



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DEL SULFORAFANO EN LA MUERTE  
CELULAR INDUCIDA POR CISPLATINO EN CULTIVO DE  
CÉLULAS RENALES.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**MARIEL CALDERÓN OLIVER**



**MÉXICO, D.F.**

**2009**



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:**

**PRESIDENTE:** M. en C. Lucía Cornejo Barrera

**VOCAL:** Dr. José Pedraza Chaverri

**SECRETARIO:** Dra. María Elena Ibarra Rubio

**1er. SUPLENTE:** Dr. Francisco Ruiz Terán

**2° SUPLENTE:** Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO 209, EDIFICIO F, SEGUNDO PISO. DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA.  
FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM

ESTA TESIS FUE FINANCIADA EN PARTE POR CONACYT PROYECTO # 102442

---

**ASESOR**

**DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**

---

**SUPERVISOR TÉCNICO**

**DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ**

---

**SUSTENTANTE**

**MARIEL CALDERÓN OLIVER**

---

---

**A mi mama Silvia.  
Por su apoyo físico y emocional en todo momento.  
Por estar siempre ahí, a mi lado.  
Por luchar juntas.  
Por la confianza.  
Por darme la vida y compartir momentos inolvidables.  
TE QUIERO MUCHO!!!!.**

---

---

## **AGRADECIMIENTOS:**

A la UNAM y a la facultad de química por ser mi segunda casa a lo largo de este tiempo, por todas las facilidades que me dio para completar mi formación profesional.

A mi hermano David y mi amigo Jorge Omar por ser mis cómplices de toda la vida y por estar ahí siempre que los necesito.

A mis amigos de primer semestre Gabriela, Roberto Alejandro y Nancy por ser las primeras amistades de valor durante mi estancia en la facultad, así como un gran apoyo personal y académico durante estos cinco años de arduo trabajo y estudio. Son unos grandes amigos y personas!!!.

A mis amigos de carrera y/o facultad, en especial Itzia, Ileri, Betty, Cinthya, Alexis, Ania, Grecia, Zaine, Luis Humberto, Viridiana, Luis Alberto; a cada uno de ustedes gracias por su tiempo, consejos y apoyo, por estar a mi lado siempre que los necesite, por las largas tardes de pláticas y las noches de desvelo, por experimentar conmigo cosas nuevas e interesantes y en cierta manera contribuir en una parte de mi carácter. Es un placer haberlos conocido!!!.

A mis compañeros del laboratorio 209 por la ayuda y los consejos en la elaboración de esta tesis. A Laura, Omar, Jazmín, Mabel, Enrique, Arelly y en especial a Eduardo Molina por todo el apoyo técnico, tiempo y por los todos los momentos padres que pasamos juntos!!!. Lab. 209 son un gran equipo de ATP, NADPH y NADH.

Al Dr. José Pedraza e Irasema por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación y por la paciencia en la elaboración de este trabajo.

A la M. en C. Lucía Cornejo, Dra. Ma. Elena Ibarra, Dr. Francisco Ruíz y Dra. Perla Maldonado, por ser parte de mi jurado revisor, por su orientación y redacción de la tesis.

Al personal docente de la facultad por contribuir a su manera y modo en mi formación como química de alimentos.

A Dios y a la vida por dejarme llegar tan lejos, por forjar lo que soy ahora.

Esta tesis simboliza el cierre de una etapa exitosa y de las más hermosas de mi vida. Una etapa en donde viví nuevas experiencias. Donde aprendí mucho, no solo como perseguir a un electrón o predecir una reacción química, sino que aprendí el valor de una amistad, de una sonrisa, de un fracaso, el significado de un desvelo, de amar a alguien como nunca, de vivir intensamente, de luchar por un sueño que parecía imposible y lejano. Cada uno de ustedes participo a su manera en muchas de éstas agradables experiencias. Gracias por compartir parte de su camino con el mío.

Por mi raza hablará el espíritu....GOOYA GOOYA.....!!!!

---

---

**EFFECTO DEL SULFORAFANO EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR  
CISPLATINO EN CULTIVO DE CÉLULAS RENALES.**

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
ABREVIATURAS.....	6
1. RESUMEN .....	8
2. INTRODUCCIÓN .....	9
2.1 Cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II).....	9
2.1.1 Mecanismo de acción.....	10
2.2 Estrés oxidante .....	11
2.3 Evidencias de la participación del estrés oxidante en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino .....	13
2.4 Sulforafano .....	15
2.5 Funciones antioxidantes del sulforafano.....	16
2.5.1 Mecanismo de acción del sulforafano como antioxidante (inductor de enzimas citoprotectoras) .....	16
2.5.2 Evidencia del sulforafano como antioxidante .....	17
3. JUSTIFICACION .....	19
4. HIPÓTESIS .....	19
5. OBJETIVOS .....	19
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
6. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	20
6.1 Diagrama de trabajo .....	20
6.2 Reactivos .....	21
6.3 Cultivo de células.....	21
6.4 Determinación de la viabilidad celular .....	22
6.4.1 Método de MTT .....	22
6.5 Evaluación del efecto del sulforafano en la viabilidad celular .....	22
6.6 Evaluación del efecto de cisplatino en la viabilidad celular.....	23
6.7 Evaluación del efecto del sulforafano sobre la toxicidad inducida por cisplatino.....	23
6.8 Análisis estadístico .....	23
7. RESULTADOS .....	24
7.1 Evaluación del efecto del sulforafano en la viabilidad celular .....	24
7.2 Evaluación del efecto de cisplatino en la viabilidad celular.....	24
7.3 Evaluación del efecto del sulforafano sobre la toxicidad inducida por cisplatino.....	27
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	29
9. CONCLUSIÓN .....	31
10. PERSPECTIVAS.....	31
11. REFERENCIAS.....	32

---

---

## ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria al 50%
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
LLCPK1	Células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo.
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical anión superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
GPx	Glutación peroxidasa
GRS	Glutación reductasa
GST	Glutación S-transferasa
RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Radical peroxilo
RO <sup>•</sup>	Radical alcoxilo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno singulete
O <sub>3</sub>	Ozono
ONOO <sup>-</sup>	Anión peroxinitrito
SOD	Superoxido dismutasa
HO-1	Hemo oxigenasa 1
NQO1	NAD(P)H quinona oxidoreductasa
Nrf2	Siglas en inglés de “NF-E2-related factor-2”
Keap1	Siglas en inglés del sensor químico “Kelch-like ECH-associated protein 1”
ARE	Siglas en inglés de la secuencia de activación de

---

---

	transcripción "Antioxidant response elements"
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
DMSO	Dimetil sulfóxido
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
SFB	Suero fetal bovino
DMEM	Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle
LDH	Lactato deshidrogenasa
SDH	Succinato deshidrogenasa
EEM	Error estándar de la media

---

---

## 1. RESUMEN

El sulforafano es un isotiocianato que resulta de la hidrólisis del glucosinolato llamado glucorafanina, el cual está presente en los vegetales de la familia *Cruciferae* particularmente del género *Brassica* como el brócoli. Se ha demostrado tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* que el sulforafano es un antioxidante indirecto, es decir, que activa la transcripción de genes de respuesta al estrés oxidante, las cuales detoxifican especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO pueden ocasionar daños en el ADN, proteínas y, lípidos de membrana.

El cisplatino es un fármaco que se usa en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, pero su principal efecto secundario es la nefrotoxicidad, la cual está asociada a la producción de ERO. Por lo tanto, si el sulforafano presenta capacidad antioxidante, podría prevenir el daño celular y la producción de ERO inducidas por cisplatino. Con base en lo anterior se consideró como objetivo principal de este trabajo, estudiar el efecto del sulforafano sobre la toxicidad inducida por cisplatino en células epiteliales de túbulo proximal de cerdo (LLC-PK1). Para alcanzar dicho objetivo, se evaluó el efecto tóxico tanto del cisplatino como del sulforafano en células LLC-PK1 determinando la viabilidad celular mediante el método de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Posteriormente se evaluó el efecto del sulforafano sobre la toxicidad inducida por cisplatino, para lo cual las células se preincubaron con sulforafano a diferentes concentraciones seguido de la exposición de las células a cisplatino, midiendo la reducción de MTT.

El cisplatino disminuyó la viabilidad celular de forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, siendo 40  $\mu\text{M}$  durante 24 horas la concentración en la que el cisplatino disminuye la viabilidad en un 50%. Por otra parte, el sulforafano *per se* no altera la viabilidad celular cuando las células se exponen a concentraciones menores a 10  $\mu\text{M}$  y protegió contra la muerte celular inducida por cisplatino de manera dependiente de la concentración. El mayor efecto protector se observó cuando las células se preincubaron con sulforafano a una concentración de 0.8  $\mu\text{M}$  durante 24 horas.

---

---

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Cisplatino (*cis-diaminodicloroplatino II*)

El cisplatino es un compuesto inorgánico de coordinación formado por un átomo de platino rodeado por 2 átomos de cloro y 2 de amonio en posición *cis* (Fig. 1) (Ali y Al Moundhri et al., 2006). El cisplatino se sintetizó en 1845 por Michel Peryone en Turín, Italia y fue hasta 1892, en Zurich, Suiza, cuando Alfred Werner determinó su configuración (Daugaard y Abildgaard, 1989). Este compuesto forma parte de la familia de fármacos antineoplásicos debido a su actividad citotóxica, la cual se reportó por primera vez en 1969 por Barnett Rosenberg en la Universidad de Michigan (Rosenberg et al., 1969).

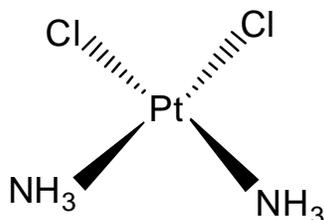


Figura 1. Estructura química del cisplatino.

Como antineoplásico es ampliamente utilizado para el tratamiento de tumores sólidos de vejiga, testículo, ovario, pulmón, esófago, cuello y cabeza (Lebwohl y Canetta, 1998). Sin embargo, la nefrotoxicidad es el efecto secundario más importante y se presenta en aproximadamente 25-30% de los pacientes que reciben el tratamiento (Daugaard y Abildgaard, 1989).

Los daños en el funcionamiento renal por cisplatino se manifiestan por cambios en el volumen de orina, depuración de creatinina, incremento en la lipoperoxidación y formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), como el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ). Las ERO producidas por el cisplatino ocasionan daño celular, desnaturalización de proteínas y del ADN (Kim et al., 1997; Mora et al., 2003). El cisplatino disminuye la concentración de glutatión reducido (GSH) y de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH), así como la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRS) (Kuhlmann et al., 1997; Santos et al., 2007); lo que sugiere que la

toxicidad inducida por cisplatino está asociada con el estrés oxidante (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009).

El cisplatino induce daño en la mitocondria, detiene el ciclo celular en la fase G2; inhibe la actividad de los complejos I, II, III y IV de la fosforilación oxidativa provocando una disminución en la síntesis de ATP. Como consecuencia del daño a túbulos proximales en riñón causado por la acumulación de cisplatino, la reabsorción de electrolitos como el sodio disminuye y aumenta la excreción de agua. Además, el cisplatino puede causar apoptosis, inflamación, necrosis y muerte celular (Boulikas y Vougiouka, 2003; Jo et al., 2005; Taguchi et al., 2005).

### 2.1.1 Mecanismo de acción

El cisplatino entra en la células por medio de transportadores de cationes orgánicos hOCT2 (Kuo et al., 2007; Hall et al., 2007; Kelland, 2007). La molécula de cisplatino pierde los cloruros y son reemplazados por moléculas de agua generando una estructura con carga positiva capaz de reaccionar con el nitrógeno de la posición 7 de la guanina en el ADN (Fig. 2). También pueden formarse enlaces cruzados entre el platino y guaninas adyacentes (Jamieson y Lippard, 1999). El cisplatino puede reaccionar con proteínas formando enlaces cruzados tanto intracatenarios como intercatenarios. Los aductos formados entre el cisplatino y la guanina inhiben la replicación y la transcripción del ADN (Kelland, 2007).

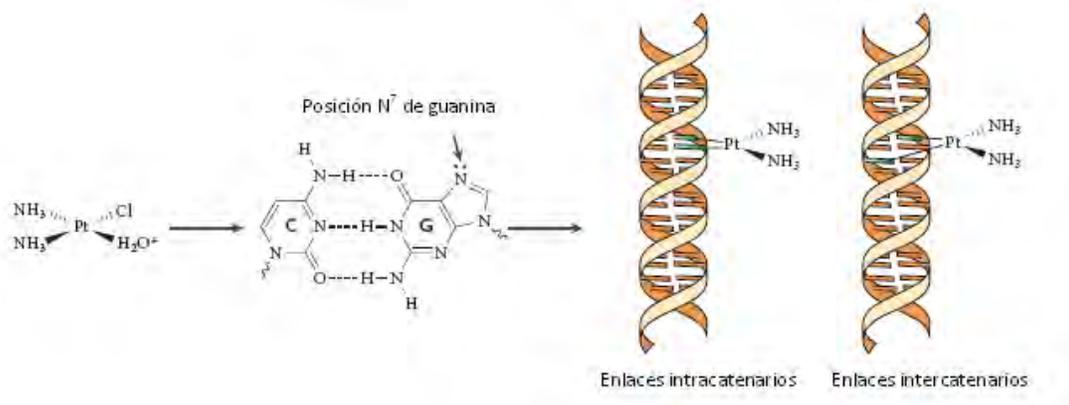


Figura 2. Formación de aductos del cisplatino con el ADN (Kelland, 2007).

La nefrotoxicidad es un evento secundario a la acumulación de cisplatino en los riñones, específicamente en los segmentos S3 de los túbulos proximales (Daugaard y Abidgaard, 1989). El mecanismo por el cual el cisplatino produce nefrotoxicidad está asociado al estrés oxidante y nitrante (Xiao et al., 2003; Ali y Al Moundhri, 2006; Chirino et al., 2004; Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009).

## 2.2 Estrés oxidante

El estrés oxidante se puede definir como un desequilibrio entre las defensas antioxidantes y la producción de ERO (Betteridge, 2000) las cuales se forman a partir de la adición sucesiva de electrones a la molécula de oxígeno produciendo especies parcialmente reducidas de este compuesto (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006)(Fig. 3).

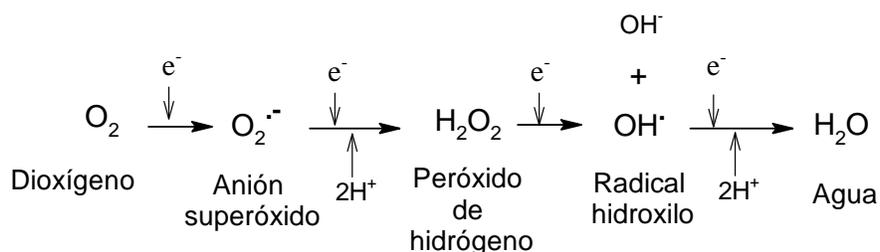


Figura 3. Formación de ERO

Lo anterior se debe a un aumento en la producción de ERO o bien, una disminución en los sistemas antioxidantes o de reparación, o una combinación de estos factores (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). La expresión “especies reactivas de oxígeno” es un término colectivo que involucra no sólo los radicales libres derivados del oxígeno ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^\cdot$ , peróxido  $\text{RO}_2^\cdot$ , alcóxido  $\text{RO}^\cdot$ ), sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular del oxígeno y que además son muy reactivos como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), ozono ( $\text{O}_3$ ) y anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). En la tabla 1, se explica la formación de algunas ERO producidas por cisplatino y sus características.

El estrés oxidante provoca la fragmentación del ADN, daño oxidante en bases nitrogenadas del ADN; lipoperoxidación generando moléculas citotóxicas como malondialdehído. Además altera la fluidez en la membrana celular y pérdida en

la capacidad catalítica de proteínas por rompimiento de los enlaces peptídicos y por oxidación de residuos de proteínas.

TABLA 1. Características de algunas ERO producidas por cisplatino.

Especie reactiva de oxígeno	Formación	Características
Anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	Reducción univalente del oxígeno (cuando el oxígeno acepta un electrón). Las enzimas que catalizan esta reacción son NADPH oxidasa y xantina oxidasa.	Es inestable. Participa en la descarga respiratoria de las células fagocíticas activadas por contacto con partículas extrañas en la respuesta inmunológica y tiene la capacidad de reaccionar con lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1999).
Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	Se forma por la enzima superóxido dismutasa (SOD) al catalizar la reacción de reducción de $O_2^{\bullet-}$ .	Es un oxidante importante en las células de los organismos aerobios y es lipofílico (Eberhardt, 2001).
Radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ )	Reducción univalente del oxígeno. Reacción de Haber-Weiss entre $O_2^{\bullet-}$ y $H_2O_2$ . Reacción de Fenton donde interviene el hierro.	Especie oxidante muy dañina. Alta reactividad y vida media corta. Tiene la capacidad de reaccionar con ADN, proteínas y lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Por otro lado un antioxidante es una sustancia que retarda, previene o remueve el daño oxidante a una molécula blanco, éstos pueden ser proteínas que abaten la disponibilidad de agentes prooxidantes por ejemplo la ferritina y transferrina; enzimas antioxidantes como SOD, catalasa y GPx; proteínas que protegen biomoléculas y agentes de bajo peso molecular que atrapan ERO como glutatión,  $\alpha$ -tocoferol, bilirrubina y vitamina C (Tabla 2).

TABLA 2. Algunos agentes antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Agente antioxidante	Reacción que realiza
Superóxido dismutasa (SOD)	Conversión de $O_2^{\bullet-}$ a $H_2O_2$ .
Glutación peroxidasa (GPx)	Reducción de peróxidos empleando dos moléculas GSH, obteniendo agua y glutación oxidado (GSSG)
Glutación reductasa (GRS)	Reducción de GSSG a GSH
Glutación S-transferasa (GST)	La conjugación de GSH con una gran cantidad de compuestos orgánicos.  Reducción de hidroperóxidos de lípidos.
Hemo oxigenasa (HO-1)	Degradación del grupo hemo proveniente de las hemoproteínas produciendo biliverdina (antioxidante), monóxido de carbono y hierro.
Vitamina C	Acepta electrones y reacciona con el $O_2^{\bullet-}$ y el $OH^{\bullet}$ .
Vitamina A	Reacciona con el $^1O_2$ y el $OH^{\bullet}$ .
Vitamina E	Interrumpe la lipoperoxidación en la fase de propagación.

### ***2.3 Evidencias de la participación del estrés oxidante en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino***

El cisplatino forma ERO por diferentes mecanismos, uno de ellos es la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como GPx, GST y SOD (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009) lo que contribuye al aumento del estrés oxidante. Otro mecanismo de formación de ERO por el cisplatino es el reportado por Baliga y colaboradores (1998) donde demostraron que al exponer células LLC-PK1 con cisplatino (670  $\mu$ M) se observaba un aumento de la concentración hierro en el medio, el cual cataliza la reacción de Fenton para la formación de  $OH^{\bullet}$ , sin embargo, cuando utilizaron sustancias atraparoras de

---

---

OH<sup>\*</sup> como dimetil sulfóxido, manitol y ácido benzoico, se disminuyó la concentración de éste radical y por lo tanto la toxicidad en las células.

Asimismo se ha demostrado que el cisplatino genera O<sub>2</sub><sup>\*-</sup> y que éste efecto se puede inhibir utilizando algunos antioxidantes como vitamina C o aumentando la actividad de SOD (Masuda et al., 1994).

En otros estudios realizados *in vivo* se ha determinado que el cisplatino administrado a ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley en dosis 7 mg/kg vía intraperitoneal, induce daño renal, que se manifestó por un incremento en la concentración creatinina y de nitrógeno de urea en sangre (Atessahin et al., 2005). Además este mismo grupo de investigación reportaron un aumento en la concentración de malondialdehído (un marcador de lipoperoxidación) y una disminución en la concentración de las enzimas antioxidantes como GPx y catalasa, las cuales se determinaron por medio de reacciones acopladas a la desaparición de NADPH y por la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente. El efecto nefrotóxico del cisplatino se aminoró en ratas tratadas previamente con el antioxidante natural licopeno (4 mg/kg) (Atessahin et al., 2005). En este estudio se observó histológicamente que el cisplatino ocasionó necrosis en el túbulo proximal de las células (Atessahin et al., 2005). Este mismo efecto se describió por Matsushima y colaboradores (1998) donde se administró cisplatino 5 mg/kg vía intravenosa en ratas macho Sprague-Dawley, en las que se observó daño tubular renal mismo que disminuyó cuando se les trató con dimetiltiourea, un atrapador de OH<sup>\*</sup> (500 mg/kg intraperitoneal, 1 hora antes del cisplatino y 125 mg/kg cada 2 horas después del cisplatino) o con SOD lecitinizada (3,000 U/kg por día, vía intravenosa) concluyendo que las ERO juegan un papel importante en el daño renal inducido por cisplatino.

Otro ejemplo en la disminución de la nefrotoxicidad de cisplatino mediante el uso de enzimas, es utilizando catalasa (100 U/mL), la cual se aplicó dos veces por 15 minutos en células terminales del túbulo proximal (S<sub>3</sub>), la cual disminuyó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tsumishita et al., 1998).

Se ha reportado en muchos experimentos *in vitro* que algunos antioxidantes y compuestos atrapadores de ERO previenen la toxicidad inducida por cisplatino

---

---

demostrando que ERO como  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^{\bullet}$  están involucrados en su toxicidad y en las alteraciones celulares.

También se han informado otros casos en los que algunos antioxidantes naturales como jugo de tomate con jugo de uvas, xanthorrhizol, flavonoides, goma arábica, capsaicina, vitaminas C, vitamina E y licopeno (Cetin et al., 2006; Kim et al., 2005, Totta et al., 2004, Al-Majed et al., 2003, Shimeda et al., 2005, Kadikoylu et al., 2004, Naziroglu et al., 2004, Gregg et al., 2000, Atessahin et al., 2005) han reducido o inhibido la nefrotoxicidad del cisplatino, ya que éstos disminuyen la lipoperoxidación y la producción de ERO.

#### **2.4 Sulforafano**

El sulforafano es un isotiocianato que resulta de la hidrólisis enzimática del glucosinolato llamado glucorafanina, la cual está presente en los vegetales de la familia *Cruciferae* especialmente los pertenecientes al género *Brassica* como el brócoli. Los glucosinolatos se encuentran a lo largo de toda la planta incluyendo raíz, tallo, hojas y semillas. La reacción de hidrólisis es catalizada por la enzima endógena mirosinasa también llamada  $\beta$ -D-tioglucohidrolasa, la cual se activa por la ruptura de la planta durante la postcosecha, procesamiento y/o masticación. Esta reacción puede dar varios productos dependiendo del pH (Fig. 4), sin embargo a pH neutro el isotiocianato es el producto mayoritario (Fahey et al., 1999, Shapiro et al., 2001). Es importante destacar que en roedores y humanos, en la ausencia de mirosinasa, la glucorafanina se convierte a sulforafano por acción de la flora intestinal (Shapiro et al., 1998).

El sulforafano se encuentra en brócoli fresco en concentraciones de 11.20-43.1 mg/100g (Galgano et al., 2007, Matusheski et al., 2001, Howard et al., 1997), pero su concentración antes de consumirse varía dependiendo del tiempo y método de cocción ya que un aumento en la cocción (9-15 min) trae como consecuencia la pérdida del 18-59% de glucosinolatos (McNaughton y Marks, 2003) ocasionando la disminución en el contenido de sulforafano.

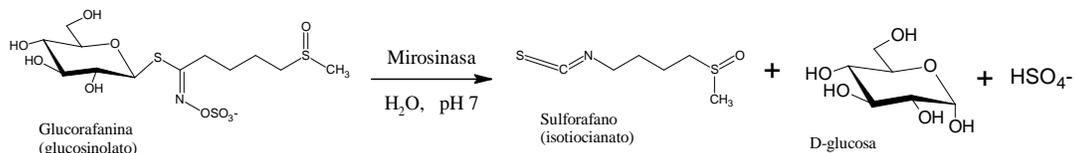


Figura 4. Reacción de hidrólisis de la glucorafanina. Formación del sulforafano.

## 2.5 Funciones antioxidantes del sulforafano

El sulforafano es un antioxidante indirecto, ya que el grupo isotiocianato no participa en reacciones de óxido-reducción en condiciones fisiológicas (Barton y Ollins, 1979). Se ha demostrado que la administración de sulforafano aumenta la capacidad antioxidante para disminuir el estrés oxidante en cultivos celulares (Fahey y Talalay, 1999). El sulforafano es un potente inductor de enzimas antioxidantes al incrementar la concentración GSH (Zhang y Talalay, 1994) y por estimular elementos de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés) así como enzimas de respuesta al estrés oxidante como glutatión transferasas, NAD(P)H: oxido quinona reductasa (NQO1) y HO-1; las cuales detoxifican carcinógenos potenciales como ERO (Yoon et al., 2008, Dinkova-Kostova y Talalay, 2008).

### 2.5.1 Mecanismo de acción del sulforafano como antioxidante (inductor de enzimas citoprotectoras)

El efecto citoprotector del sulforafano se debe a que disocia el complejo Keap1-Nrf2 (Kelch-like ECH-associated protein 1 y NF-E2-related factor-2). Al disociarse este complejo, Nrf2 se trasloca al núcleo (Zhang, 2006) y se une al promotor ARE (antioxidant response elements) induciendo así la transcripción de genes citoprotectores (Fig. 5) (Motohashi y Yamamoto., 2004, Kobayashi y Yamamoto., 2006).

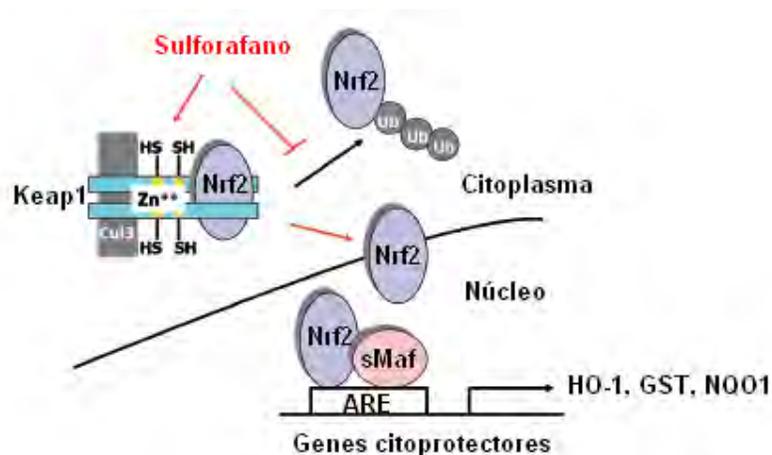


Figura 5. Mecanismo de inducción de genes citoprotectores debido al sulforafano (Dinkova-Kostova y Talalay, 2008).

El mecanismo de inducción de genes citoprotectores por el sulforafano anteriormente descrito se ha reportado en estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. Yoon y colaboradores (2008) encontraron que el pretratamiento con sulforafano (20  $\mu$ M por 12 horas) de las células HK2 (células epiteliales del túbulo renal) protegió a esta línea celular del daño por hipoxia-reoxigenación. Esta protección se asoció con la inducción de enzimas antioxidantes como NQO1, GRS, GPx y HO-1, debido al incremento de la translocación nuclear de Nrf2 y una disminución de los niveles de Keap1 en citoplasma. En este mismo trabajo se encontró que la administración de sulforafano (500  $\mu$ g/kg vía intravenosa) fue capaz de proteger del daño renal a ratas sometidas a isquemia reperusión, el cual produce un aumento de ERO. Lo obtenido sugiere que el sulforafano se puede usar como coadyuvante para prevenir el daño renal producido durante la isquemia-reperusión (el cual se da durante el trasplante de riñón).

### **2.5.2 Evidencia del sulforafano como antioxidante**

El sulforafano es un potente inductor *in vitro* de la enzima NQO1, GST, UDP-glucuroniltransferasa, y HO-1 en varias líneas celulares como HepG2 (hematoma de hígado humano), Hepa1c1c7 (hematoma de hígado de ratón) (Juge et al., 2007) ya que cuando las células Hepa1c1c7 se exponen a concentraciones crecientes de sulforafano por 24 horas, se observa un incremento de tres veces en la actividad de NQO1 con respecto al control (Matusheski y Jeffery. 2001), dicho efecto se observa también en células de

---

---

próstata humana (McMahon et al., 2003), y en células de vejiga (Zhang et al., 2006). Se ha informado que el efecto del sulforafano en la actividad de enzimas como GST, NQO1 y GRS varía dependiendo del tiempo, la concentración y la línea celular empleada (Jiang et al., 2003). También se ha demostrado que la inducción de enzimas antioxidantes debidas al sulforafano se da en altas y en bajas concentraciones, ya que ratas a las que se les administró dosis elevadas de sulforafano (más de 1000  $\mu\text{mol/kg/día}$  por 4-5 días) presentaron un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes en tejidos como hígado, pulmón, glándula mamaria, páncreas, estómago, intestino delgado y colon (Gerhauser et al., 1997; Zhang et al., 1992., Matusheski y Jeffery. 2001, Posner et al., 1994; Keck et al., 2002); aunque también dosis más bajas (40  $\mu\text{mol/kg/día}$ ) aumentaron significativamente la actividad de NQO1, GST total en próstata y vejiga en ratas (Jones y Brooks, 2006; Zhang et al., 2006). Lo que significa que el sulforafano al inducir la transcripción de enzimas antioxidantes disminuye el estrés oxidante en las células.

También se ha demostrado que el sulforafano induce la expresión y la actividad enzimática de GPx en células epiteliales de adenocarcinoma colorectal humanas Caco-2 (Banning et al., 2005). En estudios en humanos se ha encontrado que el alto consumo de vegetales del género Brassica aumenta la actividad enzimática de GST en plasma sanguíneo y por lo tanto disminuye el riesgo de padecer cáncer de hígado y de intestino (Bougaards et al., 1994; Petri et al., 2003).

---

---

### 3. JUSTIFICACION

Se ha demostrado que el sulforafano es un antioxidante indirecto pues al inducir la transcripción de genes de respuesta antioxidante es capaz de disminuir el estrés oxidante y el daño celular en varios modelos de estudio. Por otro lado, la generación de ERO forma parte del mecanismo por medio del cual el cisplatino ejerce sus efectos nefrotóxicos, por lo que la disminución en la formación de ERO podría prevenir, al menos en parte, el daño celular. Por lo anterior se espera que un tratamiento con sulforafano prevenga la toxicidad inducida por cisplatino.

### 4. HIPÓTESIS

El sulforafano prevendrá la disminución de la viabilidad celular causada por la exposición de células renales de túbulo proximal a cisplatino.

### 5. OBJETIVOS

#### 5.1 OBJETIVO GENERAL

🌿 Determinar el efecto protector del sulforafano en la toxicidad inducida por cisplatino en células epiteliales de túbulo proximal de cerdo (LLC-PK1).

#### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

🌿 Realizar una curva concentración-respuesta para evaluar la toxicidad del sulforafano en células LLC-PK1. Determinar las concentraciones de sulforafano a las cuales no se observe citotoxicidad en las células LLC-PK1.

🌿 Realizar una curva concentración-respuesta para encontrar la concentración a la cual el cisplatino produce el 50% de muerte celular (CI<sub>50</sub>).

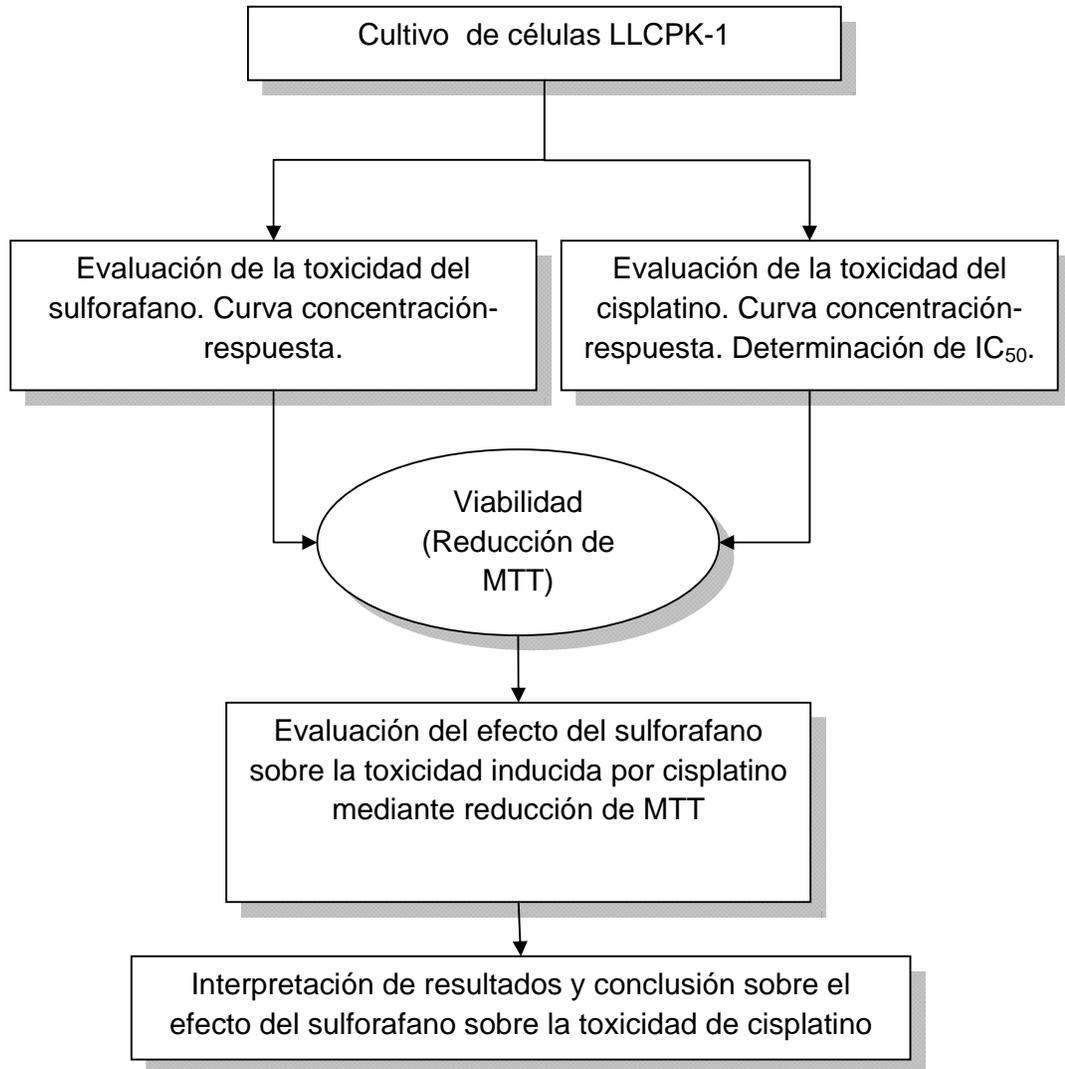
🌿 Determinar el tiempo y la concentración de preincubación del sulforafano en las células LLC-PK1 para estudiar si el sulforafano tiene efecto citoprotector sobre la toxicidad inducida por cisplatino.

---

---

## 6. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 6.1 Diagrama de trabajo



---

---

## 6.2 Reactivos

El cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II  $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ ) cat. no. P4394-1G lote 087K1349, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, y el dimetil sulfóxido (DMSO) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

El sulforafano cat. no. S8044, lote 26815401 se adquirió de LKT laboratorios (St. Paul, MN).

Las células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo (LLC-PK1) se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC) CAT. CRL-6509.

El medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), la tripsina TrypLE Express, el suero fetal bovino (SFB), el antibiótico/antimicótico (10,000 U/mL de penicilina G y 10,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de sulfato de estreptomina en 0.85% de sol. salina) se adquirieron de GIBCO (México D.F.).

El fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), el fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), el cloruro de sodio (NaCl) empleados en la solución buffer; así como el ácido clorhídrico y 2-isopropanol empleados para la técnica de MTT, se adquirieron de JT Baker (Xanostoc, Edo. de Mex.).

## 6.3 Cultivo de células

Las células LLC-PK1 se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico/antimicótico y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de  $\text{O}_2$  con 5% de  $\text{CO}_2$  en una incubadora RMI30005-9-ABA (Revco Termo Electron Corporation). Las células LLC-PK1 se subcultivaron tres veces por semana para lo cual se removió el medio y se les adicionó 2.5 mL de tripsina (Tryple Express) después se centrifugaron a 200xg por 3 minutos (centrífuga Megafuge 1.0-Heraeus). Se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1mL de DMEM con SFB al 10% para resuspender las células (Kawai et al., 2006).

Para el crecimiento de células se adicionaron 4 mL de DMEM con SFB al 10% y se cultivaron en cajas de 75  $\text{cm}^2$ . Cuando se sembraron células para experimento, se contaron las células en una Cámara de Neubauer y posteriormente se sembraron las células en placas de cultivo a una densidad de 40,000 células/ $\text{cm}^2$  por pozo. A las 24 horas cuando las células alcanzaron confluencia se eliminó el medio y se inició en tratamiento experimental.

---

---

## 6.4 Determinación de la viabilidad celular

### 6.4.1 Método de MTT

Este método es una modificación del procedimiento descrito por Mosmann (1983). El método se basa en la reducción de una sal de tetrazolio, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), por enzimas deshidrogenasas mitocondriales principalmente succinato deshidrogenasa (SDH) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Berriged y Tan, 1993) obteniendo formazán (la forma reducida del MTT) que se identifica por ser un precipitado color púrpura. (Fig. 6).

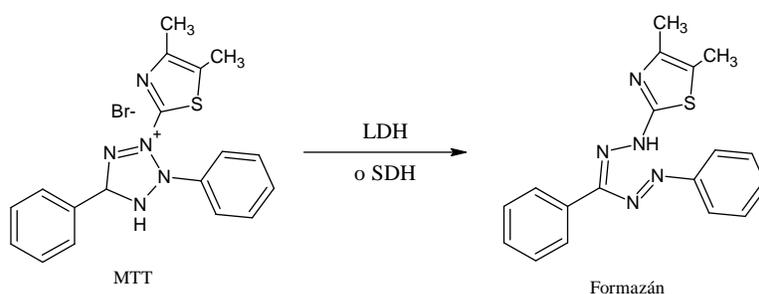


Figura 6. Reducción de MTT a formazán por medio de enzimas deshidrogenasas como lactato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa.

Después del tratamiento, a las células se les adicionó MTT en una concentración de 0.125 mg/mL disuelto en DMEM. Las células se incubaron durante una hora a 37°C. Pasado ese tiempo, se retiró el medio de cultivo y el formazán se disolvió con isopropanol ácido. La absorbancia se determinó a 570 nm. Los datos se expresaron como el porcentaje de la reducción del MTT haciendo referencia a las células sin tratar o control.

### 6.5 Evaluación del efecto del sulforafano en la viabilidad celular

Se realizó un estudio de toxicidad usando diferentes concentraciones de sulforafano (5-100  $\mu$ M). Se preparó una solución stock de sulforafano 0.1 M en DMSO y a partir de ésta se realizaron diluciones en medio DMEM. La viabilidad celular se determinó 24 horas después del tratamiento con sulforafano (Shinkai et al., 2006). Adicionalmente se determinó que la concentración de DMSO usada (menor a 0.01%) no afecta la viabilidad celular.

---

---

### **6.6 Evaluación del efecto de cisplatino en la viabilidad celular**

Se realizó un estudio de concentración-respuesta para lo cual se emplearon concentraciones de cisplatino de 0-50  $\mu$ M. El cisplatino se preparó en PBS a una concentración stock de 0.01M. La viabilidad celular se determinó a las 24 horas después de la exposición a cisplatino (Shino et al., 2006).

Para observar el efecto del tiempo sobre la toxicidad inducida por cisplatino en las células LLC-PK1, se realizó el tratamiento anteriormente descrito, variando los tiempos de incubación (1, 3, 6 y 24 horas).

### **6.7 Evaluación del efecto del sulforafano sobre la toxicidad inducida por cisplatino**

Las células se preincubaron con diferentes concentraciones de sulforafano (0-1  $\mu$ M durante 24 horas) y después se trataron con 40  $\mu$ M de cisplatino durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se determinó la viabilidad celular.

### **6.8 Análisis estadístico**

Los datos se expresaron como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM) y se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, seguido de una prueba de comparaciones múltiples Dunnet. Para ello se empleó el software estadístico PRISM3 (Graphphad Software, Inc. California). Las diferencias  $p < 0.05$  y  $p < 0.001$  se consideraron estadísticamente significativas.

---

---

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Evaluación del efecto del sulforafano en la viabilidad celular

La evaluación del efecto del sulforafano sobre la viabilidad de las LLC-PK1 se realizó como una prueba de toxicidad. El sulforafano no afecta la viabilidad de las células LLC-PK1 hasta una concentración de 10 $\mu$ M cuando se les incubaba durante 24 horas. Sin embargo, concentraciones superiores a 10  $\mu$ M de sulforafano se observa que disminuye la viabilidad celular significativamente ( $p < 0.001$ ). (Fig. 7).

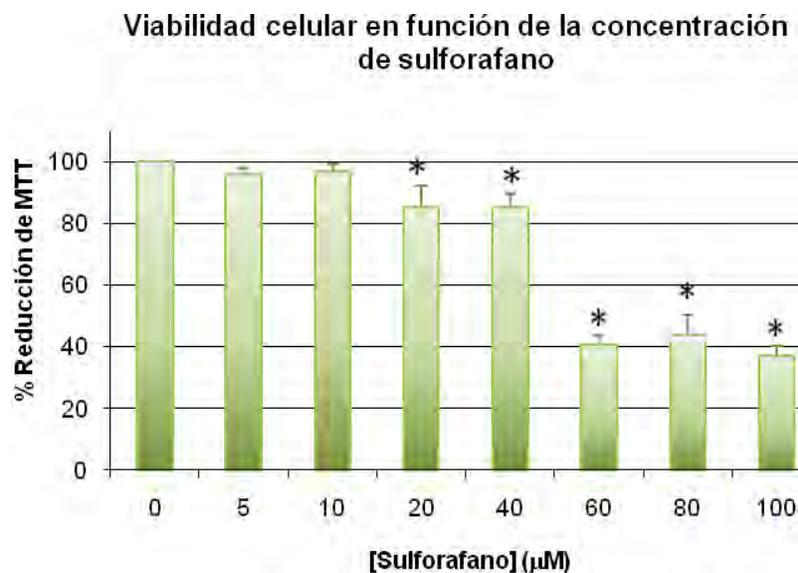


Figura 7. Evaluación del efecto del sulforafano en la viabilidad celular. Las células se incubaron con sulforafano durante 24 horas. Cada valor representa promedio  $\pm$  EEM,  $n=3-6$ . \* $p < 0.001$  vs control.

Con lo anterior se observa que el sulforafano es tóxico para las células LLC-PK1 en concentraciones mayores a 20  $\mu$ M cuando se incuban durante 24 horas con sulforafano. Debido a lo anterior, en experimentos posteriores se emplearon concentraciones por debajo de 20  $\mu$ M, de ésta manera se asegura que el antioxidante no induzca daño celular.

### 7.2 Evaluación del efecto de cisplatino en la viabilidad celular

Se realizó una curva de concentración-respuesta del cisplatino sobre la viabilidad de las células LLC-PK1. Tomando en cuenta estudios publicados previamente, que indican que la incubación de cisplatino en células LLC-PK1

durante 24 horas en concentraciones de 30-50  $\mu\text{M}$  disminuye la viabilidad celular (Shino et al., 2003; Kim et al., 2006), por lo que se evaluaron concentraciones de cisplatino de 0-50  $\mu\text{M}$  a diferentes tiempos de incubación. Se observa que la muerte celular por cisplatino es dependiente del tiempo y de la concentración de cisplatino (Fig. 8 y 9).

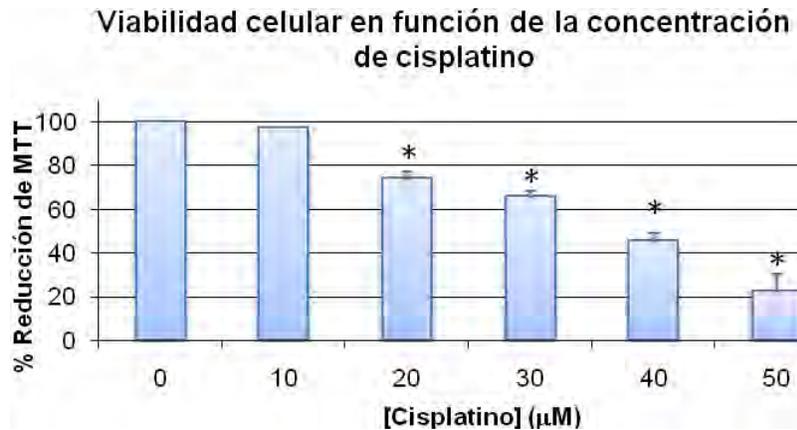


Figura 8. Evaluación del efecto del cisplatino en la viabilidad celular. Las células se incubaron con cisplatino durante 24 horas. Cada valor representa promedio  $\pm$  EEM,  $n=4-7$ . \* $p<0.001$  vs control.

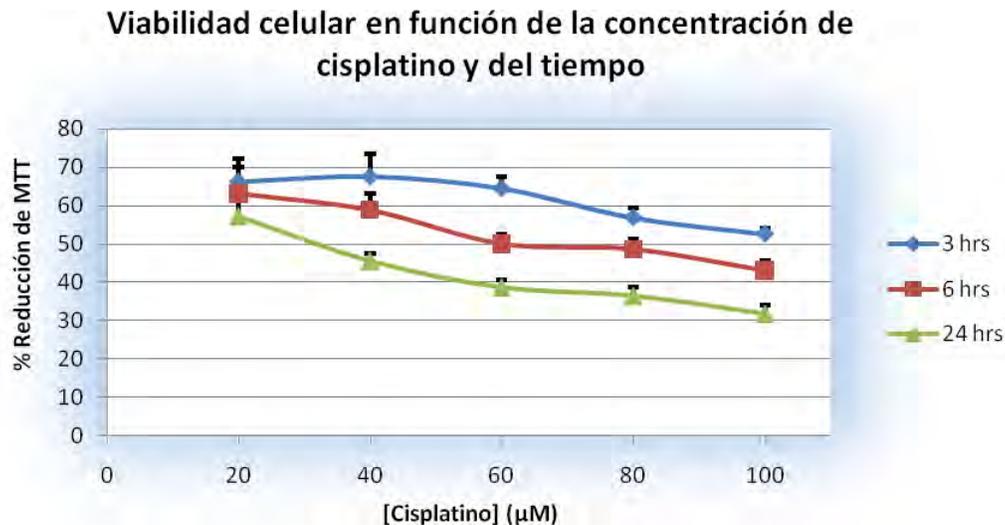


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de cisplatino a diferentes tiempos de incubación. Cada valor representa promedio  $\pm$  EEM,  $n=6$ .

De acuerdo a lo observado en las figuras 8 y 9, para experimentos posteriores se empleó la concentración de 40  $\mu\text{M}$  de cisplatino durante 24 horas de

incubación, ya que ésta fue la concentración y el tiempo a la que se observa 50% de muerte celular.

De las evaluaciones anteriores se tomaron micrografías representativas en campo claro, las cuales se muestran a continuación (Fig. 10).

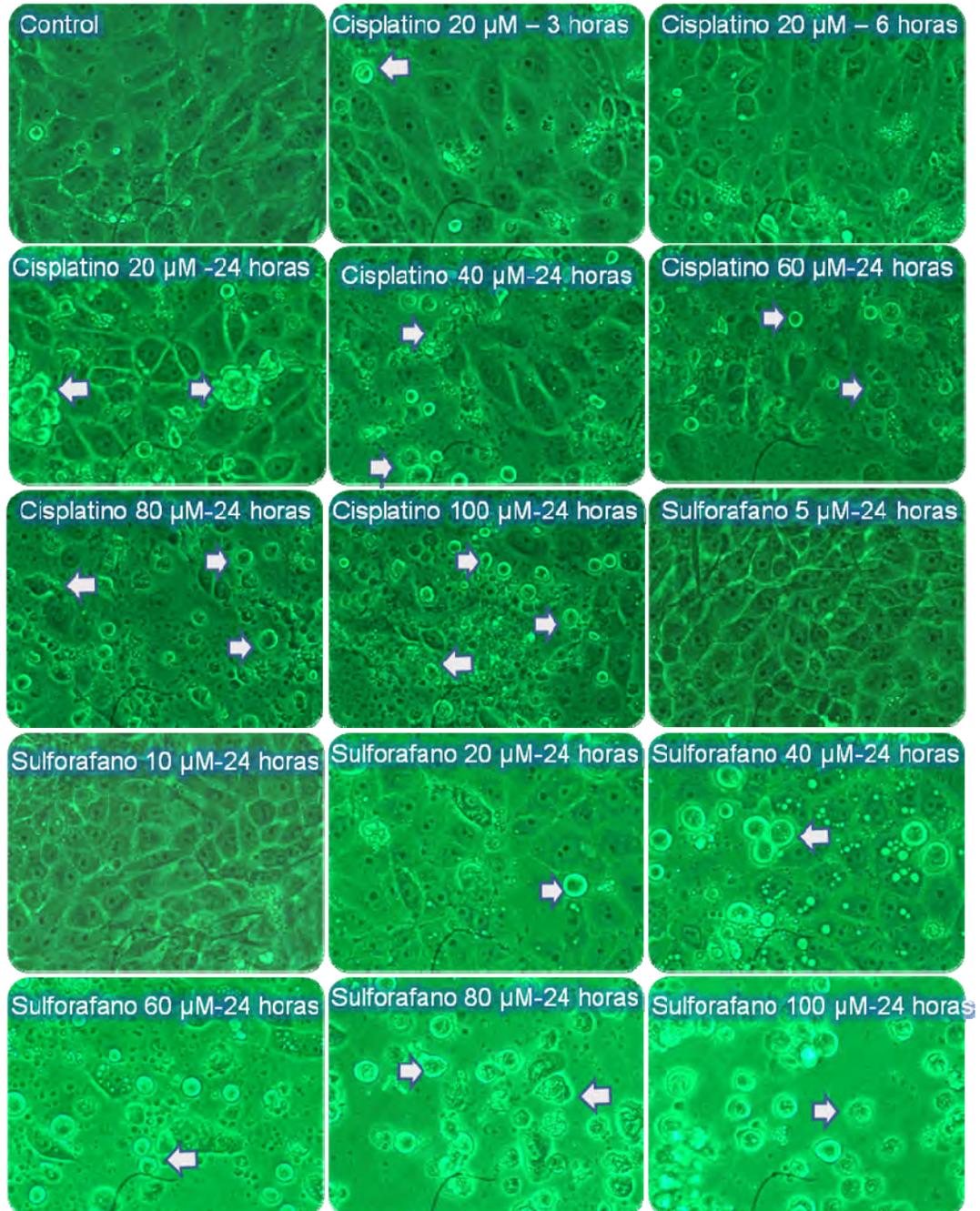


Figura 10. Efecto del cisplatino y del sulforafano a diferentes tiempos y concentraciones. Células no adheridas (→).

### 7.3 Evaluación del efecto del sulforafano sobre la toxicidad inducida por cisplatino

Las células se preincubaron con concentraciones de 0-1  $\mu\text{M}$  de sulforafano durante 24 horas y posteriormente se expusieron a 24 horas con cisplatino 40  $\mu\text{M}$ ; transcurrido ese tiempo se determinó viabilidad por MTT.

Se observa que el sulforafano previene del daño inducido por cisplatino de manera dependiente de la concentración, siendo significativa con  $p < 0.001$  y  $p < 0.01$  con respecto al tratamiento con cisplatino. En la tabla 3 se encuentran los porcentajes de protección del sulforafano determinados mediante la técnica de viabilidad por MTT.

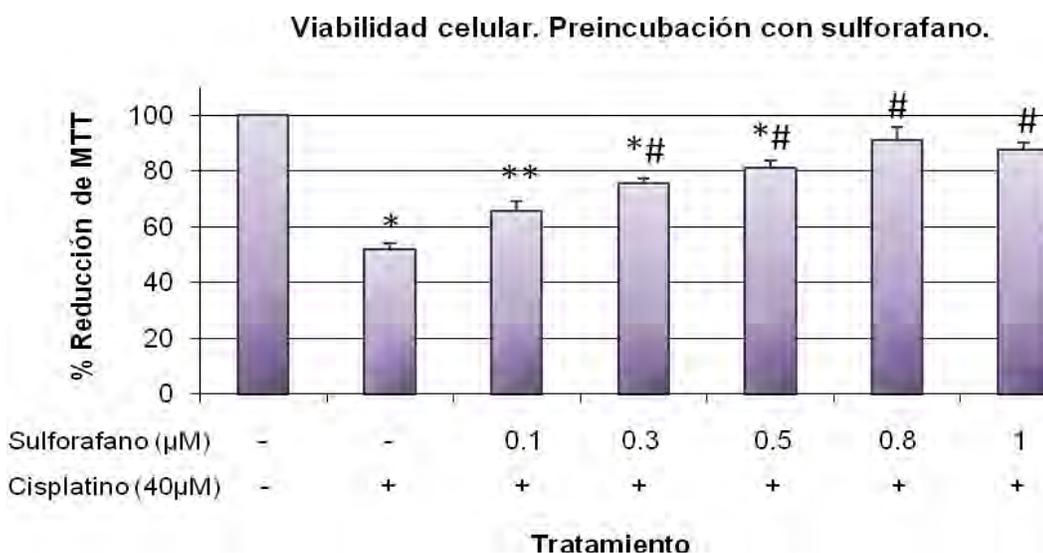


Figura 11. Evaluación del efecto del sulforafano sobre la toxicidad inducida por cisplatino. Las células se preincubaron con diferentes concentraciones de sulforafano durante 24 horas. Posteriormente se les incubó con 40  $\mu\text{M}$  de cisplatino durante 24 horas. Cada valor representa promedio  $\pm$  EEM,  $n=4-7$ . \* $p < 0.001$  vs Control, \*\*  $p < 0.01$  y #  $p < 0.001$  vs cisplatino.

Tabla 3. Porcentaje de protección del sulforafano (preincubación).

Concentración de sulforafano ( $\mu\text{M}$ )	% de protección
0.1	$28.24 \pm 3.4$
0.3	$49.09 \pm 1.6$
0.5	$61.01 \pm 2.4$
0.8	$81.13 \pm 4.8$
1	$74.27 \pm 4.6$

El efecto de protección del sulforafano también se evaluó microscópicamente (Fig. 12).

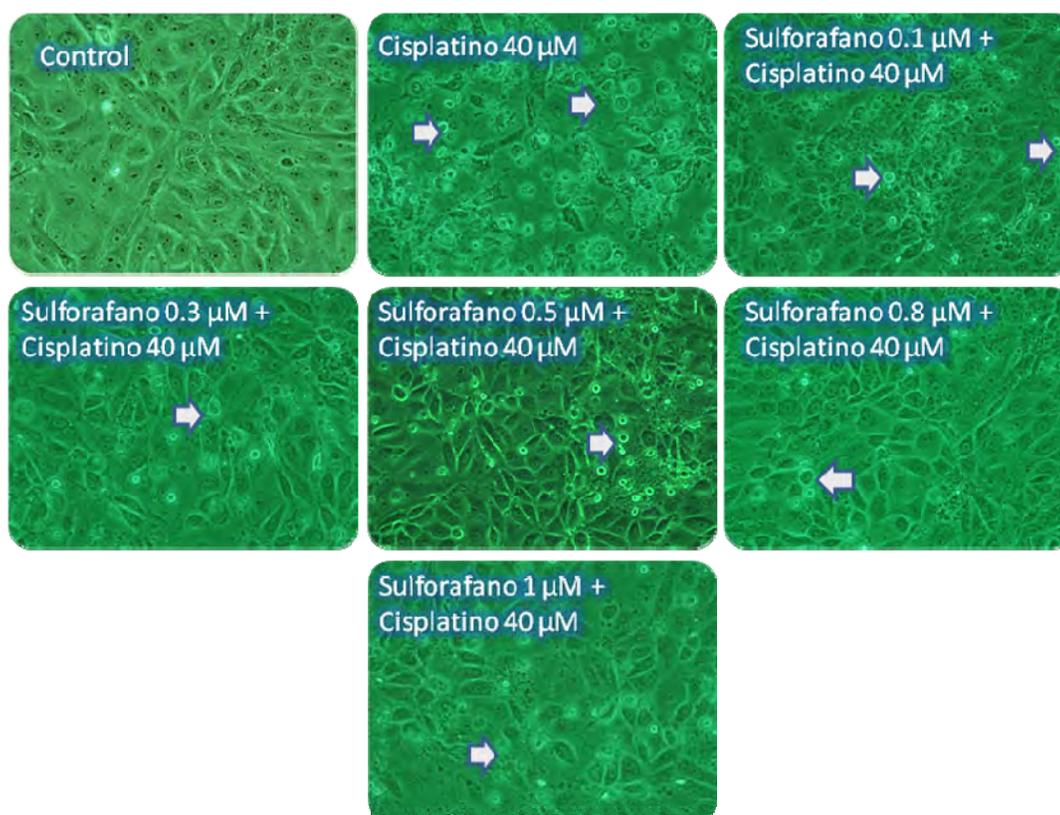


Figura 12. Efecto del sulforafano sobre la toxicidad de cisplatino. Las células se preincubaron durante 24 horas con diferentes concentraciones de sulforafano, después se incubaron con cisplatino  $40\mu\text{M}$  durante 24 horas. Células no adheridas ( $\rightarrow$ ).

---

---

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cisplatino es un agente antineoplásico ampliamente usado debido a su efectividad contra una gran variedad de tumores sólidos. Sin embargo, la nefrotoxicidad es el principal efecto secundario, lo que ha limitado su uso (Davis et al., 2001). El mecanismo por el cual el cisplatino induce nefrotoxicidad no está completamente descrito, pero existen evidencias que sustentan la participación de ERO en el daño. Actualmente se sabe que el cisplatino es nefrotóxico debido a que se acumula en el riñón al entrar a la células del túbulo proximal a través de transportadores de cationes orgánicos conocidos como hOCT2 (Ciarimboli et al., 2005). La formación de ERO por el cisplatino es, en parte, debida a la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, GPx y GR, las cuales catalizan reacciones de disminución en la reactividad de las ERO. El cisplatino disminuye la actividad de los complejos I-IV en la mitocondria lo que provoca una disfunción en éste organelo y por lo tanto la producción de ERO como  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$ ,  $O_2^\cdot$ . La formación de ERO en las células se observa en las primeras etapas del daño celular, provocando modificaciones en aminoácidos, proteínas, lípidos y muerte celular.

Weiner y Jacobs (1983) reportaron que el segmento S3 del túbulo proximal renal que se encuentra en la corteza renal, es donde se produce el mayor daño inducido por cisplatino. Por lo tanto en este estudio se utilizaron las células LLC-PK1 para evaluar la toxicidad de cisplatino, ya que tienen características de túbulo proximal renal.

En este estudio se realizó una evaluación de concentración respuesta del cisplatino en las células LLC-PK1 encontrando que el cisplatino produce una disminución en la viabilidad celular, la cual es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición (Fig. 8 y 9). Esto se ha demostrado anteriormente por varios investigadores como Shino y colaboradores (2003) y por Kim y colaboradores (2006) en la misma línea celular donde a diferentes concentraciones y tiempo de exposición con cisplatino la viabilidad celular disminuye, demostrando también que esta disminución está asociada a la producción de ERO como  $OH^\bullet$ .

---

---

Se han propuesto diferentes estrategias para disminuir la toxicidad del cisplatino, como el consumo de vitaminas (Naziroglu et al., 2004) y de alimentos que contengan antioxidantes como el resveratrol presente en la uva (Cetin et al., 2006). Por lo tanto, es muy atractiva la idea de desarrollar nuevas estrategias que disminuyan el estrés oxidante ocasionado por cisplatino u otros compuestos, mediante el consumo de alimentos de la dieta. Estudios epidemiológicos han demostrado que los vegetales del género *Brassica* como el brócoli tienen un papel protector contra muchos tipos de cáncer (Van Poppel et al., 1999), ya que contienen glucosinolatos que al ser hidrolizados originan productos que inducen la activación de los elementos de respuesta antioxidante (Van Poppel et al., 1999) como la inducción en la transcripción de genes que codifican para enzimas que disminuyen ERO, y por lo tanto podrían disminuir la toxicidad del cisplatino. Tal es el caso del sulforafano, un isotiocianato que resulta de la hidrólisis enzimática de la glucorafanina (Fahey et al., 1999). La glucorafanina está presente principalmente en el brócoli (Kushad et al., 1999). Se ha demostrado que el sulforafano además de inducir la transcripción de enzimas antioxidantes presenta otros mecanismos de acción como la inhibición del citocromo P450, activación de vías apoptóticas, inhibición de vías inflamatorias y la supresión del ciclo celular (Higdon et al., 2007, Fimognari and Hrelia, 2007, Juge et al., 2007), sin embargo, a altas concentraciones ocasiona muerte celular, efecto que se observó cuando las células LLC-PK1 se incubaron con sulforafano a concentraciones mayores a 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 7). En este trabajo se demostró que el sulforafano disminuye la toxicidad inducida por cisplatino de manera significativa ( $p < 0.05$ ), ya que se encontró una protección del 81.13% cuando las células se preincubaron con 0.8  $\mu\text{M}$  de sulforafano (tabla 3). Se sabe que el sulforafano es un inductor de la vía Nrf2, la cual activa la transcripción de genes de respuesta antioxidante que se traducen en enzimas como HO-1, GPX, NQO-1 y GR (Yoon et al., 2008), las cuales catalizan reacciones de descomposición y eliminación de ERO. Probablemente éste sea parte del mecanismo por el cual el sulforafano previene la disminución en la viabilidad celular de las células LLC-PK1 cuando son expuestas a cisplatino.

---

---

## 9. CONCLUSIÓN

- 🌱 El sulforafano protege de manera dependiente de la concentración a las células LLC-PK1 del daño inducido por cisplatino.

## 10. PERSPECTIVAS

- 🌱 Investigar el mecanismo por el cual el sulforafano protege a las células LLC-PK1 de la toxicidad inducida por cisplatino midiendo la expresión de enzimas de respuesta a estrés oxidante.
- 🌱 Estudiar si este efecto de protección del sulforafano sobre la toxicidad por cisplatino es por la disminución de especies reactivas de oxígeno.

---

---

## 11. REFERENCIAS

Al-Majed AA, Abd-Allah AR, AL-Rikabi AC, Al-Shabanah OA, Mostafa AM. 2003. Effect of oral administration of Arabic gum on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17:146-153.

Ali BH, Al Moundhri MS. 2006. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. *Food Chem Toxicol.* 44: 1173-1183.

Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A. 2005. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology.* 212: 116-123.

Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. 1998. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* 53:394-401.

Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, Brigelius-Flohé R. 2005. The G1-Gpx gene is a target for Nrf2. *Mol. Cell Biol.* 25:4914-4923.

Barton D, Ollis WD. 1979. *Comprehensive Organic Chemistry: The synthesis and reactions of organic compounds.* Vol. 3, pp 461-477. Pergamon. New York.

Berridge MV, Tan A. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), subcellular localization, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem. Biophys.* 303 (2): 474-482.

Betteridge DJ. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism.* 49 (2 suppl 1):3-8.

Boulikas T, Vougiouka M, 2003. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review). *Oncol. Rep.* 10:1663–1682.

Bougaards JJ, Verhagen H, Willems MI, van Poppel G, van Bladeren PJ. 1994. Consumption of brussels sprouts results in elevated alpha-class glutathione S-transferase levels in human blood plasma. *Carcinogenesis* 15 (5):1073-1075.

Cardenas-Rodriguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química.* Vol.12 Pp: 164-173.

Cetin R, Devrim E, Kiliçoğlu B, Avci A, Candir O, Durak I. 2006. Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues: possible protective roles of natural antioxidant foods. *J Appl Toxicol;* 26(1):42-6.

---

---

Chirino YI, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J. 2004. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol.* 4:20.

Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. 2009. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol.* 61(3):223-242.

Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ, Haier J, Jaehde U, Zisowsky J, Schlatter E. 2005. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol.* 167(6):1477-1484.

Daugaard G, Abildgaard U. 1989. Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 25:1-9.

Davis CA, Nick HS, Agarwal A. 2001. Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol.* 12(12):2683-2690.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P. 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (Suppl 1):5128-5138.

Eberhardt MK. 2001. Reactive oxygen metabolites. Chemistry and medical consequences. CRC Press. Florida. USA

Fahey JW, Talalay P. 1999. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes. *Food Chem. Toxicol.* 37(9-10): 973-979.

Fimognari C, Hrelia P. 2007. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutat Res.* 635(2-3):90-104.

Galgano F, Favati F, Caruso M, Pietrafesa A, Natella S. 2007. The influence of processing and preservation on the retention of health-promoting compounds in broccoli. *J Food Sci.* 72(2):S130-5.

Gerhausser C, You M, Liu J, Moriarty RM, Hawthorne M, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. 1997. Cancer chemopreventive potential of sulforafane, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.* 57 (2): 272-278.

Greggi Antunes LM, Darin JP, Bianchi MD. 2000. Protective Effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacol Res.* 41(4):405-411.

Hall MD, Okabe M, Shen DW, Liang XJ, Gottesmann MM. 2007. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48:495-535.

---

---

Halliwell B, Gutteridge M. 1999. Free Radicals in biology and medicine. Oxford University Press. Nueva York. USA.

Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH. 2007. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacol Res.* 55(3):224-236.

Howard LA, Jeffery EH, Wallig MA, Klein BP. 1997. Retention of phytochemicals in fresh and processed broccoli. *J Food Sci* 62: 1098-104.

Jamieson ER, Lippard SJ. 1999. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem. Rev.* 99(9): 2467-2498.

Jiang ZQ, Chen C, Yang B, Hebbar V, Kong AN. 2003. Differential responses from seven mammalian cell lines to the treatments of detoxifying enzyme inducers. *Life Sci.* 72(20):2243-2253.

Jo SK, Cho WY, Sung SA, Kim HK, Won NH. 2005. MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis. *Kidney Int.* 67(2):458-466.

Jones SB, Brooks JD. 2006. Modest induction of phase 2 enzyme activity in the F-344 rat prostate. *BMC Cancer* 6: 62.

Juge N, Mithen RF, Traka M. 2007. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell. Mol. Life Sci.* 64(9):1105-1127.

Kadikoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y. 2004. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidants enzymes in rat kidneys. *Hum. Exp. Toxicol.* 23(1):29-34.

Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M. 2006. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci.* 100(1):65-72.

Keck AS, Staack R, Jeffery EH. 2002. The cruciferous nitrile crambene has bioactivity similar to sulforaphane when administered to Fischer 344 rats but is far less potent in cell culture. *Nutr. Cancer* 42(2):233-240.

Kelland L. 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* 7(8):573-84.

Kim SH, Hong KO, Hwang JK, Park KK. 2005. Xanthorrhizol has a potential to attenuate the high dose cisplatin-induced. *Food Chem. Toxicol.* 43(1):117-122.

Kim YK, Jung JS, Lee SH, Kim YW. 1997. Effects of antioxidants and Ca<sup>2+</sup> in cisplatin-induced cell injury in rabbit renal cortical slices. *Toxicol. Appl Pharmacol.* 146(2):261-269.

---

---

Kim YH, Kim YW, Oh YJ, Back NI, Chung SA, Chung HG, Jeong TS, Choi MS, Lee KT. 2006. Protective effect of the ethanol extract of the roots of *Brassica rapa* on cisplatin-induced nephrotoxicity in LLC-PK1 cells and rats. *Biol Pharm Bull.* 29(12):2436-41.

Kobayashi M, Yamamoto M. 2006. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme Regul.* 46:113 – 140.

Kuhlman MK, Burkhardt G, Kohler H. 1997. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol. Dial. Transplant.* 12(12):2478-2480.

Kuo MT, Chen HH, Song IS, Savaraj N, Ishikawa T. 2007. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 26(1):71-83.

Kushad MM, Brown AF, Kurilich AC, Juvik JA, Klein BP, Wallig MA, Jeffery EH. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *J Agric Food Chem.* 47(4):1541-1548.

Lebwohl D, Canneta R. 1998. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J. Cancer.* 34: 1522-1534.

Masuda H, Tanaka T, Takahama U. 1994. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203(2): 1175-1180.

Matsushima H, Yonemure K, Ohishi K, Hishida A. 1998. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J. Lab. Clin. Med.* 131 (6): 518-526.

Matusheski NV, Jeffery EH. 2001. Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *J. Agric. Food Chem.* 49(12):5743-5749.

McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. 2003. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* 278(24): 21592-21600.

McNaughton SA, Marks GC. 2003. Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of cruciferous vegetables. *Br. J. Nutr.* 90(3):687-697.

Mora L de O, Antunes LM, Francescato HD, Bianchi M de L. 2003. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol. Res.* 47(6):517–522.

---

---

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65(1-2): 55-63.

Motohashi H, Yamamoto M. 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol.Med*. 10(11):549 – 557.

Naziroglu M, Karaoglu A, Aksoy AO. 2004. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* 195(2-3): 221-230.

Petri N, Tannergren C, Holst B, Mellon FA, Bao Y, Plumb GW, Bacon J, O'Leary KA, Kroom PA, Knutson L, Forsell P, Eriksson T, Lennernas H, Williamson G. 2003. Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug. Metab. Dispos*. 31(6):805-813.

Posner GH, Cho CG, Green JV, Zhang Y, Talalay P. 1994. Design and synthesis of bifunctional isothiocyanate analogs of sulforaphane: correlation between structure and potency as inducers of anticarcinogenic detoxication enzymes. *J. Med. Chem*. 37(1): 170-176.

Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. 1969. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 222(5191):385-386.

Santos NA, Catão CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. 2007. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch. Toxicol*. 81(7):495-504.

Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P, 1998. Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 7(12):1091-1100.

Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. 2001. Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 10 (5), 501-508

Shimeda Y, Hirotsu Y, Akimoto Y, Shindou K, Ijiri Y, Nishihori T, Tanaka K. 2005. Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol. Pharm. Bull*. 28(9):1635-1638.

Shinkai Y, Sumi D, Fukami I, Ishii T, Kumagai Y. 2006. Sulforaphane, an activator of Nrf2, suppresses cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *FEBS Lett*. 580(7):1771-1774.

- 
- 
- Shino Y, Itoh Y, Kubota T, Yano T, Sendo T, Oishi R. 2003. Role of poly(ADP-ribose)polymerase in cisplatin-induced injury in LLC-PK1 cells. *Free Radic Biol Med.* 35(8):966-77.
- Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS. 2005. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib. Nephrol.* 148:107–121.
- Totta P, Acconcia F, Leone S, Cardillo I, Marino M. 2004. Mechanisms of naringenin-induced apoptotic cascade in cancer cells: involvement of estrogen receptor alpha and beta signalling. *IUBMB Life* 56(8):491–499.
- Tsutsumishita Y, Onda T, Okada K, Takeda M, Endou H, Futaki S, Niwa M. 1998. Involvement Of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242: 310-312.
- Van Poppel G, Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA. 1999. Brassica vegetables and cancer prevention. *Epidemiology and mechanisms. Adv Exp Med Biol.* 472:159-68.
- Weiner MW, Jacobs C. 1983. Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *Fed Proc.* 42(13):2974-8.
- Xiao T, Choudhary S, Zhang W, Ansari NH, Salahudeen A. 2003. Possible involvement of oxidative stress in cisplatin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 66(5):469-479.
- Yoon HY, Kang NI, Lee HK, Jang KY, Park JW, Park BH. 2008. Sulforaphane protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through induction of the Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Biochem. Pharmacol.* 75(11):2214-2223.
- Zhang DD. 2006. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug. Metab. Rev.* 38(4):769–89.
- Zhang Y, Talalay P. 1994. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: Chemistry and mechanism. *Cancer Res. (Suppl).* 54:1976s-1981s.
- Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(6):2399-2403.
- Zhang Y, Munday R, Jobson HE, Munday CM, Lister C, Wilson P, Fahey JM, Mhawech-Fauceglia P. 2006. Induction of GST and NQO1 in cultured bladder cells and in urinary bladders of rats by an extracts of broccoli (*Brassica oleracea italica*) sprouts. *J. Agric. Food Chem.* 54(25): 9370-9376.