



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO PROTECTOR DEL DIALIL SULFURO  
SOBRE LA NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR  
GENTAMICINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ALEJANDRA CLEMENCIA CERÓN TOALÁ



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

2002



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.

Jurado asignado:

Prof. IRMA OFELIA BERNAL LUGO

Prof. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

Prof. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

Prof. GLORIA VENEGAS GUTIERREZ

Prof. MA. TERESA DE LOURDES FLORES CAMACHO

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Bioquímica Clínica, Departamento de Biología, Edificio B.  
Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

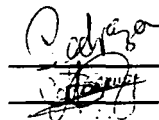
Este trabajo de investigación recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (Proyecto No. 34920 M).

Asesor:

Dr. José Pedraza Chaverri

Sustentante:

Alejandra Clemencia Cerón Toalá





*A mis padres*

*Heribertha Toalá y Roberto Cerón, que me han regalado su tiempo, su amor, su comprensión, su apoyo y sobre todo su paciencia para heredarme una formación académica y personal.*

*A mi hermano*

*Roberto J. Cerón, por ser único en su especie y tener un corazón de oro.*

---

*Una familia feliz no es sino un paraíso anticipado.*

*- John Bowling*

# *Agradecimientos*

---

Muchas personas han influido en la elaboración de ésta tesis que sería imposible mencionarlas a todas, pero quiero dar especialmente las gracias:

A DIOS, por acompañarme en todos los momentos de mi vida, por darme las fuerzas y la capacidad de culminar una etapa más en mi vida y por darme el mejor regalo en la vida: MIS PADRES Y MI HERMANO.

A los compañeros del laboratorio 209 por la ayuda que me brindaron durante mi estancia, en especial a Omar Medina, Irasema Chirino, Diana Barrera, Perla Maldonado y al Dr. José Pedraza por su paciencia en la elaboración de ésta tesis.

A todos los profesores que a lo largo de mis estudios encausaron mi obra y me brindaron sus conocimientos.

A las ratas que han dado su vida por la ciencia.

---

*Nunca consideres el estudio como un deber, sino como una oportunidad para penetrar en el maravilloso mundo del saber.*

*- Albert Einstein*

## *Agradecimientos*

---

A Abel Gutiérrez, Marco Antonio Ortiz, Mauro Cruz, Mónica Espino, Andrea Ortega, Sandra Galicia, Alejandra Delgado, Lupita Barrera, Nancy Cuenca, Angélica Reyes, Laura Muñóz, Francesca Janiello, Andrea Dannibal, Gavin Clarke y Frederick Bulsara, que me han dado parte de su tiempo, su amistad incondicional y sabios consejos.

A mis compañeros del ruso, en especial a mi maestra Sonya Marmujtova, Silvia Barrón, Silvia Elizabeth, Karla Bonilla y Eva.

*Большой спасибо !!*

A mi hermanita Marlén Müller, por su tiempo, por sus valiosas correcciones ortográficas y porque a pesar de la distancia está siempre conmigo.

*Los verdaderos amigos son como las estrellas, aunque nunca las ves siempre están allí.*

Al profesor Alexandro Bonifaz, por su hongo cariño.

A Julio César Carrero, por su insuperable ayuda.

Al rincón secretarial: Violeta, Verónica, Yebel, Rocio y Jessica.

---

*Un hermano es un amigo que nos da la naturaleza y un amigo es un hermano que nos da la sociedad.*

*- Anónimo*

# ÍNDICE

Página

- i. Resumen
- ii. Abreviaturas

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	01
1. <b>Gentamicina</b> .....	01
1.1 Mecanismo de acción.....	01
1.2 Usos y aplicaciones terapéuticas.....	02
1.3 Farmacocinética.....	02
1.4 Limitaciones en el uso de la gentamicina .....	02
2. <b>La gentamicina y el daño renal</b> .....	03
2.1 Asociación del daño renal por gentamicina con la generación de especies reactivas de oxígeno.....	05
3. <b>Especies reactivas de oxígeno</b> .....	06
3.1 Anión superóxido.....	08
3.2 Peróxido de hidrógeno .....	09
3.3 Radical hidroxilo.....	10
4. <b>Óxido nítrico</b> .....	11
5. <b>Mecanismos antioxidantes</b> .....	13
5.1 Enzimas antioxidantes naturales.....	14
5.1.1 Superóxido dismutasa .....	14
5.1.2 Catalasa.....	15
5.1.3 Glutatión peroxidasa.....	16
6. <b>El ajo (<i>Allium sativum</i>)</b> .....	17
6.1 Dialil sulfuro .....	18
<b>II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b> .....	21
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b> .....	23
1. <b>Objetivos particulares</b> .....	23
<b>V. METODOLOGÍA</b> .....	24
1. <b>Reactivos</b> .....	24
2. <b>Animales</b> .....	24
3. <b>Tratamiento de los animales</b> .....	25
4. <b>Determinaciones</b> .....	26
4.1 Actividad de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa en orina.....	26
4.2 Excreción de proteínas totales en orina.....	27
4.3 Creatinina en suero.....	28
4.4 Glutatión peroxidasa plasmática (p1GPx).....	29
4.5 Nitrógeno de urea en sangre.....	30

4.6	Proteínas oxidadas.....	30
4.7	Catalasa.....	31
4.8	Superóxido dismutasa (SOD total y Mn-SOD).....	32
4.9	Efecto de DAS sobre la producción del anión superóxido.....	32
4.10	Histología.....	33
4.11	Inmunohistoquímica.....	34
5.	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>34</b>
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
1.	<b>Peso corporal.....</b>	<b>35</b>
2.	<b>Volumen urinario.....</b>	<b>35</b>
3.	<b>Parámetros de daño tubular.....</b>	<b>36</b>
3.1	Actividad de la NAG en orina.....	36
3.2	Excreción de proteínas totales en orina.....	36
3.3	Actividad de la GPx plasmática.....	37
4.	<b>Parámetros de daño glomerular.....</b>	<b>37</b>
4.1	Nitrógeno de urea en sangre.....	37
4.2	Creatinina en suero.....	38
5.	<b>Proteínas oxidadas.....</b>	<b>38</b>
6.	<b>Actividad de las enzimas antioxidantes en corteza renal.....</b>	<b>39</b>
6.1	Actividad de CAT.....	39
6.2	Actividad de GPx citosólica.....	39
6.3	Actividad de SOD total.....	40
6.4	Actividad de Mn-SOD.....	41
6.5	Actividad de Cu-Zn-SOD.....	41
7.	<b>Histología.....</b>	<b>42</b>
8.	<b>Inmunohistoquímica.....</b>	<b>43</b>
9.	<b>Efecto del DAS sobre la generación de anión superóxido.....</b>	<b>44</b>
9.1	Ensayo utilizando NBT como aceptor de electrones.....	44
9.2	Ensayo utilizando citocromo c como aceptor de electrones.....	45
9.3	Ensayo no enzimático.....	45
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>IX.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>53</b>



---

## i. RESUMEN

**Antecedentes:** La gentamicina (GM) es un antibiótico que pertenece a la familia de los aminoglucósidos de gran especificidad frente a bacterias gram negativas y que es muy usado para el tratamiento de infecciones de los tractos urinario y respiratorio, así como de la piel y tejidos blandos. Sin embargo, la nefrotoxicidad es el efecto colateral más frecuentemente asociado a la administración sistémica de este antibiótico. Se ha estimado que aproximadamente el 20% de los pacientes tratados con GM, muestran señales de insuficiencia renal aguda después de 7 días, lo cual limita el uso de este antibiótico en la práctica clínica.

**Planteamiento del problema:** Debido al amplio uso que se le da a la GM debido a su costo relativamente bajo, a su rápida acción bactericida, a su amplio espectro de actividad, a su estabilidad química y a que casi no genera resistencia, se pretende encontrar una forma de proteger al riñón de los efectos colaterales dañinos y así aumentar su utilidad clínica. El mecanismo por el cual este aminoglucósido genera daño al riñón aún es incierto, sin embargo se ha propuesto que las especies reactivas del oxígeno juegan un papel muy importante para generar el daño. Se ha demostrado ya, en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio que una dieta enriquecida al 2% con polvo de ajo protege al riñón contra este efecto adverso, sin embargo se pretende conocer cual es el principio activo del ajo responsable de la protección observada. Por lo tanto en el presente estudio se evaluará el efecto que tiene el dialil sulfuro, un metabolito de la alicina que se encuentra en el organismo después del consumo de ajo y que además es uno de los componentes del aceite de ajo, sobre el daño renal que induce la GM.

**Objetivo:** Evaluar el efecto que ejerce el dialil sulfuro sobre la nefrotoxicidad inducida por gentamicina para conocer si es el responsable total o parcial de la protección que ofrece una dieta enriquecida al 2% con polvo de ajo reportada previamente.

**Metodología:** Se utilizaron 35 ratas macho de la cepa Wistar de peso aproximado de 230-250 g, divididos en 4 grupos según el tratamiento que recibieron: Control

(CT), Gentamicina (GM), Dialil sulfuro (DAS) y Dialil sulfuro más gentamicina (DAS+GM). La GM se administró en una dosis de 125 mg/kg vía subcutánea y el dialil sulfuro se administró en dosis de 50 mg/kg vía intragástrica, ambas dosis se dieron cada 24 h por 4 días. Los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas durante todo el tratamiento, el cual se suspendió un día y se sacrificaron al siguiente día por decapitación para la recolección de la sangre y así obtener el suero para su posterior uso. Los animales se mantuvieron en cajas metabólicas para recolectar la orina de 24 h del día 5 para el 6 de tratamiento. En la orina se determinaron creatinina y parámetros para evaluar el daño tubular: actividad de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y proteinuria. En el suero sanguíneo se determinaron parámetros para evaluar el daño glomerular: creatinina y nitrógeno de urea, así como para determinar la actividad de la GPx (marcador de daño tubular). Se extrajeron los dos riñones de cada animal para determinar en la corteza renal la actividad de las enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa citosólica y superóxido dismutasa así como sus isoformas Mn-SOD y Cu-Zn-SOD) y realizar la cuantificación de proteínas oxidadas como marcador de estrés oxidativo. En la corteza renal también se realizaron estudios histológicos y de inmunohistoquímica.

### **Resultados:**

*Parámetros que evalúan la función tubular:* La administración de GM indujo un aumento en la actividad de la enzima N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAG) y en la excreción de proteínas totales en orina así como una disminución de la actividad de GPx plasmática. Sin embargo, el tratamiento simultáneo con DAS a las ratas tratadas con GM evitó de forma total el aumento en la actividad de la NAG, y sólo de forma parcial el de la proteinuria, pero no la disminución de la actividad de GPx plasmática.

*Parámetros que evalúan la función glomerular:* El tratamiento con GM indujo un aumento en la concentración de creatinina y de nitrógeno de urea en suero, la cual se evitó de forma parcial al administrar DAS a ratas tratadas con GM.

*Histología:* La administración de GM provocó un elevado daño estructural en la corteza renal ya que se observó necrosis y licuefacción casi total de las células epiteliales del túbulo proximal, sin embargo los cortes renales de ratas a las que

se les administró DAS en paralelo con GM mostraron una notable mejoría observándose solamente una ligera necrosis tubular.

*Marcadores de estrés oxidativo:* El tratamiento con GM provocó un aumento en la formación de residuos de nitrotirosina, como lo reveló la inmunohistoquímica y en la concentración de proteínas oxidadas; este aumento se evitó en forma parcial con la administración de DAS a ratas tratadas con GM.

*Actividad de las enzimas antioxidantes en corteza renal:* La administración de GM disminuyó significativamente la actividad de CAT, SOD total y de la isoforma Mn-SOD y ligeramente, sin ser significativa, de la GPx. El tratamiento con DAS a ratas tratadas con GM no previno la disminución de la actividad de CAT, SOD total y Mn-SOD, pero sí aumentó significativamente la actividad de la GPx. Sin embargo, el DAS provocó *per se* una disminución en la actividad de las enzimas CAT y Mn-SOD. La actividad de la isoforma Cu-Zn-SOD no se afectó en ninguno de los tratamientos.

*Efecto de DAS sobre la producción de  $O_2^{\cdot-}$  in vitro:* La adición de DAS en el ensayo enzimático utilizando NBT como aceptor de electrones provocó una disminución en la formación del ácido úrico y en consecuencia de la producción del  $O_2^{\cdot-}$ . En el caso del ensayo enzimático utilizando citocromo c como aceptor de electrones y del ensayo no enzimático se observó un aumento en la producción de ácido úrico y del  $O_2^{\cdot-}$ .

**Conclusión:** La administración de DAS a ratas tratadas con GM resultó en una protección parcial de los efectos nefrotóxicos inducidos por el fármaco debido a su posible acción antioxidante. Los hallazgos encontrados del efecto de DAS sobre la producción de anión superóxido demostraron que este compuesto no es un atrapador efectivo de esta ERO.

## ii. ABREVIATURAS

ATP	Adenosintrifosfato
BUN	Nitrógeno de urea en sangre
CAT	Catalasa
cGPx	Glutación peroxidasa citosólica
CT	Grupo control
Cu-Zn-SOD	Superóxido dismutasa que contiene cobre y zinc
DAS	Dialilsulfuro y/o grupo tratado con dialilsulfuro
DAS+GM	Grupo tratado con dialilsulfuro y gentamicina
DADS	Dialildisulfuro
DATS	Dialiltrisulfuro
DFO	Deferoxamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTU	Dimetiltiurea
EC-SOD	Superóxido dismutasa extracelular
EROs	Especies reactivas del oxígeno
gl-GPx	Glutación peroxidasa gastrointestinal
GM	Gentamicina y/o grupo tratado con gentamicina
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSH	Glutación oxidado
GSH-Rx	Glutación reductasa
GST	Glutación S-transferasa
HOCl	Ácido hipocloroso
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HOO <sup>·</sup>	Radical perhidroxilo
H&E	Hematoxilina y eosina
Kf	Coefficiente de ultrafiltración capilar glomerular
Mn-SOD	Superóxido dismutasa que contiene manganeso
MROs	Metabolitos reactivos del oxígeno
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NAG	N-acetil-β-D-glucosaminidasa
NBT	Nitroazul de tetrazolio
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Anión superóxido
OH <sup>·</sup>	Radical hidroxilo
PAF	Factor activador de plaquetas
PH-GPx	Glutación peroxidasa de fosfolípidos
plGPx	Glutación peroxidasa plasmática
RO <sup>·</sup>	Radical alcoxilo
ROO <sup>·</sup>	Radical peroxilo
SAC	S-alilcisteína
SAMC	S-Alilmercaptocisteína
SOD	Superóxido dismutasa

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Gentamicina (GM)

Es un antibiótico natural de amplio espectro producido por la fermentación del actinomiceto *Micromonospora purpurea*. Pertenece al grupo de los aminoglucósidos de estructura heterocíclica formado por dos aminoazúcares - la purpurosamina y garosamina - unidos por enlaces glucosídicos a un anillo de aminociclitol. Las variaciones en la metilación de la purpurosamina genera a los diferentes componentes de la subfamilia de la GM, que incluye las gentamicinas C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>1a</sub>; dichas modificaciones al parecer tienen poco efecto en la actividad biológica (1, 2).

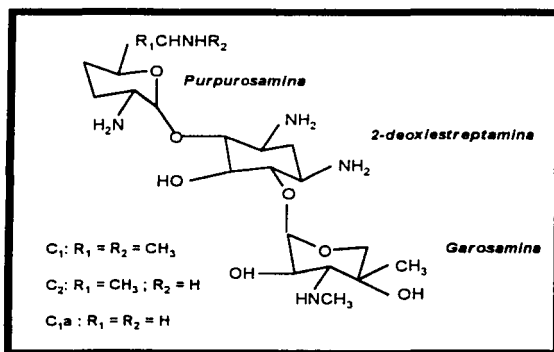


Fig 1. Estructura química de la gentamicina

### 1.1 Mecanismo de acción

Su acción bactericida se debe a que penetra a través de la membrana celular, se fija a la subunidad ribosómica bacteriana 30S e interfiere en la iniciación de la síntesis de proteínas y con la lectura del código genético del ARNm, causando así la muerte de la bacteria (3, 4).

## 1.2 Usos y aplicaciones terapéuticas

Se utiliza en la terapéutica de infecciones microbianas graves generadas por gram negativos como las causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Providencia*, así como en infecciones por gram positivos como *Neisseria gonorrhoeae* y *Staphylococcus*. En general se emplea en el tratamiento de infecciones del riñón y aparato genitourinario, vías respiratorias (neumonía), sistema nervioso central (meningitis), gastrointestinales, pélvicas, peritonitis, osteomielitis, otitis, bacteriemia, heridas y quemaduras infectadas (1, 5).

## 1.3 Farmacocinética

La GM se administra por vía parenteral o tópica ya que su absorción por el intestino es escasa debido a que es una molécula policatiónica fuertemente polar. Cuando se aplica por vía intramuscular se absorbe con rapidez y su vida media en plasma es corta: 1 a 4 h en humanos y de 30 min en animales pequeños de laboratorio (6). La unión de GM a proteínas plasmáticas es baja y su concentración en secreciones y tejidos es pequeña. Sin embargo, la GM se acumula en el riñón ya que una parte se reabsorbe en los túbulos proximales y su tiempo de vida media en la corteza renal es amplio, como en la rata en la cual excede las 100 h (7, 8). También se detectan cifras altas en la endolinfa y perilinfa del oído interno. La GM se excreta casi por completo mediante filtración glomerular eliminándose en la orina sin cambios, con una recuperación hasta del 80% del fármaco después de 24 h de haber sido administrado (1, 5, 7).

## 1.4 Limitaciones en el uso de la gentamicina

A pesar de que la GM es el aminoglucósido de primera elección por ser un antibiótico de amplio espectro, de bajo costo y de tener una actividad fiable contra casi todos los aerobios gram negativos (1), su uso clínico está limitado debido a que se han descrito fuertes efectos nefrotóxicos y ototóxicos (8-10). Las complicaciones que se atribuyen a la toxicidad debida a aminoglucósidos, se considera como una de las razones más comunes para prolongar la estancia de

pacientes en los hospitales en el mundo desarrollado con grandes pérdidas económicas (11). Los efectos nefrotóxicos son los más comunes y se desarrollan después de periodos relativamente cortos de tratamiento (12, 13). Algunas de las características fisicoquímicas y farmacocinéticas de éste compuesto que contribuyen definitivamente a la manifestación del daño renal son: un rápido transporte, una gran acumulación y una ávida retención durante periodos prolongados (2). Se sabe que 8-26% de los individuos que reciben tratamiento con éste antibiótico durante varios días muestran trastorno renal, el cual es reversible si se descontinúa su uso (14-16). El nivel de daño es proporcional a la duración del tratamiento, pudiendo incrementarse hasta en un 50% en el caso de terapias prolongadas (17) como resultado de la acumulación y retención ávida del fármaco en las células tubulares proximales (18-20).

## ***2. La gentamicina y el daño renal***

La nefrotoxicidad por GM representa del 10 al 15% de todos los casos de insuficiencia renal aguda (21), que es la disminución abrupta de la filtración glomerular. Las primeras etapas de daño renal tras la administración de la gentamicina se caracterizan por un aumento de la excreción urinaria de varias enzimas tubulares (alanina aminopeptidasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y fosfatasa alcalina), proteinuria e incremento en la excreción de  $\beta$ -2-microglobulina. Más tarde aparecen modificaciones en el sedimento urinario (leucocituria y cilindruria) y finalmente, como resultado de la disminución de la filtración glomerular, un aumento del nitrógeno de urea en sangre (BUN) y de la creatinina plasmática (2, 22).

El mecanismo preciso por el cual se produce la nefrotoxicidad inducida por GM aún es incierto (4, 23); incluso algunos sugieren que podrían ser varios los responsables del efecto tóxico. Se ha sugerido que la nefrotoxicidad está principalmente relacionada a una acumulación preferencial del fármaco en los túbulos proximales del riñón (24) lo cual causa un daño que es seguido por un deterioro de la función renal que se manifiesta por una azoemia (25). Se han propuesto varias hipótesis para explicar esta patogénesis sobre las células de los

túbulos proximales tales como el daño a la estructura y función de las membranas lisosomal (26), mitocondrial (27) y plasmática (28).

Las células de los túbulos proximales de la corteza del riñón poseen un mecanismo de transporte particular y pueden concentrar al fármaco hasta niveles 5-50 veces más elevados a los que se encuentran en plasma (21, 29). La GM no es metabolizada y se excreta sin cambios por los riñones. Sufre una libre filtración por los glomérulos pero una pequeña porción toxicológicamente importante de la gentamicina total filtrada, es reabsorbida por las células de los túbulos proximales (30). El transporte se realiza principalmente a través del borde en cepillo luminal de las células de los túbulos renales, e incluyen la unión inicial del aminoglucósido (con carga positiva) al fosfatidilinositol (con carga negativa) dentro de la membrana (29, 31-33). Se considera que la internalización se realiza por pinocitosis, formándose vesículas que luego se fusionan con lisosomas, cuyo interior cargado negativamente atrapa de forma efectiva la gentamicina (30, 34). Morfológicamente causan una acumulación de estructuras multilamelares dentro de los lisosomas, que se llaman cuerpos mieloides (34-36).

Algunos autores señalan que la nefrotoxicidad por gentamicina se produce fundamentalmente por una fosfolipidosis provocada por una inhibición de enzimas responsables del metabolismo de los lípidos (fosfolipasas lisosomales A1, A2 y C1) (37-39), habiéndose asociado también con una pérdida de la actividad de la esfingomielinasa. (40, 41). Finalmente la fosfolipidosis conllevaría a la destrucción del organelo y subsecuentemente a la necrosis celular. De igual forma, la inhibición de la fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol citosólico (42) y responsable de la biosíntesis de prostaglandinas y prostaciclina vasodilatadoras, conllevaría a una vasoconstricción arteriolar y a una disminución en la filtración glomerular (43).

En contraste con lo expuesto anteriormente, se ha descrito que la administración de aminoglucósidos puede activar a la fosfolipasa A2 (44), catalizando a partir de los fosfolípidos de membrana la formación de ácido araquidónico y factor activador de plaquetas (PAF). El ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa daría lugar a la síntesis de tromboxanos y prostaglandinas, mediadores



vasoconstrictores. Papanikolau et al. (45) y Assael et al. (46) sugirieron que el incremento en tromboxanos y prostaglandinas podría jugar un papel en la generación de la insuficiencia renal aguda producida por los aminoglucósidos. En este sentido, diversos estudios mostraron en ratas tratadas con gentamicina (47, 48) administrada por vía parenteral (49-51) un aumento en la producción de PAF, el cual produce una disminución en la tasa de filtración glomerular.

Otra enzima afectada por la administración de gentamicina es la Na-K-adenosinatrifosfato (Na-K-ATPasa), cuya actividad disminuye en homogenados corticales de ratas tratadas crónicamente con éste fármaco (52-54). La pérdida de integridad de la Na-K-ATPasa se ha señalado como responsable del efecto nefrotóxico (55) ya que esta enzima regula el transporte de electrolitos intracelulares y el volumen celular. A nivel glomerular, se produce un descenso en la tasa de filtración glomerular (VFG), del flujo plasmático renal y del coeficiente de ultrafiltración (Kf), e incrementa la resistencia glomerular aferente y eferente (56). A nivel mitocondrial disminuye la generación de ATP, lo que altera funciones de transporte celular dependientes del mismo, producción de energía y respiración celular. Así, se ha evidenciado necrosis celular tras la depleción de ATP en modelos experimentales de nefrotoxicidad (57). Interesantemente, en este organelo, rico en hierro hémico y no hémico, se potencia la producción de radicales libres en presencia de gentamicina (58, 59).

### *2.1 Asociación del daño renal por gentamicina con la generación de especies reactivas de oxígeno*

La formación de especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es otro de los mecanismos que se han relacionado con la nefrotoxicidad de estos compuestos (60, 61). Los radicales libres formados pueden generar moléculas muy inestables que reaccionan químicamente con macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, produciendo daño celular por modificaciones covalentes (62). Las evidencias *in vitro* indican que la GM aumenta la generación del anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo en las mitocondrias de la corteza renal

(58, 63) así como la liberación de hierro, que, en combinación con el antibiótico promueve la lipoperoxidación y generación de radicales libres (64). En este sentido, la suplementación de hierro (Fe) en la dieta o la administración del mismo vía intramuscular, agrava la nefrotoxicidad por éste antibiótico (65, 66). Además de la observación previa, este mecanismo está indirectamente fundamentado *in vivo* por el hecho de que algunos atrapadores de OH<sup>•</sup> como dimetiltiourea (DMTU), dimetilsulfóxido (DMSO) o benzoato de sodio, antioxidantes como la vitamina E y el selenio y quelantes de hierro como la deferoxamina (DFO) disminuyen la nefrotoxicidad (67-69) inducida por GM en ratas. El mismo efecto se ha observado para los atrapadores de radicales libres sobre la ototoxicidad (67, 70). Se ha sugerido que la GM por si misma puede ser activada *in vitro* a especies citotóxicas (71), en una reacción que es inhibida por dichos atrapadores de radicales libres (72).

Otros trabajos que apoyan el papel de los radicales libres en la nefrotoxicidad son los realizados con la enzima superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión reducido (GSH) (73-77). Se ha evidenciado que la actividad de esta enzima y la cantidad de GSH, claves en el proceso fisiológico de eliminación de radicales libres, están disminuidos en los tratamientos con GM, lo cual justificaría que el incremento en la producción de radicales libres contribuyera a los efectos tóxicos renales. El efecto de GM sobre SOD es respaldado por el hecho de que la administración de la enzima protege notoriamente contra el daño sobre la función renal (77).

### **3. Especies reactivas de oxígeno (EROs)**

Un radical libre es cualquier especie capaz de existir de forma independiente y que posee uno o más electrones desapareados. Dado que en la mayoría de los ambientes químicos hay muchos electrones disponibles, los radicales son altamente reactivos. Los términos radicales libres de oxígeno, especies reactivas de oxígeno (EROs), metabolitos reactivos del oxígeno (MROs) y especies excitadas del oxígeno se han usado indistintamente. Las principales EROs se pueden clasificar en dos grupos: 1) Radicales con un electrón del oxígeno

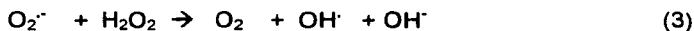
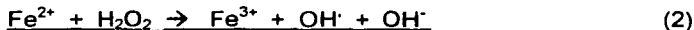
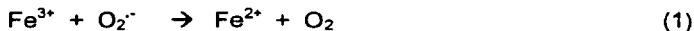
desapareado (como  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{HO}_2^\cdot$ ,  $\text{RO}^\cdot$  Y  $\text{ROO}^\cdot$  ) y 2) Oxígeno molecular que contiene productos como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ROOR}$ ,  $\text{ROOH}$ , singulete de oxígeno, epóxidos y endoperóxidos. El término EROs incluye tanto a las especies de oxígeno molecular como a los radicales libres de oxígeno (78).

Las principales EROs son:

RADICALES:	DE OXIGENO MOLECULAR:
$\text{O}_2^{\cdot-}$ Anión superóxido y su ácido conjugado $\text{HO}_2^\cdot$	$\text{H}_2\text{O}_2$ Peróxido de hidrógeno
$\text{OH}^\cdot$ Radical hidroxilo	$\text{HOCl}$ Ácido hipocloroso
$\text{ROO}^\cdot$ Radical peroxilo	$\text{O}_3$ Ozono
$\text{RO}^\cdot$ Radical alcoxilo	$^1\text{O}_2$ Singulete de oxígeno
$\text{HOO}^\cdot$ Radical perhidroxilo	

El oxígeno es absolutamente necesario para la vida aeróbica pero también es tóxico bajo ciertas condiciones. Químicamente el oxígeno existe como un triplete en su estado de energía más bajo, por lo tanto reacciona más rápidamente con otras moléculas que se encuentran también como tripletes o con los radicales libres que con las que se encuentran como singuletes. Normalmente acepta cuatro electrones y se convierte directamente a agua; sin embargo, la reducción parcial del oxígeno puede y ocurre en los sistemas biológicos. Así, la reducción secuencial del oxígeno a lo largo de una vía univalente durante el metabolismo normal conduce a la generación del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (79, 80).

Sin embargo, la producción excesiva de ellos y en particular del  $\text{OH}^\cdot$  pueden resultar en daño tisular en presencia de los iones catalíticos hierro (Fe) y cobre (Cu) (21, 23) en una reacción que comúnmente se conoce como la reacción catalizada por metales de Haber-Weiss/ Fenton (81):



La mayoría de estas rutas metabólicas representan aberturas en el flujo normalmente regulado de electrones dentro de las células que permiten a los electrones alcanzar el oxígeno molecular fuera de la cadena altamente ordenada de transporte de electrones dentro de las mitocondrias. En la mayoría de los casos, el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial es muy eficiente; sin embargo, es frecuente la pérdida de electrones en sitios de la cadena donde participa la coenzima Q, ubiquinona y sus complejos mitocondriales enzimáticos que contribuyen a la mayor parte de la producción de las EROs celulares. Otros sitios y sistemas de producción de EROs incluyen el retículo endoplásmico, la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la NO sintasa, la citocromo P-450 reductasa y el ciclo redox de xenobióticos.

El daño oxidativo inducido por las EROs afecta a las clases mayores de biomoléculas: ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. En términos generales, en los ácidos nucleicos producen modificaciones en las bases y ruptura de las hebras que pueden conllevar a mutaciones en las nuevas hebras transcritas. En cuanto a las proteínas las EROs producen cambios en su estructura, estabilidad y función, alterando por ejemplo el estado de reducción de enzimas que las lleva a la activación o inhibición, induciendo la unión cruzada de las proteínas de membrana oxidadas, alterando la vía de transducción de señales hacia el núcleo o inhibiendo a factores de transcripción nuclear. Por su parte la lipoperoxidación puede causar daño en el ADN e inhibir directamente a enzimas tales como la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y transportadores de glutamato. A su vez puede haber cambios en la permeabilidad de las células alterando las interacciones lípido-proteínas.

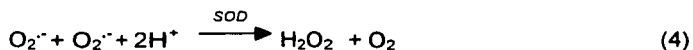
### 3.1 Anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ )

Es la primera especie reactiva formada durante la reducción univalente del oxígeno. Se forma cuando el oxígeno captura un electrón. Las fuentes de esta ERO en los organismos vivos son:

<b>FUENTES ENDÓGENAS</b>	<b>CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN LA MITOCONDRIA, CLOROPLASTOS Y RETÍCULO ENDOPLÁSMICO.</b>
	Enzimas oxidantes: Xantina oxidasa, galactosa oxidasa, monoamina oxidasa, triptofano oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxidasa. Células fagocíticas: neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, células endoteliales.
<b>FUENTES EXÓGENAS</b>	Autooxidación de catecolaminas, ión ferroso, tioles, hemoglobina.
	Oxidación de compuestos redox: paraquat, antraciclinas, aloxano.
	Oxidación metabólica de paracetamol, tetracloruro de carbono, etc.
	Irradiación con radiación ionizante, luz UV. Quemaduras y otros traumas.

(82)

El anión superóxido actúa casi exclusivamente como un agente reductor, entra a la célula a través de los canales como un anión y sufre una reacción de dismutación *in vivo* solamente con la ayuda de la enzima superóxido dismutasa (SOD):

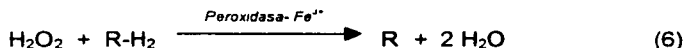
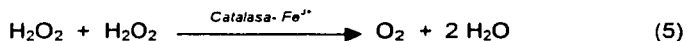


El  $\text{O}_2^{\cdot -}$  reduce el nitroazul de tetrazolio de color amarillo ( $\text{NBT}^{2+}$ ) para producir un producto azul llamado formazán. La habilidad que tiene para reducir al citocromo c y al  $\text{NBT}^{2+}$  se usa en ensayos para medir la actividad de SOD (83).

### 3.2 Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

La adición de un segundo electrón al  $\text{O}_2^{\cdot -}$  produce el ión peróxido ( $\text{O}_2^{2-}$ ), el cual no es un radical libre pero que bajo condiciones que existen *in vivo* produce  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se forma en las reacciones catalizadas por la coenzima flavina, en la oxidación de las quinonas y compuestos que contienen grupo sulfhidrilo, y en la actividad de SOD. Sin embargo, la fuente más importante de su formación en las células es la cadena de transporte de electrones mitocondrial. El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , atraviesa la membrana celular pues se mezcla fácilmente con el agua, siendo tóxico en concentraciones de 10-100  $\mu\text{M}$  (82, 83). Es un oxidante débil y generalmente poco

reactivo. Una vez dentro de la célula probablemente reacciona con los iones hierro y posiblemente con el ión cobre para formar especies mucho más dañinas como el  $\text{OH}^\cdot$  (83). Puede degradar ciertas hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina y citocromo c) para liberar iones de hierro (84). Su descomposición involucra una variante de la reacción de Fenton y enzimas que contienen hierro como la catalasa (CAT) y las peroxidasas que actúan de la siguiente forma:



A diferencia de la reacción de Haber-Weiss/Fenton, estas reacciones son benéficas pues catabolizan al  $\text{H}_2\text{O}_2$  produciendo oxígeno y un metabolito (R).

### 3.3 Radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ )

Junto con el singulete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ ), son las especies de oxígeno reactivas más poderosas. *In vivo* se produce según la reacción 2, 3 y la reacción entre el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y una sal de cobre:



Este reacciona rápidamente con cualquier compuesto orgánico (RH) tales como ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y proteínas:



donde  $\text{R}^\cdot$  es un radical libre o un compuesto estructuralmente modificado.

Es posible que la gran capacidad para causar daño de esta ERO se deba a la formación de estos compuestos modificados, los cuales son ya incapaces de mantener sus funciones normales. Aún si su acción es directa o indirecta, su formación cerca de moléculas biológicas críticas como el ADN o enzimas regulatorias parece tener un efecto oxidante. Debido a su alta reactividad y a la

ausencia de un sistema antioxidante efectivo en contra de él, los organismos vivos usan como estrategia de defensa la eliminación de sus precursores como son el  $O_2^{\cdot -}$  y el  $H_2O_2$  (82).

#### 4. Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico, es una molécula de señalización que se genera en las células del endotelio vascular a partir de la oxidación de la L-arginina a citrulina. La reacción es catalizada por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS) y requiere de  $O_2$  y NADPH:



El NO a pesar de que es un radical libre gaseoso de vida corta es relativamente benigno, pues es un metabolito multifuncional que puede: actuar como segundo mensajero, neurotransmisor, vasodilatador, regular el tono vascular y el transporte de iones en el riñón, contribuir a la inmunosupresión y servir como una molécula de defensa (82). Sin embargo, en un ambiente de estrés oxidativo, la formación del NO puede conducir a la generación de especies reactivas de nitrógeno las cuales son dañinas a las células (Fig. 2).

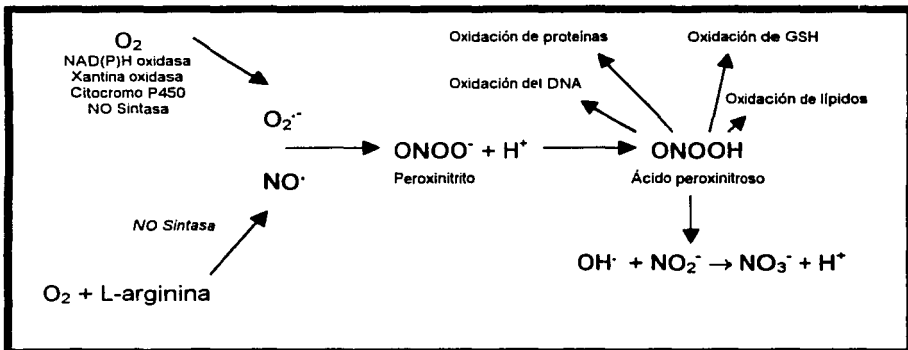


Fig 2. Formación de las especies reactivas de nitrógeno

En presencia del  $O_2^-$ , el NO reacciona rápidamente con él en una reacción mediada por la xantina oxidasa y dependiente de hierro para generar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). En su forma aniónica ( $ONOO^-$ ) es relativamente estable, pero es en su forma protonada ( $ONOOH$ ) cuando exhibe una actividad similar a la del  $OH^-$  y es cuando puede llevar a cabo reacciones de oxidación. La reacción del peroxinitrito con las proteínas conduce a la nitración de los residuos de tirosina, a la formación de enlaces cruzados de tirosina-tirosina y a la oxidación de residuos triptofano, metionina y cisteína.

El peroxinitrito participa como oxidante en el daño renal agudo tóxico pues la nitración de proteínas que ocurre, daña la función celular al interferir con la integridad estructural y funcional de varias proteínas.

A diferencia de las células del endotelio, donde el NO se produce por una isoforma constitutiva de la óxido nítrico sintasa (cNOS), las células del túbulo renal normalmente no producen NO, sin embargo pueden expresar una forma inducible de la enzima (iNOS) debido a un daño isquémico y/o tóxico que da por resultado una sobreproducción de NO, la cual juega un papel importante en varios modelos de insuficiencia renal aguda. Este se genera normalmente en el riñón, sin embargo su producción excesiva afecta los procesos de filtración, absorción y excreción. Los atrapadores de radicales hidroxilo, al igual que los atrapadores de peroxinitritos, son preventivos en varios modelos de insuficiencia renal aguda. Además la deferoxamina, un quelante de hierro, es también un atrapador efectivo de peroxinitrito.

La mitocondria es capaz de sintetizar NO, sin embargo el daño oxidativo que éste puede causar es un factor importante sobre la insuficiencia renal aguda inducida por GM, donde la disponibilidad de hierro proveniente de la mitocondria juega un papel esencial. En presencia del  $O_2^-$ , tanto el NO como el  $ONOO^-$  inhiben la función mitocondrial y estos podrían aumentar o aún mediar la disfunción mitocondrial inducida por gentamicina.

La activación de la guanilato ciclasa soluble para generar cGMP es la principal vía por la cual el NO regula el tono vascular y el transporte de iones en el riñón. En este sentido, se han observado altos niveles de cGMP en glomérulos aislados de



ratas tratadas con GM lo cual sugiere que la producción de NO es alta. El efecto de la GM sobre la producción del NO en los túbulos renales no se conoce aún. La inhibición no selectiva de la NOS con *N*<sup>6</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) empeora la nefrotoxicidad inducida por GM. Sin embargo, el concluir que la producción endógena de NO es protectora en este modelo sería prematuro ya que L-NAME aumenta la presión sanguínea y puede afectar a la velocidad de filtración glomerular. Los inhibidores selectivos de la iNOS aún no han sido examinados en este modelo (21).

### 5. Mecanismos antioxidantes

Los organismos aerobios poseen sistemas de defensa antioxidantes que reaccionan con las EROs producidas como consecuencia de la respiración aerobia y la oxidación de sustratos. Los antioxidantes son sustancias que detienen o previenen significativamente la oxidación de un sustrato oxidable porque atrapan rápidamente a los radicales libres y a las EROs o bien porque previenen su formación. Se clasifican según su naturaleza en:

Antioxidantes	No enzimáticos	Naturales: vitamina C, E, GSH, etc
	Enzimáticos	Catalasa Glutación peroxidasa Superóxido dismutasa

Compuestos con otros papeles biológicos principales como la albúmina, glucosa, carnosina, taurina, ácido úrico, estrógenos, carotenos, creatinina, vitamina A, ácido dihidrolipoico, poliaminas y fibrinógeno también pueden funcionar como antioxidantes. Hay un balance entre las actividades y los niveles intracelulares de estos antioxidantes que es esencial para la supervivencia de los organismos y su salud (82). El papel de los antioxidantes es el de proteger moléculas esenciales de la célula como el ADN, así como organitos, membranas y otras estructuras celulares.

## 5.1 Enzimas antioxidantes naturales

### 5.1.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Metaloenzima capaz de catalizar la transferencia de un electrón entre dos moléculas de  $O_2^{\cdot -}$  para producir  $O_2$  y  $H_2O_2$  (reacción 4). Es pH independiente, tiene alta afinidad por su sustrato y el 98% de la actividad de esta enzima en mamíferos se localiza en los eritrocitos. Su actividad en otros tejidos se reduce en enfermedades como la diabetes, artritis reumatoide y cistitis crónica, entre otras (82). En los humanos hay 3 isoformas de la SOD las cuales contienen al menos un metal de transición en el sitio activo: Cu-Zn-SOD citosólica, Mn-SOD mitocondrial y SOD extracelular (EC-SOD) (85, 86). Algunas características de estas enzimas se resumen a continuación:

Isoforma	localización	estructura	peso molecular total
EC Cu-Zn/SOD (rata)	extracelular	dímero	85 kDa
Cu-Zn/SOD	citosol	dímero	32 kDa
Mn/SOD	matriz mitocondrial	tetrámero	96 kDa

(87-89)

- *Mn-SOD*

Es un homotetrámero de 96 kDa que contiene un átomo de manganeso por subunidad en su sitio activo (90). Se sintetiza como un precursor citosólico codificado por genes nucleares que es transportado hacia la mitocondria donde se localiza principalmente en la membrana interna por un proceso dependiente de energía (91, 92). Su biosíntesis es modulada en diferentes niveles por trazas de hierro, quelantes y oxidantes.

- *Cu-Zn-SOD*

Consiste de dos subunidades idénticas de 32 kDa que tienen como sitio activo un centro de Cu-Zn unidos por un puente de residuos de histamina (93). Se cree que juega un papel importante en la primera línea de defensa antioxidante. Se localiza principalmente en el citoplasma de eucariontes, aunque también se ha encontrado en lisosomas, núcleo y en menor cantidad en peroxisomas y el espacio intermembranoso mitocondrial. Contribuye con un 0.5 a un 20% de la

actividad de la SOD total (94). El cobre es rápidamente removido *in situ* del sitio activo con una diálisis usando amortiguadores isotónicos que contengan quelantes del cobre como: catecol, trietilentetramina, tetraetilenpentamina o dietiltiocarbonato (95, 96).

- *Ec-SOD*

Glicoproteína secretora tetramérica que contiene cobre y zinc, localizada en varios fluidos extracelulares como el plasma, linfa y líquido sinovial (85, 97, 98). Posee afinidad por la heparina y por los proteoglicanos de sulfato de heparán (99) por lo que se ha sugerido que su sitio de síntesis son las células endoteliales (100). En la rata esta isoforma está constituida por dos subunidades de 85 kDa y a diferencia de la forma tetramérica, no posee afinidad por la heparina (99). No es inducida por su sustrato o por otros oxidantes y su regulación en tejidos de mamíferos ocurre principalmente de manera coordinada por las citocinas, mas que como respuesta de las células a los oxidantes (101).

### 5.1.2 *Catalasa (CAT)*

Es una hemoproteína tetramérica con un peso total de 240 kDa con cuatro ferriprotoporfirinas por molécula (102). Su vida media en la circulación es de 6 a 8 minutos y su único sustrato es el  $H_2O_2$  (103). Está presente en los peroxisomas y posee una doble función: la descomposición del  $H_2O_2$  a oxígeno y agua según la reacción 5 que se conoce como actividad catalítica, y la oxidación de donadores de protones como metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles, con el consumo de 1 mol de peróxido, que se le conoce como actividad de peroxidasa según la reacción 10 (104):

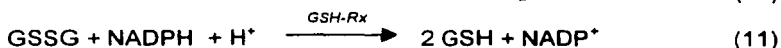


Está presente en altas concentraciones en hígado y riñón, y en bajos niveles en tejido conectivo (105). En las células, está unida principalmente a los peroxisomas (80%) y mitocondria, mientras que en los eritrocitos existe en forma soluble (102). Juega un papel importante en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células. Además de la catalasa, la glutatión

peroxidasa y la peroxidasa de leucocitos compiten por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato, razón por la cual no hay un aparente efecto dañino con la deficiencia de catalasa.

### 5.1.3 Glutatión peroxidasa (GPx)

Peroxidasa que contiene un residuo de selenio-cisteína (Sec) en cada una de sus 4 subunidades idénticas de entre 76 y 105 kDa, el cual es esencial para la actividad de la enzima (95, 106). Cataliza la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  o de otros peróxidos orgánicos a  $\text{H}_2\text{O}$  con la concomitante oxidación del glutatión reducido (GSH), según la reacción 11. En la mayoría de los casos, el glutatión oxidado (GSSG) es, a su vez, reducido a GSH por la glutatión reductasa (GSH-Rx) en presencia de NADPH formando un ciclo redox que impide que se agoten las reservas de GSH, según la reacción 12 (95, 107):



El metabolismo del glutatión es uno de los mecanismos de defensa antioxidantes más esenciales. En el humano se pueden encontrar 4 isoenzimas que a pesar de que su expresión es ubicua, los niveles de cada una varían dependiendo del tipo de tejido:

- GPx 1 o cGPx (GPx citosólica). Es una enzima tetramérica (108) de 84 kDa que se localiza en el citosol y mitocondrias de la mayoría de los tejidos. Reduce el  $\text{H}_2\text{O}_2$  de los ácidos grasos a expensas del glutatión y sólo tiene actividad antioxidante en casos de un incremento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de hidroperóxidos de lípidos. Su actividad sobre hidroperóxidos de fosfolípidos y de colesterol es muy baja.
- GPx 2 o gl-GPx (GPx gastrointestinal). Enzima tetramérica de 75 kDa que se localiza principalmente en el tracto gastrointestinal, hígado y colon de humanos. Se piensa que tiene un papel de protección contra efectos adversos en la ingesta de hidroxiperóxidos (108).

- GPx 3 o pl-GPx (GPx extracelular). Enzima presente en la circulación como un homotetrámero (109) de 100 kDa que se sintetiza en la región extracelular de células renales y pulmón. Se piensa que tiene un papel importante en la protección del riñón durante el daño oxidativo (110), sin embargo su función no ha sido bien establecida (108,111).
- GPx 4 o PHGPx (GPx de fosfolípidos). Enzima monomérica de 21 kDa que actúa como hidroxiperoxidasa de fosfolípidos. Está unida a membranas intracelulares y tiene una menor afinidad por GSH que las demás (112). Se ha informado que reduce hidroperóxidos de colesterol y al 7- $\beta$ -hidroperóxido de colesterol, uno de los compuestos más citotóxicos de las lipoproteínas estudiadas (113, 114).

El riñón contiene alrededor de un 7.5% de la concentración total de selenio encontrado en tejidos de rata y la actividad de la GPx en este órgano es de aproximadamente un 2.0% de la total (114-116).

## **6. El ajo (*Allium sativum*)**

Es una de las plantas de cultivo más antiguas procedente del Asia central. Desde hace más de 4000 años se ha empleado como condimento en las comidas y como uno de los principales ingredientes de la medicina tradicional. Por esta razón, el ajo ha sido ampliamente estudiado y se ha demostrado que posee propiedades anticancerígenas, antimicrobianas, antiparasitarias, antiartríticas, antitrombóticas, antihipertensivas, insecticidas, hipoglicémicas, hipolipidémicas y en particular hipocolesterolémicas y antioxidantes, entre otras (117-119).

La mayor parte de los compuestos activos del ajo son azufrados, siendo algunos de ellos los responsables del olor y sabor característicos de esta especie. El mayor componente del ajo, la alina, se libera cuando el parénquima es cortado y se transforma por acción de la enzima alinasa en alicina, uno de los componentes odoríferos de los homogenados (Fig. 3).

Se ha demostrado que una amplia variedad de los compuestos azufrados extraídos del ajo poseen actividad farmacológica. Esta actividad es termolábil, por lo que la eficacia de las diferentes preparaciones de ajo es controversial. Se ha

demostrado que la alina y el polvo de ajo, al igual que un extracto completo, pueden atrapar radicales  $\text{OH}^\cdot$  y proteger contra el daño oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en células endoteliales vasculares inhibiendo la lipoperoxidación (120). Igualmente, confieren protección contra el daño causado por una amplia variedad de compuestos cancerígenos y tóxicos, entre estos últimos los aminoglucósidos como la GM (119, 121). En este sentido, estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que el polvo de ajo es capaz de proteger contra el daño renal causado por la administración de GM en ratas (119). La naturaleza de esa protección es desconocida, pero en dicho trabajo se sugiere que podría deberse a la capacidad antioxidante del ajo. De los compuestos presentes en el aceite de ajo, del cual también se ha reportado que tiene propiedades antioxidantes (122), es el DAS el que ha sido mas ampliamente estudiado y demostrado que tiene actividad protectora (123, 124).

#### 6.1 *Dialil sulfuro (DAS)*

La alina puede dar lugar a la formación de varios productos organosulfurados gracias a la acción de la enzima alinasa, cuando se corta o tritura el ajo o bien cuando es metabolizado por los animales (125). Entre ellos se encuentra al DAS, el cual es un tioéter lipofílico que es en parte responsable del fuerte olor y sabor del ajo.

Es un metabolito que se forma después de la ingesta de ajo y corresponde a aproximadamente el 4% de su aceite esencial (126). Como en el ajo, se ha reportado que el DAS tiene propiedades antitumorígenicas, antibióticas, detoxificantes y antioxidantes, entre otras (127). Así, DAS confiere protección contra la toxicidad y carcinogénesis inducida químicamente en animales, inhibiendo el desarrollo de cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de hígado, adenoma pulmonar y tumores estomacales en roedores tratados (123, 128-130).

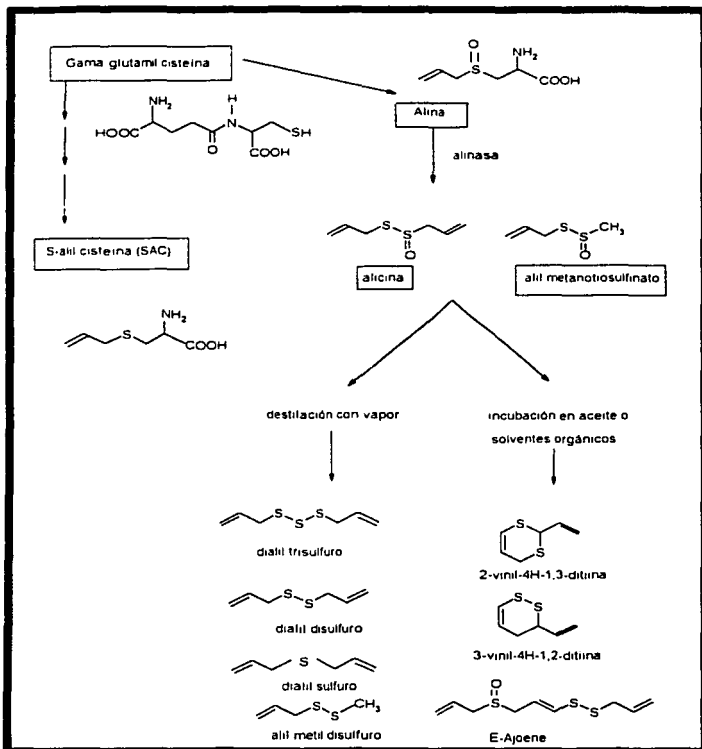


Fig 3. Acción de la alinasa sobre la alina para producir alicina mediante un proceso mecánico o deshidratación. La alicina dará origen a los diversos compuestos organosulfurados presentes en el aceite de ajo, entre ellos el DAS.

activación metabólica de los carcinógenos (127). DAS puede sufrir oxidaciones en su átomo de azufre, en el carbón alílico y en los enlaces dobles terminales (131). La oxidación de DAS en el átomo de azufre genera de manera secuencial al dialil sulfóxido (DASO) y a la dialil sulfona (DASO<sub>2</sub>). En el caso de la protección contra compuestos carcinógenos, mientras el DAS y el DASO parecen competir por las EROs con la CYP2E1, DASO<sub>2</sub> parece inhibir directamente a la enzima en las mitocondrias (131, 132).

Como antioxidante, se ha demostrado *in vitro* que el DAS tiene capacidad de inhibir la lipoperoxidación (124). *In vivo*, se ha reportado que un tratamiento de casi un mes con DAS, inhibe ligeramente la lipoperoxidación en riñón y en corazón de ratas (133). Se desconoce si DAS ejerce su efecto antioxidante de una manera directa, o si lo hace a través de la activación de otros elementos antioxidantes. DAS podría estar activando a enzimas del sistema celular antioxidante que serían las responsables de la disminución en los niveles de oxidación. Tal es el caso del GSH, para el cual se ha observado un incremento en la concentración intracelular de hepatocitos tratados con concentraciones bajas de 0.5 a 1 mM de DAS (134). Sin embargo hasta ahora, su efecto sobre enzimas antioxidantes como catalasa, GPx y SOD es controversial, ya que los resultados parecen depender de las dosis de DAS, el tiempo y el órgano sobre el cual se evalúe. Así por ejemplo, existen trabajos que reportan que DAS no tiene efecto sobre estas enzimas, sin embargo, otros indican que DAS incluso disminuye la actividad de catalasa en hígado de ratas, aún a bajas concentraciones (135). Por el contrario, Helen A et. al. (136), encontraron un incremento significativo de SOD, GSH, GPX e incluso de CAT en la mayoría de tejidos de ratas tratadas con aceite de ajo, el cual incluye DAS. Sin embargo, en este último caso es posible que el efecto observado se deba a los otros componentes del ajo como DADS y DATS.



---

## II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La gentamicina es uno de los aminoglucósidos de primera elección utilizado en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gram negativas debido a que casi no genera resistencia, a su rápida acción bactericida, a su amplio espectro de actividad, a su estabilidad química, a que se han estudiado extensamente sus propiedades farmacológicas, tóxicas y terapéuticas así como a su costo relativamente bajo. Sin embargo, su utilidad clínica se ve limitada debido a que su administración por más de 7 días induce nefrotoxicidad como un efecto adverso. Debido a su amplio uso, el valor de la gentamicina en la práctica clínica aumentaría si se encontrara una forma de proteger al riñón de los efectos indeseables que se presentan.

Existe evidencia de que las EROs, entre otros factores, juegan un papel importante en el desarrollo del daño renal provocado por GM, aunque el mecanismo exacto aún se desconoce.

En este sentido, un estudio previo realizado en nuestro laboratorio demostró que una dieta enriquecida al 2% con polvo de ajo disminuye la nefrotoxicidad inducida por GM en ratas. El mecanismo de protección se desconoce, pero debido al hecho de que se registró una clara disminución en la lipoperoxidación, es probable que se deba a la capacidad antioxidante de alguno de los compuestos del ajo. En este trabajo se selecciono al DAS para determinar su papel en el efecto protector observado con el ajo en el modelo de nefrotoxicidad por GM en ratas, debido a que es uno de los metabolitos de la alicina que se encuentran en el organismo después de consumir ajo, además de estar presente en el aceite de ajo, una de las preparaciones comerciales que se pueden obtener del polvo de ajo con una destilación por arrastre de vapor, y a que hay evidencias de su capacidad antioxidante.

---

### III. HIPÓTESIS

Se sabe que las EROs participan en la nefrotoxicidad inducida por GM, la cual es reducida por el efecto antioxidante del polvo de ajo. Si el DAS es uno de los metabolitos que se generan después de la ingesta de ajo y disminuye en algunos modelos la peroxidación de lípidos sugiriendo un efecto antioxidante, entonces es probable que la administración directa de DAS pueda reproducir total o parcialmente los efectos protectores del polvo de ajo en la nefrotoxicidad inducida por GM.

---

---

## IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el posible efecto protector de DAS sobre la nefrotoxicidad inducida por gentamicina en ratas, utilizando un modelo experimental ya conocido.

### 1 *Objetivos particulares*

- Evaluar la nefrotoxicidad inducida por gentamicina en las ratas mediante la determinación de parámetros que miden daño tubular como actividad de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAG) en orina, proteinuria y glutatión peroxidasa plasmática (GPx) así como parámetros que miden daño glomerular como nitrógeno de urea en sangre y creatinina en suero.
- Evaluar el daño estructural mediante cortes de tejido teñidos con hematoxilina y eosina (HyE).
- Evaluar la presencia de estrés oxidativo en la corteza renal mediante la determinación de las proteínas oxidadas y por medio de inmunohistoquímica para determinar las nitrotirosinas, uno de los productos del estrés oxidativo.
- Evaluar la actividad del sistema antioxidante enzimático (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) en la corteza renal de ratas con insuficiencia renal.
- Evaluar el efecto de DAS sobre los parámetros mencionados anteriormente.
- Evaluar el efecto de DAS sobre la producción de  $O_2^{\cdot -}$  en ensayos *in vitro*.

---

## V. METODOLOGÍA

### 1. Reactivos

El p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucosaminido, el p-nitrofenol, la albúmina sérica bovina (ASB), el nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), la glutatión reductasa, el glutatión reducido (GSH), la leupeptina, la pepstatina A, la aprotinina, la dinitrofenilhidrazina (DNPH), el sulfato de estreptomina, la guanidina-HCl, la xantina oxidasa, la xantina, el nitroazul de tetrazolio (NBT), el dietilditiocarbamato (DDC), el reactivo de Folin & Ciocalteu's phenol, el citocromo c, el dimetilsulfóxido (DMSO), la fenazina metosulfato (PMS), el amortiguador HEPES y el nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El citrato trisódico y la azida de sodio fueron de Merck (Alemania). El carbonato de sodio, el ácido tricloroacético (TCA), el EDTA disódico, las sales de fosfatos para los amortiguadores, el HCl, el sulfato de amonio, el sulfato de cobre, el hidróxido de sodio y el cloruro cúprico fueron de J.T. Baker (México, D.F.). El peróxido de hidrógeno al 30% y el tartrato de sodio y potasio fue de Mallinckrodt (México, D.F.). La gentamicina (GM) que se uso fue la presentación comercial Garamicina<sup>®</sup> solución inyectable de 160 mg/2 mL de Schering-Plough. (México, D.F.). Las determinaciones de urea en sangre y creatinina se realizaron con estuches comerciales de la marca Spinreact, S.A. (España). El dialil sulfuro fue de LKT laboratories (St. Paul, MN).

### 2. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 220-250 g de peso que fueron mantenidas durante todo el tratamiento en jaulas metabólicas con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12 h con alimentación y agua *ad libitum*.

### **3. Tratamiento de los animales**

Un total de 35 ratas se dividieron en cuatro grupos de la siguiente manera: i) Grupo CT (n=8), al cual se le administró aceite de oliva vía intragástrica cada 24 h; ii) Grupo GM (n=10), al cual se le administró GM a una concentración de 125 mg/kg de peso vía subcutánea cada 24 h; iii) Grupo DAS (n=6), al cual se le administró DAS a una concentración de 50 mg/kg de peso vía intragástrica cada 24 h y iv) Grupo DAS + GM (n=11), al cual se le administró DAS a 50 mg/kg de peso y 30 min después GM a 125 mg/kg de peso por las vías mencionadas anteriormente. Para estos ensayos DAS se preparó en aceite de oliva como vehículo y se les inyectó a los animales entre 90 y 100  $\mu$ l por dosis.

El tratamiento se administró por 4 días, se suspendió el día 5 y los animales se sacrificaron por decapitación el día 6. El peso corporal se monitoreo a diario y se midió el volumen urinario de 24 h del día 5 para el día 6. La orina de 24 h se centrifugó a 2500 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se colocaron 3 alícuotas en tubos eppendorf y se congelaron a  $-45^{\circ}$  C hasta su uso. Al momento del sacrificio, la sangre de las ratas se recolectó de manera individual en tubos de ensayo de vidrio de 13 x 100, después de un tiempo se separó el coágulo, se recolectó el suero por centrifugación a 2,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se preparó alícuotas en tubos eppendorf y se congeló a  $-45^{\circ}$  C hasta su uso.

Por otra parte, se extrajeron los dos riñones de cada una de las ratas, se rebanaron en 6 partes y se colocaron en papel aluminio para almacenarlos a  $-70^{\circ}$  C hasta su uso. Porciones de los riñones se fijaron en formol al 10% para posterior preparación de cortes histológicos e inmunohistoquímica. La corteza se separó de la médula mecánicamente al momento de preparar sus homogenados en un politrón y obtener los sobrenadantes por centrifugación para las determinaciones de proteínas oxidadas, GPx, CAT y SOD.

#### 4. Determinaciones

- ❖ En las 3 alícuotas de orina se determinó la excreción de la enzima N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG), de proteínas totales y de creatinina.
- ❖ En el suero se determinó la concentración de nitrógeno de urea, de creatinina, y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx plasmática).
- ❖ En la corteza renal se determinó la concentración de proteínas oxidadas y la actividad de las enzimas catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx renal) y las diferentes isoformas de la superóxido dismutas (SOD, Mn-SOD y Cu-Zn SOD).
- ❖ Se determinó *in vitro* el efecto de DAS sobre la generación del anión superóxido inducido a través de 3 diferentes métodos.

En todas las determinaciones se utilizó un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640 y sus diferentes programas: longitud de onda fija (Fixed wavelenght), proteína (PROTEIN) y cinética (KINETICS).

##### 4.1 Actividad de N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) en orina (Ec 3.2.1.30)

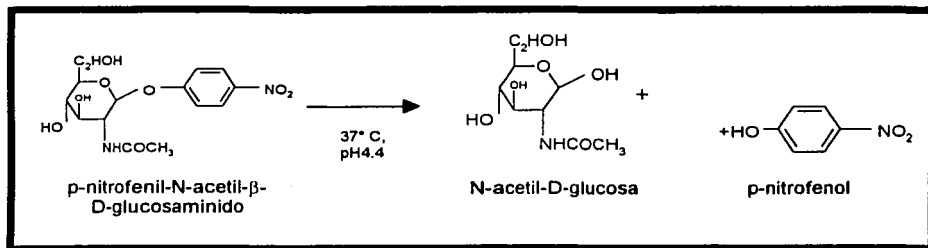


Fig 4. Reacción de la NAG sobre el p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminido para formar el p-nitrofenol, que en medio ácido se encuentra protonado e incoloro. Al añadir carbonato de sodio a la reacción, el p-nitrofenol se transforma a su forma aniónica que absorbe a 405 nm.

La actividad de la enzima NAG se determinó a través de un ensayo basado en la conversión del p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminido en p-nitrofenol, que en medio alcalino pasa de su forma protonada a su forma aniónica. Se utilizaron 10 y 50 μl de orina diluidos en un total de 550 μl de amortiguador de citratos 0.05 M, pH

4.4 y 125  $\mu\text{l}$  de sustrato a una concentración final de 6.8 mM. Para cada muestra se preparó un blanco sin sustrato y para evaluar la conversión espontánea del sustrato uno sin muestra de orina. Todos los tubos se agitaron y se incubaron a 37 °C durante 15 min. La reacción se detuvo con 550  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2 M, pH 10.4 y los tubos se leyeron a 405 nm. Las longitudes de onda máxima de la forma aniónica del p-nitrofenol se interpolaron en una curva de calibración de p-nitrofenol 0.5 mM con rangos de 5 a 175 nM. Los resultados se expresaron como unidades (U) de NAG/24 h en donde una U se define como la cantidad de enzima que libera un  $\mu\text{M}$  de p-nitrofenol por min bajo las condiciones del ensayo.

#### 4.2. Excreción de proteínas totales en orina

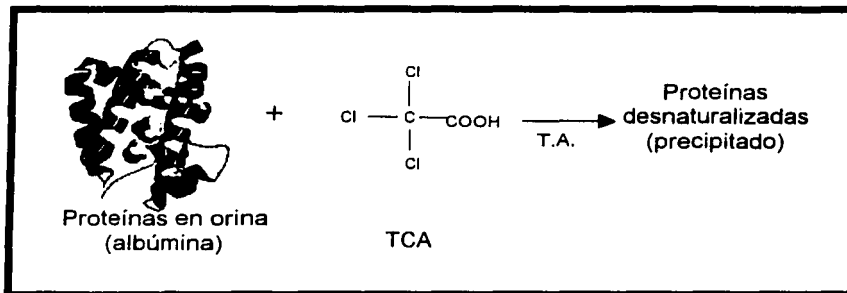


Fig 5. Reacción entre las proteínas excretadas en la orina, principalmente albúmina, y el ácido tricloroacético para formar un precipitado y así medir la turbidez de la reacción a 420 nm.

La concentración de proteína total eliminada con la orina se determinó por medio de precipitación con ácido tricloroacético y medición de la turbidez a 420 nm (137). Para ello se incubó 1 ml de orina diluida (1:5 y 1:20 en solución salina) con 250  $\mu\text{l}$  de TCA al 12.5% por 10 min a temperatura ambiente. Para cada muestra se preparó un blanco que no contenía TCA y con el cual se calibró a cero el espectrofotómetro. Para la determinación de la concentración, los resultados de absorbencias se interpolaron con una curva patrón de ASB entre 0.04 y 0.8 mg/ml. Los resultados se expresaron en mg de proteína/24 h.

### 4.3 Creatinina en suero

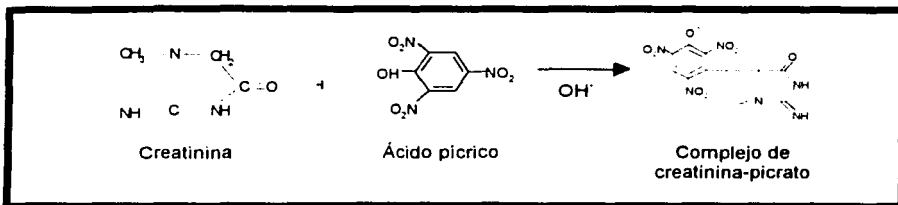


Fig 6. Reacción de Jaffé. La creatinina reacciona con el ácido pícrico para formar un complejo colorido de creatinina-picrato el cual absorbe a 492 nm.

La creatinina presente en suero se determinó con un método colorimétrico-cinético mediante la reacción de Jaffé, basada en la generación de un color anaranjado al reaccionar la creatinina con el picrato alcalino. El producto formado absorbe a 492 nm y su absorbencia es directamente proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra. El suero se desproteinizó previamente por precipitación con TCA al 1.25 %. En una celda se adicionaron 50  $\mu$ L del suero desproteinizado y 500  $\mu$ L de la mezcla reactiva (ácido pícrico e hidróxido de sodio en partes iguales), se mezcló con vórtex y se leyó en el espectro a los 30 y 90 seg. Simultáneamente se preparó un blanco que carecía de las muestras experimentales y un estándar de creatinina de 1.48 mg/dL. La cantidad de creatinina presente en las muestras se obtuvo comparando la diferencia de lecturas entre los dos tiempos con aquella del estándar de creatinina y al dividir la densidad óptica obtenida de la muestra entre la densidad óptica del estándar y multiplicar el resultado por la concentración del estándar. Los resultados se expresaron como mg de creatinina/dl.



#### 4.4. Glutación peroxidasa (cGPx y pGPx) (EC. 1.11.1.19)

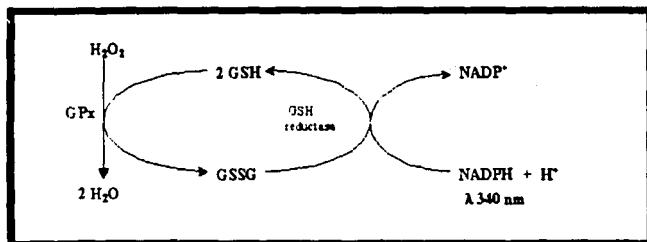


Fig 7. Actividad de la GPx, la cual se mide por una reacción acoplada con la GSH-Rx y se basa en la disminución de la absorbencia a 340 nm debido a la desaparición de NADPH, la cual se da al ser regenerado el GSH por la GSH-Rx a partir de GSSG, cuando la GPx reduce hidroperóxidos.

La actividad de esta enzima se midió en suero y en homogenado de corteza renal de manera indirecta por medio de un par de reacciones en las que en presencia de  $H_2O_2$  se genera glutación oxidado (GSSG), el cual a su vez es reducido por la glutación reductasa utilizando NADPH como cofactor. Ya que el NADPH absorbe a 340 nm, la reacción se basa en la desaparición de NADPH y la disminución de la absorbencia (138). Las muestras de suero (1:8) y de homogenado de corteza renal (1:10) se diluyeron previamente en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. En un tubo se mezclaron 100  $\mu L$  de la muestra diluida y 800  $\mu L$  de la mezcla de reacción mantenida en hielo, la cual contenía EDTA disódico, azida de sodio, NADPH, glutación reductasa, glutación reducido y amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 5 min y después se adicionó a una celdilla de cuarzo que contenía 100  $\mu L$  de una solución sustrato que contenía 2  $\mu L$  de  $H_2O_2$  al 30% en 10 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. La absorbencia se leyó a 340 nm durante 3 min a intervalos de 1 min. Se utilizó un blanco de actividad inespecífica el cual carecía de la muestra experimental. Los resultados se expresaron en U/ml donde  $1U = 1 \mu mol$  de NADPH oxidado/min.

#### 4.5. Nitrógeno de urea en sangre (BUN)

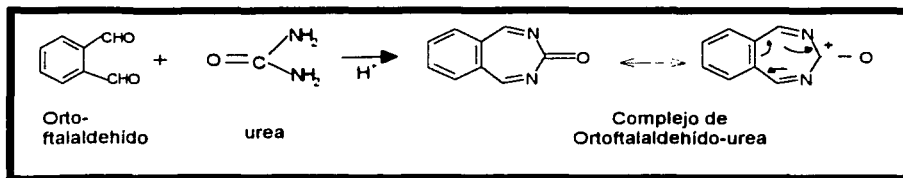


Fig 8. Reacción entre la urea y el ortoftaldehído en medio ácido para producir un complejo colorido que se lee a 510 nm debido a la deslocalización de los electrones.

La concentración de la urea en el suero se determinó con una prueba colorimétrica adaptada de la reacción propuesta por Jung *et al.*, 1975 (139). Se basa en la reacción de la urea con el ortoftaldehído a 37° C en medio ácido desarrollando un producto colorido que se lee a 510 nm. En un tubo se mezclaron 10  $\mu$ l de la muestra con 400  $\mu$ l de ortoftaldehído (4,8 mM) y 400  $\mu$ l de borato (87 mM), se incubó a 37° C por 15 min y se leyó en el espectro. En las mismas condiciones se incluyó un blanco que carecía de la muestra experimental y un estándar de urea de 50 mg/dl. La concentración de urea en el suero se obtuvo al dividir la densidad óptica obtenida de la muestra entre la densidad óptica del estándar y multiplicar el resultado por la concentración del estándar de urea. Finalmente la cantidad de nitrógeno de la urea se obtuvo dividiendo la concentración entre 2.14 que son los átomos de nitrógeno en una molécula de urea. Los resultados se expresan en mg /dl.

#### 4.6 Proteínas oxidadas

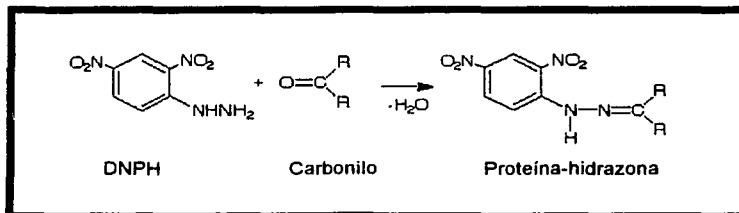


Fig 9. Reacción entre la 2,4-dinitrofenilhidrazina y los grupos carbonilo presentes en las proteínas oxidadas para dar un complejo de proteína hidrazona, marcador de estrés oxidativo

Se determinaron en los homogenados de corteza de riñón preparados en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7 con inhibidores de proteasas [leupeptina (5 µg/ml), pepstatina A (7 µg/ml) y aprotonina (5 µg/ml)], EDTA 1 mM y tritón X-100 al 0.1%. Los homogenados se trataron con sulfato de estreptomina (2.5% final) por 24 h, se centrifugaron y 150 µl de los sobrenadantes libres de ácidos nucleicos se trataron con 600 µl de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM disuelto en HCl 2.5 M por 1 h a temperatura ambiente. La DNPH reacciona con los grupos carbonilo de las proteínas oxidadas presentes en las muestras para formar un complejo proteína-hidrazona el cual absorbe a 370 nm. A continuación las muestras se precipitaron un par de veces con 20 y 10 % de TCA y los lípidos y DNPH libre se extrajeron con etanol:acetato de etilo (1:1). Los precipitados se resuspendieron en guanidina-HCl 6 M y finalmente se leyeron a 370 nm utilizando como blanco para cada una de las muestras un tubo procesado de la misma manera pero sin DNPH.

El contenido de carbonilos que expresa la cantidad de proteínas oxidadas se determinó utilizando el coeficiente de extinción del DNPH ( $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y el dato de la concentración total de proteínas determinada a 280 nm en los tubos blancos. Los resultados se expresan como nmoles de carbonilos / mg de proteína.

#### 4.7 Catalasa (EC.1.11.1.6)

La actividad se midió por medio de una reacción cinética en donde disminuye la absorbencia del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm debido a su degradación por la catalasa de acuerdo al método de Aebi (104). Brevemente, el sobrenadante de los homogenados diluidos 1:30 en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0 se mezcló en proporción 1:30 con  $\text{H}_2\text{O}_2$  7.7 mM y se leyó a los 15 y 30 seg a 240 nm. La actividad de catalasa se determinó usando la constante de reacción de primer orden  $\kappa$  como la unidad de actividad de la catalasa de acuerdo a la siguiente fórmula:

$\kappa = (1/\Delta t)(2.3 \times \log [A_1]/[A_2])$  donde t = intervalo de tiempo medido,  $[A_1]$  y  $[A_2]$  son las absorbencias del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ . Finalmente la actividad específica se calculó al dividir el valor de  $\kappa$  entre los mg de proteína adicionados al ensayo

determinado por el método de Lowry et al. (141). La actividad se expresó como  $\kappa$  / mg de proteína.

#### 4.8 Superóxido dismutasa (SOD total y Mn-SOD) (EC 1.15.1.1)

Se midió en los homogenados de corteza renal por medio de una reacción cinética en la cual se inhibe la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones superóxido generados por el sistema xantina-xantina oxidasa. La reacción se leyó a 560 nm que es la longitud de onda a la cual absorbe el NBT reducido. Brevemente, 330  $\mu$ l de los sobrenadantes de los homogenados sin dializar diluidos 1:100 (SOD total) y dializados con dietilditiocarbamato (DDC) diluidos 1:50 (140) se incubaron durante 15 min con 1.66 ml de una mezcla de reacción que contenía xantina 0.3 mM, EDTA 0.6 mM, NBT 150 mM,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  400 mM y albúmina 0.1 %. Las reacciones se iniciaron con la adición de 33  $\mu$ l de xantina oxidasa (168 U/L) y se detuvieron a intervalos de cada 15 seg después de los 15 min con la adición de 660  $\mu$ l de  $\text{CuCl}_2$  0.8 mM. Se utilizaron un tubo de 100% de reducción que carecía de muestra y tubos blancos para cada una de las muestras que carecían de xantina-oxidasa. Finalmente la cantidad de NBT reducido se leyó a 560 nm y la actividad de SOD total y Mn-SOD se determinaron en base a la concentración de proteína total añadida al ensayo. La actividad de Cu-Zn-SOD en los homogenados de corteza renal se estimó por la diferencia entre la actividad de SOD total y Mn-SOD. Los resultados se expresaron como U de SOD / mg de proteína, donde 1 U de SOD se define como la cantidad de enzima capaz de inhibir el 50% de la reducción del NBT.

#### 4.9 Efecto de DAS sobre la producción de anión superóxido

Se determinó utilizando 2 técnicas enzimáticas y una no enzimática para la producción del  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Las técnicas enzimáticas se basaron en la utilización de xantina-oxidasa para la producción del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a partir de la xantina y NBT o citocromo c como aceptores de electrones. En el caso del método con NBT, la xantina se utilizó a una concentración final de 0.09 mM y NBT a 22.8  $\mu$ M en amortiguador de fosfatos. La reducción del NBT da origen al formazán que absorbe a 560 nm. En el

caso del método con citocromo c, la xantina se utilizó a 0.23 mM final y el citocromo c a 0.1 mM en el mismo amortiguador. En este caso se forma ferrocitocromo c que absorbe a 550 nm. En ambos casos la xantina oxidasa se utilizó a una concentración final de 4.2 mU. En el método no enzimático se usó dimetilsulfóxido (DMSO) y NADH para la producción del  $O_2^{\cdot -}$  y la fenazina metosulfato (PMS) como transportador de electrones del NADH a NBT que actúa como aceptor de electrones produciendo formazán que se lee a 560 nm. En este caso la mezcla de reacción se preparó con 10  $\mu$ l de DMSO, PMS a 3.92  $\mu$ M final, NBT 39.2  $\mu$ M final y NADH a 196  $\mu$ M final en amortiguador de HEPES 20 mM, pH 7.2.

El efecto de DAS sobre la inhibición en la formación del  $O_2^{\cdot -}$  por estas técnicas, se determinó mediante una curva dosis respuesta y una cinética utilizando diferentes concentraciones de DAS entre 0.1 y 6 mM e intervalos de tiempo de 1 min durante 4 min. La solución stock de DAS se preparó en etanol a una concentración de 100 mM. En los ensayos enzimáticos la producción de ácido úrico que se lee a 295 nm se utilizó como un control del efecto de DAS sobre la actividad de la enzima xantina-oxidasa. En todos los casos se utilizó un control que contenía mezcla de reacción y etanol a los volúmenes empleados sin DAS. Sólo se reportaron las concentraciones cuyas lecturas se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la ley de Lambert-Beer. Las concentraciones menores a las reportadas en cada ensayo, mostraron un comportamiento idéntico al 100% por lo que no se incluyeron.

#### 4.10 Histología

Fragmentos de riñones de las ratas fijadas con 10% de formaldehído en PBS, se trataron con etanol y xilol y se embebieron en parafina. Se prepararon cortes de 4  $\mu$ m con un microtomo, se desparafinaron con xilol, se rehidrataron con diferentes preparaciones de etanol en agua (100%, 96% y 70%) y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Finalmente, los cortes teñidos se deshidrataron con etanol y xilol y se prepararon para su observación con una resina soluble en xilol y cubreobjeto. Se analizó bajo microscopía de luz la histología de los túbulos

proximales de cada una de las ratas, centrándose en indicios de vacuolización y necrosis que indican daño estructural.

#### **4.11 Inmunohistoquímica**

Esta técnica se usó para la determinación mediante un anticuerpo anti-nitrotirosina, de residuos de tirosina modificados en las proteínas por  $\text{ONOO}^-$  derivado de la reacción del  $\text{NO}$  con el  $\text{O}_2^-$ . Brevemente, cortes de tejido renal de cada una de las ratas desparafinados y rehidratados, se trataron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 15% en metanol durante 90 min para consumir la peroxidasa endógena del tejido. A continuación los cortes se bloquearon con PBS-ASB al 3% durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo anti-nitrotirosina producido en conejo a dilución 1:700 en PBS-ABS 1% durante 12 h. Después de lavar con PBS, los cortes se incubaron durante 1 h con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa diluido 1:500 en PBS. Finalmente los cortes se lavaron con PBS y los complejos inmunes se revelaron con diaminobenzidina (DAB) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato. Para dar contraste, los cortes se tiñeron con hematoxilina, se deshidrataron con etanol y xilol y se prepararon para su observación bajo microscopía de luz con una resina soluble en xilol y cubreobjeto.

#### **5. Análisis estadístico**

Los datos se reportaron como la media  $\pm$  la desviación estándar. Los datos se analizaron con el programa Prism 3.0 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) usando la prueba de ANOVA y comparaciones múltiples con el método de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a valores de  $p < 0.05$ .

## VI. RESULTADOS

### 1. *Peso corporal*

Ni la GM ni el DAS tuvieron efecto sobre este parámetro. (Fig. 9). No hubo diferencias significativas entre los grupos durante todo el experimento (6 días).

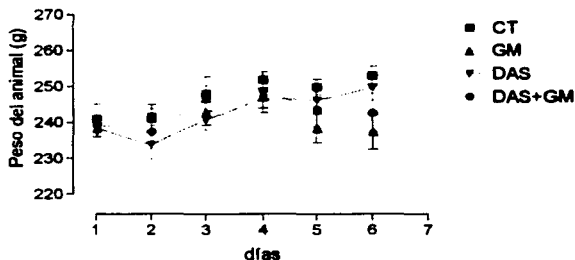


Fig 10. Efecto de GM y de DAS sobre el peso corporal a lo largo del tratamiento.

### 2. *Volumen urinario*

Se observó un aumento significativo del volumen urinario del día 6 tanto en el grupo GM ( $17 \pm 4$ ) como el grupo DAS + GM ( $19 \pm 8$ ) respecto al control ( $9 \pm 4$ ). El volumen urinario del grupo tratado sólo con DAS ( $6 \pm 1$ ) no presentó diferencias respecto al control.

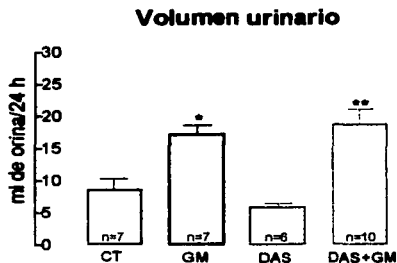


Fig 11. Efecto de GM y de DAS sobre el volumen urinario.  
\* p < 0.05 vs. CT. \*\* p < 0.001 vs. CT.

### 3. Parámetros de daño tubular

#### 3.1 Actividad de la NAG en orina

Como era de esperarse, el grupo de ratas tratadas con la GM ( $2 \pm 1$ ) presentó un aumento significativo de NAG respecto al control ( $0.2 \pm 0.06$ ). Sin embargo, la administración de DAS a ratas tratadas con GM (DAS+GM) ( $0.3 \pm 0.2$ ) evitó este incremento de forma total.

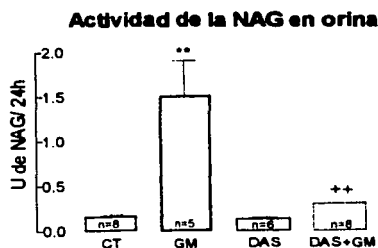


Fig 12. Efecto de GM y de DAS sobre la actividad de la NAG en orina. \*\*  $p < 0.001$  vs. CT. ++  $p < 0.001$  vs. GM.

#### 3.2 Excreción de proteínas totales en orina

Al igual que NAG, la proteinuria aumentó de forma significativa en el grupo tratado con GM ( $116 \pm 26$ ) respecto al control ( $13 \pm 4$ ). El tratamiento con DAS a ratas tratadas con GM ( $58 \pm 20$ ) previno parcial y significativamente este aumento.

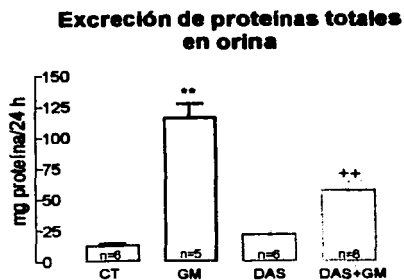


Fig 13. Efecto de GM y de DAS sobre la excreción de las proteínas totales en orina. \*\*  $p < 0.001$  vs. CT. ++  $p < 0.001$  vs. GM.



### 3.3 Actividad de GPx plasmática

La administración de GM ( $4 \pm 1$ ) disminuyó de forma significativa este parámetro respecto al control ( $6 \pm 1$ ). El DAS previno parcialmente pero no significativamente esta disminución ( $4 \pm 1$ ).

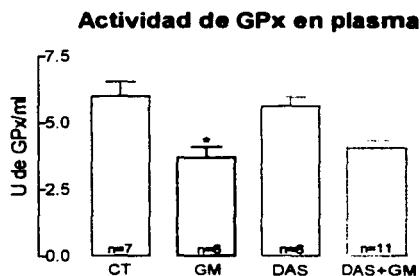


Fig 14. Efecto de GM y de DAS sobre la actividad de GPx en plasma.  
\*  $p < 0.01$  vs. CT.

## 4. Parámetros de daño glomerular

### 4.1 Nitrógeno de urea en sangre (BUN)

Se observó un aumento significativo del grupo que recibió GM ( $41 \pm 12$ ) respecto al control ( $16 \pm 3$ ). El DAS previno parcialmente pero significativamente el aumento de BUN inducido por la GM ( $30 \pm 7$ ).

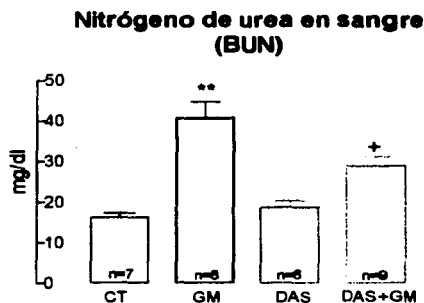


Fig 15. Efecto de la GM y del DAS sobre el BUN.  
\*\*  $p < 0.001$  vs. CT. +  $p < 0.05$  vs. GM.

#### 4.2 Creatinina en suero

De manera similar al BUN, se determinó un aumento significativo de creatinina en el suero de las ratas tratadas con GM ( $0.7 \pm 0.1$ ) respecto al grupo control ( $0.3 \pm 0.1$ ). De nueva cuenta, la administración de DAS a ratas tratadas con GM previno de forma parcial pero significativa dicho aumento ( $0.6 \pm 0.1$ ).

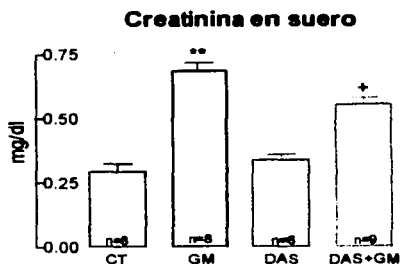


Fig 16. Efecto de GM y de DAS sobre la creatinina en suero.

\*  $p < 0.001$  vs. CT. +  $p < 0.05$  vs. GM.

#### 5. PROTEÍNAS OXIDADAS

La GM ( $4 \pm 1$ ) aumentó significativamente el contenido de proteínas oxidadas en la corteza renal respecto al control ( $3 \pm 1$ ). El tratamiento con DAS a ratas tratadas con GM ( $3 \pm 1$ ) evitó este contenido en forma parcial pero significativa respecto al grupo GM.

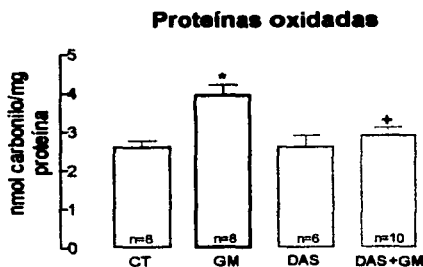


Fig 17. Efecto de GM y de DAS sobre el contenido de proteínas oxidadas en corteza renal. \*  $p < 0.01$  vs. CT. +  $p < 0.05$  vs. GM.

## 6. Actividad de las enzimas antioxidantes en corteza renal

### 6.1 Actividad de CAT

Al igual que la alteración de los parámetros que determinan un daño renal, la GM también disminuyó ( $0.2 \pm 0.03$ ) significativamente la actividad de la enzima CAT cuando se comparó con el grupo CT ( $0.4 \pm 0.03$ ). En este caso, DAS ( $0.2 \pm 0.02$ ) por sí solo disminuyó la actividad de CAT a niveles similares a los del grupo que recibió la GM, razón por la cual la administración de DAS a ratas tratadas con GM no restauró en nada la actividad de CAT ( $0.2 \pm 0.1$ ).

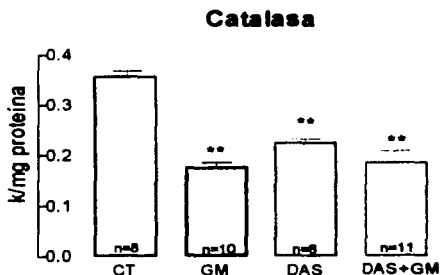


Fig 18. Efecto de GM y de DAS sobre la actividad de la CAT. \*\*  $p < 0.001$  vs. CT.

### 6.2 Actividad de GPx en corteza renal

No hubo cambios significativos de la actividad de GPx en los 3 grupos experimentales respecto al grupo CT ( $0.19 \pm 0.06$ ). Sin embargo, hubo diferencia significativa entre el grupo GM y el DAS+GM. Con base en estos datos, este resultado indica que en la presencia de GM, DAS aumentó ligeramente la actividad de GPx en la corteza renal.

### Actividad de GPx en corteza renal

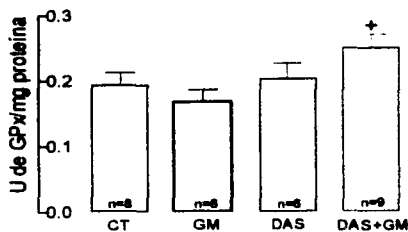


Fig 19. Efecto de GM y de DAS sobre la actividad de GPx en corteza renal.  
+  $p < 0.05$  vs. GM.

### 6.3 Actividad de SOD total

La actividad de esta enzima disminuyó significativamente por el tratamiento con GM ( $16 \pm 2$ ) respecto al control ( $19 \pm 1$ ). Al igual que catalasa, DAS ( $16 \pm 1$ ) por sí solo disminuyó la actividad de SOD total a niveles similares a los del grupo que recibió la GM, y podría ser la razón por la cual la administración de DAS a ratas tratadas con GM no restauró en nada la actividad de SOD total ( $18 \pm 1$ ).

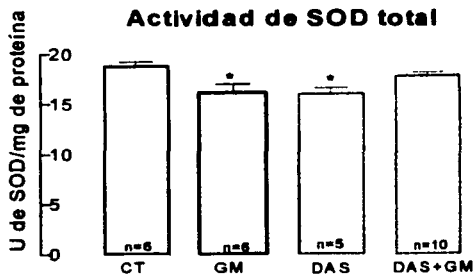


Fig 20. Efecto de GM y de DAS sobre la actividad de SOD total.  
\*  $p < 0.05$  vs. CT. DAS + GM vs. GM,  $p = NS$ .

#### 6.4 Actividad de Mn-SOD

Nuevamente se observó que la GM disminuyó ( $4 \pm 1$ ) significativamente la actividad de la isoforma Mn-SOD al ser comparada con la del grupo CT. ( $6 \pm 1$ ) y que DAS ( $4 \pm 1$ ) *per se* disminuyó la actividad de ésta isoforma enzimática de SOD lo cual, al igual que SOD total, puede explicar que el tratamiento con DAS a ratas tratadas con GM ( $5 \pm 1$ ) no previniera la caída en la actividad de Mn-SOD por GM.

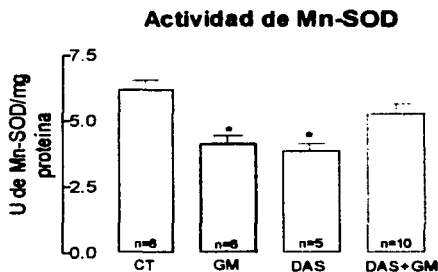


Fig 21. Efecto de GM y de DAS sobre la actividad de Mn-SOD.  
\*  $p < 0.01$  vs. CT. DAS + GM vs. GM,  $p = NS$ .

#### 6.5 Actividad de Cu-Zn-SOD

No se aprecian diferencias significativas en la actividad de Cu-Zn-SOD entre los 3 grupos respecto al control.

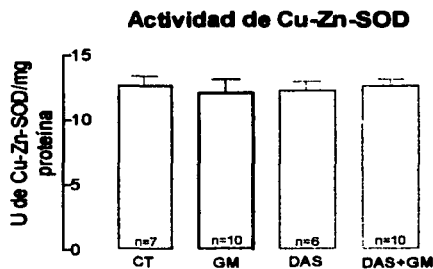


Fig 22. Efecto de GM y de DAS sobre la actividad de Cu-Zn-SOD

### 7. Histología

El análisis de los cortes histológicos demostró que el tejido renal de las ratas tratadas con GM presentó casi en su totalidad necrosis y licuefacción en las células epiteliales del túbulo proximal (B). Sin embargo, la administración de DAS a ratas tratadas con GM (D) indujo una notable mejoría respecto al grupo GM, donde se aprecia solo una ligera necrosis tubular.

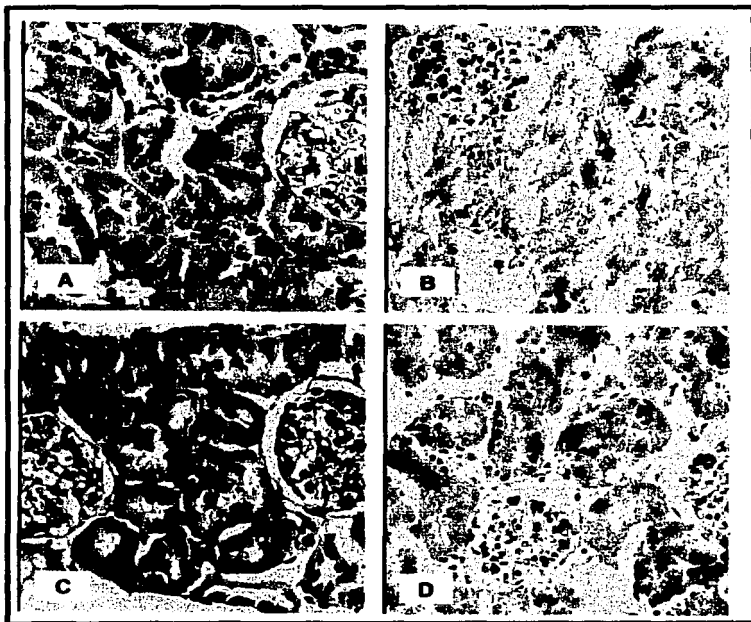


Fig 23. Microscopía de luz de los cortes de corteza renal de ratas control (A), ratas tratadas con GM (B), ratas tratadas con DAS (C) y ratas tratadas con GM en paralelo con DAS (D). H&E. 200X.

### 8. Inmunohistoquímica

La reacción con el anticuerpo anti-nitrotirosina reveló la presencia de gran cantidad de estas moléculas en los túbulos proximales en el tejido renal de las ratas tratadas con GM, sugiriendo el desarrollo de estrés oxidativo ante este tratamiento (B). En contraste, el tejido de ratas control (A) y ratas tratadas con DAS (C) mostró poca reacción con el anticuerpo anti-nitrotirosina, probablemente debido al nivel basal de estrés que se sufre de forma fisiológica. El DAS impidió notablemente la formación de residuos de nitrotirosinas en las proteínas y del estrés oxidativo, sin embargo esta prevención no fue completa ya que se aprecia una tinción ligeramente mayor que el control (D).

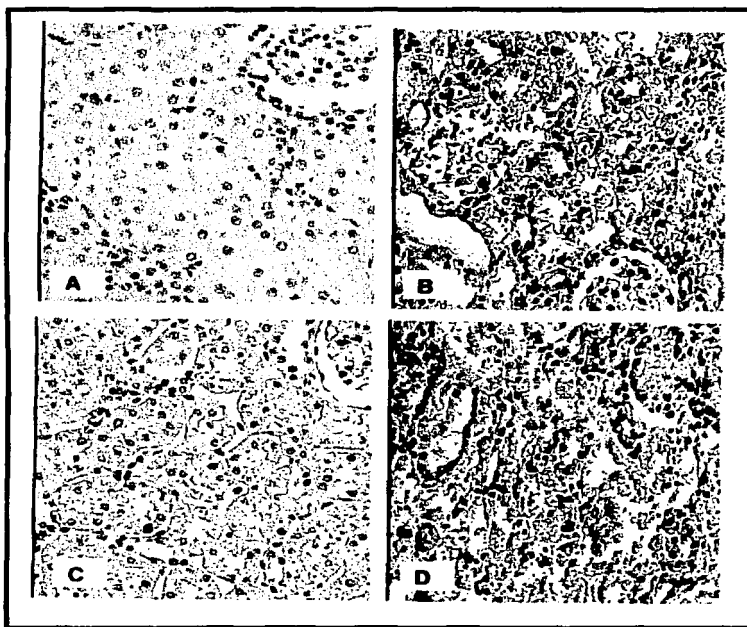


Fig 24. Microscopía de luz de los cortes de corteza renal de ratas control (A) tratadas con GM (B), con DAS (C) y DAS + GM (D). Inmunohistoquímica. 200X.

## 9. Efecto de DAS sobre la producción de $O_2^{\cdot -}$

Se observó que el DAS es incapaz de disminuir la producción de  $O_2^{\cdot -}$  por los tres métodos empleados. Con el método enzimático usando NBT como aceptor de electrones, se apreció una disminución significativa con la concentración más alta, sin embargo esto no se pudo considerar como válido debido a que también disminuyó la producción de ácido úrico, un indicador de la actividad de la xantina oxidasa. Con otro método enzimático, en el cual se utilizó citocromo c como aceptor de electrones se apreció un aumento tanto de la producción de ácido úrico como de  $O_2^{\cdot -}$ . En el método no enzimático también se observó un aumento en la producción de esta ERO. Aún no se conoce la razón por la cual ocurre este fenómeno.

### 9.1 Ensayo utilizando NBT como aceptor de electrones

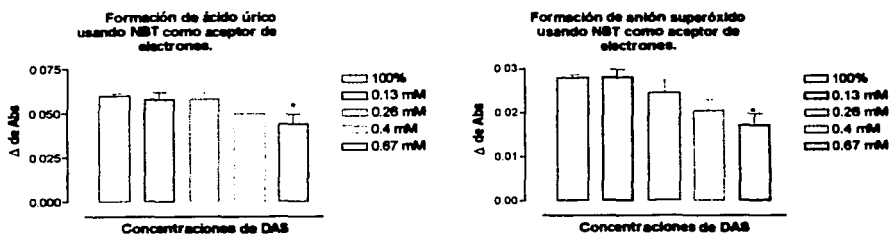


Fig 25. Efecto de DAS sobre la producción de anión superóxido y ácido úrico usando NBT como aceptor de electrones. \*  $p < 0.05$  vs. 100%.



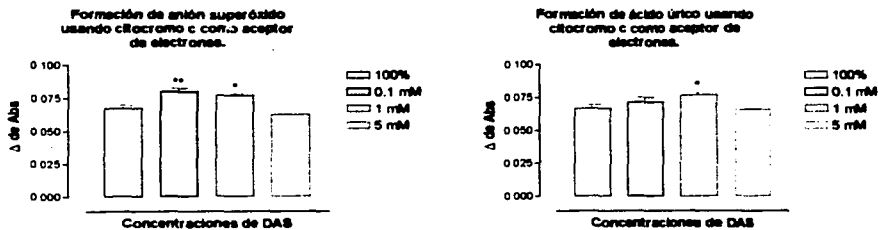


Fig 26. Efecto de DAS sobre la producción de anión superóxido y ácido úrico usando citocromo c como aceptor de electrones. \*  $p < 0.05$  vs. 100%. \*\*  $p < 0.001$  vs. 100%.

### 9.3 Ensayo no enzimático

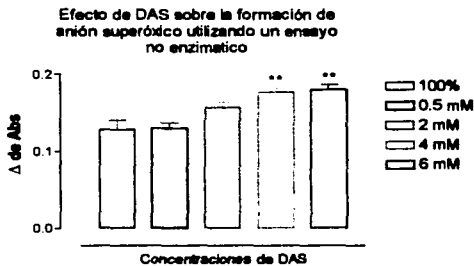


Fig 27. Efecto de DAS sobre la producción de anión superóxido utilizando un método no enzimático. \*\*  $p < 0.001$  vs. 100%.

---

## VII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se demostró que la administración de DAS, un metabolito de la alicina que se encuentra en el organismo después del consumo de ajo y que además es uno de los componentes del aceite de ajo, disminuyó en forma parcial la nefrotoxicidad en ratas causada por la gentamicina. Como se ha reportado extensamente (14, 68, 142), la administración de GM indujo una reducción en la función glomerular que se manifestó en un aumento de creatinina y nitrógeno de urea en suero, y daño al túbulo proximal determinado por un incremento en la actividad de la enzima lisosomal NAG y en la excreción de proteínas totales en orina así como de la actividad de GPx en suero. Esta serie de datos junto con el aumento en el volumen urinario confirmaron el patrón ya establecido de nefrotoxicidad inducida por gentamicina, la cual se caracteriza por una disminución en la velocidad de filtración glomerular y un daño tubular directo asociado con poliuria (143). Se considera que el primer paso en el desarrollo de la nefrotoxicidad inducida por GM es la interacción entre las cargas catiónicas de ésta y los fosfolípidos aniónicos de la membrana. En tales condiciones los lisosomas no funcionan correctamente y es cuando liberan sus enzimas hidrolíticas como la NAG (144). Por otro lado, se ha sugerido que el daño renal puede deberse a la exposición excesiva del tejido a EROs como consecuencia directa de la GM, que como otros xenobióticos median su producción (145), o debido a la inactivación o disminución de antioxidantes como GSH (73), SOD (76, 146, 147), GPx (148) y catalasa (147). La habilidad de las EROs para inducir daño renal se ha demostrado en varios estudios (119, 149) así como el de los atrapadores de EROs para prevenir dicho daño (68, 150). Se tiene evidencia *in vivo* (59, 60, 119) de que las EROs como  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$  y  $O_2^\cdot$  están involucradas en el desarrollo de la insuficiencia renal debido al uso de la GM (19, 68), así como pruebas *in vitro* que indican que ésta aumenta la generación de  $H_2O_2$  y radicales libres de oxígeno en las mitocondrias de la corteza renal (58, 63). Se ha sugerido

que la GM puede actuar como un quelante de hierro formando complejos con este metal que cataliza la formación de EROs y la lipoperoxidación (64, 151).

En nuestro laboratorio, se ha demostrado que una dieta enriquecida al 2% con polvo de ajo puede conferir protección contra la nefrotoxicidad causada por la GM en ratas. En correlación con la probable participación de EROs en el daño, en dicho trabajo se observó que el tratamiento con ajo previno casi de manera total la lipoperoxidación causada por la GM (119). Al contrario de la GM, el ajo además de sus propiedades antioxidantes incrementa la actividad de SOD, GPx y CAT (152). En este trabajo se demostró que la administración diaria de DAS (uno de los principales componentes del aceite de ajo el cual se obtiene a partir del polvo de ajo) a las ratas tratadas con GM resultó en protección parcial contra la nefrotoxicidad, evidenciada tanto en los cortes de tejido así como en la función renal. La administración de DAS junto con la GM previno parcial pero de manera significativa, el aumento en los niveles séricos de creatinina, BUN y GPx y de la excreción urinaria de NAG y de proteínas totales, indicando protección en las funciones glomerular y tubular. Sin embargo, el tratamiento con DAS no previno la poliuria inducida por GM. Esto pudo deberse a la necrosis parcial de las células del túbulo proximal que se observó en el grupo de ratas tratadas con DAS + GM, lo que disminuye su capacidad de reabsorber iones como el sodio, el cual por gradiente osmótico normalmente arrastra agua y concentra la orina. Otra posibilidad en el mismo sentido es la disminución de la actividad de la enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa presente en las células del túbulo proximal, afectando la reabsorción de estos iones y conduciendo a la poliuria observada.

Para poner de manifiesto la presencia del estrés oxidativo debido al tratamiento con GM así como el efecto de DAS sobre el mismo, se midió el contenido de grupos carbonilo, productos finales estables de las reacciones oxidativas que se originan por acción de las EROs sobre las proteínas oxidando algunos aminoácidos como leucina, valina, lisina, prolina, arginina, treonina e isoleucina a derivados carbonilo (153-156). De igual forma, se determinó el nivel de nitrotirosinas que se produce por efecto de las EROs sobre el aminoácido tirosina, en cortes de la corteza renal por inmunohistoquímica. Ambas técnicas funcionan

como un marcador *in vivo* del daño oxidativo a los tejidos (157). Como era de esperarse, las ratas tratadas con GM mostraron un aumento significativo de proteínas oxidadas y de nitración de proteínas en la corteza renal, lo cual indica la presencia de EROs en el desarrollo de la nefropatía. Esto concuerda con hallazgos previos en donde se observa un aumento en la lipoperoxidación en corteza renal de ratas tratadas con GM (68, 119, 150, 151, 158-160) y de la producción de las EROs. El DAS previno de forma parcial el aumento en la oxidación y nitración de las proteínas en la corteza renal de ratas que fueron sometidas al tratamiento con GM, lo cual puede explicarse en base a sus propiedades antioxidantes (124), a que disminuya la producción de EROs en la mitocondria renal o a un posible efecto inductor sobre el sistema enzimático antioxidante local.

El análisis en este trabajo del comportamiento de las enzimas Mn-SOD, Cu-Zn-SOD, CAT y cGPx en corteza renal sugiere que esta última posibilidad es improbable. Cabe hacer notar que las determinaciones se realizaron exclusivamente en homogenados de corteza renal y no en médula ya que se sabe con certeza que la gentamicina se acumula en las células del túbulo proximal, las cuales están en la corteza renal (119). La actividad de Mn-SOD disminuyó de manera significativa en el grupo GM, lo cual concuerda con lo reportado previamente (119), pero también disminuyó de la misma manera en el grupo de ratas al cual se administró solamente DAS. Por lo tanto en el grupo tratado con DAS junto con GM no hubo restauración de la actividad. Respecto a la actividad de la isoforma Cu-Zn-SOD, no se observó ninguna diferencia significativa entre el grupo tratado con GM y el control, lo cual concuerda con los datos obtenidos previamente (119). En este caso, DAS no mostró ningún efecto sobre esta isoforma de SOD. Por lo tanto, la disminución observada para la actividad de SOD total se puede acreditar a la caída de la actividad de la isoforma Mn-SOD. En base a estas observaciones, se puede concluir que el DAS no ejerció su efecto antioxidante a través de la prevención en la disminución de la actividad de la SOD, sino que por el contrario, su administración llevó a una disminución de la misma. Aunque la razón de este comportamiento se desconoce, es posible especular que

de alguna manera DAS este reduciendo la producción de  $O_2^{\cdot -}$  y con ello regule de manera negativa la expresión de SOD y con ello su nivel de actividad.

En cuanto a la actividad de cGPx en riñón, no hay una disminución clara en las ratas tratadas con GM aunque parece haber una tendencia a ello. Interesantemente, la actividad en el grupo DAS + GM fue mayor que la del grupo control y significativamente mayor que el grupo que sólo recibió el tratamiento con GM. El DAS por si solo no tuvo efecto sobre la actividad de cGPx, por lo que éste resultado sugiere que tal vez solo en presencia de bajas concentraciones de  $H_2O_2$  generadas por GM, DAS podría estar aumentando ligeramente la actividad de GPx en la corteza renal.

En cuanto al comportamiento de CAT, se observó que su actividad disminuye en la corteza renal de ratas tratadas con GM lo cual puede ser una evidencia más de la participación de las EROs en el daño renal. Al igual que ocurre con la Mn-SOD, el tratamiento sólo con DAS disminuyó la actividad de CAT.

En conjunto, la mayoría de estos resultados con enzimas antioxidantes, están de acuerdo con lo informado en la literatura. Aunque el efecto del ajo y de DAS sobre estas enzimas parece depender de la concentración y del tipo de órgano en el que se analice, la mayoría de los reportes demuestran que ambos tiene poco efecto sobre la actividad de SOD y GPx (135) pero sí disminuye la actividad de CAT. Esta disminución se ha observado en el hígado (135) y mas recientemente en corteza renal de ratas tratadas con DAS y una dieta con polvo de ajo al 2% (119), respectivamente. Se ha sugerido que la disminución en la actividad de CAT se debe a una disminución en la generación *in vivo* de  $H_2O_2$  que controlaría la expresión de ésta enzima como adaptación a las bajas concentraciones de esta ERO (161). A su vez, la disminución en la generación de  $H_2O_2$  *in vivo* podría deberse al efecto antioxidante directo de DAS. El hecho de que Mn-SOD haya disminuido en presencia de DAS, puede indicar que bajo dicho tratamiento había bajas concentraciones de  $O_2^{\cdot -}$ , que se traduce en una baja producción de  $H_2O_2$ , razón por la cual la actividad de CAT, que actúa en presencia de altas concentraciones de esta ERO, también disminuyó.

El o los mecanismos por los cuales DAS atrapa o disminuye al  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$  no se conocen aún, sin embargo podría ser que la disminución en el consumo de oxígeno por la mitocondria inducido por DAS contribuya a tal efecto (162). Los ensayos realizados para observar el efecto de DAS sobre la producción del  $O_2^{\cdot -}$  *in vitro* durante este trabajo empleando 3 diferentes técnicas, muestran que DAS bajo las condiciones ensayadas no tiene la habilidad para atrapar  $O_2^{\cdot -}$ .

Por otra parte, es posible que en lugar de tener un efecto directo sobre las EROs, el DAS haya incrementado la actividad y cantidad de otras moléculas antioxidantes como la glutatión S-transferasa (GST) y el glutatión reducido (GSH). En este sentido, se ha demostrado que DAS, dependiendo de la concentración, es capaz de aumentar la actividad de GST en varios órganos como el hígado, estómago, intestino delgado y pulmón de ratones (118) y la cantidad de GSH en hepatocitos de ratas (117). La GST cataliza la conjugación de compuestos electrofílicos, como las EROs, con el GSH. Ya que en este trabajo no se hicieron determinaciones de estos compuestos, el posible papel de los mismos en la protección parcial sobre la nefrotoxicidad por el DAS es únicamente especulativo. Sería de gran importancia determinar en el futuro el posible papel de estas moléculas en la protección observada con el ajo y DAS.

Aunque el conjunto de datos parece apuntar a que DAS no ejerce su efecto de manera directa por la captura de EROs ni por la inducción de las enzimas antioxidantes ensayadas, es claro que su administración confirió una protección parcial contra la nefrotoxicidad por GM como se evidenció por el análisis de los cortes histológicos de la corteza renal. Mientras los cortes del grupo de ratas tratadas con GM durante los 6 días mostró una completa necrosis del tejido con licuefacción y pérdida de la estructura renal, los cortes de las ratas tratadas en conjunto con el DAS mostraron necrosis parcial, sin licuefacción ni pérdida de la estructura renal. Este nivel de protección se correlacionó con la disminución de la nitrotirosina en las proteínas de la corteza renal determinada en la inmunohistoquímica y con las otras determinaciones que sugieren que la protección se dio asociada a una disminución de las EROs. Aunque hay protección, esta no se compara a los niveles observados en los cortes de ratas

tratadas con polvo de ajo, por lo que es posible que alguno o todos los otros compuestos azufrados del ajo desempeñen un papel. En conjunto, todos estos compuestos podrían actuar en forma sinérgica para lograr el nivel de protección que se observa con el polvo de ajo. En este sentido se ha encontrado que una amplia variedad de compuestos además del DAS tienen una serie de propiedades en diferentes sistemas ensayados. Entre estos podemos mencionar al DADS, DATS, alicina, ajoene, alina, SAC y SAMC, entre otros. Precisamente por las evidencias encontradas en éste y otros trabajos anteriores utilizando al ajo o a sus compuestos, la identificación de aquellos que pudieran estar confiriendo la protección contra la nefrotoxicidad por GM es el objetivo principal de nuestro laboratorio.

---

## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis indican que el DAS disminuye de forma parcial la nefrotoxicidad inducida por GM, probablemente a través de un mecanismo indirecto de bloqueo en la producción o de la inactivación de las EROs, como se observó en la prevención del aumento en el contenido de grupos carbonilos reflejados como proteínas oxidadas así como en los niveles de nitrotirosina determinados por inmunohistoquímica. El efecto protector del ajo probablemente se deba a la participación de múltiples componentes de los cuales DAS es sólo uno de ellos.

---



## X. REFERENCIAS

1. Chambers HF, Sande MA: Aminoglucósidos; en Hardman JG, Limbid LE, Goodman Gilman A: Goodman & Gilman (eds): Las bases farmacológicas de la terapéutica. México, McGraw Hill Interamericana, 1996, pp 1173-1186.
2. Morales AI, Arevalo M, Perez-Barriocanal F: Mecanismos implicados en la nefrotoxicidad producida por aminoglucósidos. *Nefrología* 2000;20:408-414.
3. Girdwood RH, Petrie JC (eds): Terapéutica médica. México, El Manual Moderno, 1992, pp 581-583.
4. Sundin DP, Sandoval R, Molitoris BA: Gentamicin inhibits renal protein and phospholipid metabolism in rats: implications involving intracellular trafficking. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:114-123.
5. Vademécum farmacéutico, Rezza editores, 6ª ed., 1997, pp 924-925.
6. Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM: Aminoglycoside nephrotoxicity: Cellular and molecular aspects. *Pharmacol* 1987;1:40-44.
7. Luft FC, Kleit SA: Renal parenchymal accumulation of aminoglycoside antibiotics in rats. *J Infect Dis* 1974;130:656-659.
8. Fabre J, Rudhardt M, Blanchard P: Persistence of sisomicin and gentamicin in renal cortex and medulla compared with other organs and serum of rats. *Kidney Int* 1976;10:444-449.
9. Grahame-Smith D, Aronson J (eds): Oxford Textbook of clinical Pharmacology and Drug Therapy. 2a ed., Gran Bretaña, Oxford University Press, 1992, pp 553.
10. Ali BH: Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol* 1995;26:1477-1487.
11. Hou SH, Bushinsky DA, Wish JB, Cohen JJ, Harrington JT: Hospital-acquired renal insufficiency: a prospective study. *Am J Med* 1983;74:243-248.
12. Henry SA, Bendush CB: Aztreonam: worldwide overview of the treatment of patients with gram-negative infections. *Am J Med* 1985;78: 57-64.
13. Mathew TH: Drug-induced renal disease. *Med J Aust* 1992;156:724 -728.
14. Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM: Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1990;40:2383-2392.
15. Fillastre JP, Godin M: An overview of drug-induced nephropaties, in Goldstein RD (ed): Mechanisms of injury in renal disease and toxicity. Boca Raton, 1992, FL.CRC, pp: 123-141.
16. Kacew S, Bergeron S: Pathogenic factors in aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 1990;51:241-259.
17. Leehey DJ, Braun BI, Tholl DA, Chung LS, Gross CA, Roback JA, Lentino JR: Can pharmacokinetic dosing decrease nephrotoxicity associated with aminoglycoside therapy?. *J Am Soc Nephrol* 1993;4:81-90.

18. Aronoff GR, Pottratz ST, Brier ME, Walker NE, Fineberg NS, Glant MD, Luft FC: Aminoglycoside accumulation kinetics in rat renal parenchyma. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;23:74-78.
19. Lietman PS, Smith CR: Aminoglycoside nephrotoxicity in humans. *J Infect Dis* 1983;2:S284-S292.
20. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Britti D, De Sarro A, Pierpaoli S, Caputi A, Masini E, Salvemini D: A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2002;16; 450:67.
21. Humes HD, Winberg JM: Toxic nephropathies; in Brenner BM, Rector FC Jr (eds): The kidney. Philadelphia, Saunders, 1986, pp 1491-1553.
22. Schentag JJ: Specificity of renal tubular damage criteria for aminoglycoside nephrotoxicity in critically ill patients. *J Clin Pharmacol* 1983;23:473-483.
23. Baliga R, Ueda N, Walker P, Shah SV: Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev* 1999;31:971-997.
24. Houghton DC, Hartnett M, Campbell-Boswell M, Porter G, Bennett W.: A light and electron microscopic analysis of gentamicin nephrotoxicity in rats. *Am J Pathol* 1976;82:589-612.
25. Hostetter TH, Brenner BM: Renal circulatory and nephron function in experimental acute renal failure; in Brenner BM, Lazarus JM (eds): Acute Renal Failure, ed 2. New York: Churchill Livingstone, 1988, pp 67-89.
26. Powell JH, Reindenberg MM: Further studies of the response of kidney lysosomes to aminoglycosides and other cations. *Biochem Pharmacol* 1983;32:3213-3220.
27. Simmons CF Jr, Bogusky RT, Humes HD: Inhibitory effects of gentamicin on renal mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;214:709-715.
28. Williams PD, Holohan PD, Ross CR: Gentamicin nephrotoxicity. II. Plasma membrane changes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981;61:243-251.
29. Collier VU, Lietman PS, Mith WE: Evidence for luminal uptake of gentamicin in perfused rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 1979;210:247-251.
30. Silverblatt FJ, Kuehn C: Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int* 1979;15:335-345.
31. Lipsky JJ, Cheng L, Sacktor B, Lietman PS: Gentamicin uptake by renal tubule brush border membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;215:390-393.
32. Sastrasinh M, Knauss TC, Weinberg JM, Humes HD: Identification of the aminoglycoside binding site in rat renal brush border membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;222:350-358.
33. Frommer JP, Senekjian HO, Babino H, Weinman EJ: *Intratubular microinjection study of gentamicin transport in the rat*. *Miner Electrolyte Metab* 1983;9:108-112.
34. Silverblatt F: Pathogenesis of nephrotoxicity of cephalosporins and aminoglycosides: a review of current concepts. *Rev Infect Dis* 1982;4:S360-S365.

35. Edwards CQ, Smith CR, Baugman KL, Lietman PS: Concentrations of gentamicin and amikacin in human kidneys. *Antimicrob Agents Chemother* 1976;9:925-927.
36. Houghton DC, Campbell-Boswell MV, Benett WM, Porter GA, Brooks RE: Myeloid bodies in the renal tubules of humans: relationship to gentamicin therapy. *Clin Nephrol* 1978;10:140-145.
37. Laurent G, Carlier MB, Rollman B, Van Hoof F, Tulkens P: Mechanism of aminoglycoside-induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *Biochem Pharmacol* 1982;31: 3861-3870.
38. Ramsammy LS, Josepovitz C, Lane B, Kaloyanides GJ: Effect of gentamicin on phospholipid metabolism in cultured rabbit proximal tubular cells. *Am J Physiol* 1989;256:C204-213.
39. Abdel-Gayoum AA, Ali BH, Ghawarsha K, Bashir AA: Plasma lipid profile in rats with gentamicin nephrotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 1993;12:371-375.
40. Aubert-Tulkens G, Van Hoof F, Tulkens P: Gentamicin-induced lysosomal phospholipidosis in cultured rat fibroblasts. Quantitative ultrastructural and biochemical study. *Lab Invest* 1979;40:481-491.
41. Carlier MB, Laurent G, Claes PJ, Vanderhaeghe HJ, Tulkens PM: Inhibition of lysosomal phospholipases by aminoglycoside antibiotics: in vitro comparative studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;23:440-449.
42. Lipsky JJ, Lietman PS: Aminoglycoside inhibition of a renal phosphatidylinositol phospholipase C. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;220:287-292.
43. McNeil JS, Jackson B, Nelson L, Butkus DE: The role of prostaglandins in gentamicin-induced nephrotoxicity in the dog. *Nephron* 1983;33:202-207.
44. Martínez-Salgado C, Rodríguez-Barbero A, Rodríguez-Puyol D, Pérez de Lema G, López-Novoa JM: Involvement of phospholipase A2 in gentamicin-induced rat mesangial cell activation. *Am J Physiol* 1997;273:F60-F66.
45. Papanikolaou N, Peros G, Morphake P, Gkikas G, Maraghianne D, Tsipas G, Kostopoulos K, Arambatze C, Gkika EL, Bariety J: Does gentamicin induce acute renal failure by increasing renal TXA2 synthesis in rats?. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1992;45: 31-136.
46. Assael BM, Chiabrando C, Gagliardi L, Noseda A, Bamonte F, Salmona M: Prostaglandins and aminoglycoside nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;78:386-394.
47. Rodríguez-Barbero A, Rodríguez-López AM, González-Sarmiento R, López-Novoa JM: Gentamicin activates rat mesangial cells. A role for platelet-activating factor. *Kidney Int* 1995;47:1346-1353.
48. Rodríguez-Barbero A, López-Novoa JM, Arévalo M: Involvement of platelet-activating factor in gentamicin nephrotoxicity in rats. *Exp Nephrol* 1997;5:47-54.
49. Pirotzky E, Bidault J, Burtin C, Gubler MC, Benveniste J: Release of platelet-activating factor, slow-reacting substance, and vasoactive amines from isolated rat kidneys. *Kidney Int* 1984;25:404-410.
50. Camussi G: Potential role of platelet-activating factor in renal pathophysiology. *Kidney Int* 1986;29:469-477.

51. Santos JC, Sanz E, Caramelo C, Hernando L, López-Novoa JM: Effect of PAF-acether on renal function in dogs *Rev Esp Fisiol* 1988;44:273-277.
52. Williams PD, Trimble ME, Crespo L, Holahan PD, Freedman JC, Ross CR: Inhibition of renal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> adenosine triphosphatase by gentamicin. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;231: 248-253.
53. Cronin RE, Newman JA: Protective effect of thyroxine but not parathyroidectomy on gentamicin nephrotoxicity. *Am J Physiol* 1985;248: F332-F339.
54. Ali BH, Bashir AA, Tanira MO: The effect of thyroxine or carbimazole treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 1995;14:13-17.
55. Fukuda Y, Malmberg AS, Aperia A: Gentamicin inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase in rat kidney cells. *Acta Physiol Scand* 1991;141:27-34.
56. Schor N, Ichikawa I, Rennke HG, Troy JL, Brenner BM: Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int* 1981;19:288-296.
57. Humes HD, Weinberg JM: Alteration in renal tubular cell metabolism in acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 1983;9:290-305.
58. Walker PD, Shah SV: Gentamicin enhanced production of hydrogen peroxide by renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* 1987;253:C495-C499.
59. Shah SV, Walker PD: Reactive oxygen metabolites in toxic acute renal failure. *Ren Fail* 1992;14:363-370.
60. Halliwell B, Gutteridge JM: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1-14.
61. Slater TF: Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1-15.
62. Gutteridge JM: Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogenperoxide. *FEBS Lett* 1984;172:245-249.
63. Yang CL, Du XH, Han YX: Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail* 1995;17:21-26.
64. Priuska EM, Schacht J: Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol* 1995;50:1749-1752.
65. Kays SE, Crowell WA, Johnson MA: Iron supplementation increases gentamicin nephrotoxicity in rats. *J Nutr* 1991;121:1869-1875.
66. Ben-Ismaïl TH, Ali BH, Bashir AA: Influence of iron, deferoxamine and ascorbic acid on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Gen Pharmacol* 1994;25:1249-1252.
67. Song BB, Shah SH, Schacht J: Iron chelators protect from aminoglycoside-induced cochleo and vestibulotoxicity in guinea pig. *Free Radic Biol Med* 1998;25:189-195.
68. Walker PD, Shah SV: Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 1988;81:334-341.
69. Ademuyiwa O, Ngaha EO, Ubah FO: Vitamin E and selenium in gentamicin nephrotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 1990;9:281-288.

70. Song BB, Schacht J: Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig in vivo. *Hear Res* 1996;94:87-93.
71. Huang MY, Schacht J: Formation of a cytotoxic metabolite from gentamicin by liver. *Biochem Pharmacol* 1990;40:R11-R14.
72. Garetz SL, Rhee DJ, Schacht J: Sulfhydryl compounds and antioxidants inhibit cytotoxicity to outer hair cells of a gentamicin metabolite in vitro. *Hear Res* 1994;77:75-80.
73. Ross D: Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacol Ther* 1988;37:231-249.
74. Ali BH, Abdel Gayoum AA, Bashir AA: Gentamicin nephrotoxicity in rat: some biochemical correlates. *Pharmacol Toxicol* 1992;70:419-423.
75. Sandhya P, Varalakshmi P: Effect of lipoic acid administration on gentamicin-induced lipid peroxidation in rats. *J Appl Toxicol* 1997;17: 405-408.
76. Ueda N, Guidet B, Shah SV: Gentamicin-induced mobilization of iron from renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* 1993;265:F435-F439.
77. Nakijama T, Hishida A, Kato A: Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am J Physiol* 1994;266:F425-F431.
78. Eberhardt MK: Reactive oxygen metabolites. Chemistry and medical consequences. USA, CRC Press, 2001, pp 13-14, 39,40.
79. McCord JM, Fridovich I: The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann Intern Med* 1978;89:122-127.
80. Fridovich I: The biology of oxygen radicals. *Science* 1978;201:875-880.
81. Halliwell B, Gutteridge JM: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.
82. Olinescu R, Smith T: Free radicals in medicine. New York, Nova science publishers Inc. Huntington, 2002, pp 23-31, 87-118.
83. Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine. United Kingdom ed 3, Oxford Science Publications, 2001, pp 36-140.
84. Gutteridge JM: Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett* 1986;201:291-295.
85. Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson k, Marklund SL: 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1994;269:19163-19166.
86. Sun E, Xu H, Liu Q, Zhou J, Zuo P, Wang J: The mechanism for the effect of selenium supplementation on immunity. *Biol Trace Elem Res* 1995;48:231-238.
87. Weisiger RA, Fridovich I: Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem* 1973;248:4793-4796.
88. Hsu JL, Visner GA, Burr IA, Nick HS: Rat copper/zinc superoxide dismutase gene: Isolation, characterization and species comparison. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;186:936-943.

89. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY: Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10405-10409.
90. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA: Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 1998;37:1613-1622.
91. Autor AP: Biosynthesis of mitochondrial manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. Precursor form of mitochondrial superoxide dismutase made in the cytoplasm. *J Biol Chem* 1982;257:2713-2718.
92. Wispe JR, Clark JC, Burhans MS, Kropp KE, Korfhagen TR, Whitsett JA: Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 1989;994:30-36.
93. Casareno RL, Waggoner D, Gitlin JD: The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1998;273:23625-8.
94. Oury TD, Day BJ, Crapo JD: Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 1996;75:617-636.
95. Harris E: Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992;6:2675-2683.
96. Keiner MJ, Bagnell R, Hale B, Alexander NM: Inactivation of intracellular copper-zinc superoxide dismutase by copper chelating agents without glutathione depletion and methemoglobin formation. *Free Rad Biol Med* 1989;6:355-360.
97. Marklund SL: Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79: 7634-7638.
98. Marklund SL: Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiol Scand Suppl* 1980;492:19-23.
99. Carlsson LM, Marklund SL, Edlund T: The rat extracellular superoxide dismutase dimer is converted to a tetramer by the exchange of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5219-5222.
100. Karlsson K, Marklund SL: Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals. *Biochem J* 1988;255:223-228.
101. Buschfort C, Müller MR, Seeber S, Rajewsky MF, Thomale J: DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. *Cancer Res* 1997;57:651-658.
102. Aebi HE: Catalase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (vol III), ed 3, Weinheim, Verlag Chemie, 1982, pp 273-286.
103. Thakur V, Walker PD, Shah SV: Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in puromycin aminonucleoside-induced proteinuria. *Kidney Int* 1988;34:494-499.
104. Aebi H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-126.
105. Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H: Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene* 1989;79:279-288.
106. Tappel AL: Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol* 1978;52:506-513.

107. Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T: Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 1994;45:1-9.
108. Arthur JR, Beckett GJ: New metabolic roles for selenium. *Proc Nutr Soc* 1994;53:615-624.
109. Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T: Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J Biochem* 1991;109:918-923.
110. Maser RL, Magenheimer BS, Calvet JP: Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. *J Biol Chem* 1994;269:27066-27073.
111. Avissar N, Ornt DB, Yagii 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:C367-C375.
112. Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Blöcker H, Gross G, Kiess M, Klöppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Usani F: Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced aminoacid sequence. *J Biol Chem* 1994;269:7342-7348.
113. Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakagawa Y: Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1998; 273:1990-1997.
114. Pushpa-Rekha TR, Burdsall AL, Oleksa LM, Chisolm GM, Driscoll DM: Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J Biol Chem* 1995;270:26993-26999.
115. Spallholz JE: Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system; in Bendich A, Phillips M, Tengerdy RP (eds): *Antioxidant Nutrients and Immune Functions*. USA, Plenum Publishing Corporation, 1990, pp 145-158.
116. Behne D, Scheid S, Kyriakopoulos A, Hilmert H: Subcellular distribution of selenoproteins in the liver of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1990;1033:219-225.
117. Sheen LY, Lii CK, Sheu SF, Meng RH, Tsai SJ: Effect of the active principle of garlic -diallyl sulfide- on cell viability, detoxification capability and the antioxidation system of primary rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 1996;34: 971-978.
118. Ali M, Thomson M, Afzal M: Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;62: 55-73.
119. Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME: Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 2000;29:602-611.
120. Kourounakis PN, Rekka EA: Effect on active oxygen species of alliin and *Allium sativum* (garlic) powder. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 1991;74:249-252.

121. Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y: Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 1994;60:417-420.
122. Reuter HD, Koch HP, Lawson LD: Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations; in Koch HP, Lawson LD (eds): *Garlic, the science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1996, pp 135-212.
123. Wattenberg LW, Sporn VL, Barany G: Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Res* 1989;49:2689-2692.
124. Fu N: Antioxidant action of garlic oil and allitridi. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 1993;15:295-301.
125. Block E: The chemistry of garlic and onions. *Sci Am* 1985;252:114-119.
126. Sheen LY, Wu CC, Lii CK, Tsai SJ: Effect of diallyl sulfide and diallyl disulfide, the active principles of garlic, on the aflatoxin B<sub>1</sub>-induced DNA damage in primary rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 2001;122:45-52.
127. Jeong HG, Lee YW: Protective effects of diallyl sulfide on N-nitrosodimethylamine-induced immunosuppression in mice. *Cancer Lett* 1998;134:73-79.
128. Unnikrishnan MC, Soudamini KK, Kuttan R: Chemoprotection of garlic extract toward cyclophosphamide toxicity in mice. *Nutr Cancer* 1990;13:201-207.
129. Unnikrishnan MC, Kuttan R: Tumor reducing and anticarcinogenic activity of selected spices. *Cancer Lett* 1990;51: 85-89.
130. Wargovich MJ, Imada O, Stephens LC: Initiation and post-initiation chemopreventive effects of diallyl sulfide in esophageal carcinogenesis. *Cancer Lett* 1992;64:39-42.
131. Yang CS, Chhabra SK, Hong JY, Smith TJ: Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic. *J nutr* 2001;131:1041S-1045S. Review.
132. Brady JF, Wang MH, Hong JY, Xiao F, Li Y, Yoo JS, Ning SM, Lee MJ, Fukuto JM, Gapac JM: Modulation of rat hepatic microsomal monooxygenase enzymes and cytotoxicity by diallyl sulfide. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;108:342-354.
133. Horie T, Murayama T, Mishima T, Itoh F, Minamide Y, Fuwa T, Awazu S: Protection of liver microsomal membranes from lipid peroxidation by garlic extract. *Planta Med* 1989;55:506-508.
134. Sheen LY, Lii CK, Sheu SF, Meng RH, Tsai SJ: Effect of the active principle of garlic -diallyl sulfide- on cell viability, detoxification system of primary rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 1996;34:971-978.
135. Chen L, Hong JY, So E, Hussin AH, Cheng WF: Decrease of hepatic catalase level by treatment with diallyl sulfide and garlic homogenates in rats and mice. *J Biochem Mol Toxicol* 1999;13:127-134.
136. Helen A, Rajasree CR, Krishnakumar K, Augusti KT, Vijayammal PL: Antioxidant role of oils isolated from garlic (*Allium sativum* Linn) and onion



- (*Allium cepa* Linn) on nicotine-induced lipid peroxidation. *Vet Hum Toxicol* 1999;41:316-319.
137. Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R: Effect of the in vivo catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic Biol Med* 1999;27:245-253.
  138. Lawrence RA, Burk RF: Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71:952-958.
  139. Jung D, Biggs H, Erikson J, Ledyard PU: New Colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clin Chem* 1975;21:1136-1140.
  140. Iqbal J, Whitney P: Use of cyanide and diethyldithiocarbamate in the assay of superoxide dismutases. *Free Radic Biol Med* 1991;10:69-77.
  141. Lowry OA, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
  142. Sener G, Sehirli AO, Altunbas HZ, Ersoy Y, Paskaloglu K, Arbak S, Ayanoglu-Dulger G: Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res* 2002;32:231-236.
  143. Bennett, WM: Comparison of cyclosporine nephrotoxicity with aminoglycoside nephrotoxicity. *Clin Nephrol* 1986;25:S126-S129.
  144. Aubert-Tulkens G, Van Hoof F, Tulkens P: Gentamicin-induced lysosomal phospholipidosis in cultured rat fibroblast. Quantitative ultrastructural and biochemical study. *Lab Invest* 1979;40:481-491.
  145. Blazquez M, Fominaya J, Hofsteenge J: Oxidation of sulfhydryl groups of ribonuclease inhibitor in epithelial cells is sufficient for its intracellular degradation. *J Biol Chem* 1996;271:18638-18642.
  146. Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Attia FF: Protective effects of vitamin E and probucol against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 1999;40:183-187.
  147. Shifow AA, Kumar KV, Naidu MUR, Ratnakar KS: Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephron* 2000;85:167-174.
  148. Kavutcu M, Canbolat O, Ozturk S, Olcay E, Ulutepe S, Ekinci C, Gokhun IH, Durak I: Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissues from gentamicin-treated guinea pigs: effects of vitamins E and C. *Nephron* 1996;72:269-274.
  149. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF: Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984;74:1156-1164.
  150. Nakajima T, Hishida A, Kato A: Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am J Physiol* 1994;266:F425-F431.
  151. Ramsammy LS, Ling KY, Josepovitz C, Levine R, Kaloyanides GJ: Effect of gentamicin on lipid peroxidation in rat renal cortex. *Biochem Pharmacol* 1985;34:3895-3900
  152. Wei Z, Lau B: Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res* 1998;18:61-70.

153. Stadtman ER: Protein oxidation in aging. *Science* 1992;257:1220-1224.
154. Garibaldi S, Aragno I, Odetti P, Marinari UM: Relationships between protein carbonyls, retinol and tocopherols level in human plasma. *Biochem Mol Biol Int* 1994;34:729-736.
155. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-478.
156. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997;324:1-18.
157. Yelinova V, Glazachev Y, Khramtsov V, Kudryashova L, Rykova V, Salganik R: Studies of human and rat blood under oxidative stress: changes in plasma thiol level, antioxidant enzyme activity, protein carbonyl content, and fluidity of erythrocyte membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221:300-303.
158. Ramsammy LS, Josepovitz C, Ling KY, Lane BP, Kaloyanides GJ: Failure of lipid peroxidation by vitamin E to protect against gentamicin nephrotoxicity in the rat. *Biochem Pharmacol* 1987;36:2125-2132.
159. Ramsammy LS, Josepovitz C, Ling KY, Lane BP, Kaloyanides GJ: Effects of dephenyl-phenylenediamine on gentamicin-induced lipid peroxidation and toxicity in rat renal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;238: 83-88.
160. Fauconneau B, Tallineau C, Huguet F, Piriou A: Gentamicin-induced kidney damage and lipid peroxidation in rats. *Toxicol Lett* 1995;76:127-134.
161. Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos O, Maldonado PD, Olivares-Corichi I, Ibarra-Rubio ME: Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Mol Cell Biochem* 2001;216:9-19.
162. George KC, Eapen J: Mode of action of garlic oil-effect on oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria of mice. *Biochem Pharmacol* 1974;23:931-936