



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO PROTECTOR DE LA α -MANGOSTINA
SOBRE LA NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR
CISPLATINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ENRIQUE NORIEGA TREJO



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

Agradezco a mi familia, Isabel mi madre, Enrique mi padre, Marlon mi hermano y Andrea mi hermana, y sobre todo a mi padre y mi madre porque me han sabido esperar todo este tiempo.

Agradezco a Dios por que a pesar de las dificultades me ha sacado a delante.

Agradezco al Dr. Pedraza por el tiempo que dedicó a la revisión de mis tesis, y por las observaciones que hizo durante el desarrollo de esta.

Agradezco a Jazmín quien en su momento me ayudo a realizar mi tesis.

Agradezco a todos los compañeros quienes trabajan en el laboratorio.

Agradezco a la UNAM porque me alojó en esta casa donde realicé mis estudios universitarios.

Agradezco a la Facultad de Química donde tuve a los maestros para adquirir mis conocimientos y a los compañeros(as) quienes estuvieron a mi lado en el aprendizaje.

Al principio todos los pensamientos pertenecen al amor. Después, todo el amor pertenece a los pensamientos. Albert Einstein (1879-1955) Científico alemán.

Jurado asignado:

Presidente	Profesor JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Vocal	Profesora PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ
Secretario	Profesora PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ
1er. Suplente	Profesora VANESSA MAYA AMPUDIA
2do. Suplente	Profesora ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 209 del Departamento de Biología Edificio F de la Facultad de Química de la UNAM, Ciudad Universitaria, México D. F., C.P. 04510.

Esta tesis fue apoyado por el proyecto IN207007 de DGAPA.

Dr. José Pedraza Chaverri

Asesor del Tema

Dra. Jazmín Marlen Pérez Rojas

Supervisor técnico

Enrique Noriega Trejo

Sustentante

Contenido

	Página
Abreviaturas	2
Resumen	3
1. Antecedentes	4
2. Justificación	10
3. Hipótesis	10
4. Objetivos	10
5. Materiales y métodos	11
6. Resultados	15
7. Discusión	20
8. Conclusiones	22
9. Perspectivas	22
10. Apéndice	23
11. Referencias	25

Abreviaturas

α M	- α -mangostina o grupo al que se administró α -mangostina.
ANOVA	Análisis de varianza.
BUN	Nitrógeno de urea en sangre.
CP	-Cisplatino o grupo al que se administró cisplatino.
CP+ α M	Grupo al que se administró α -mangostina y cisplatino.
d	Días.
DCr	Depuración de creatinina.
ERN	Especies reactivas de nitrógeno.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
FG	Filtración glomerular.
GML	<i>Garcinia mangostana</i> Lin.
g	Gramos o aceleración de la gravedad.
h	Hora.
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete.
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Anión superóxido.
OH^{\bullet}	Radical hidroxilo.
ONOO^-	Peroxinitrito.

Resumen

Antecedentes. La α -mangostina (α M) tiene propiedades antioxidantes y es la xantona presente en mayor concentración en la fruta del mangostán. En nuestro laboratorio se encontró que la α M tiene la capacidad de atrapar las especies reactivas de oxígeno (ERO): anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), anión peroxinitrito ($ONOO^-$) y oxígeno singulete (1O_2). Por otro lado el CP, un agente antineoplásico, induce nefrotoxicidad asociada a estrés oxidante. La nefrotoxicidad por CP se caracteriza por daño a las células epiteliales del túbulo proximal renal que se manifiesta como insuficiencia renal aguda. El CP induce daño al ADN, disfunción mitocondrial, formación de ERO, disminución de enzimas antioxidantes y de antioxidantes no enzimáticos y la muerte celular por necrosis y/o por apoptosis, dependiendo de la concentración del fármaco.

Hipótesis: La α M será capaz de prevenir el daño renal producido por CP.

Objetivo. Determinar si la α M tiene efecto protector en la nefrotoxicidad inducida por CP.

Diseño experimental. Se estudiaron cuatro grupos de ratas Wistar: 1. control (n=6); 2. α M (n=8); 3. CP (n=10) y 4. CP+ α M (n=10). Todas las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas para la recolección de orina de 24 h a lo largo del estudio. La α M se administró diariamente de manera intragástrica a una dosis de 12.5 mg/kg a lo largo de todo el estudio (6 días antes y 3 días durante y después de la inyección de CP). El CP se administró de manera intraperitoneal a una dosis única de 7.5 mg/kg en el día 7. Los animales control recibieron una dosis de solución salina. Los animales de todos los grupos se sacrificaron 3 días después de la administración de CP o de salina para la recolección de sangre y separación del suero (día 10). En la orina recolectada se midió la excreción urinaria de proteínas (proteinuria) y de creatinina y en suero sanguíneo se midió el nitrógeno de urea en sangre (BUN) y los niveles de creatinina. También se calculó la depuración de creatinina.

Resultados. El CP indujo disfunción renal la cual se hizo evidente por la proteinuria, el aumento de BUN y de creatinina sérica y la disminución de la depuración de creatinina. La α M atenuó significativamente la disfunción renal inducida por CP cuando se evaluó por los parámetros antes descritos.

Conclusión. La α M protege de la disfunción renal inducida por CP.

Perspectivas. Analizar si el efecto renoprotector de la α M en este modelo experimental está asociado con la disminución del estrés oxidante.

1. Antecedentes

1.1 α -mangostina.

La α -mangostina (Figura 1) es una xantona extraída del mangostán, *Garcinia mangostana* L., un árbol diseminado y cultivado en el sudeste de Asia. Este es un compuesto ópticamente inactivo, cuya fórmula fue dilucidada en 1958 por Yates y Stout (1958).

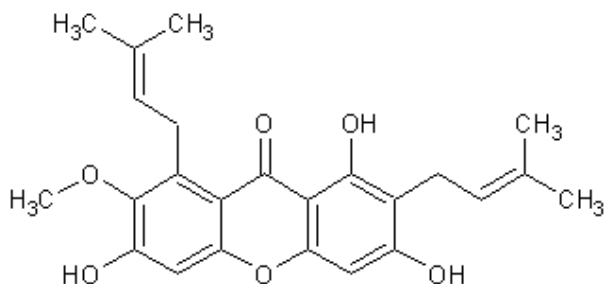


Figura 1. Estructura de la α -mangostina.

Este compuesto posee propiedades cardioprotectoras, ya que previene la toxicidad miocárdica, el daño oxidante y la inflamación inducidos por la catecolamina β -adrenérgica isoproterenol (Devi Sampath y Vijayaraghavan, 2007, 2008). Sus propiedades se hacen evidentes también por su capacidad de secuestrar directamente ERO, prevenir su producción inducida por el ácido 3-nitropropiónico en cultivos neuronales (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2009); así como por inhibir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) *in vitro* inducida por iones cobre (Williams *et al.*, 1995). Además, posee propiedades antibacterianas, ya que actúa contra *Enterococci* resistentes a vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (Sakagami *et al.*, 2005), tiene actividad antiinflamatoria ya que inhibe la liberación de prostaglandina E₂ (Chen *et al.*, 2008) y antagoniza los receptores de histamina H₁ (Chairungrilerd *et al.*, 1996). También posee propiedades anticancerígenas, pues tiene un efecto citotóxico en células cancerosas DLD-1 (Nakagawa *et al.*, 2007).

1.2 Riñón

1.2.1 Organización general de los riñones y el tracto urinario. Los dos riñones se encuentran en la pared posterior del abdomen, fuera de la cavidad peritoneal (Figura 2). Cada riñón de un ser humano adulto normal pesa alrededor de 150 g y tiene el tamaño aproximado de un puño cerrado. La cara medial de cada riñón contiene una región con

una muesca llamada el *hilum renal* a través del cual pasan la arteria y la vena renal, el sistema linfático, los nervios y el uréter, el cual acarrea la orina final del riñón a la vejiga, donde se acumula hasta ser vaciada. El riñón está rodeado por una cápsula fibrosa y tensa que protege sus estructuras internas delicadas (Guyton & Hall, 2006).

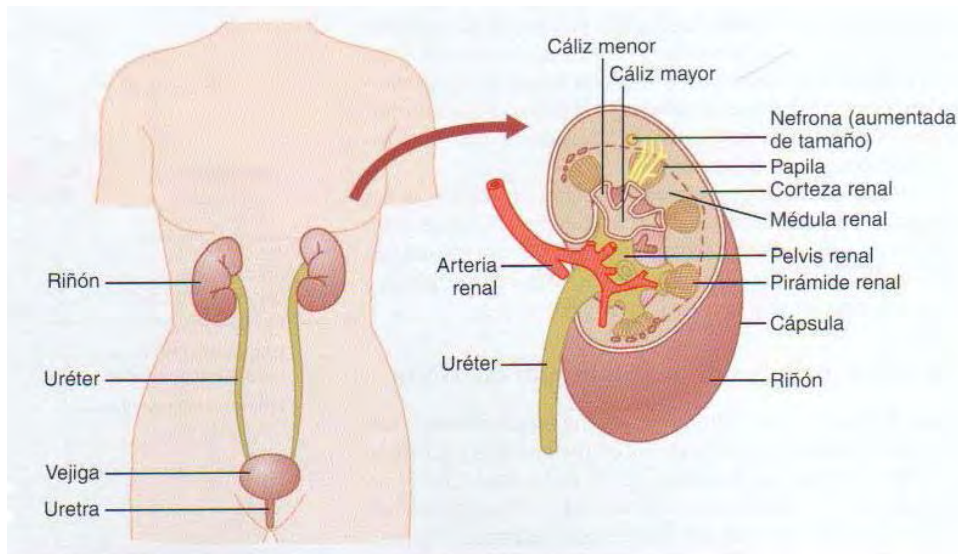


Figura 2. Organización general de los riñones y del sistema urinario (Guyton & Hall, 2006).

Si se cortan los riñones de arriba a abajo, las dos regiones de importancia que pueden verse son la *corteza* externa y la región interna denominada *médula*. La médula está dividida en múltiples masas de tejido, de forma cónica, llamadas *pirámides renales*. La base de cada pirámide se origina en el borde entre la corteza y la médula y termina en la *papila*, la cual se proyecta dentro del espacio de la *pelvis renal*, una continuación en forma de abanico de la porción superior del uréter. El borde exterior de la pelvis está dividido en bolsas abiertas, llamadas *cálices mayores*, que se extienden hacia abajo y se dividen en los *cálices menores*, las cuales recolectan orina de los túbulos de cada *papila* (Guyton & Hall, 2006).

1.2.2 La nefrona es la unidad funcional de los riñones. Cada riñón en el ser humano contiene alrededor de 1 millón de nefronas, cada una capaz de formar orina. Cada nefrona contiene: 1) un mechón de capilares glomerulares llamado glomérulo, a través del cual grandes cantidades de líquido son filtradas desde la sangre, y 2) un túbulo largo en el cual el líquido filtrado es convertido en orina en su recorrido a la pelvis del riñón (Figura 3; Guyton & Hall, 2006).

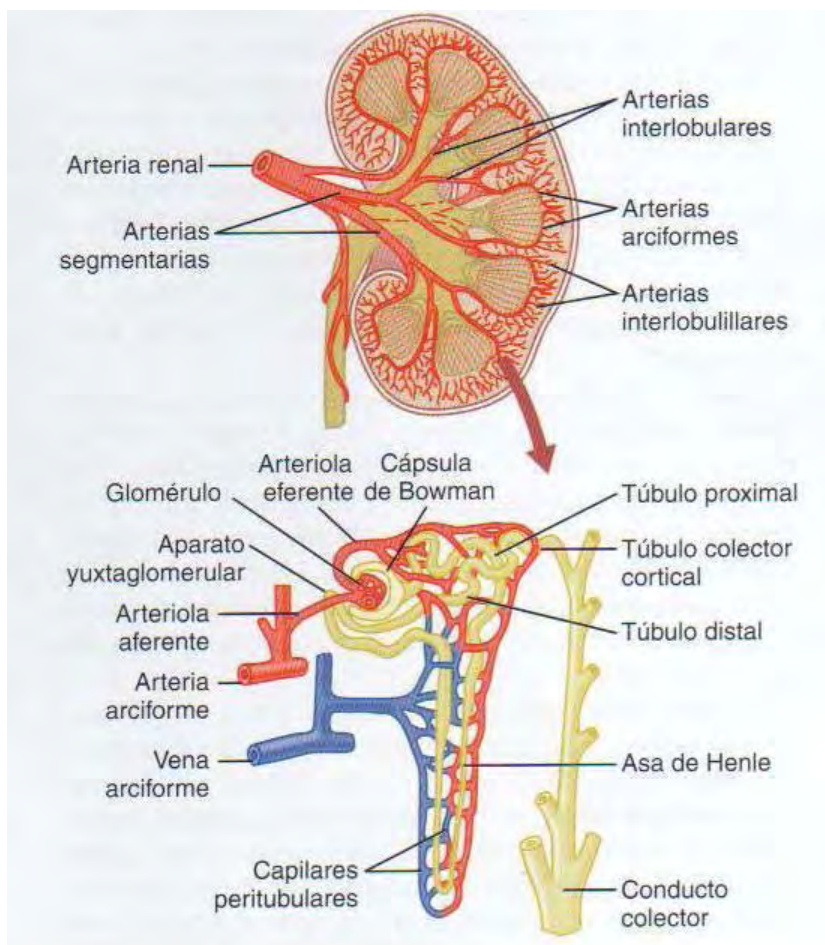


Figura 3. A) Sección de riñón humano que muestra los principales vasos que aportan el riego sanguíneo al riñón y B) esquema de la microcirculación de cada nefrona (Guyton y Hall, 2006).

El glomérulo contiene una red de capilares glomerulares conectados y ramificados que están cubiertos por células epiteliales y todo el glomérulo está cubierto por la *cápsula de Bowman*. El líquido filtrado desde los capilares glomerulares fluye hacia la cápsula de Bowman y después hacia el *túbulo proximal*, que se sitúa en la corteza renal.

Desde el túbulo proximal, el líquido fluye hacia el asa de Henle, que desciende hasta la médula renal. Cada asa consta de una rama descendente y otra ascendente (Guyton y Hall, 2006).

Más allá del asa de Henle, el líquido entra en el *túbulo distal*, que, como el túbulo proximal, se dispone en la corteza renal. A este le sigue el *túbulo colector cortical*, que conduce al *conducto colector principal*. Las partes iniciales, de 8 a 10 conductos colectores corticales, se unen para formar un solo conducto colector mayor que discurre

hacia abajo al interior de la médula y se convierte en el *conducto colector medular*. Los conductos colectores se funden para formar progresivamente conductos cada vez mayores que finalmente se vacían dentro de la pelvis renal a través de las puntas de las papilas renales (Guyton & Hall, 2006).

1.2.3 Nefronas corticales y yuxtamedulares. Los dos tipos principales de nefronas son clasificadas de acuerdo a su posición en el riñón y la longitud de las asas de Henle. Las nefronas que se originan en un tercio del interior de la corteza - llamadas *nefronas yuxtamedulares* ya que estas están próximas a la médula - tienen asas de Henle más largas que las *nefronas corticales*, que son mas numerosas, las cuales se originan en las dos terceras partes externas de la corteza (Figura 4). Las nefronas yuxtamedulares juegan un papel importante en la habilidad del riñón para producir la orina concentrada (Fox, 2008).

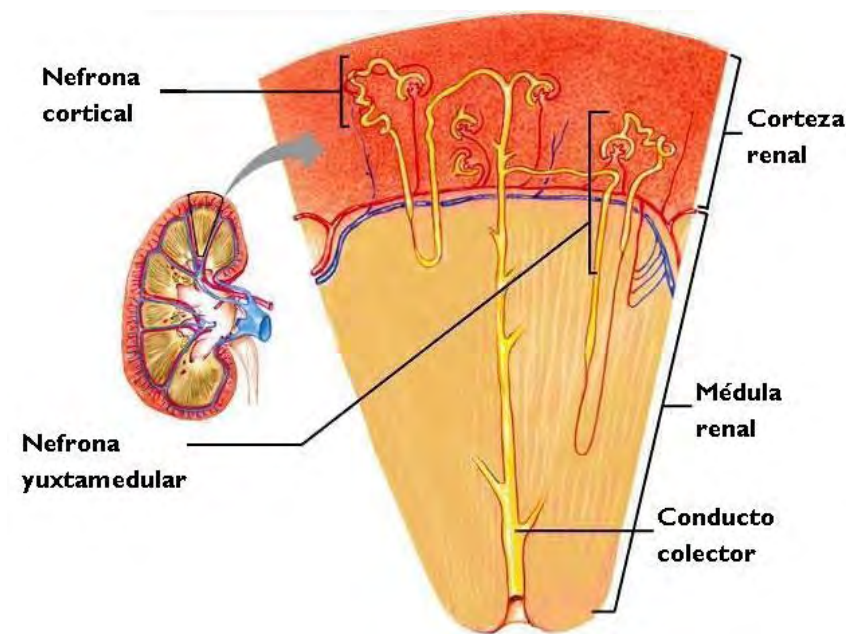


Figura 4. Contenido de la pirámide renal. La posición de las nefronas corticales y yuxtamedulares se muestra dentro de la pirámide renal del riñón (Fox, 2008).

Un **conducto colector** recibe el líquido de los túbulos distales enroscados de varias nefronas. Los fluidos entonces son drenados por el conducto colector desde la corteza a la médula mientras el conducto colector pasa a través de la pirámide renal. Este fluido, ahora llamado orina, pasa dentro del cáliz menor. La orina es entonces encausada a través de la pelvis y fuera del riñón en la uretra (Fox, 2008).

1.3 Cisplatino

El CP, cis-diaminodichloroplatino (II), es uno de los agentes quimioterapéuticos más usados para el tratamiento de tumores sólidos (Molitoris y Finn, 2001). Se emplean regímenes de quimioterapia basados en CP para el tratamiento de cáncer testicular, tumores de células germinales de ovario, cáncer epitelial de los ovarios, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical avanzado, cáncer de vejiga, mesotelioma, cáncer endometrial, cáncer de pulmón, melanoma maligno, tumores carcinoides, cáncer de pene, carcinoma adrenocortical, entre otros (Hanigan y Devarajan, 2003). Las terapias con altas dosis CP están limitadas por su nefrotoxicidad y neurotoxicidad acumulativa. Sin embargo, el CP es aún el fármaco de elección en muchos regímenes terapéuticos basados en compuestos de platino, y permanece como uno de los fármacos quimioterapéuticos más comúnmente usados. La estructura del CP se muestra en la Figura 5 (Hanigan y Devarajan, 2003).

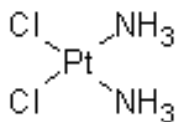


Figura 5. Estructura del cisplatino.

El CP es tóxico a los túbulos proximales renales. Los pacientes tratados con cisplatino presentan elevación en los niveles de nitrógeno de urea en sangre (BUN por sus siglas en inglés) u otras evidencias de daño renal. El CP se une a ADN, matando células tumorales (Hanigan y Devarajan, 2003). Hay evidencias contundentes tanto de estudios *in vivo* como en cultivos celulares que revelan que el CP es metabolizado a nefrotoxinas a través de un intermediario conjugado con el glutatión. Los compuestos conjugados glutatión-platino pueden formarse ya sea en el hígado o en el riñón. Mediante inyecciones continuas de CP, en las que se usa el isótopo Pt (195), se ha demostrado que los más altos niveles de platino se encuentran en el hígado y en el riñón (Hanigan y Devarajan, 2003). El tratamiento con antioxidantes conocidos tales como el α -tocoferol, la vitamina C, y la N-acetilcisteína podrían contrarrestar en algún grado, los efectos tóxicos mediados por las ERO. Algunos estudios han mostrado que la generación de radicales libres mediadas por CP podría activar la cascada de señales de muerte celular y podría hacer a las células epiteliales tubulares sensibles y vulnerables a los daños relacionados con el estrés oxidante (Razzaque, 2007).

1.3.1 Farmacocinética. El CP se une intensamente a proteínas; dentro de 2 h después de la infusión de CP, un 90% está unido a proteínas principalmente a albúmina, transferrina, y γ -globulina. La concentración máxima en sangre se alcanza dentro de 90 a

150 minutos, y declina de manera bifásica con una vida media de 36 a 47 días. Las concentraciones más altas se ven en el hígado, la próstata y el riñón.

Después de una administración intravenosa de 40 a 140 mg/m² de cisplatino, sólo 10% a 40% se excreta por los riñones en 24 h. En 5 días del 35% a 51% se excreta en la orina. La depuración renal de platino libre excede la proporción de la filtración glomerular (FG), sugiriendo una eliminación activa del fármaco por el riñón. El aclaramiento renal de platino libre es variable y no lineal. Este es dependiente de la dosis, del flujo renal, y de la secreción tubular. No hay evidencia de la reabsorción tubular, lo que sugiere que los riñones acumulan el CP por absorción peritubular (Molitoris y Finn, 2001).

2. Justificación

Se ha demostrado que la α M tiene diversos efectos citoprotectores algunos de los cuales pueden estar mediados por su capacidad antioxidante directa. Por otro lado, se sabe que el CP es uno de los agentes quimioterapéuticos más usados para el tratamiento de tumores sólidos y que uno de sus efectos secundarios más importantes es la nefrotoxicidad. Se ha establecido que dicho efecto secundario está asociado al estrés oxidante. Dada la importancia de este efecto secundario, la investigación de estrategias para atenuar dicho efecto constituye un tema de investigación plenamente justificado. Basados en este hecho y en las propiedades de la α M, en este trabajo se estudió el posible efecto protector de la α M sobre la nefrotoxicidad inducida por CP.

3. Hipótesis

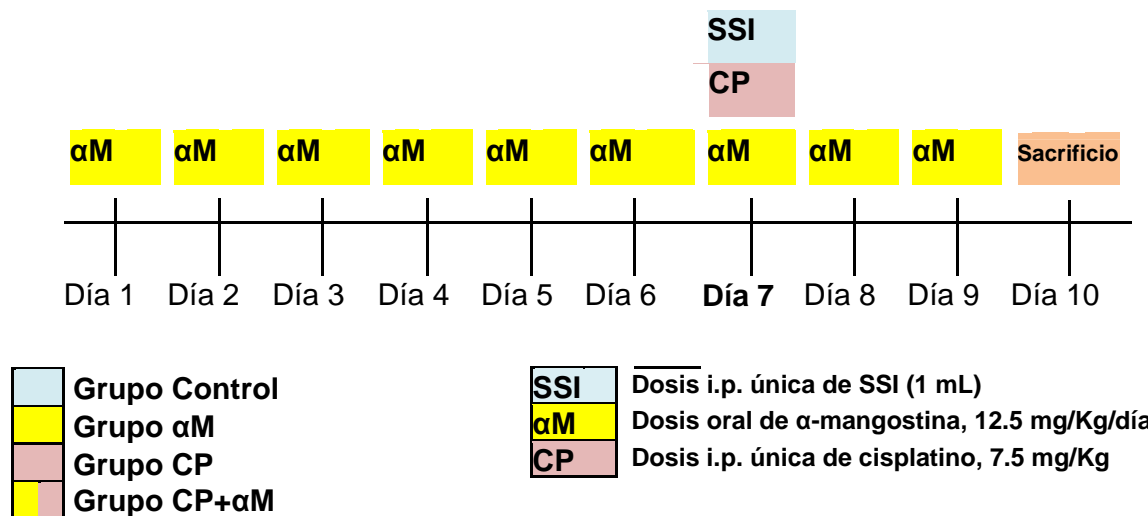
- La α M será capaz de prevenir el daño renal producido por CP.

4. Objetivo

- Determinar si la α M tiene efecto protector en la nefrotoxicidad inducida por CP.

5. Materiales y métodos

5.1 Diseño experimental y animales. Se usaron ratas macho de la cepa Wistar, que se obtuvieron del bioterio del conjunto E de la Facultad de Química, UNAM, para determinar el efecto protector *in vivo* de la α M. Se formaron cuatro grupos de animales: grupo 1, Control (6 animales), grupo 2, tratamiento con α M (8 animales), grupo 3, tratamiento con CP (10 animales), grupo 4, tratamiento con CP + α M (10 animales). Cabe señalar que las ratas se agruparon de modo que el peso promedio de cada grupo fuera similar. Así los animales se seleccionaron aleatoriamente para administrarles las dosis según el grupo correspondiente y el régimen de administración según el esquema siguiente.



Esquema de dosificación

La dosis de 12.5 mg/Kg de α M que se usó para producir el efecto protector se eligió con base a estudios previos que se realizaron en nuestro laboratorio en los que se encontró que esta era la dosis que producía el efecto protector óptimo, ya que a esta dosis se obtiene una buena protección con una dosis baja. La dosis de cisplatino también se eligió con base a estudios previos que se realizaron en nuestro laboratorio en los que encontraron que esta era la más adecuada para inducir la nefrotoxicidad.

Los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas durante todo el periodo de estudio (10 días). El día cero (d 0) se define como el día previo a la primera administración de α M; las muestras obtenidas en este día se consideran como basales. En los días 1, 7 y 10 se recolectó la orina de los animales. Se determinó el volumen de la orina y se centrifugó a 7,500 x g por 5 min; del sobrenadante se tomaron dos muestras de

1 mL, por cada día de recolección.

Para los días 0 y 6 se tomaron muestras de sangre del plexo venoso orbital. Se sacrificaron las ratas al día 10 por decapitación para recolectar la sangre de las arterias principales en tubos de ensayo de 13 x 100, se usó heparina para evitar la coagulación de la sangre. Las muestras de sangre de los días 0, 6 y 10, se centrifugaron a 6,000 x g por 5 min, para posteriormente recolectar muestras del sobrenadante (plasma) de cada una de las ratas.

5.2. Métodos analíticos

Una vez obtenidas las muestras, se determinó el BUN y la creatinina en las muestras de plasma; y en la orina se determinó la creatinina y la proteinuria. Con el valor de creatinina en plasma y orina se calculó la depuración de creatinina.

5.2.1 Determinación de creatinina en plasma/suero y orina. La depuración de creatinina endógena es comúnmente usada para la estimación de la FG. La creatinina es producida en el músculo en proporción relativamente constante, no se une a proteínas plasmáticas, y se filtra libremente a través de los glomérulos (McClatchey, 2002). La creatinina presente en el suero o en el plasma reacciona directamente con el ácido pícrico en solución alcalina (reacción Jaffé) produciendo un complejo cuya absorbencia se mide 520 nm (Slot, 1965; Perrone *et al.*, 1992; Vasiliades, 1976).

Creatinina + ácido pícrico \longrightarrow Complejo picrato-creatinina.

La creatinina se elimina del organismo casi completamente por FG. Por esto, la depuración de creatinina puede usarse para evaluar la FG (Guyton y Hall, 2006).

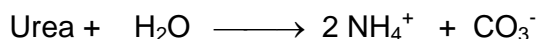
$$DCr = ([Creatinina \text{ en orina}] / [Creatinina \text{ en plasma}]) \times \text{Flujo urinario (ml/min)}$$

$$\text{Flujo urinario} = \text{Vol. de orina (mL)} / \text{Tiempo de recolección (min)}$$

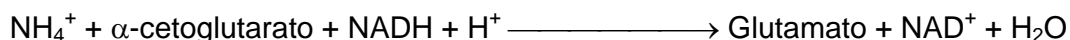
5.2.2 Determinación de la depuración de creatinina. De las muestras recolectadas se determinó la concentración de creatinina tanto en plasma como en orina en mg/dL. Así, se calculó la depuración de creatinina en mL/min (el tiempo de recolección fue de 24 h). Una vez obtenidos los resultados de depuración de creatinina estos se normalizaron por cada 100 g de peso.

$$\text{DCr}/100 \text{ g} = \frac{\text{DCr} \times 100 \text{ g}}{\text{Peso de la rata}}$$

5.2.3 Determinación de BUN. La urea es sintetizada casi exclusivamente en el hígado y es transportada a los riñones donde es filtrada para su excreción (Mathews *et al.*, 2000). La mayoría de los tejidos convierten el ión amonio a glutamina, la cual es transportada al hígado donde se convierte en urea. Por otro lado, en tejidos musculares el ión amonio es convertido en alanina la cual es transportada al hígado: ahí es reconvertida a ión amonio, y a partir de este se forma la urea (Mathews *et al.*, 2000). Las mediciones del BUN proveen un ensayo clínico sensible al funcionamiento del riñón, ya que la filtración y la remoción de urea están deterioradas en los casos de mal funcionamiento del riñón (Mathews *et al.*, 2000). Más del 90% de urea es excretada a través de los riñones y el resto es excretada a través del tracto gastrointestinal y la piel. En un riñón normal, 40% a 70% de la urea altamente difusible se mueve pasivamente fuera del túbulo renal finalmente para reentrar al plasma (Burtis y Ashwood, 2001). Los métodos enzimáticos son considerados indirectos ya que ellos usan una enzima para convertir urea a productos que subsecuentemente son cuantificados. La urea es hidrolizada a amonio por la ureasa (urea amidohidrolasa), para formar amonio, como sigue:



El ion amonio resultante entonces es cuantificado por el ensayo enzimático con glutamato deshidrogenasa (Burtis y Ashwood, 2001) como sigue:



Con la adición de muestras se inicia la reacción. La medición de la disminución en la absorbencia resultante de la reacción de la glutamato deshidrogenasa se realiza a 340 nm (Burtis y Ashwood, 2001). Este cambio es proporcional a la concentración de BUN.

A las muestras se les determinó urea y los resultados obtenidos se presentan en mg/dL. Además con estos resultados se calculó el BUN, que se presentó en las mismas unidades. La concentración de BUN se obtiene al multiplicar por 0.467 la concentración obtenida de urea. Factor que resulta de dividir los gramos de nitrógeno (28) contenidos en 1 mol de urea (60 g) (Burtis y Ashwood, 2001).

5.2.4 Determinación de proteinuria. La proteinuria es definida como el aumento en la excreción urinaria de proteínas. La proteinuria sirve como una base para el diagnóstico

de daños renales intrínsecos (McClatchey, 2002). La mayoría de las proteínas contienen tirosina o triptófano o ambos, pero cada proteína contiene una porción única de ellas. Estos aminoácidos, libres o en una cadena polipeptídica desdoblada, reducen el ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (reactivo Folin-Ciocalteu) y produce un color azul (Burtis y Ashwood, 2001) que es detectable en un espectrofotómetro en el rango de 500 a 750 nm (Lowry *et al.*, 1951). En este trabajo se leyó a una longitud de onda de 660 nm. El método de Lowry se basa en la reactividad del nitrógeno de los aminoácidos con los iones Cu^{2+} en condiciones alcalinas (Figura 6).

Por cada muestra se determinaron los mg de proteínas totales/24 h.

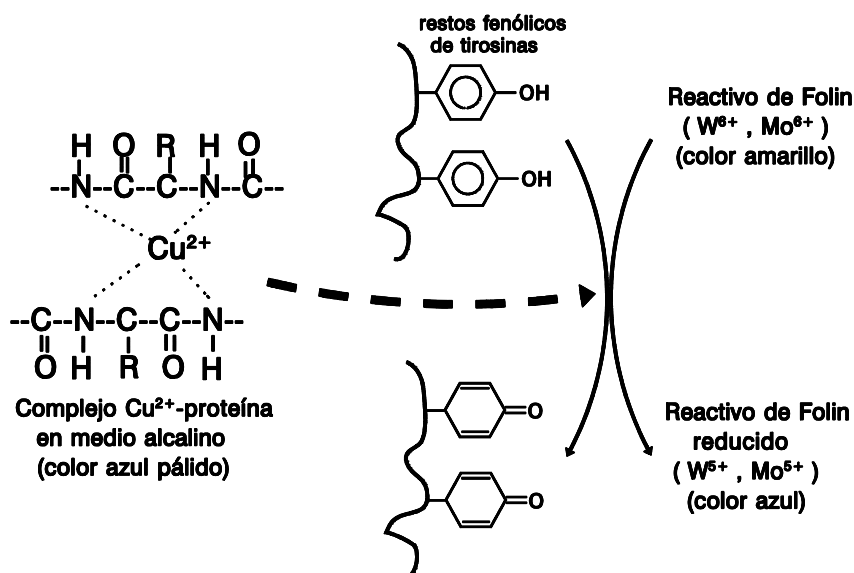


Figura 6. Reacción entre la proteína y los reactivos (Pérez-Albarsanz, 2008).

5.3 Análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por una prueba de comparación múltiple Newman-Keuls para examinar las diferencias entre grupos (paquete estadístico GraphPad PRISM versión 3.02). Los datos se presentan como el resultado promedio \pm error estándar. Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo.

6. Resultados

Se presentan los resultados de proteinuria, BUN, y creatinina en el día 10 del estudio, mientras que los datos de depuración de creatinina por 100 g se presentan a los días 1, 7 y 10 del estudio.

6.1 Creatinina sérica. En el día 10 el nivel de creatinina en el grupo CP es de 300% con respecto al control, lo que indica que el CP causó daño renal (Figura 7). Por otro lado, en el grupo CP+ α M se observa que sólo se presenta 150% del valor de creatinina comparado con el grupo control. Esto indica que la α M ejerció un efecto renoprotector.

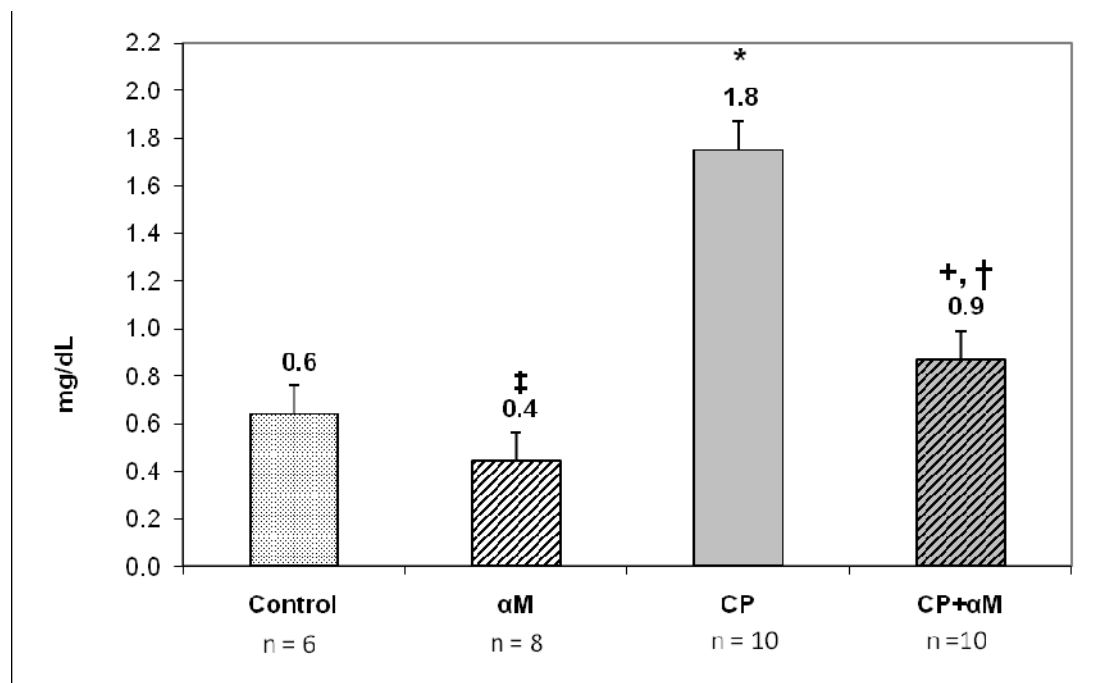


Figura 7. Nivel de creatinina sérica en los cuatro grupos en el día 10 de estudio. * $P < 0.001$ vs. Control; + $P < 0.001$ vs. CP; ‡, † $P > 0.05$ vs. Control.

6.2 Depuración de creatinina por 100 g. En el día 10 se presentó un valor de 24% en el grupo CP con respecto al grupo Control (Figura 8). Lo anterior hace evidente que se presentó el daño renal que se esperaba, ya que hubo una marcada disminución de la función renal. Por otro lado, se presentó el efecto renoprotector en el grupo CP+ α M ya que el valor de depuración es de 70% con respecto al control, lo que indica una marcada diferencia con respecto al grupo cisplatino y un valor de depuración cercano al del grupo Control. Con esto se hace evidente el efecto renoprotector de la α M en este parámetro.

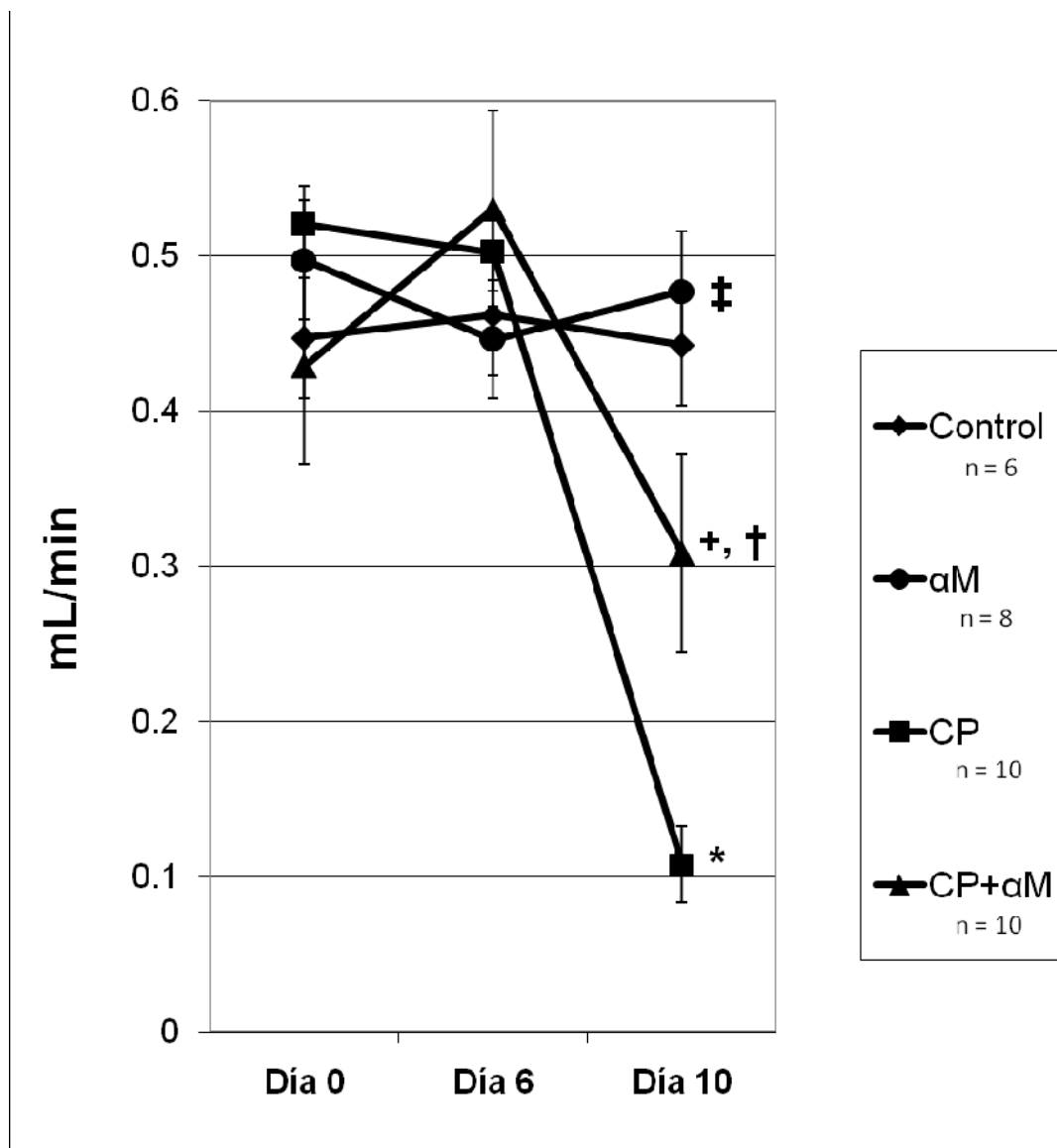


Figura 8. Depuración de creatinina en los cuatro grupos en los día 0, 6 y 10; * $P < 0.01$ vs. Control; † $P < 0.05$ vs. CP; ‡ $P > 0.05$ vs. Control.

6.3 Nitrógeno de urea en sangre (BUN). En la Figura 9 se presentan los resultados de BUN. La administración de CP indujo un aumento del 239% en el grupo CP con respecto al valor del grupo control. En el grupo CP+αM se presenta un valor de 152% con respecto al grupo control, lo que indica que la α-mangostina tiene un efecto renoprotector.

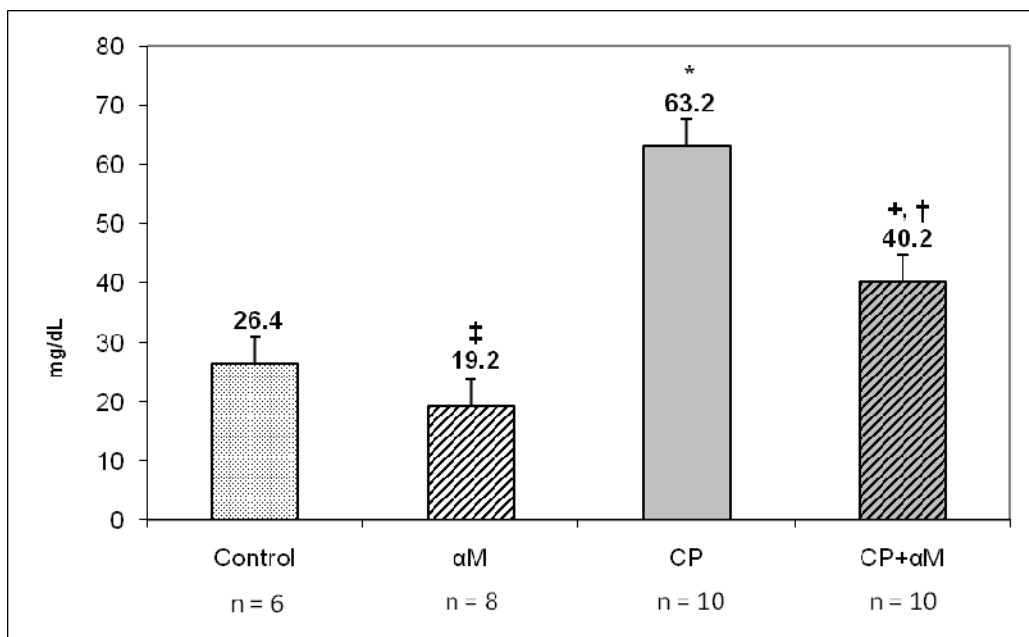


Figura 9. Determinación de BUN en los cuatro grupos en el día 10 de estudio. * $P < 0.001$ vs. Control; † $P < 0.001$ vs. CP; ‡ $P > 0.05$ vs. Control.

6.4 Proteinuria. En la Figura 10 se observa que la proteinuria aumentó en un 197% en el grupo CP con respecto al valor del grupo control, lo que sugiere daño al tejido renal. Mientras en el grupo CP+αM presenta sólo un aumento del 121% con respecto al control. Esto representa un efecto renoprotector, ya que este valor es cercano al del grupo control.

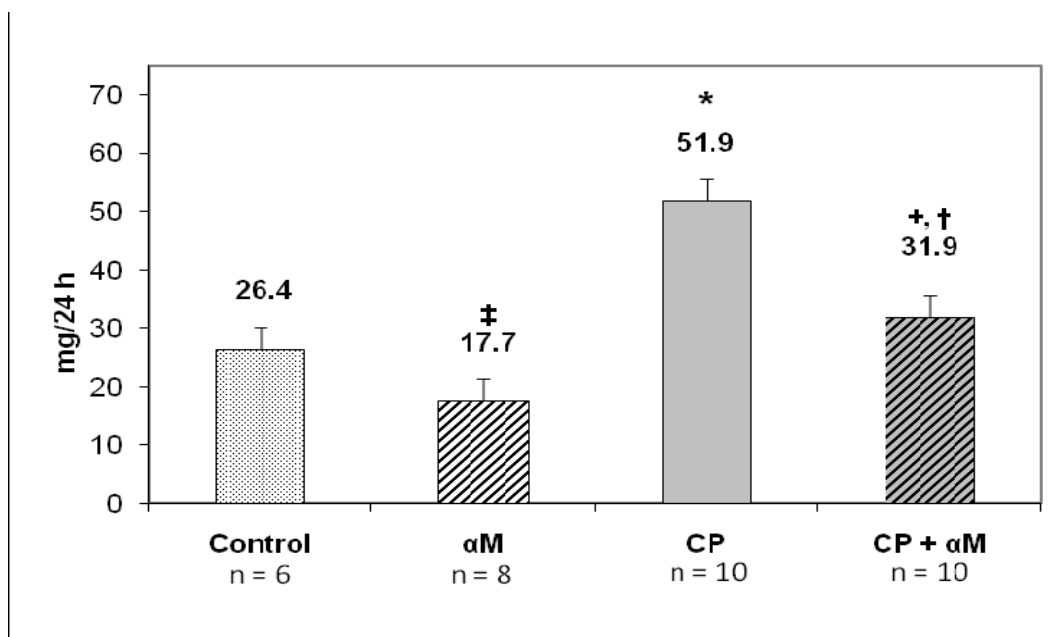


Figura 10. Determinación de proteinuria en los cuatro grupos en el día 10 de estudio * $P < 0.01$ vs. Control; † $P < 0.01$ vs. CP; ‡ $P > 0.05$ vs. Control.

Los resultados de los parámetros que se presentaron anteriormente se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Datos de las determinaciones bioquímicas en día 10 en todos los grupos estudiados.

	Proteinuria (mg/24 h)	BUN (mg/dL)	Creatinina sérica (mg/dL)	Depuración de creatinina (mL/min/ 100 g)
Grupos				
Control n=6	26.4±2.7*	26.4±2.2*	0.64±0.11*	0.443±0.05*
αM n=8	17.7±3.6* P>0.05 vs. Control	19.2±1.2* P>0.05 vs. Control	0.44±0.02* P>0.05 vs. Control	0.477±0.03* P>0.05 vs. Control
CP n=10	51.9±3.8* P<0.01 vs. Control	63.2±7.3* P<0.001 vs. Control	1.75±0.19* P<0.001 vs. Control	0.108±0.01* P<0.01 vs. Control
CP+αM n=10	31.9±4.9* P<0.01 vs. CP P>0.05 vs. Control	40.2±7.2* P<0.001 vs. CP P>0.05 vs. Control	0.87±0.17* P<0.001 vs. CP P>0.05 vs. Control	0.308±0.06* P<0.05 vs. CP P>0.05 vs. Control

Los datos están expresados como promedio±EEM.

6.5 Peso de los animales. En el grupo αM se presenta una disminución no significativa del 3.3% con respecto al control, al día 10 (Figura 11). En el grupo CP se observa disminución significativa del 14.9% con respecto al control, al mismo día. Además, se observa en el grupo CP+αM una disminución significativa del 12.1% (P<0.05 vs Control).

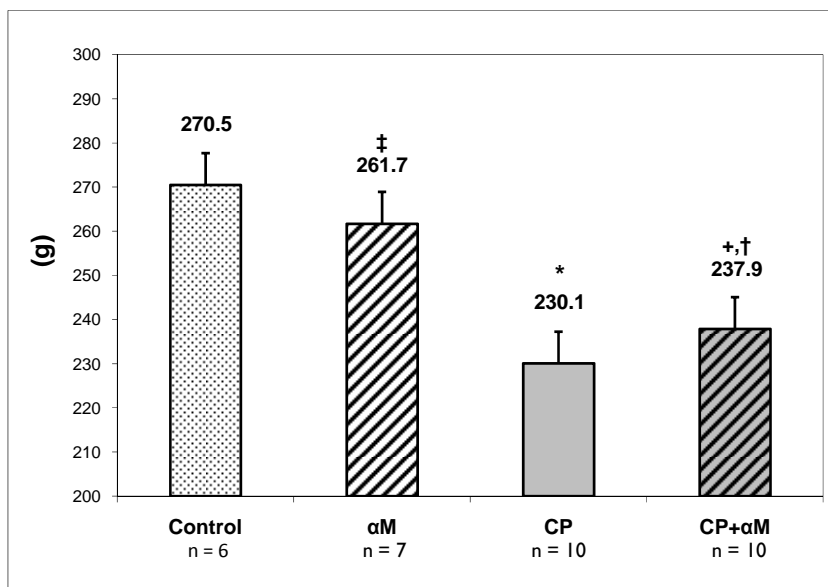


Figura 11. Peso corporal en todos los grupos de animales estudiados. *P<0.01 vs. Control; †P>0.05 vs. CP; ‡P>0.05 vs. Control; †P<0.05 vs. Control.

7. Discusión

La α M es un producto natural con reconocidas propiedades citoprotectoras por lo que en este trabajo se planteó la hipótesis de que podía tener efectos renoprotectores en la nefrotoxicidad inducida por el CP.

El principal hallazgo de este trabajo es el efecto renoprotector de la α M en la nefrotoxicidad inducida por CP. La α M atenuó las alteraciones en los marcadores del daño renal que se valoraron en este trabajo: proteinuria, BUN, creatinina en suero y depuración de creatinina. Diversos estudios han permitido establecer que la nefrotoxicidad inducida por cisplatino se caracteriza por un aumento de BUN y una disminución de la depuración de creatinina (Chirino *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 1996; Hanigan y Devarajan, 2003; Jung *et al.*, 2009). En este trabajo confirmamos lo anterior.

Ya que diversas investigaciones confirman que la nefrotoxicidad inducida por CP está asociada a un aumento del estrés oxidante (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009) se piensa que el efecto de la α M podría deberse a la capacidad antioxidante de esta xantona (Pedraza Chaverri *et al.*, 2008,2009). Sin embargo se requieren experimentos adicionales para probar dicha hipótesis.

De acuerdo a los estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio, la α M no es capaz de atrapar todas las ERO por lo que es posible, que si se quisiera mejorar el efecto renoprotector sería adecuado evaluar la administración conjunta de α M con otros antioxidantes capaces de secuestrar otras ERO, específicamente H_2O_2 y OH.

A continuación se comparan los resultados obtenidos en nuestro trabajo con los de otros investigadores que han explorado algunas estrategias para atenuar la nefrotoxicidad por CP. Yildirim y colaboradores (2003) encontraron que la erdoesteina (un compuesto expectorante con propiedades antioxidantes) atenuó el incremento en los niveles séricos de creatinina y BUN, pero no alcanzó significancia estadística ($P>0.05$). Esto demuestra que la α M tuvo un mejor efecto renoprotector, comparado con este trabajo, ya que sí se presentaron diferencias significativas cuando se compararon los grupos CP vs. CP+ α M ($P<0.001$). Por otro lado Lee y colaboradores (2006) observaron que la administración de rosiglitazona (un compuesto con propiedades anti-inflamatorias) en el grupo tratado con CP redujo significativamente el BUN y la creatinina comparados con el grupo tratado con cisplatino solo ($P<0.05$). Este efecto es comparable con nuestros datos aunque nosotros encontramos una significancia de $P<0.001$ para el efecto renoprotector en los mismos parámetros. En tanto, Atasayar y colaboradores (2009) observaron que la combinación de las vitaminas antioxidantes C y E previno el incremento de los niveles de BUN inducidos por el CP y los mantuvo muy similares a los niveles del control. Sin embargo, la

administración conjunta de las vitaminas C y E no previno el incremento de los niveles de creatinina. En este trabajo la α M aunque no mantiene los niveles de BUN casi tan eficientemente como la vitamina C y E, presenta una mayor capacidad para mantener los niveles de creatinina cercanos a los niveles normales. La comparación del tratamiento con el antioxidante natural carnosina resultó en una reducción significativa de los niveles de BUN y casi normalizó los niveles de creatinina sérica con respecto al control (Fouad *et al.*, 2008). La protección obtenida con carnosina es muy similar a la obtenida con α M en este trabajo. Otro grupo de investigadores observó que la administración de 50 y 100 mg/Kg de ligustrazina evitó la proteinuria inducida por CP (Liu *et al.*, 2008). En cambio, la α M a dosis menores presentó un mejor efecto a una dosis de 12.5 mg/Kg/día. Además, la ligustrazina revirtió con eficacia el efecto del cisplatino en los niveles de BUN y creatinina sérica (Liu *et al.*, 2008). En este estudio, la α M también evitó dichas alteraciones, pero a una dosis menor. Sin embargo, cualquiera de estos dos compuestos (α M y ligustrazina) no evitan una protección completa. La dimetiltiourea (atrapador de OH) mantuvo los niveles de creatinina sérica muy semejantes a los niveles normales que por la administración de cisplatino se incrementaron (Tsuji *et al.*, 2008). Sin embargo, este efecto protector fue logrado con dosis mayores que las que se aplicaron en nuestro estudio con α M.

De lo anterior se desprende que se han efectuado diversos trabajos experimentales con el objetivo de proteger del daño renal que induce el cisplatino. Sin embargo, en ninguno de los trabajos se ha encontrado una óptima protección al tejido renal. Se observa que en algunos trabajos sólo uno de los parámetros bioquímicos utilizados es el que presentó una máxima protección, por ejemplo los niveles de BUN. También, se observa que en algunos se usan dosis mayores que las utilizadas en este trabajo, lo que podría ser un punto a favor de la α M como un potente renoprotector.

8. Conclusiones

El cisplatino provoca daño renal que se hizo evidente con la alteración de diversos parámetros bioquímicos.

La α M protege de la disfunción renal inducida por cisplatino (atenúa la alteración de los valores de los parámetros bioquímicos).

9. Perspectivas.

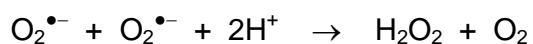
Estudiar el mecanismo por medio del cual la α M protege al riñón del daño por CP. Se pretende explorar en primer lugar si la protección de α M está asociada a la disminución del estrés oxidante.

Explorar si la administración conjunta de α M con otro compuesto antioxidante puede aumentar el porcentaje de renoprotección observado en este trabajo solo con α M.

10. Apéndice

Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). El $O_2^{\bullet-}$ puede ser producido por la reducción univalente del O_2 o por diversas enzimas como xantina oxidasa o la NADPH oxidasa. El $O_2^{\bullet-}$ es mucho menos reactivo que el OH^{\bullet} y no reacciona con la mayoría de las moléculas biológicas en soluciones acuosas. Sin embargo, reacciona rápidamente con otros radicales, tales como NO^{\bullet} , grupos hierro-azufre en ciertas enzimas y algunos radicales fenoxilo (Halliwell y Gutteridge, 2007). Por otro lado, la rápida desaparición de $O_2^{\bullet-}$ en soluciones acuosas se debe a la reacción de dismutación. Una molécula de $O_2^{\bullet-}$ es oxidada a O_2 y otra es reducida a H_2O_2 . La reacción es la siguiente



Cabe mencionar que el daño biológico por $O_2^{\bullet-}$ es altamente selectivo y usualmente involucra su reacción con otros radicales, por ejemplo NO^{\bullet} o iones hierro. Este también reacciona con HOCl y cloraminas e interactúa con proteínas mitocondriales (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Radical hidroxilo (OH^{\bullet}). El OH^{\bullet} puede ser generado por la reacción de iones metálicos con H_2O_2 o por fisión homolítica inducida por radiación UV del enlace O-O en el H_2O_2 .

Puesto que el mayor constituyente de las células es el agua, la exposición a radiación de alta energía, tal como los rayos γ origina la producción de OH^{\bullet} por la fisión homolítica de agua. Los OH^{\bullet} son responsables por mucho del daño hecho al ADN celular, proteínas y lípidos por radiación ionizante.

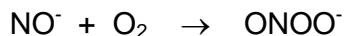
El OH^{\bullet} es el radical de oxígeno más reactivo conocido. Por ejemplo, es difícil demostrar las reacciones del OH^{\bullet} *in vitro* en soluciones que contienen determinadas soluciones amortiguadoras, ya que el OH^{\bullet} las ataca rápidamente y se producen los radicales derivados del amortiguador.

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 es un líquido viscoso de color azul pálido. Es tóxico a muchas células en el intervalo de 10 a 100 μM , y causa senescencia o apoptosis, pero a niveles más bajos puede promover la proliferación de ciertos tipos de células, y a niveles más altos suprime la apoptosis y promueve muerte celular necrótica. Además, el H_2O_2 se mezcla fácilmente con agua y puede difundir dentro y entre las células *in vivo* (Halliwell y Gutteridge, 2007). El H_2O_2 es continuamente producido en muchos tejidos *in vivo*. Dada su extensa presencia *in vivo*, H_2O_2 es solo un débil agente oxidante o reductor y es generalmente poco reactivo. Además, al cruzar las membranas

celulares reacciona con iones hierro, y posiblemente cobre, para formar especies más dañinas tales como OH^\bullet .

Oxígeno singulete. El oxígeno singulete es mucho más oxidante que el oxígeno en estado basal (O_2). El oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) es a menudo generado por reacciones de fotosensibilización. Si ciertas moléculas son iluminadas con luz de la correcta longitud de onda, estas la absorben y la energía lleva la molécula a un estado excitado. La energía de excitación puede entonces transferirse a una molécula de O_2 adyacente, y convertirla en un estado singulete mientras el fotosensibilizador regresa a su estado basal.

Oxido nítrico. El oxido nítrico (NO^\bullet) es un gas incoloro, moderadamente soluble en agua y más soluble en solventes orgánicos. Así, NO^\bullet puede cruzar membranas y fácilmente difundir entre y dentro de las células. El NO^\bullet tiene un electrón desapareado que si es removido se produce NO^+ , catión nitrosonium. Una reducción da anión nitroxil, NO^- , el cual también existe como una forma protonada, HNO . El nitroxil es una especie reactiva de vida corta, por ejemplo esta reacciona con O_2 para dar peroxinitrito (ONOO^-)



11. Referencias

- Atasayar S, Gürer-Orhan H, Orhan H, Gürel B, Girgin G, Özgünes H. Preventive effect of aminoguanidine compared to vitamin E and C on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* **2009**; 61(1): 23-32.
- Burtis CA, Ashwood ER, eds. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Fifth Edition. Philadelphia, Pennsylvania, W.B. Saunders **2001**; Pp. 349, 415, 416, 417.
- Chairungsrilerd N, Furukawa K, Ohta T, Nozoe S, Ohizumi Y. Pharmacological properties of α -mangostin, a novel histamine H1 receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology* **1996**; 314(3): 351-356.
- Chen LG, Yang LL, Wang CC. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. *Food and Chemical Toxicology* **2008**; 46(2): 688-693.
- Chirino YI, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacology* **2004**; 4: 20.
- Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicological Pathology* **2009**; 61(3): 223-242.
- Devi Sampath P, Vijayaraghavan K. Ameliorative prospective of alpha-mangostin, a xanthone derivative from *Garcinia mangostana* against β -adrenergic catecholamine-induced myocardial toxicity and anomalous cardiac TNF- α and COX-2 expressions in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* **2008**; 60(4-5): 357-364.
- Devi Sampath P, Vijayaraghavan K. Cardioprotective effect of α -mangostin, a xanthone derivative from mangosteen on tissue defense system against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **2007**; 21(6): 336-339.
- Fouad AA, Morsy MA, Gomaa W. Protective effect of carnosine against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2008**; 25(3): 292-297.
- Fox SI. Human Physiology. 10th ed. Boston, McGraw-Hill Higher Education **2008**; Pp. 564-565.
- Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 11th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders **2006**; Pp. 308-310, 344.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Fourth Edition. New York, Oxford University Press Inc. **2007**; Pp. 42, 44, 46-48, 53, 61, 63, 66, 67, 69, 70, 73, 74.

- Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Therapy* **2003**; 1: 47-61.
- Jung M, Hotter G, Viñas JL, Sola A. Cisplatin upregulates mitochondrial nitric oxide synthase and peroxynitrite formation to promote renal injury. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2009**; 234(2): 236-246.
- Lee S, Kim W, Moon SO, Sung MJ, Kim DH, Kang KP, Jang YB, Lee JE, Jang KY, Park SK. Rosiglitazone ameliorates cisplatin-induced renal injury in mice. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2006**; 21(8): 2096-2105.
- Liu Xh, Li J, Li Qx, Ai Yx, Zhang L. Protective effects of ligustrazine on cisplatin-induced oxidative stress, apoptosis and nephrotoxicity in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2008**; 26(1): 49-55.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* **1951**; 193(1): 265-275.
- Mathews CK, Holde KE van, Ahern KG. Biochemistry. Third Edition. San Francisco, CA, Addison Wesley Longman **2000**; Pp. 727, 729, 730.
- McClatchey KD. Clinical Laboratory Medicine. Second Edition. Philadelphia, Pennsylvania, Lippincott Williams & Wilkins ed **2002**; Pp. 385, 524.
- Molitoris BA, Finn WF. Acute Renal Failure. First Edition. Philadelphia, Pennsylvania, W.B. Saunders **2001**; Pp. 366.
- Nakagawa Y, Iinuma M, Naoe T, Nozawa Y, Akao Y. Characterized mechanism of α -mangostin-induced cell death: Caspase-independent apoptosis with release of endonuclease-G from mitochondria and increased miR-143 expression in human colorectal cancer DLD-1 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**; 15(16): 5620-5628.
- Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Orozco-Ibarra M, Pérez-Rojas JM. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology* **2008**; 46(10): 3227-3239.
- Pedraza-Chaverri J, Reyes-Fermín LM, Nolasco-Amaya EG, Orozco-Ibarra M, Medina-Campos OM, González-Cuahutencos O, Rivero-Cruz I, Mata R. ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of α -mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Experimental and Toxicologic Pathology* **2009**; 61(5); 491-501.
- Pérez Albarsanz MA. Universidad de Alcalá. Valoración de proteínas por el método de Lowry (en línea). Madrid, España **2008**. Consultado 3 jun. 2009. Disponible en <http://www2.uah.es/mapa/Professor%20Sample%20Site/activos/practicas/Lowry.doc>
- Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an Index of renal function: New

Insights into old concepts. *Clinical Chemistry* **1992**; 38(10): 1933-1953.

- Razzaque MS. Cisplatin nephropathy: is cytotoxicity avoidable? *Nephrology Dialysis and Transplantation* **2007**; 22(8): 2112-2116.
- Sakagami Y, Iinuma M, Piyasena KGNP, Dharmaratne HRW. Antibacterial activity of α -mangostin against vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) and synergism with antibiotics. *Phytomedicine* **2005**; 12(3): 203-208.
- Slot C. Plasma creatinine determination. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* **1965**; 17(4): 381-387.
- Srivastava RC, Farookh A, Ahmad N, Misra M, Hasan SK, Husain MM. Evidence for the involvement of nitric oxide in cisplatin-induced toxicity in rats. *BioMetals* **1996**; 9(2): 139-142.
- Tsuji T, Kato A, Yasuda H, Miyaji T, Luo J, Sakao Y, Ito H, Fujigaki Y, Hishida A. The dimethylthiourea-induced attenuation of cisplatin nephrotoxicity is associated with the augmented induction of heat shock proteins. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2008**; 234(2): 202-208.
- Vasiliades J. Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: kinetics and mechanism of formation of the mono-creatinine picric acid complex. *Clinical Chemistry* **1976**; 22(10): 1664-1671.
- Williams P, Ongsakul M, Proudfoot J, Croft K, Beilin L. Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. *Free Radical Research* **1995**; 23(2): 175-184.
- Yates P, Stout GH. The structure of mangostin. *Journal of the American Chemical Society* **1958**; 80 (7): 1691-1700.
- Yildirim Z, Sogut S, Odaci E, Iraz M, Ozyurt H, Kotuk M, Akyol O. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacological Research* **2003**; 47(2): 149-156.