



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

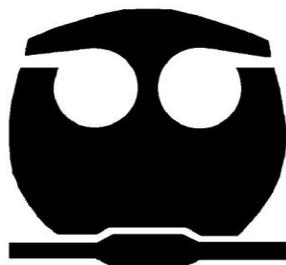
ESTUDIO IN VITRO SOBRE EL EFECTO
PROTECTOR DEL SULFORAFANO SOBRE
LA NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR
CISPLATINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

QA. MARIEL CALDERÓN OLIVER



Tutor: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

MÉXICO, D. F.

Mayo 2011



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.

ESTUDIO IN VITRO SOBRE EL EFECTO PROTECTOR DEL SULFORAFANO SOBRE LA NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR CISPLATINO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverrí en el Laboratorio 209 del edificio F, en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Dr. José Pedraza Chaverrí	Facultad de Química, UNAM.

Se reconoce la asesoría técnica del M. en C. Omar Noel Medina Campos en los experimentos de capacidad antioxidante y de actividad antioxidante enzimática así como en la revisión de tesis.

El proyecto fue apoyado parcialmente por el CONACYT (129838) y la DGAPA-UNAM (IN201910).

El CONACYT me distinguió como becaria durante los estudios de maestría.

Esta tesis fue presentada el día

El Jurado de examen de maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Vocal	Dr. Francisco Ruiz Terán	Facultad de Química, UNAM.
Secretario	Dr. José de Jesús García Trejo	Facultad de Química, UNAM.
Suplente	Dra. Carmen Mejía Vázquez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Suplente	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Esta tesis está dedicada a mi mamá Silvia y a mi hermano David por todo el apoyo, comprensión, tiempo, paciencia y cariño que me han brindado a lo largo de mi vida. ¡Los quiero mucho!

Al M. en C. Omar Medina por su apoyo, capacitación y ayuda en la realización de los experimentos y cálculos. Además de llegar a ser un gran amigo y compañero de trabajo a lo largo de tres años de mucho trabajo exhaustivo en el laboratorio.

A Eduardo Molina por compartir grandes momentos (¡¡de todo tipo!!), por escucharme y apoyarme, por vivir conmigo esta larga aventura llena de aprendizaje, sonrisas, tristezas, comidas, un viaje de conocimientos por Chiapas...en fin, muchos recuerdos imborrables. ¡Eres genial!

A cada uno de los miembros del jurado por su tiempo, dedicación y consejos durante la revisión de la tesis: Dr. Ruiz Terán, Dr. García Trejo, Dra. Mejía Vázquez y Dra. Quirasco Baruch. Así mismo un agradecimiento especial a la Dra. Chagoya de Sánchez y al Dr. Espinosa Aguirre por sus observaciones, preguntas y comentarios en cada uno de los tutorales.

Al Dr. Pedraza por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por el aprendizaje y enseñanzas en estos tres años de colaboración.

A mis amig@s Cinthya, Gaby, Itzia, Ileri, Betty, Daniela y Adverqueydi por estar presentes en estos dos años de la maestría, compartiendo diversos momentos, pláticas y sonrisas, etc. También quiero agradecer a Jorge Ramírez y Roberto Alejandro Reyes por ser los amigos más especiales, que me han ofrecido una amistad sincera y momentos muy gratos en todo momento.

Al personal docente del Posgrado de Ciencias Bioquímicas por contribuir a su manera y modo en mi formación como Maestra en Ciencias. Con mención especial para Leticia García Gutiérrez, por su orientación y ayuda en todo momento, ya que sin ella, cada uno de los trámites escolares sería un caos. ¡Mil gracias!

A Dios y a la vida por dejarme llegar tan lejos, por forjar lo que soy ahora y poner en mi camino a muchas personitas especiales que han dejado huella en mi vida.

A UNAM por ser mi segunda casa en más de 7 años, por todas las facilidades que me ha dado, por el aprendizaje continuo y por forjar mi carácter profesional.

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	i
2.	ABREVIATURAS.....	iii
3.	INTRODUCCIÓN.....	1
3.1.	Sulforafano (SFN).....	1
3.1.1.	Función antioxidante del SFN.....	2
3.2.	Cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II; CIS).....	5
3.3.	Estrés y daño oxidante.....	6
4.	JUSTIFICACIÓN.....	10
5.	HIPÓTESIS.....	10
6.	OBJETIVOS.....	10
6.1.	Objetivo general.....	10
6.2.	Objetivos particulares.....	10
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
7.1.	Reactivos.....	10
7.2.	Cultivos celulares.....	11
7.3.	Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).....	11
7.4.	Medición del contenido de glutatión (GSH).....	13
7.5.	Cuantificación de la actividad de enzimas citoprotectoras.....	13
7.5.1.	NADPH quinona óxido reductasa-1 (NQO1).....	14
7.5.2.	γ -glutamato-cisteína ligasa (GCL).....	14
7.6.	Viabilidad celular. Método de MTT.....	15
7.7.	Evaluación del potencial de membrana mitocondrial (MMP).....	16
7.8.	Análisis de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> del SFN sobre ERO.....	17
7.8.1.	Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	17
7.8.2.	Anión peroxinitrito ($ONOO^-$).....	18
7.8.3.	Oxígeno singulete (1O_2).....	19
7.8.4.	Ácido hipocloroso (HOCl).....	19
7.8.5.	Radical peroxilo (RO_2^{\bullet}).....	20
7.8.6.	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....	21
7.8.7.	Radical hidroxilo (OH^{\bullet}).....	21
7.9.	Análisis de datos.....	22
8.	RESULTADOS.....	23
8.1.	Producción de ERO.....	23
8.2.	Contenido de GSH.....	25
8.3.	Actividad de enzimas citoprotectoras.....	26
8.3.1.	Actividad de NQO1.....	26
8.3.2.	Actividad de GCL.....	27
8.4.	Participación de las enzimas citoprotectoras en el efecto del SFN.....	28
8.5.	Efecto del SFN sobre la alteración del MMP inducida por CIS.....	31
8.6.	Efecto de la preincubación y coincubación con SFN sobre la muerte celular.....	33
8.7.	Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> del SFN.....	35
9.	DISCUSIÓN.....	36
10.	CONCLUSIÓN.....	40
11.	PERSPECTIVAS.....	40
12.	REFERENCIAS.....	40

1. RESUMEN

- **INTRODUCCIÓN:** El sulforafano (SFN) es un isotiocianato que se produce como resultado de la hidrólisis del glucosinolato glucorafanina que está presente en los vegetales de la familia *Cruciferae*, particularmente en los pertenecientes al género *Brassica* como el brócoli. En modelos *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que el SFN es un antioxidante indirecto puesto que activa la transcripción de genes de respuesta al estrés oxidante como los de las enzimas antioxidantes hemo oxigenasa-1 (HO-1), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), NAD(P)H quinona óxido-reductasa-1 (NQO1), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST) y glutamato-cisteína ligasa (GCL), entre otras, lo cual forma parte de una respuesta celular o citoprotectora. El cisplatino (CIS) es un fármaco que se usa en los tratamientos de cáncer, sin embargo induce nefrotoxicidad como principal efecto secundario, la cual está asociada a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y a la disminución del contenido de glutatión reducido (GSH). Estas condiciones favorecen el establecimiento del estrés oxidante.
- **ANTECEDENTES:** En nuestro laboratorio hemos encontrado, mediante la evaluación de la viabilidad celular, que el SFN es capaz de disminuir de manera dependiente de la concentración el daño causado por el CIS en un cultivo de células renales LLCPK1. Una concentración de SFN 5 μM en presencia de CIS (40 μM por 24 h) mantiene en un 81.13% la viabilidad celular en comparación con el 50% observada por CIS; $p < 0.001$) y que el SFN induce la traslación del factor transcripcional Nrf2 del citoplasma al núcleo.
- **HIPÓTESIS:** La protección del SFN contra el daño del CIS en las células LLCPK1, se debe a la disminución del estrés oxidante causado por la inducción de enzimas antioxidantes, disminución en el daño mitocondrial y por la restauración de los niveles de GSH.
- **OBJETIVO:** Determinar el mecanismo por el cual el SFN es capaz de prevenir la muerte celular en las células expuestas a CIS analizando si en este proceso están involucrados la disminución de la producción de ERO, el daño mitocondrial, el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes como NQO1 y GCL, así como cambios en la concentración de GSH.
- **METODOLOGÍA:** Los estudios se realizaron en células LLCPK1 en cultivo que se preincubaron con SFN (0-5 μM) por 24 h, se lavaron y se incubaron con CIS 40 μM por 24 h más. Se determinaron los niveles de GSH mediante fluorescencia debido a la formación de aductos con el monoclorobimano, las actividades de las enzimas antioxidantes GCL y NQO1 mediante ensayos espectrofotométricos, la producción de ERO y de anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) mediante las sondas fluorescentes diacetato de 5-(y 6-)carboxi-2'-7'-diclorodihidrofluoresceína y dihidroetidio, respectivamente. Se evaluaron el potencial de membrana mitocondrial (MMP) usando la sonda fluorescente JC-1 y el papel que sobre la viabilidad celular, la producción de ERO y el MMP tienen las enzimas antioxidantes GCL y NQO1 mediante el empleo de los inhibidores butionina sulfoximina y dicumarol, respectivamente. Además se

determinó *in vitro* la capacidad atrapadora del SFN sobre algunas ERO por métodos espectrofotométricos, fluorescentes y luminiscentes.

- **RESULTADOS:** En las células LLCPK1 la incubación con SFN (1-5 μM) causó un aumento en el contenido de GSH y en la actividad de las enzimas NQO1 y GCL, previno la producción de ERO y de $\text{O}_2^{\bullet-}$, la disipación del MMP y la disminución de las actividades de las enzimas NQO1 y GCL causadas por el CIS. Sin embargo, la disminución en la concentración de GSH debida al CIS sólo se previno con la concentración 5 μM de SFN. El efecto protector del SFN en la viabilidad celular, el contenido de GSH, la producción de ERO y el MMP se previno al inhibir a las enzimas NQO1 y GCL. Se observó que cuando las células en presencia de CIS fueron incubadas antes o al mismo tiempo con SFN (a partir de la concentración 3 μM) la muerte celular se previno, efecto que no se presentó con el postratamiento con SFN. La capacidad antioxidante del SFN fue casi nula a concentraciones menores de 10 μM y se observó que a la concentración de 100 μM sólo atrapó 24% de peroxinitrito (ONOO^-), 33.7% de $\text{O}_2^{\bullet-}$, 13.7% de oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), 10.7% de ácido hipocloroso (HOCl) y 22.9% de radical hidroxilo (OH^{\bullet}), pero no atrapó radical peroxilo (ROO^{\bullet}) ni peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

- **DISCUSIÓN:** El SFN previno la producción de ERO, la disminución en el contenido de GSH y en las actividades enzimáticas de GCL y NQO1 y la muerte celular inducidas por CIS. La protección observada del SFN fue debida a su función de antioxidante indirecto puesto que induce la transcripción de enzimas antioxidantes como NQO1 y GCL por la vía Keap1/Nrf2/ARE, resultados que concuerdan con otros modelos experimentales anteriormente reportados, en donde el SFN protegió del estrés oxidante por la activación de esta vía y por un aumento en la cantidad y actividad de enzimas citoprotectoras.

El pre y co-tratamiento con SFN previnieron la muerte celular inducida por CIS probablemente por la inducción de enzimas citoprotectoras, sin embargo en el postratamiento con SFN, no se evidenció protección y esto podría explicarse porque el SFN presentó baja o nula capacidad atrapadora de ERO y por lo tanto no fue capaz de prevenir el daño o el estrés que se indujo por el CIS en la células. Lo que indica que el SFN al activar enzimas antioxidantes y disminuir el estrés oxidante es un buen candidato para el tratamiento de la nefrotoxicidad inducida por CIS.

- **CONCLUSIÓN:** En las células LLCPK1 el SFN disminuyó el estrés oxidante generado por la exposición a CIS a través de mecanismos mediados en parte por la actividad de las enzimas citoprotectoras NQO1 y GCL lo que se tradujo en una disminución del efecto citotóxico de este agente antitumoral.

- **PERSPECTIVAS:** Determinar el papel de otras enzimas antioxidantes en la protección del SFN contra el daño inducido por CIS. Evaluar la posible participación de otras vías de señalización involucradas en la protección por SFN. Analizar si el papel protector del SFN no interfiere con la función antineoplásica del CIS.

2. ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
AAPH	Dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)
ARE	Siglas en inglés de los elementos de respuesta antioxidante
ASB	Albúmina sérica bovina
ATP	Trifosfato de adenosina
BSO	Butionina sulfoximina
Carboxi-DCF	5-(y 6-) carboxi-2',7'-diclorofluoresceína
Carboxi-H ₂ DCF	5-(y 6-) carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína
Carboxi-H ₂ DCFDA	Diacetato de 5-(y 6-) carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína
CAT	Catalasa
CIS	Cisplatino
CT	Control
DCDHFDA	Diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína
DCDHF	2'7'-diclorodihidrofluoresceína
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DHEt	Dihidroetidio
DIC	Dicumarol
DFBF	Difenilisobenzofurano
DMEM	Medio de cultivo Eagle de Dulbecco modificado
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMTU	Dimetiltiourea
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
ERK	Siglas en inglés de las cinasas reguladas por señales extracelulares
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavina adenina dinucleótido
GCL	Glutamato-cisteína ligasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación S-transferasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO-1	Hemo oxigenasa-1
HOCl	Ácido hipocloroso
JC-1	Yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazol-carbocianina
JNK	Siglas en inglés de la cinasa del amino terminal de c-Jun
Keap1	Siglas en inglés del sensor químico "Kelch-like ECH-



	associated protein 1”
LLCPK1	Células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo
MAPK	Siglas en inglés de las cinasas activadas por mitógenos
MMP	Potencial de membrana mitocondrial
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NDA	2,3-naftalendicarboxialdehído
NDGA	Ácido nordihidroguayarético
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NO•	Óxido nítrico
NQO1	NAD(P)H quinona óxido-reductasa-1
Nrf2	Siglas en inglés del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2
$O_2^{\bullet-}$	Radical anión superóxido
OH•	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Anión peroxinitrito
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PI3K	Siglas en inglés de la cinasa de fosfatidil inositol 3
RO•	Radical alcoxilo
RO ₂ •	Radical peroxilo
SFB	Suero fetal bovino
SFN	Sulforafano
SOD	Superóxido dismutasa
SSA	Ácido 5-sulfosalicílico

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Sulforafano (SFN)



El sulforafano (SFN) es un isotiocianato que se origina de la hidrólisis enzimática del glucosinolato glucorafanina que está presente en los vegetales de la familia *Cruciferae* o *Brassicaceae*, especialmente los pertenecientes al género *Brassica* como el brócoli, la col de Bruselas, el colinabo, la coliflor y la col. La glucorafanina constituye más del 80% de los glucosinolatos totales presentes en el brócoli (Van Eylen et al., 2009) los cuales se distribuyen en toda la planta (raíz, tallo, hojas y semillas), son compuestos no volátiles, hidrofílicos y carentes de fragancia (Lampe, 2003; Campas-Baypoli et al., 2009).

La reacción de hidrólisis de la glucorafanina es catalizada por la enzima mirosinasa, también llamada β -D-tioglucoSIDASA (EC 3.2.3.1), la cual se activa por condiciones como la ruptura de la planta durante la postcosecha, daño por insectos, procesamiento y/o masticación, lo que ocasiona que se produzcan varios compuestos dependiendo del pH (Fig. 1) siendo el SFN el producto mayoritario formado a pH neutro (Fahey y Talalay, 1999; Shapiro et al., 2001). Es importante destacar que en roedores y humanos, en ausencia de mirosinasa, la glucorafanina se convierte a SFN por acción de la microbiota intestinal (Shapiro et al., 1998).

El SFN se encuentra en el brócoli fresco en concentraciones de 11.2-43.1 mg por cada 100 g (Galgano et al., 2007; Matusheski y Jeffery, 2001; Howard et al., 1997) y la amplitud de este rango se debe a diversos factores como la variación en las condiciones ambientales y el lugar de cultivo, así como las condiciones de postcosecha (Botero-Omary et al., 2002) o al tiempo y método de cocción. De hecho un aumento en el tiempo de cocción, de 9-15 min, ocasiona la pérdida del 18-59% de glucosinolatos lo que causa que el contenido de SFN disminuya (McNaughton y Marks, 2003).

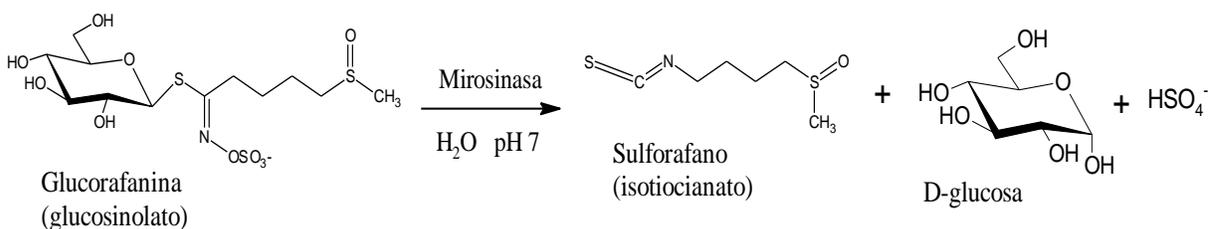


Figura 1. Formación de SFN mediante la reacción de hidrólisis de la glucorafanina.

En humanos se ha observado que después de consumir 200 g de brócoli cocido, el SFN alcanza su máxima concentración en orina y en sangre a las 6 h, con un 3.4% de biodisponibilidad y un tiempo de excreción de 2.4 h; mientras que después del consumo de 200 g de brócoli crudo, el SFN presenta una biodisponibilidad del 37% y una vida media de excreción de 2.6 h y alcanza su máxima concentración en sangre en 1.6 h (Vermeulen et al., 2008). La principal vía de excreción del SFN en mamíferos es la urinaria e involucra su conjugación con GSH y la posterior formación de ácido mercaptúrico mediante la acción de

las enzimas γ -glutamyltranspeptidasa, cisteinilglicinasa y N-acetiltransferasa (Zhang y Callaway, 2002, Kassahun et al., 1997) (Fig. 2).

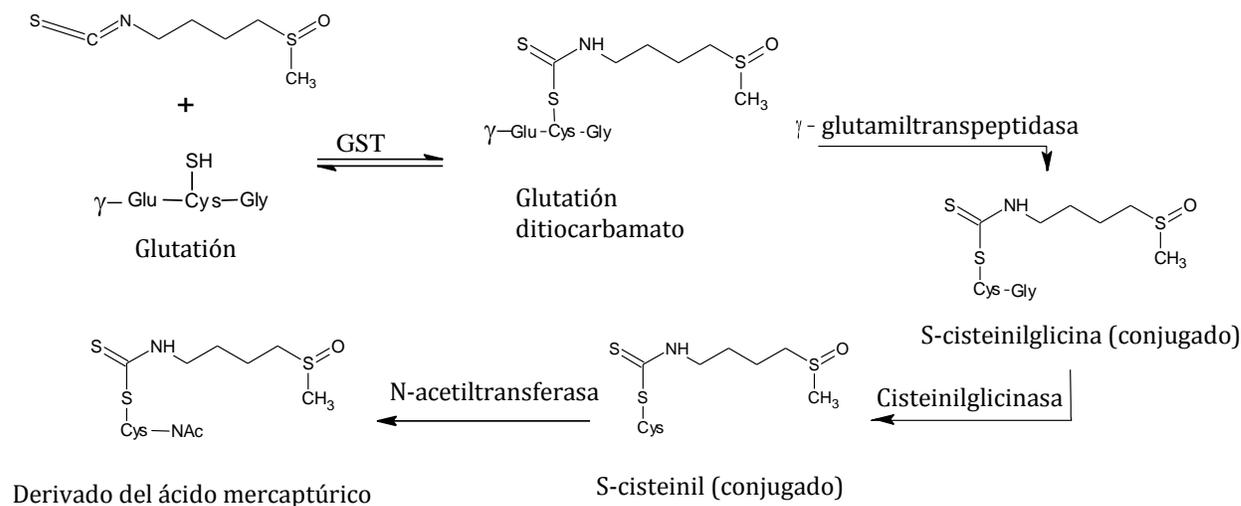


Figura 2. Vía de excreción del SFN.

3.1.1. Función antioxidante del SFN

El SFN es considerado como un antioxidante indirecto puesto que es un potente inductor de enzimas antioxidantes como glutatión-S-transferasa (GST), NAD(P)H óxido quinona reductasa (NQO1), hemo oxigenasa-1 (HO-1), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), γ -glutamato cisteína ligasa (GCL) y glutatión peroxidasa (GPx) las cuales eliminan carcinógenos y electrófilos potenciales resultantes del metabolismo como las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Yoon et al., 2008; Dinkova-Kostova y Talalay, 2008) por lo tanto el SFN fortalece así el estado antioxidante celular favoreciendo condiciones de citoprotección (Zhang y Talalay, 1994; Angeloni et al., 2009).

El mecanismo por el cual el SFN causa o desencadena un efecto citoprotector se relaciona con una vía de señalización celular en la que este compuesto participa permitiendo la disociación del complejo proteico Keap1-Nrf2 (siglas en inglés del sensor químico Kelch-like ECH-associated protein 1 y NF-E2-related factor-2) presente en el citoplasma, lo que permite que el factor Nrf2 se traslade al núcleo celular (Zhang, 2006) y se una a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) estimulando así la transcripción de genes citoprotectores (Fig. 3) (Motohashi y Yamamoto, 2004; Kobayashi y Yamamoto, 2006). Sin embargo, el mecanismo por el cual el SFN causa la disociación de este complejo no se ha descrito con detalle aunque se sabe que el SFN actúa directamente en las cisteínas de Keap1 formando aductos con algunos grupos tioles e induciendo cambios conformacionales que permiten la disociación de Nrf2 y de Keap1 (Hong et al., 2005). Por otra parte, se ha informado que el SFN es capaz de modular la actividad de algunas proteínas cinasas como las activadas por mitógenos (MAPK), las cinasas del amino terminal de c-Jun (JNK), las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2), la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K/Akt) (Jakubíková et al., 2005, Juge et al, 2007) que fosforilan a Nrf2 y que le permite disociarse de Keap1 (Apopa et al., 2008).

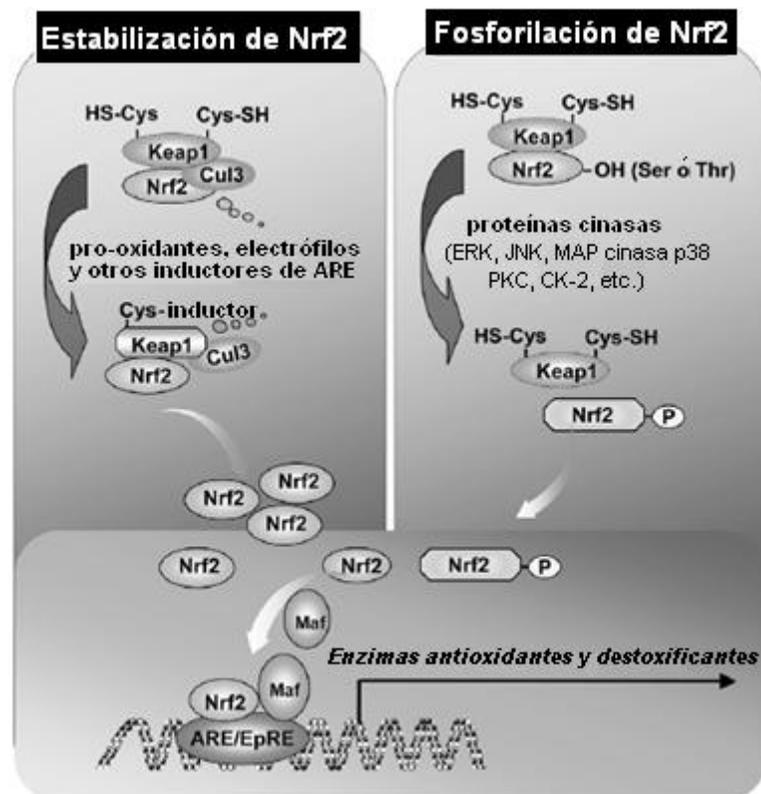


Figura 3. Mecanismo de inducción de genes citoprotectores debido a un inductor como el SFN (Surh et al., 2008).

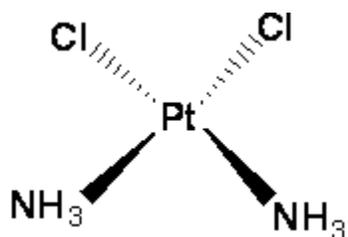
En la Tabla 1 se presentan algunos estudios *in vivo* e *in vitro* en los que se ha analizado el mecanismo anteriormente descrito de inducción de genes citoprotectores por el SFN mediante la determinación de la traslación de Nrf2 al núcleo, la medición de la cantidad y la actividad de proteínas citoprotectoras, efectos que se asociaron con la disminución del estrés oxidante.

Tabla 1. Evidencia de la actividad antioxidante del SFN.

	<i>Modelo experimental</i>	<i>Referencia</i>
Inducción de enzimas antioxidantes (NQO1, GR, GPx, HO-1, GST)	Daño por hipoxia-reoxigenación en células HK2	Yoon et al., 2008
	Isquemia-reperfusión en riñón de ratas	Yoon et al., 2008
	Acumulación de arsénico en hepatocitos primarios de ratón	Shinkai et al., 2006
	Daño por estreptozotocina en células pancreáticas de rata	Song et al., 2009
	Incubación con SFN a diferentes tiempos y concentraciones en cardiomiocitos de rata	Angeloni et al., 2009

	Incubación con SFN a diferentes concentraciones en diferentes líneas celulares humanas de próstata	Brooks et al., 2001
	Consumo de brócoli en ratas. Inducción de enzimas en diversos tejidos como estómago, intestino delgado, duodeno, vejiga, páncreas e hígado.	McWalter et al., 2004 Munday y Munday, 2004 Hu et al., 2004 Hu et al., 2006 Matusheski y Jeffery, 2001
	Incubación con SFN a diferentes concentraciones en diversas líneas celulares de mamíferos	Jiang et al., 2003
	Nefrotoxicidad inducida por cisplatino	Guerrero-Beltrán et al., 2010
	Consumo de col de Bruselas en humanos	Bogaards et al., 1994
Aumento de Nrf2 en núcleo y disminución de Nrf2 en citoplasma	Daño por hipoxia-reoxigenación en células HK2	Yoon et al., 2008
	Isquemia-reperfusión en riñón de ratas	Yoon et al., 2008
	Acumulación de arsénico en hepatocitos primarios de ratón	Shinkai et al., 2006
	Daño por estreptozotocina en células pancreáticas de rata	Song et al., 2009
Disminución en la lipoperoxidación	Isquemia-reperfusión en riñón de ratas	Yoon et al., 2008
Aumento de GSH	Isquemia-reperfusión en riñón de ratas	Yoon et al., 2008
	Acumulación de arsénico en hepatocitos primarios de ratón	Shinkai et al., 2006
Disminución de ERO	Células pancreáticas de rata incubadas con interferon- γ e interleucina-1 β	Song et al., 2009
	Incubación con SFN a diferentes tiempos y concentraciones en cardiomiocitos de rata frente al estrés oxidante inducido por H ₂ O ₂	Angeloni et al., 2009
	Hipertensión y aterosclerosis en tejidos cardíacos y riñón de rata	Wu et al., 2004
Disminución en la fragmentación de ADN	Incubación con SFN a diferentes tiempos y concentraciones en cardiomiocitos de rata frente al estrés oxidante inducido por H ₂ O ₂	Angeloni et al., 2009

3.2. Cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II; CIS)



El cisplatino (CIS) es un compuesto inorgánico de coordinación, formado por 1 átomo de platino rodeado por 2 átomos de cloro y 2 átomos de amonio en posición *cis* (Ali y Al Moundhri, 2006). Es un importante agente quimioterapéutico usado clínicamente para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer que se presentan en cuello, testículo, ovario, pulmón, vejiga, esófago, cuello uterino, entre otros (Lebwohl y Canetta,

1998). El CIS puede reaccionar con proteínas (formando enlaces cruzados tanto intracatenarios como intercatenarios) y con el ADN (formando aductos que inhiben la replicación y la transcripción de ese ácido nucleico) (Kelland, 2007; Jamieson y Lippard, 1999).

Desafortunadamente, en aproximadamente el 30% de los pacientes a los que se les administra CIS se presenta nefrotoxicidad (Daugaard y Abildgaard, 1989). Generalmente después de 10 días de la administración se presenta una disminución en la filtración glomerular y elevación en los niveles de creatinina sérica (Arany y Safirstein, 2003; Gonzales-Vitale et al., 1977).

En varios trabajos, tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha demostrado que la nefrotoxicidad ocasionada por el CIS está asociada a la producción de especies reactivas de nitrógeno (ERN) y de ERO (Davis et al., 2001; Xiao et al., 2003; Ali y Al Moundhri, 2006; Chirino et al., 2004; Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009) (Tabla 2), a la disminución en la actividad de algunas enzimas antioxidantes como GPx, GR, SOD y CAT (Guerrero-Beltrán et al., 2010; Cetin et al., 2006; Mohan et al., 2006; Badary et al., 2005; Naziroglu et al., 2004), a la disminución de glutatión reducido (GSH) (Saad et al., 2002; Dwivedi et al., 2005), al aumento de algunos marcadores de lipoperoxidación como malondialdehído y 4-hidroxi-2-nonenal (Matsushima et al., 1998; Mohan et al., 2006; Cetin et al., 2006; Minamiyama et al., 2002) y al daño al ADN (Minamiyama et al., 2002).

Tabla 2. Evidencias de la producción de ERO y/o ERN en la nefrotoxicidad inducida por CIS.

<i>ERO ó ERN</i>	<i>Modelo experimental</i>	<i>Referencia</i>
Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Sistemas acelulares y en ratas Wistar macho	Masuda et al., 1994 Nishikawa et al., 2001 Chirino et al., 2008a Son y Kim, 1995
Óxido nítrico (NO^{\bullet})	Macrófagos aislados de ratón	Srivastava et al., 1996 Mansour et al., 2003 Chirino et al., 2008b
Oxígeno singulete (1O_2)	Ratas Sprague Dawley macho	Atessahin et al., 2005
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	Células de túbulo proximal terminal	Tsutsumishita et al., 1998
Anión peroxinitrito ($ONOO^-$)	Ratas Wistar macho	Chirino et al., 2004 Husain et al., 1998 Masuda et al., 1994
Radical hidroxilo (OH^{\bullet})	Sistemas acelulares, ratas Wistar	Yoshida et al., 2003 Kadikoylu et al., 2004 Sueishi et al., 2002

Se sabe que parte del mecanismo en la producción de ERO por CIS es debida a la inhibición en la cadena de transporte de electrones durante la respiración mitocondrial, ya que el CIS inhibe a los complejos respiratorios I-IV (Kruidering et al., 1997) además de disminuir la producción de ATP y la entrada de calcio a la mitocondria (Rodrigues et al., 2010), lo que impide la reducción del oxígeno a agua, contribuyendo a la formación de ERO.

El CIS se acumula en el riñón en las células del túbulo proximal y penetra en ellas a través de transportadores de cationes orgánicos conocidos como hOCT2 (Ciarimboli et al., 2005). El mayor daño inducido por CIS se presenta en el segmento S3 del túbulo proximal renal que se encuentra en la zona de la corteza renal (Weiner y Jacobs, 1983) debido a que es la zona donde principalmente se acumula, por lo tanto en nuestro modelo de estudio se emplearan las células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo (LLCPK1) para evaluar los efectos del SFN sobre la toxicidad del CIS, ya que estas células poseen características bioquímicas y morfológicas similares a las de túbulo proximal renal de humanos.

3.3. Estrés y daño oxidante

El estrés oxidante es una alteración en el balance existente entre moléculas oxidantes y moléculas antioxidantes a favor de las primeras y que tiene el potencial de inducir daño celular causado por la interacción de las ERO con los constituyentes de los organismos vivos como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Las ERO 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. 4) y a su vez estas especies parcialmente reducidas pueden reaccionar entre sí para formar otras ERO.

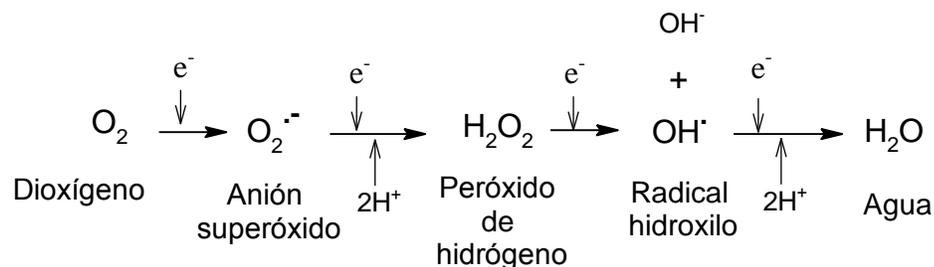


Figura 4. Formación de ERO mediante la reducción univalente del oxígeno.

El estrés oxidante provoca la fragmentación del ADN por alteraciones en las bases nitrogenadas, altera la fluidez en la membrana celular por la oxidación de lípidos y favoreciendo la generación de moléculas citotóxicas como malondialdehído y causa la pérdida de la capacidad catalítica de proteínas por el rompimiento de los enlaces peptídicos así como por la oxidación de aminoácidos.

En la Tabla 3 se presentan algunas de las características importantes de algunas ERO (Morales et al., 2009).

Tabla 3. Características de algunas ERO.

<i>ERO</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Características</i>
Ácido hipocloroso	HOCl	Formado por la acción de la mieloperoxidasa.
Anión radical superóxido	O ₂ ^{•-}	Intermediario en la reducción del O ₂ al H ₂ O. Es importante debido a que puede generar más especies reactivas de oxígeno como OH [•] y H ₂ O ₂ .
Oxígeno singulete	¹ O ₂	Especie molecular de oxígeno que se activa por acción de la luz solar y las radiaciones. Es altamente oxidante.
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	Originado en la dismutación del O ₂ ^{•-} por acción de la enzima SOD. Puede originar otros reactivos durante la reacción de Fenton con metales. Es lipofílico.
Radical alcoxilo	RO [•]	Es un agente oxidante con potencial medio para actuar sobre los lípidos.
Radical hidroxilo	OH [•]	Es el agente oxidante más reactivo en los sistemas biológicos. Normalmente es producido durante la reacción de Fenton y Haber-Weiss. Tiene la capacidad de reaccionar con ADN, proteínas y lípidos.
Radical peroxilo	RO ₂ [•]	Es un agente oxidante con baja reactividad pero con alta difusión.

En contraposición a un agente oxidante, un compuesto antioxidante es cualquier sustancia que retarda, previene o remueve el daño oxidante a una molécula blanco (Halliwell y Gutteridge, 2007). Desde un punto de vista particular existen tres tipos de antioxidantes, los directos, los indirectos y los bifuncionales. En la Tabla 4 se resumen algunas de las características de estos tres tipos de antioxidantes.

Tabla 4. Características de los tipos de antioxidantes.

<i>Directos</i>	<i>Indirectos</i>	<i>Bifuncionales</i>
Con actividad redox	Pueden o no tener actividad redox	Cumplen con una o varias características de los antioxidantes directos e indirectos
Se consumen durante las funciones antioxidantes	No se consumen e inducen proteínas citoprotectoras que actúan catalíticamente	Ejemplos: Resveratrol, curcumina
Necesitan ser regenerados	Tiene vida media larga	
Son de corta duración	Poca probabilidad de presentar efecto pro-oxidante	
Pueden tener efectos pro-oxidantes	Ejemplos: SFN, carnosol, epigallocatequina 3-galato	
Ejemplos: vitamina C y E, α-mangostina		

Dependiendo de su mecanismo de acción, los antioxidantes se pueden clasificar en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros son proteínas que tienen una función catalítica para remover ERO y otras especies reactivas como las de nitrógeno y radicales libres, ejemplo de ellos son enzimas como SOD, CAT y otras peroxidases. Los no enzimáticos son proteínas que disminuyen la disponibilidad de moléculas pro-oxidantes y protegen a las biomoléculas contra el daño oxidante, ya que pueden atrapar ERO, ejemplo

de ellos son la ferritina, transferrina, proteínas de choque térmico, GSH y α -tocoferol (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006), además de metaloproteínas y proteínas regulatorias de algunos factores de transcripción que ayudan a disminuir el estrés oxidante (Baird y Dinkova-Kostova 2011).

Se ha demostrado que el uso de algunos antioxidantes directos e indirectos de origen natural disminuyen la nefrotoxicidad causada por el CIS (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009; Weijl et al., 2004; Ali y Al Moundhi, 2006; Chirino et al., 2004; 2008a,b; Razo-Rodríguez et al., 2008; Pérez-Rojas et al., 2009), por lo que el uso de antioxidantes naturales ha adquirido un mayor auge y relevancia en la actualidad. En la Tabla 5 se indican algunos ejemplos de antioxidantes dietarios cuyo uso ha disminuido la toxicidad del CIS.

Tabla 5. Antioxidantes dietarios que disminuyen la nefrotoxicidad de CIS.

<i>Antioxidante</i>	<i>Modelo nefrotóxico o de estrés oxidativo inducido por CIS</i>	<i>Referencia</i>
α-tocoferol	Ratas hembra Wistar (6 mg/ kg i.p.)	Naziroglu et al., 2004
Resveratrol	Ratas Sprague-Dawley (10 mg/kg i.p.)	Cetin et al., 2006
Vitamina C	Ratones (7 mg /kg i.p.)	Maliakel et al., 2008
Licopeno	Ratas macho Sprague Dawley (7 mg/kg i.p.)	Atessahin et al., 2005
α-mangostina	Ratas macho Wistar (7.5 mg/kg i.p.)	Pérez-Rojas et al., 2009
Curcumina	Ratas macho Wistar (5 mg/kg i.p.)	Kuhad et al., 2007
Sulforafano	Ratas macho Wistar (7.5 mg /kg i.p.)	Guerrero-Beltrán et al., 2010

En nuestro laboratorio ya se ha demostrado que el SFN es capaz de disminuir el daño inducido por CIS en cultivos de células LLCPK1. Cuando estas células se preincubaron con diferentes concentraciones de SFN por 24 h se observó un aumento (dependiente de la concentración) en su viabilidad en comparación con las células que sólo se trataron con CIS (Guerrero-Beltrán et al., 2010) (Fig. 5). Este efecto fue relacionado con la disminución del estrés oxidante y con la activación de la expresión de enzimas antioxidantes como consecuencia de la traslación de Nrf2 al núcleo (Fig. 6).

También se ha observado *in vivo* que la administración de SFN atenúa el daño renal (evaluado histológicamente y por marcadores de función renal) inducido por CIS, lo que podría explicarse por el aumento en la actividad de algunas enzimas citoprotectoras como CAT, GST y GPx (Guerrero-Beltrán et al., 2010).

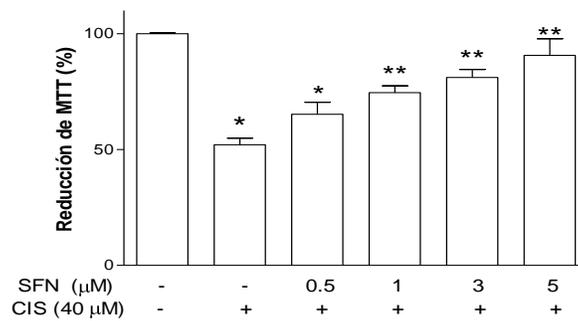


Figura 5. El SFN previene la muerte celular inducida por CIS. Las células LLCPK1 se preincubaron con SFN por 24 h y después con CIS (40 μM) por 24 h más. La viabilidad se determinó por el método de MTT. Los datos se presentan como promedio \pm SEM. * $p < 0.001$ vs. CT, ** $p < 0.001$ vs. CIS (Guerrero-Beltrán et al., 2010).

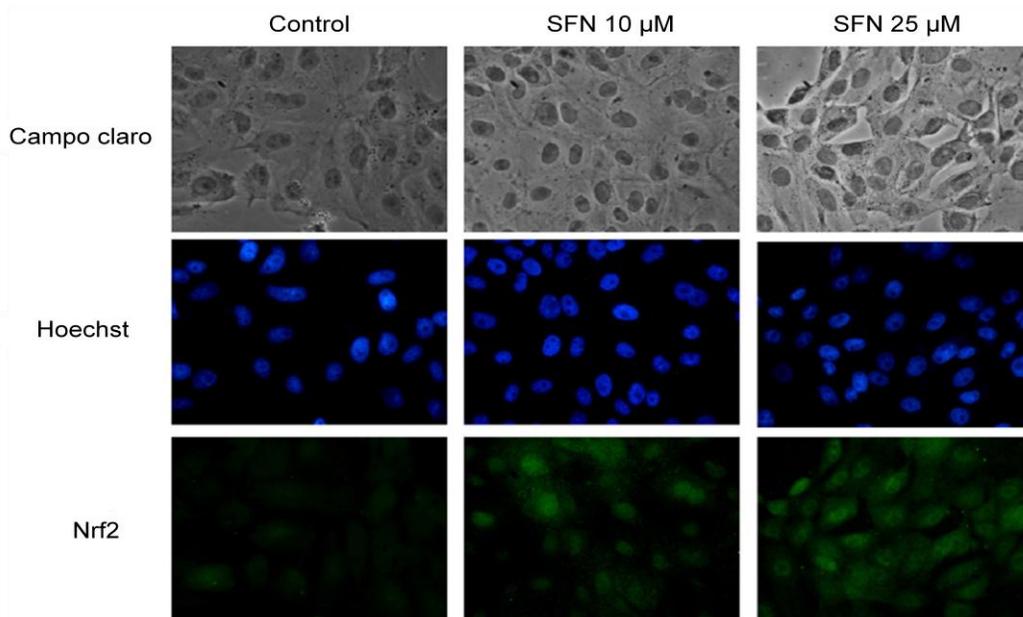


Figura 6. El SFN induce la traslación del factor transcripcional Nrf2 al núcleo. Las células LLCPK1 se incubaron con SFN (10 y 25 μM) por 3 h. La traslación nuclear de Nrf2 se detectó por inmunofluorescencia (Guerrero-Beltrán et al., 2010).

4. JUSTIFICACIÓN

El SFN es un antioxidante indirecto que tiene funciones protectoras en condiciones de estrés oxidante. Se ha demostrado el efecto citoprotector de este antioxidante en la citotoxicidad inducida por CIS en cultivos celulares pero no se ha estudiado el mecanismo por el cual el SFN ejerce este efecto en este modelo.

5. HIPÓTESIS

- La protección del SFN contra el daño del CIS en las células LLCPK1 se debe a la disminución del estrés oxidante mediada por la inducción de enzimas antioxidantes como NQO1 y GCL así como a la prevención en la disminución en los niveles de GSH y a la disminución del daño mitocondrial.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

- Describir el mecanismo por medio del cual el SFN ejerce un efecto protector en la toxicidad inducida por CIS en células LLCPK1.

6.2. Objetivos particulares

- Determinar el efecto del SFN sobre el estrés oxidante inducido por CIS evaluando:
 - la producción de ERO.
 - la concentración de GSH.
 - el potencial de membrana mitocondrial.
- Determinar la actividad de enzimas antioxidantes
 - NQO1 y GCL.
- Determinar la capacidad antioxidante del SFN.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Reactivos

Las células LLCPK1 (Cat. CL-101) se adquirieron de American Type Culture Collection (Rockville, MD, EUA). El sulforafano (cat. No. S8044, lote 26815401) se adquirió de LKT Laboratories (St. Paul, MN, EUA).

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): CIS (cis-diaminodicloroplatino II $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$; cat. No. P4394, lote 087K1349), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), dimetil sulfóxido (DMSO), Tritón X-100, albúmina sérica bovina (ASB), ácido 5-sulfosalicílico (SSA), 2,3-naftalendicarboxialdehído (NDA), ácido nordihidroguayarático (NDGA) (cat. N2036), xantina (cat. X0626), xantina oxidasa (X4376), azul de nitrotetrazolio (NBT) (cat. N6876), luminol (cat. A8511), dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (AAPH) (cat. 440914), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) (cat. D6518) y difenilisobenzofurano (DFBF) (cat. 105481), GST (cat. G6511), GSH (cat. G4251), NADPH (cat. N1630), GSH reductasa (cat.

G3664), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (cat. G6378), glucosa-6-fosfato (cat. G7879), FAD (cat. F6625), β -NADP (cat. N0505), dicumarol (cat. M1390), dimetiltiourea (DMTU) (cat. D188700), menadiona (cat. M5625) y ATP (cat. A2754).

De GIBCO (México D.F.) se adquirieron: Medio Eagle de Dulbecco modificado (DMEM) (cat. 12800-017), DMEM sin rojo de fenol, tripsina (Tryple Express) cat. 12604013, suero fetal bovino (SFB) (cat. 16000-044), antibiótico/antimicótico (10,000 unidades de penicilina G y 10,000 μ g de sulfato de estreptomicina/mL en solución salina al 0.85%) (cat. 15140122). Las cajas de cultivo se adquirieron de Nunc (Roskilde, Dinamarca).

Las sondas fluorescentes diacetato de 5-(y 6-)carboxi-2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (Carboxi-H₂DCFDA) (cat. C400), el dihidroetidio (DHEt) (cat. D1168) y el yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazol-carbocianina (JC-1) (cat. T3168) se adquirieron de Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). De J.T. Baker (Xalostoc, Edo. de México, México) se compraron: Fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) (cat. 3828), fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄) (cat. 3818), hipoclorito de sodio (NaOCl) (cat. 9416) y cloruro de sodio (NaCl) (cat. 3624).

La sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCDHFDA) (cat. 85155) se adquirió de Cayman-Chemical Company (Ann Arbor, MI, EUA).

El monoclorobimano (cat. 69899) se adquirió de Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Los demás reactivos se adquirieron comercialmente y fueron de la más alta pureza.

7.2. Cultivos celulares

Las células LLCPK1 se cultivaron en DMEM suplementado (con 10% de SFB y 1% de antibiótico/antimicótico) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de O₂ con 5% de CO₂ en una incubadora NUAIRE modelo NU8500 (NUAIRE, Inc., Plymouth, MN, EUA) y se subcultivaron tres veces por semana para lo cual se removió el medio, se lavaron con PBS, se les adicionó 1 mL de tripsina durante 5 min, se colocaron en un tubo cónico de 15 mL y se centrifugaron a 200 x g por 3 min (centrífuga Megafuge 1.0-Heraeus). Se desechó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de DMEM con SFB al 10% para resuspender las células con ayuda de una micropipeta de 1 ml (Kawai et al., 2006).

Para el crecimiento o propagación de células, al resuspendido celular se adicionaron 4 mL de DMEM suplementado y se cultivaron en cajas de 75 cm².

Para sembrar células para los experimentos, las células del resuspendido se contaron en una cámara de Neubauer y se sembraron en placas de cultivo a una densidad de 40,000 células/cm². Cuando las células alcanzaron la confluencia del 90% (24 h después), se eliminó el medio y se inició el tratamiento experimental preincubando a las células con diferentes concentraciones de SFN (0-5 μ M durante 24 h) y después con CIS 40 μ M durante 24 h.

7.3. Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)

En estudios *in vivo* e *in vitro* previos se ha encontrado que la producción de ERO es uno de los principales mecanismos asociados a la nefrotoxicidad inducida por el CIS (Davis et al., 2001; Xiao et al., 2003; Ali y Al Moundhri, 2006; Chirino et al., 2004; Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009) por lo que se analizó si el SFN disminuye los niveles de ERO en las células expuestas a CIS.

La producción de ERO se realizó utilizando el marcador fluorescente carboxi-H₂DCFDA que entra a la célula y se acumula en el citosol donde es desacetilado por esterasas a 5-(y 6-) carboxi-2',7'-diclorohidrofluoresceína (Carboxi-H₂DCF), que en presencia de ERO es oxidado a 5-(y 6-) carboxi-2',7'-diclorofluoresceína (carboxi-DCF; Fig. 7), produciendo un compuesto fluorescente que permanece en el citoplasma exhibiendo un color verde brillante (Hernández-Fonseca et al., 2008).

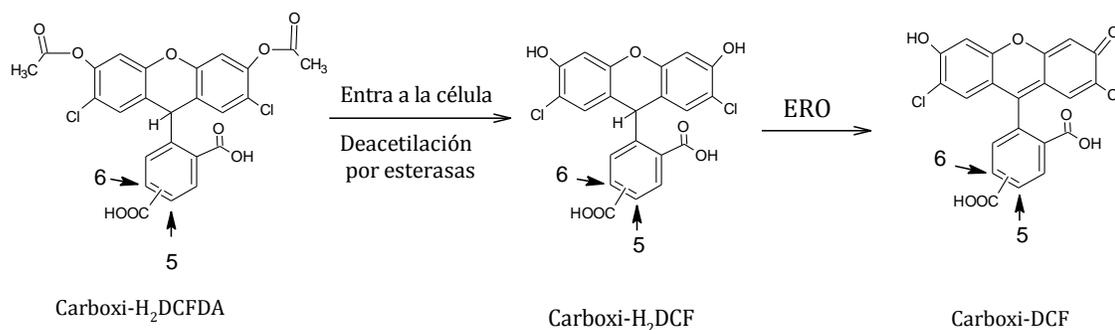


Figura 7. Oxidación carboxi-H₂DCFA a carboxi-DCF (método fluorescente).

También se utilizó la sonda DHEt con el propósito de detectar O₂^{•-}. Esta molécula entra a las células y es oxidada en el citosol produciendo el producto fluorescente etidio (Fig. 8) (Robinson et al., 2008; Zhao et al., 2003) el cual difunde al núcleo celular e interacciona con el ADN emitiendo una fluorescencia de color rojo brillante a 610 nm cuando se excita a 535 nm (Bindokas et al., 1996).

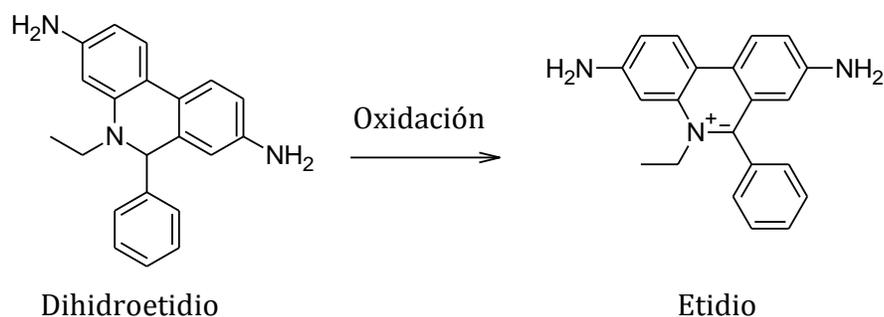


Figura 8. Oxidación del dihidroetidio a etidio.

Después del tratamiento de las células (preincubación con SFN con posterior adición de CIS 40 μM por 2 h), se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS, se les adicionaron las sondas (disueltas en DMEM sin rojo de fenol a una concentración final de 20 μM) durante 10 min a 37°C, después se lavaron con PBS frío y se les añadió DMEM sin rojo de fenol. Las células se examinaron con un microscopio de epifluorescencia (Nikon, TS-100F) usando los cubos de fluorescencia B-2A/C (excitación 450-490 nm) y G2A (excitación 510-560 nm) para la detección de la carboxi-DCF y el etidio, respectivamente. El número de células positivas para etidio o carboxi-DCF se cuantificó en 5 campos o áreas diferentes por cada pozo, y por condición, en al menos 3 experimentos independientes mediante el software NIS elements 3.0 (Nikon Inc., Melville, NY, EUA). El nivel basal de ERO

observadas en las células control se estandarizó con el valor de 1, para las demás condiciones experimentales se calculó la relación con respecto al nivel basal de ERO.

7.4. Medición del contenido de glutatión (GSH)

La determinación de GSH se realizó mediante el método fluorométrico descrito por Fernández-Checa y Kaplowitz (1990) que se basa en la formación de aductos de GSH con el monoclorobimano en presencia de GST. El monoclorobimano es un compuesto no fluorescente pero forma aductos fluorescentes con el GSH y otros tioles de bajo peso molecular como N-acetilcisteína y mercaptopurina (Fig. 9).

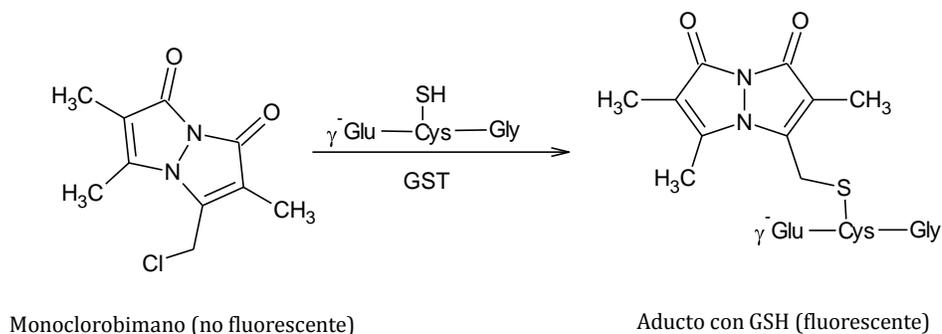


Figura 9. Formación de aductos de GSH con monoclorobimano en presencia de GST.

Las células se lisaron con ultrasonido en 50 μ L de solución Krebs-Henseleit y se centrifugaron a 15,000 x g por 30 min a 4°C. Del sobrenadante se tomaron 33.3 μ L a los que se adicionaron 33.3 μ L de monoclorobimano (1 mM), 33.3 μ L de GST (1 U/mL) y 233 μ L de solución Krebs-Henseleit. La fluorescencia se determinó 30 min después en un lector de placas Synergy HT ("multi-mode microplate reader"; Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) usando una longitud de onda de excitación de 385 nm y una longitud de onda de emisión de 478 nm. Los niveles de GSH de la muestra se interpolaron a partir de una curva patrón de GSH y se corrigieron por la concentración de proteínas totales presentes en la muestra. Los resultados se expresaron como μ moles de GSH/mg de proteína.

7.5. Cuantificación de la actividad de enzimas citoprotectoras

Después de los tratamientos experimentales las células se lavaron con PBS, se cosecharon, se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron a velocidad máxima durante 10 s en una centrífuga de mesa Beckman modelo Microfuge E, el sobrenadante se desechó y el paquete celular de LLCPK1 se resuspendió en 0.2 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 con Tritón X-100. Las células se lisaron aplicando ultrasonido por 10 s, se incubaron 10 min en hielo y se centrifugaron a 10,000 x g por 10 min. El sobrenadante se usó para realizar las determinaciones de actividad enzimática.

7.5.1. NADPH quinona óxido reductasa-1 (NQO1)

La actividad de NQO1 se determinó mediante el ensayo descrito por Prochaska y Santamaría (1988) con algunas modificaciones. El principio del ensayo se basa en la generación de NADPH a partir de la glucosa-6-fosfato y de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que es utilizado por la quinona reductasa para transferir electrones a la menadiona. El producto resultante, menadiol, reduce el MTT a formazán que se mide espectrofotométricamente a 610 nm (Fig. 10).

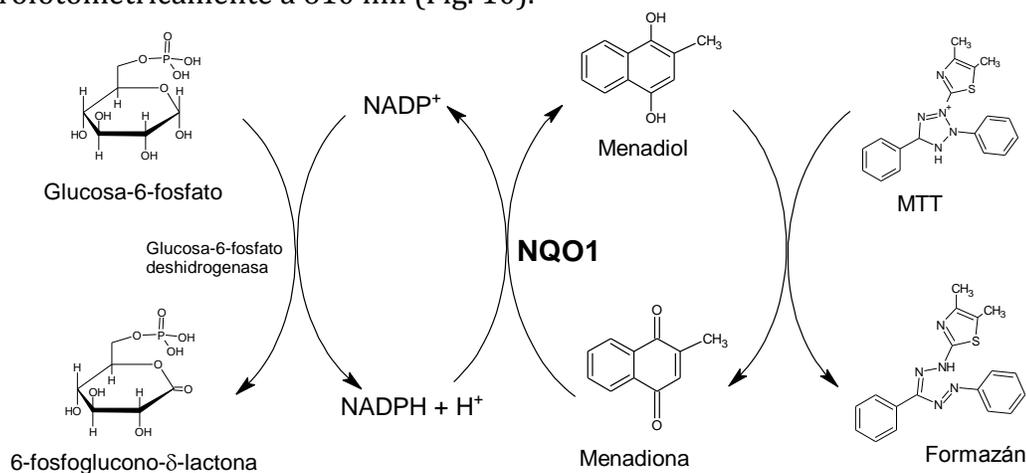


Figura 10. Principio del ensayo de actividad de NQO1.

Se tomaron 20 μL del sobrenadante del lisado celular y se mezclaron con 200 μL de la mezcla de reacción (Tris-HCl 0.025 M pH 7.4, ASB (0.7 mg/mL), Tween-20 al 0.01%, FAD 5 μM , glucosa-6-fosfato 1 mM, 1 μL de menadiona 50 mM, 300 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 0.3 mg/mL de MTT y NADP 30 μM), la mezcla se incubó por 5 min a temperatura ambiente y la reacción se detuvo al adicionar 50 μL de dicumarol 0.3 mM. Se midió la absorbancia a 610 nm en el lector de placas Synergy HT y los cálculos se realizaron considerando que el coeficiente de extinción molar del MTT a 610 nm es de 11,300 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron como nmoles de formazán/min/mg de proteína.

7.5.2. γ -Glutamato-cisteína ligasa (GCL)

La actividad de GCL se determinó mediante el ensayo descrito por White y colaboradores (2003). El fundamento del ensayo se basa en la formación de aductos del compuesto NDA con el producto de la enzima (glutamato-cisteína). El NDA es un compuesto no fluorescente pero forma aductos fluorescentes con el GSH y con el compuesto glutamato-cisteína (Fig. 11).

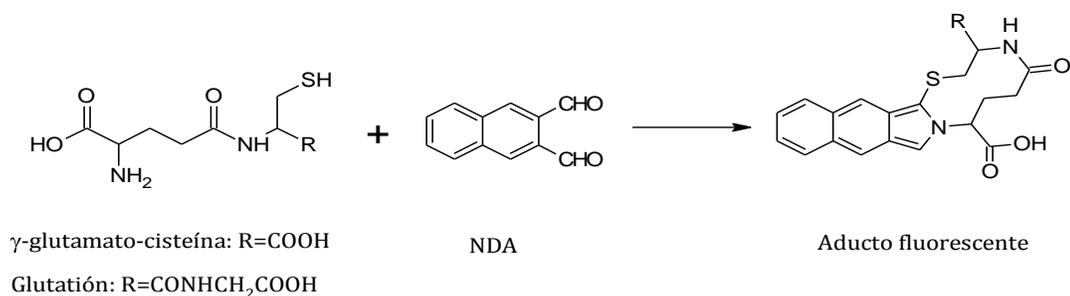


Figura 11. Formación de aductos del NDA con glutatión y γ -glutamato-cisteína (Orwar et al., 1995).

Después del tratamiento de las células y de la obtención del botón celular éste se resuspendió en 50 μ L de amortiguador TES-SB (Tris base 20 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM, L-serina 2 mM y ácido bórico 20 mM). Las células se lisaron mediante ultrasonido por 10 s, se incubaron 10 min en hielo y se centrifugaron a 5,000 x g por 10 min a 4°C. Se tomaron 20 μ L del sobrenadante (por duplicado) y se mezclaron con 50 μ L de la mezcla de reacción (Tris base 400 mM, ATP 40 mM, L-ácido glutámico 20 mM, EDTA 2 mM, ácido bórico 20 mM, L-serina 2 mM y cloruro de magnesio hexahidratado 40 mM) precalentada a 37°C por 20 s. La reacción se inició al agregar 50 μ L de L-cisteína 2 mM a un tubo de cada tratamiento (tubo GCL). Después de incubar todas las muestras a 37°C por 20 min, la reacción se detuvo adicionando 50 μ L de SSA 200 mM. Además se adicionaron 50 μ L de L-cisteína 2 mM al duplicado de cada muestra. Después de incubar todas las muestras en hielo por 20 min, los tubos se centrifugaron a 2,000 x g a 4°C por 5 min. Se tomaron 20 μ L del sobrenadante (por triplicado) y se colocaron en una placa negra de 96 pozos. A cada pozo se adicionaron 180 μ L de la solución NDA (Tris base 50 mM, NaOH 0.5 N y NDA 10 mM disuelto en DMSO, v/v/v 1.4/0.2/0.2). La placa se protegió de la luz y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. La fluorescencia se determinó usando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm en el lector de placas Synergy HT. Los resultados se expresaron como nmoles de GSH sintetizado por encima del GSH basal/min/mg de proteína.

7.6. Viabilidad celular. Método de MTT.

Este método es una modificación del procedimiento descrito por Mosmann (1983) y se basa en la reducción de una sal de tetrazolio, MTT, por deshidrogenasas como succinato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa (Berridge y Tan, 1993) con lo que se origina formazán (la forma reducida del MTT) que se identifica por ser un precipitado color púrpura (Fig. 12).

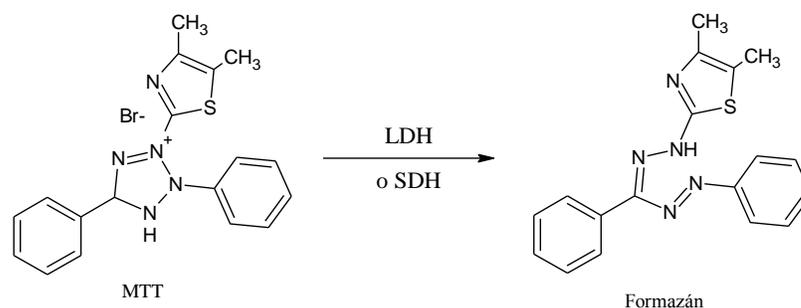


Figura 12. Reducción de MTT a formazán por enzimas como lactato deshidrogenasa (LDH) y succinato deshidrogenasa (SDH).

Por este método se evaluó el efecto del SFN en la muerte celular inducida por CIS, para ello se realizaron 2 tratamientos: En el primero las células fueron preincubadas por 24 h con SFN y después coincubadas con SFN y CIS por 24 h más; en el segundo se realizó una incubación con SFN por 24 h después de la incubación con CIS por 2 h (postratamiento).

También se evaluó la importancia de las enzimas citoprotectoras NQO1 y GCL en la protección del SFN, usando los inhibidores específicos dicumarol (DIC) y butionina sulfoximina (BSO), respectivamente. Las células LLCPK1 se incubaron por 1 h con los inhibidores y luego se les adicionó SFN (concentración final de 5 μ M) por 24 h (sin retirar los inhibidores), transcurrido ese tiempo se retiró el medio y se incubaron con CIS 40 μ M por 24 h más.

Después del tratamiento a las células se les adicionó MTT disuelto en DMEM con una concentración de 0.125 mg/mL y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se retiró el medio de cultivo y el formazán se disolvió con isopropanol ácido (HCl 0.1 N en isopropanol). La absorbancia se determinó a 570 nm y los datos se expresaron como el porcentaje de la reducción del MTT con respecto a las células sin tratamiento alguno o control.

7.7. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial (MMP)

El MMP se determinó usando el compuesto fluorescente JC-1 (Fig. 13) el cual se conserva en la mitocondria de una manera dependiente del potencial de la membrana (Smiley et al., 1991). Cuando la membrana mitocondrial está polarizada JC-1 forma agregados dentro de la mitocondria que emiten una fluorescencia roja-naranja a 590 nm. Sin embargo, en condiciones donde la membrana mitocondrial se encuentra despolarizada JC-1 se localiza en el citoplasma en forma de monómero y emite una fluorescencia verde a 530 nm.

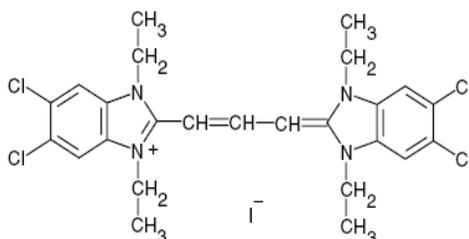


Figura 13. Estructura de la sonda fluorescente JC-1.

Después del tratamiento de las células (preincubación con SFN con posterior adición de CIS 40 μM por 5 h), se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS, se les adicionó JC-1 (disuelto en DMEM sin rojo de fenol a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37°C durante 30 min, se lavaron con PBS frío, se les añadió DMEM sin rojo de fenol y se examinaron con el microscopio de epifluorescencia TS-100F usando los cubos de fluorescencia B-2A/C (excitación 450-490 nm) y G2A (excitación 510-560 nm) para la detección del monómero y la forma agregada, respectivamente. La cuantificación de la despolarización del MMP se determinó midiendo la fluorescencia en el lector de placas Synergy HT con una excitación de 485 nm y una emisión de 530 y 590 nm. Los resultados se expresaron como la relación JC-1 agregado (rojo)/JC-1 monómero (verde), es decir, como el cociente 590 nm/530 nm.

7.8. Análisis de la capacidad antioxidante *in vitro* del SFN sobre ERO

7.8.1. Anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

El método se basa en la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ durante la oxidación de xantina a ácido úrico por la xantina oxidasa. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ reduce al NBT a formazán, un producto colorido que absorbe a una longitud de onda de 560 nm (Fig. 14). En este método es importante determinar que la producción de ácido úrico (medida a 295 nm) sea constante para asegurarse que el compuesto a evaluar no afecta la actividad de la xantina oxidasa y que éste sea el mecanismo por el cual disminuye la generación de formazán y no porque la muestra atrape o neutralice $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Pedraza-Chaverri et al., 2009).

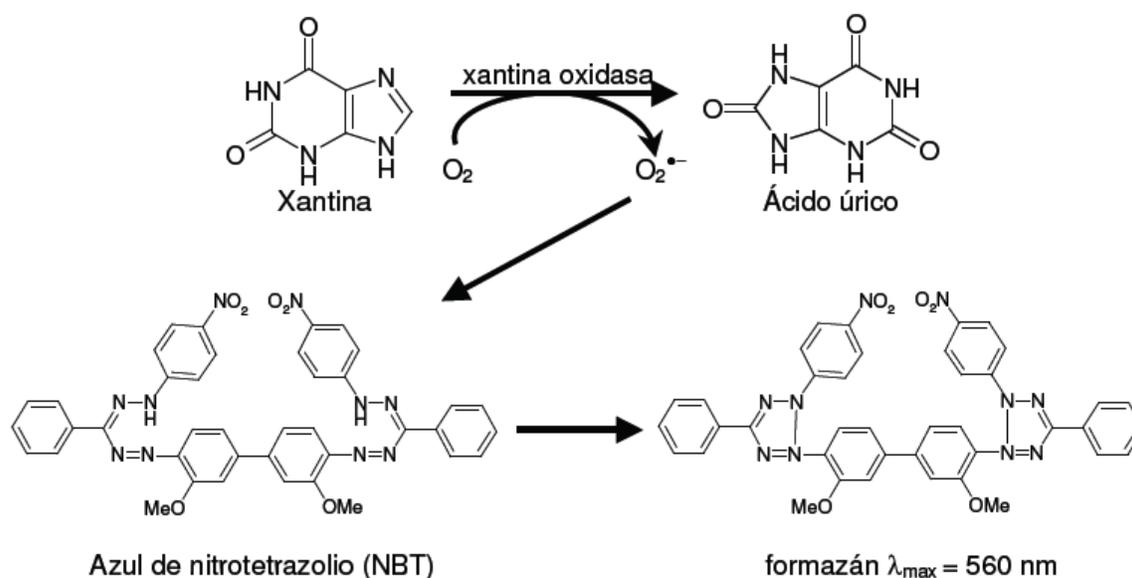


Figura 14. Determinación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por la actividad de xantina oxidasa.

Cuatrocientos μL de mezcla de reacción (xantina 0.116 mM, Na_2CO_3 20 mM, NBT 29 mM y amortiguador de fosfatos 18 mM pH 7.0) se mezclaron con 50 μL de amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7.0) (tubo control: 0% atrapamiento) ó con 50 μL de diferentes concentraciones de SFN (de 0-100 μM) ó con 50 μL del compuesto referencia NDGA (0-100 μM). La reacción se inició al adicionar 50 μL de xantina oxidasa (168 U/L). La reacción se

analizó en un espectrofotómetro Beckman DU-640 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EUA) mediante la medición de la absorbancia a 295 nm (formación de ácido úrico) y a 560 nm (formación de formazán) cada min durante 3 min y estableciendo como referencia al tubo sin muestra para cada ensayo. Para determinar la capacidad atrapadora se calcularon los cambios de absorbancia a 560 nm del tubo control que corresponde a la máxima generación de formazán por la presencia de $O_2^{\cdot-}$ en el sistema. Los datos obtenidos de la reacción con SFN se compararon con los cambios de absorbancia a 560 nm del tubo control.

En donde Δabs =cambio en la absorbancia/min.

7.8.2. Anión peroxinitrito ($ONOO^-$)

En este ensayo se usó DCDHFDA como indicador de la formación o presencia de $ONOO^-$. El DCDHFDA es desacetilado por esterasas en un medio básico formando 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCDHF) la cual es oxidada por el $ONOO^-$ a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Kooy et al., 1997). La formación de DCF se determinó por fluorescencia usando una excitación de 488 nm y una emisión de 525 nm. Por lo tanto el método mide la capacidad de inhibición de un compuesto en la formación de DCF a partir de DCHF inducida por $ONOO^-$ (Fig. 15).

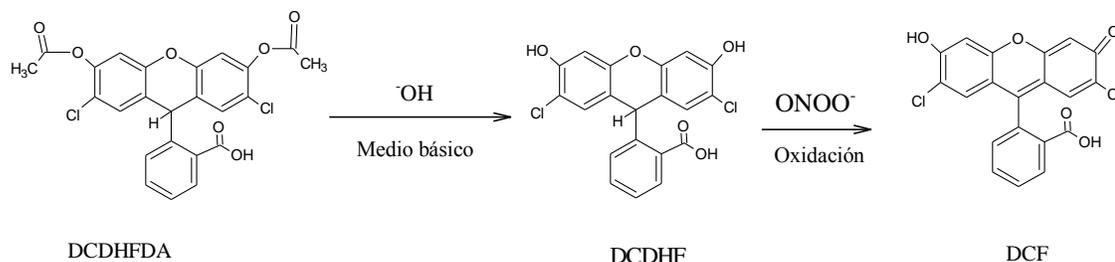


Figura 15. Reacción de oxidación del DCFDA.

El $ONOO^-$ se sintetizó de la siguiente manera: En un baño de hielo se permitió la reacción por 1 s de 5 mL de una solución ácida de H_2O_2 0.7 M (en HCl 0.6 M) con 5 mL de KNO_2 0.6 M y la reacción se detuvo añadiendo 5 mL de NaOH 1.2 M frío. El H_2O_2 residual de la mezcla se removió pasando la solución amarillenta a través de una columna de MnO_2 previamente lavada con NaOH 1.2 M (Medina-Campos et al., 2007). La solución de $ONOO^-$ se almacenó protegida de la luz y en congelación hasta su uso. La concentración de $ONOO^-$ se determinó espectrofotométricamente a 302 nm antes de realizar cada ensayo usando el coeficiente de extinción molar de $1,670 M^{-1}cm^{-1}$.

La capacidad atrapadora se determinó mezclando 80 μL de H_2O , 10 μL de muestra o H_2O (control), 3.33 μL de DTPA 1 mM, 3.33 μL $ONOO^-$ 0.625 mM y 3.33 μL de DCDHFDA 3.5 mM. Se utilizaron como controles positivos ácido úrico y penicilamina (0-50 μM). Después de 30 min de incubar la reacción a temperatura ambiente y protegida de la luz, se midió la fluorescencia usando una excitación de 488 nm y una emisión de 525 nm en el lector de

placas Synergy HT. Para calcular la capacidad atrapadora de ONOO⁻ se consideró la fluorescencia del tubo control como la máxima cantidad de DCF formada por la acción del ONOO⁻.

En donde UF=unidades de fluorescencia.

7.8.3. Oxígeno singlete (¹O₂)

A partir de NaOCl y H₂O₂ se generó el ¹O₂ el cual produce una disminución en la fluorescencia del DFBF (excitación 410 nm y emisión 455 nm) debido a que el DFBF es un atrapador específico de ¹O₂ (Wozniak et al., 1991) (Fig. 16).

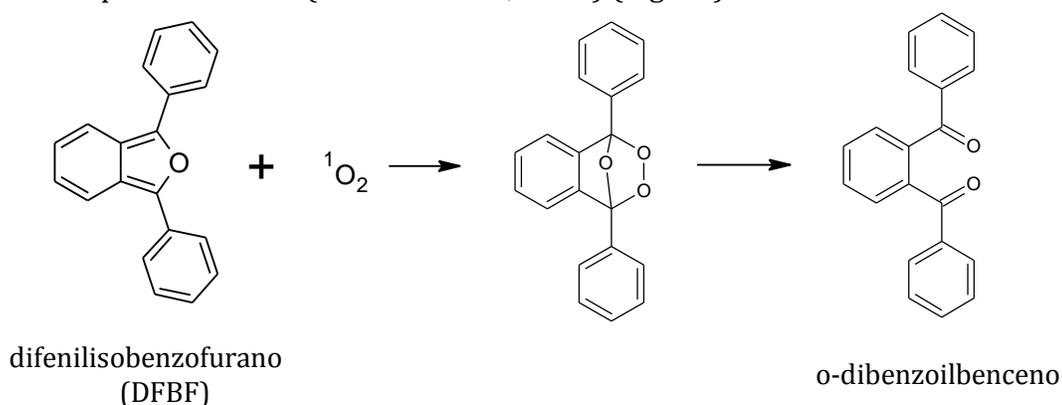


Figura 16. Reacción de oxidación del DFBF (Howard y Mendenhall, 1975).

En este ensayo se mezclaron 25 µL de la muestra a estudiar o etanol (control) con 25 µL de H₂O₂ 10 mM, 25 µL de DFBF 10 µM y 25 µL de NaOCl 300 µM. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 10 min y protegida de la luz. Después de ese tiempo se adicionaron 150 µL de etanol y se determinó la fluorescencia en el lector de placas Synergy HT con una excitación de 410 nm y una emisión de 455 nm. Como control positivo de atrapador se utilizó histidina (0-50 mM).

Para calcular la capacidad atrapadora de ¹O₂ se consideró la fluorescencia del tubo control como la máxima cantidad de DFBF oxidada por la acción del ¹O₂.

En donde UF=unidades de fluorescencia.

7.8.4. Ácido hipocloroso (HOCl)

El luminol es un compuesto que al oxidarse emite luz que puede ser detectada por quimioluminiscencia ($\lambda_{\text{max}} = 485 \text{ nm}$). La oxidación del luminol puede llevarse a cabo en

diferentes condiciones de reacción, una de ellas es por medio de las ERO (Fig. 17). En este ensayo la molécula de luminol es oxidada por HOCl (Yamaguchi et al., 2010).

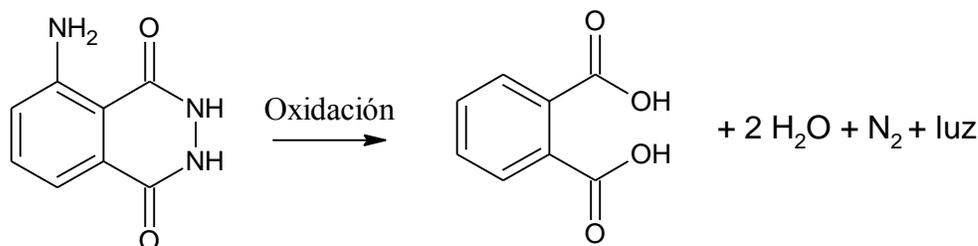


Figura 17. Reacción de oxidación del luminol

Para cada ensayo la concentración de HOCl se determinó espectrofotométricamente a 235 nm usando el coeficiente de extinción molar de $100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El HOCl fue diluido con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 hasta alcanzar una concentración de 3.4 mM. Se mezclaron 100 μL de luminol 1.2 mM, 175 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, 25 μL de muestra o de amortiguador (control) y 20 μL de HOCl 3.4 mM. Inmediatamente se determinó la luminiscencia en el lector de placas Synergy HT. Se utilizó vitamina C (0-0.5 mM) como atrapador de esta especie reactiva.

Para calcular la capacidad atrapadora de HOCl se consideró la luminiscencia del tubo control como la máxima cantidad de luminol oxidado por la acción del HOCl.

En donde CL=unidades de quimioluminiscencia.

7.8.5. Radical peroxilo (RO_2^\bullet)

La descomposición del compuesto AAPH genera radicales RO_2^\bullet y en este ensayo el luminol se utilizó como marcador de oxidación y de quimioluminiscencia (Lissi et al., 1995).

Se mezclaron 25 μL de muestra o de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 8.6 (control) con 58.3 μL de luminol 21.43 μM y 166.66 μL de AAPH 30 mM. La mezcla, protegida de la luz, se incubó a temperatura ambiente por 3 min y se midió la quimioluminiscencia usando el lector de placas Synergy HT. Se utilizó como control positivo de atrapamiento NDGA (0-0.1 μM).

Para calcular la capacidad atrapadora de RO_2^\bullet se consideró la luminiscencia del tubo control como la máxima cantidad de luminol oxidado por la acción del RO_2^\bullet .

En donde CL=unidades de quimioluminiscencia.

7.8.6. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

En este método se utilizó el luminol como marcador de oxidación y de quimioluminiscencia (Yamaguchi et al., 2010).

Se mezclaron 25 µL de muestra o de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 8.6 (control) con 68 µL de H₂O₂ 7.5 mM y 134 µL de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 8.6. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 30 min, se adicionaron 23 µL de luminol 12 µM e inmediatamente se determinó la quimioluminiscencia usando el lector de placas Synergy HT. Se utilizó como control positivo de atrapador al piruvato de sodio (0-100 µM).

Para calcular la capacidad atrapadora de H₂O₂ se consideró la luminiscencia del tubo control como la máxima cantidad de luminol oxidado por la acción del H₂O₂.

En donde CL=unidades de quimioluminiscencia.

7.8.7. Radical hidroxilo (OH[•])

El tereftalato, el cual es un compuesto no fluorescente, reacciona con OH[•] y por hidroxilación se produce el compuesto fluorescente hidroxitereftalato (Qu et al., 2000) (Fig. 18).

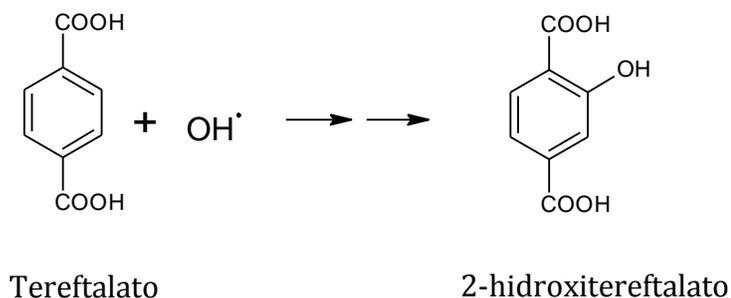


Figura 18. Reacción de oxidación del tereftalato.

En este ensayo se utilizó la reacción de Fenton para producir OH[•]. Se mezclaron 180 µL de la mezcla de reacción (ácido ascórbico 1 mM, FeCl₃ 1 mM, EDTA 1 mM, H₂O₂ 10 mM, tereftalato 3.5 mM y amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4) con 20 µL de SFN (0-100 µM) ó 20 µL de agua destilada (tubo control: 0% de atrapamiento). La reacción anterior se incubó a temperatura ambiente por 30 min para generar el OH[•]. La sal férrica (FeCl₃) se mezcló con EDTA antes de adicionarla a la mezcla de reacción. El producto fluorescente se determinó en el lector de placas Synergy HT a 326 nm de excitación y 432 nm de emisión. Se utilizó como control positivo de atrapamiento la DMTU (0-1,000 µM).

En donde CL=unidades de quimioluminiscencia.

7.9. Análisis de datos

Los datos se expresan 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 de Dunnet o de Bonferroni usando el software estadístico Prism 5 (Graph Pad Software, Inc., CA, EUA).

8. RESULTADOS

8.1. Producción de ERO

El uso de las sondas fluorescentes DHEt y carboxi-H₂DCFDA mostró que el CIS indujo una producción máxima de ERO en las primeras 3 h de exposición (Fig. 19). Considerando este resultado las células fueron expuestas a CIS por 2 h con una incubación previa de 24 h con SFN en base a reportes que indican que en ese tiempo hay un aumento en la cantidad de proteínas citoprotectoras inducido por el SFN (Hu et al., 2004; Tarozzi et al., 2009; Lii et al., 2010; Yeh et al., 2009) y a que en ese lapso de 24 h este compuesto atenúa la muerte celular inducida por CIS (Guerrero-Beltrán et al., 2010).

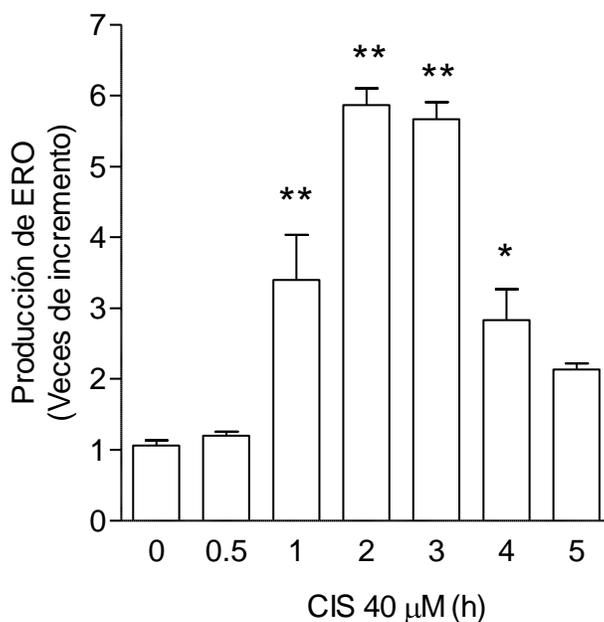


Figura 19. Producción de ERO inducida por CIS. Las células LLCPK1 se incubaron con CIS 40 μM a diferentes tiempos (0 a 5 h) y con carboxi-H₂DCFDA (20 μM por 10 min). Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes. *p<0.01; **p<0.001 vs. 0 h.

En la Figura 20 se muestran microfotografías representativas de células expuestas a SFN por 24 h y a CIS por 2 h en las que se observa que la producción de O₂^{•-} (fluorescencia roja) y de ERO (fluorescencia verde) inducidas por CIS fue menor en las células pretratadas con SFN.

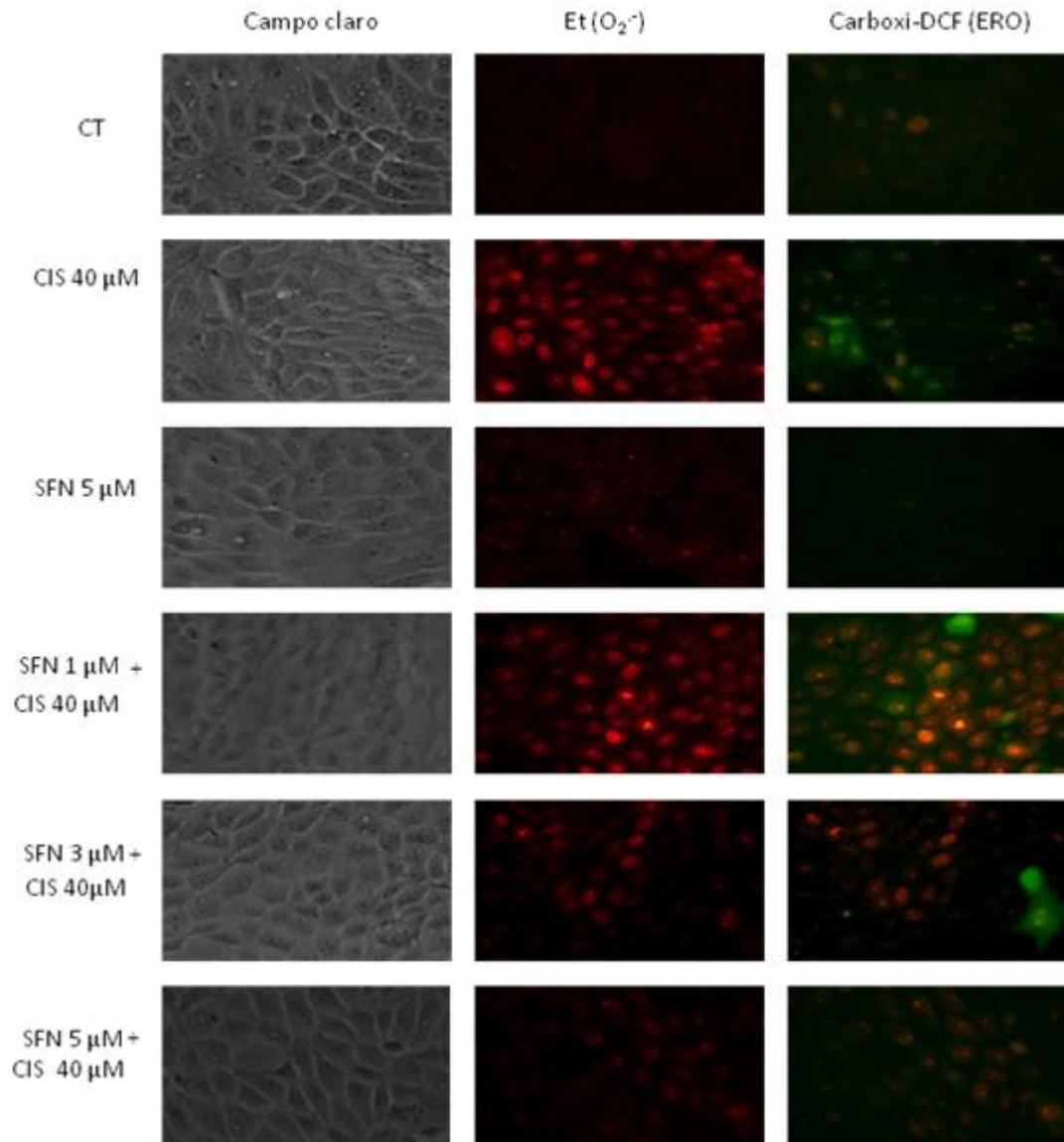


Figura 20. Producción de O₂⁻ y de ERO. Las células se incubaron con SFN (0-5 μM) por 24 h, luego con CIS 40 μM por 2 h y finalmente con una solución 20 μM de las sondas DHEt (O₂⁻) y carboxi-H₂DCFDA (ERO) por 10 min.

La Figura 21 muestra la cuantificación de la producción de O₂⁻ (panel a) y de ERO (panel b) y se observa que los niveles del primero aumentaron 3.3 veces y los de los segundos se incrementaron 6.2 veces en las células tratadas con CIS. La preincubación de las células con diferentes concentraciones de SFN (0-5 μM) por 24 h, antes de la exposición a CIS, atenuó el incremento de O₂⁻ y de ERO de una manera dependiente de la concentración de SFN (para el caso de la producción de O₂⁻ el aumento fue de 2.27 ± 0.91 , 1.53 ± 0.25 , y 0.86 ± 0.48 veces para las concentraciones de 1, 3 y 5 μM respectivamente; y para la producción de ERO el incremento fue de 2.43 ± 0.35 , 2.28 ± 0.57 y 1.51 ± 0.44 veces para las concentraciones de 1, 3 y 5 μM de SFN, respectivamente; $p < 0.005$ vs. CIS).

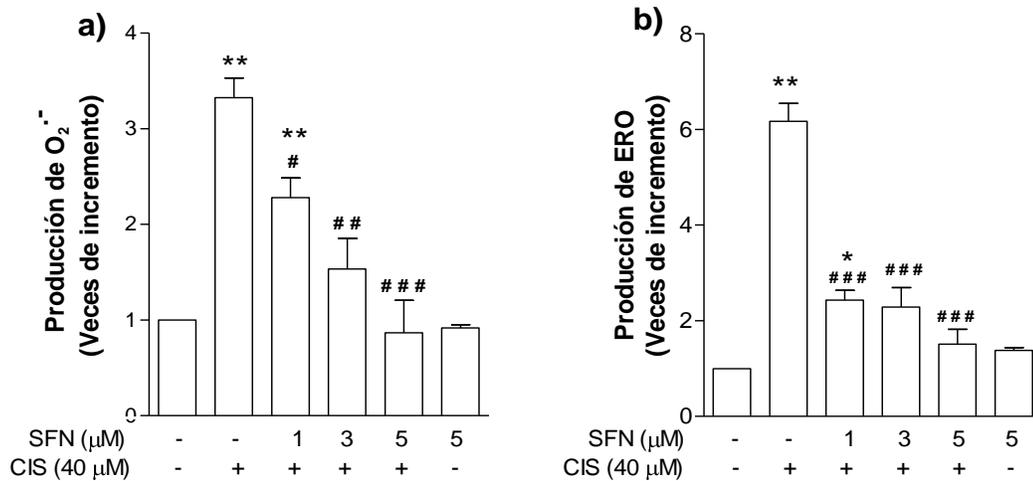


Figura 21. Producción de $O_2^{\bullet-}$ (panel a) y de ERO (panel b). La preincubación con SFN (0-5 μ M) fue por 24 h seguida de la exposición a 40 μ M de CIS por 2 h. Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CT; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. CIS+/SFN-.

8.2. Contenido de GSH

En la Figura 22 se observa que el SFN atenuó, de manera dependiente de la concentración, la disminución de los niveles de GSH debida a la exposición al CIS, aunque sólo con la concentración de 5 μ M de SFN se presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a las células tratadas con CIS. Sin embargo el SFN no fue capaz de evitar la disminución de GSH puesto que, como se observa en la Figura 22a, los niveles de GSH eran elevados después de la exposición al SFN por 24 h y antes de la exposición de las células al CIS (Fig. 22a). La prevención en la disminución de los niveles de GSH debida al SFN fue abatida cuando las células se preincubaron con BSO (inhibidor de la enzima GCL) (Fig. 22b).

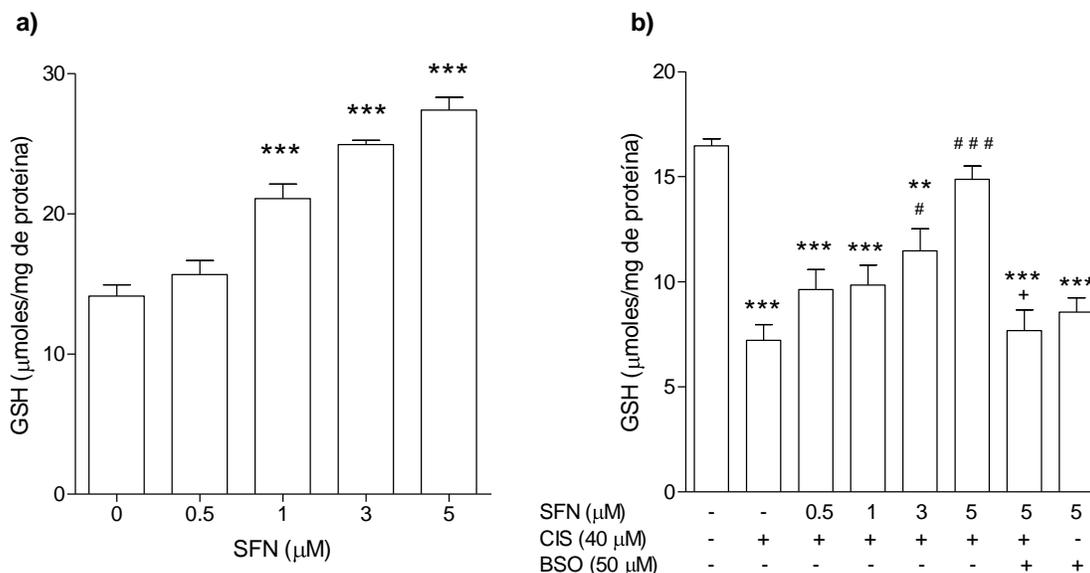


Figura 22. Efecto del SFN en el contenido de GSH. Las células se incubaron por 24 h con diferentes concentraciones de SFN (panel a). La preincubación con SFN (0-5 μM) por 24 h antes de la exposición a CIS por 24 h atenuó la disminución de GSH (panel b). Los datos se obtuvieron de 4 experimentos independientes. Panel a) ***p<0.001 vs. SFN 0 μM; panel b) **p<0.01, ***p<0.001 vs. CT; #p<0.05, ###p<0.001 vs. CIS; +p<0.001 vs. CIS+SFN 5 μM.

8.3. Actividad de enzimas citoprotectoras

8.3.1. Actividad de NQO1

La actividad de esta enzima se determinó en células que fueron incubadas con diferentes concentraciones de SFN (0-10 μM) por 24 h. Se observó que el SFN aumentó, de manera dependiente de la concentración, la actividad de la NQO1 (Fig. 23a). También se determinó la actividad de esta enzima en las células preincubadas con SFN (0-5 μM) por 24 h y con posterior incubación con CIS por 24 h. Se observó que el CIS disminuyó la actividad de la NQO1, efecto que se previno cuando las células se preincubaron con SFN por 24 h (Fig. 23b). Además se observó que cuando las células se preincubaron SFN y con DIC (inhibidor de NQO1) el efecto de prevención causado por el primero se anuló, lo que sugiere que la enzima NQO1 participa en la protección conferida por el SFN contra el daño por CIS.

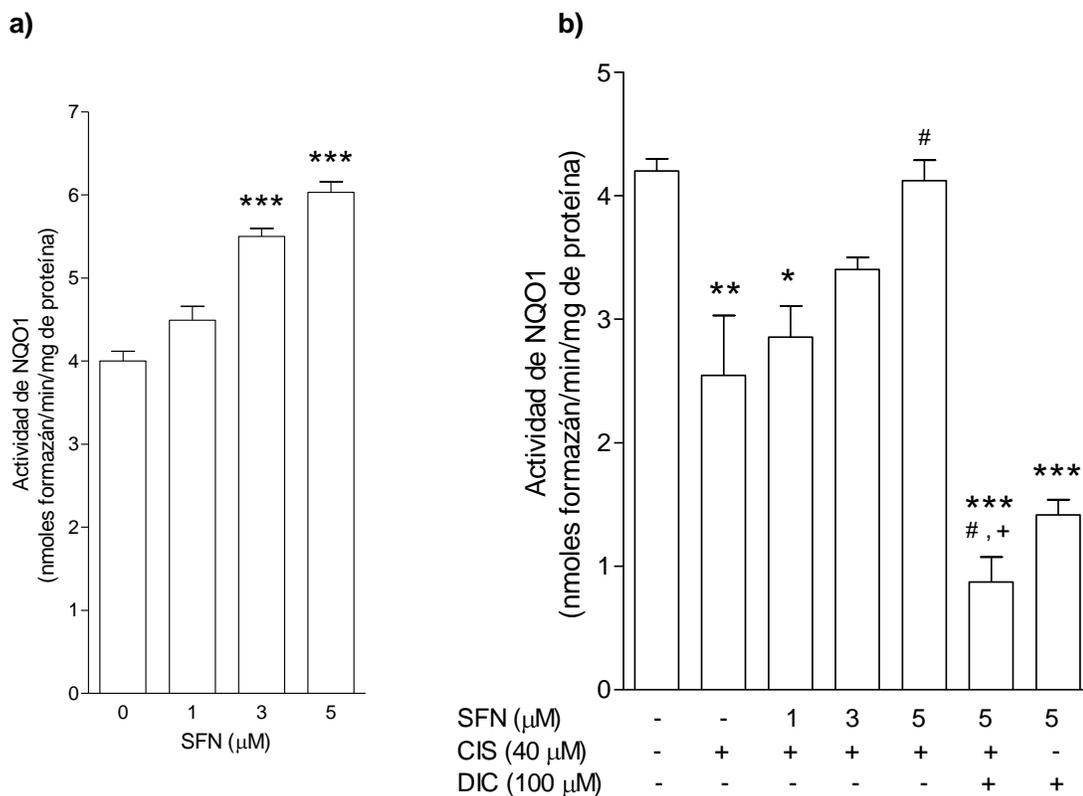


Figura 23. Efecto del SFN en la actividad enzimática de NQO1. Las células se incubaron por 24 h con diferentes concentraciones de SFN (panel a). El SFN previno la disminución en la actividad de NQO1. Las células LLCPK1 se preincubaron por 24 h con SFN (0-5 μM), después se incubaron con CIS por 24 h o bien se preincubaron por 24 h con DIC y SFN con posterior incubación con CIS (panel b). Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. CT; # $p < 0.01$ vs. CIS, + $p < 0.001$ vs. CIS+SFN 5 μM.

8.3.2. Actividad de GCL

La actividad de esta enzima se determinó en células que fueron incubadas con diferentes concentraciones de SFN (0-5 μM) por 24 h. Se observó que el SFN causó un aumento, de manera dependiente de la concentración, en la actividad de la GCL (Fig. 24a). También se determinó la actividad de esta enzima en las células preincubadas con SFN (0-5 μM) por 24 h y con posterior incubación con CIS por 24 h. Se observó que el CIS disminuyó la actividad de la GCL, efecto que se previno cuando las células se preincubaron con SFN por 24 h (Fig. 24b). Además se observó que cuando las células se preincubaron con BSO (un inhibidor irreversible de GCL) junto con SFN, el efecto de prevención por este último se anuló, lo que sugiere que la enzima GCL participa en la protección del SFN contra el daño por CIS.

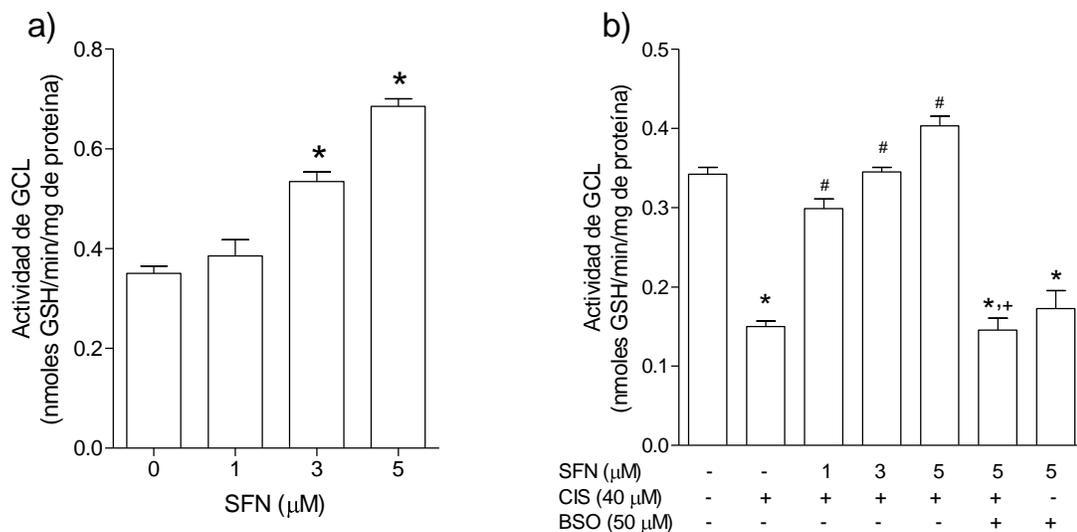


Figura 24. Efecto del SFN en la actividad enzimática de GCL. Las células LLCPK1 se incubaron por 24 h a diferentes concentraciones de SFN (panel a). El SFN previno la disminución en la actividad de GCL causada por el CIS. Las células se preincubaron por 24 h con SFN (0-5 μM), después se incubaron con CIS por 24 h o bien por 24 h con BSO y SFN con posterior incubación con CIS (panel b). Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes. * $p < 0.001$ vs. CT, # $p < 0.05$ vs. CIS, + $p < 0.001$ vs. CIS+SFN 5 μM .

8.4. Participación de las enzimas citoprotectoras en el efecto del SFN

Para determinar si en el efecto protector del SFN contra el daño por CIS algunas enzimas citoprotectoras están involucradas se realizaron tratamientos con dicumarol (DIC; 0-200 μM) (inhibidor de NQO1) y la butionina sulfoximina (BSO; 0-200 μM) (inhibidor de GCL). El papel de estas enzimas en la protección conferida por el SFN se determinó evaluando la viabilidad celular (Fig. 25).

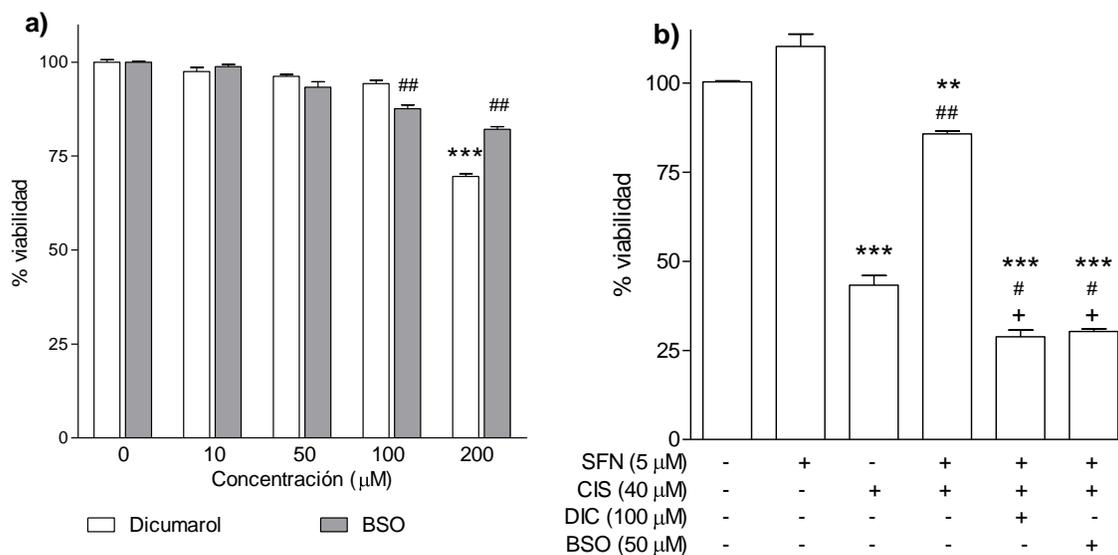


Figura 25. Anulación de la citoprotección del SFN ante la citotoxicidad del CIS por la inhibición de NQO1 y de GCL. Panel a) Las células LLCPK1 se incubaron por 24 h con diferentes concentraciones (0-200 μM) de los inhibidores DIC y BSO. ***p<0.001 vs. DIC 0 μM; ##p<0.001 vs. BSO 0 μM. Panel b) Las células se pre-incubaron por 1 h con los inhibidores, luego con SFN (5 μM) por 24 h y finalmente con CIS (40 μM) por 24 h más. Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes. **p<0.001 vs. CT, #p<0.01, ##p<0.001 vs. CIS, +p<0.001 vs. CIS+SFN 5 μM.

Debido a estos resultados de viabilidad se evaluó si las enzimas NQO1 y GCL participan en la disminución en la producción de ERO debida al SFN. En la Figura 26 se muestran microfotografías representativas de células expuestas a SFN por 24 h y a CIS por 2 h en las que se observa que la producción de $O_2^{\bullet-}$ (fluorescencia roja) y de ERO (fluorescencia verde) inducidas por CIS disminuyeron en las células tratadas con SFN 5 μM, efecto que no se observó cuando las enzimas mencionadas fueron inhibidas.

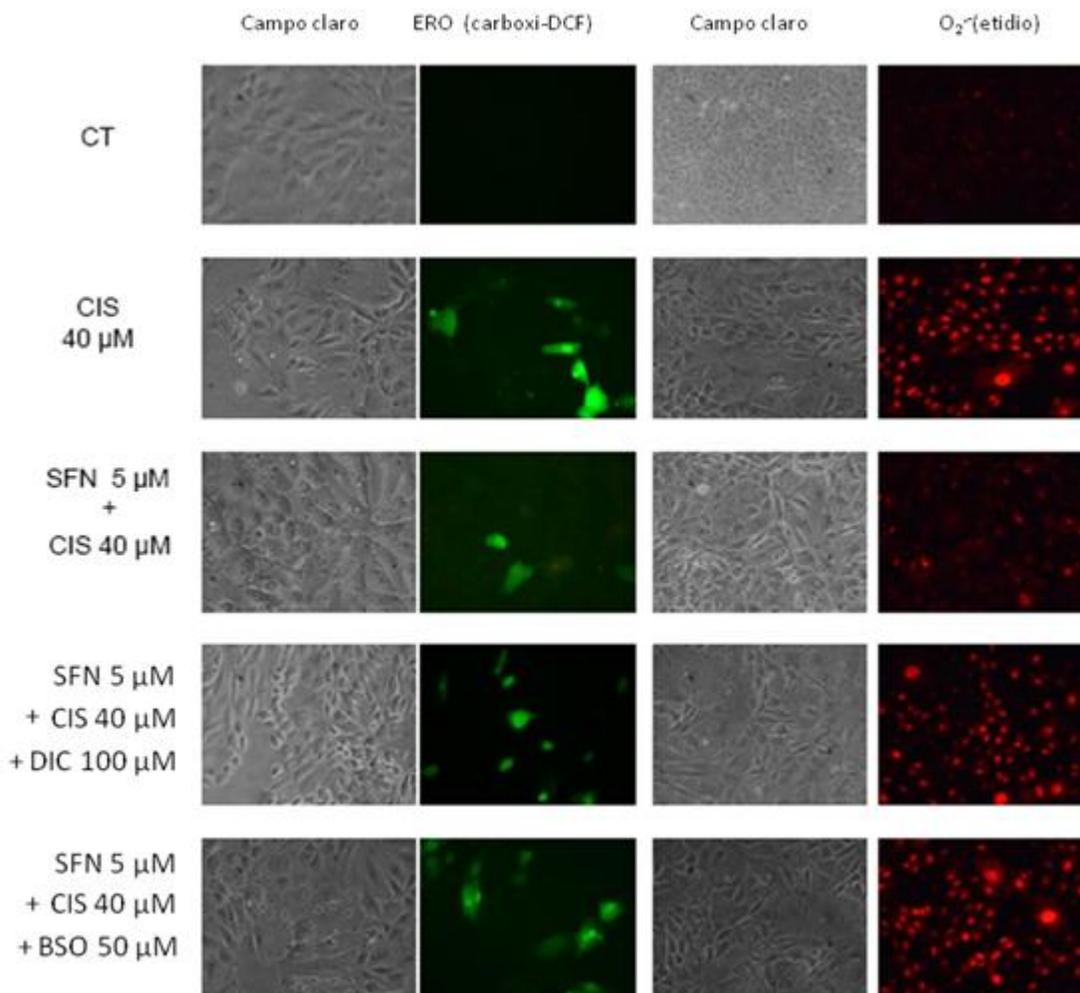


Figura 26. Producción de O₂^{•-} y de ERO. Las células se preincubaron con SFN (0-5 μM) por 24 h y luego se expusieron a CIS 40 μM por 2 h. Se realizó una incubación con SFN en presencia de DIC o de BSO por 24 h para inhibir a la NQO1 y a la GCL y luego con CIS por 2 h.

La Figura 27 muestra la cuantificación de la producción de O₂^{•-} (panel a) y de ERO (panel b) y se observa que los niveles del primero aumentaron 3.3 veces y los de los segundos se incrementaron 6.2 veces en las células tratadas con CIS. La preincubación de las células con SFN 5 μM por 24 h antes de la exposición a CIS atenuó el incremento de O₂^{•-} y de ERO. El pretratamiento con SFN y con los inhibidores DIC y BSO anuló el efecto antioxidante del SFN. En el caso del O₂^{•-} el aumento fue de 2.88 ± 0.44 y 2.99 ± 0.40 veces y el aumento de ERO fue de 4.32 ± 0.07 y 4.90 ± 0.33 veces para DIC y BSO respectivamente ($p < 0.05$ vs. CT), lo que indica que ambas enzimas están implicadas en la supresión de la oxidación de DHEt y de carboxi-H₂DCFDA causada por el SFN, ya que la inhibición de NQO1 y GCL permitió la oxidación de ambas sondas debido a las especies reactivas generadas por el CIS.

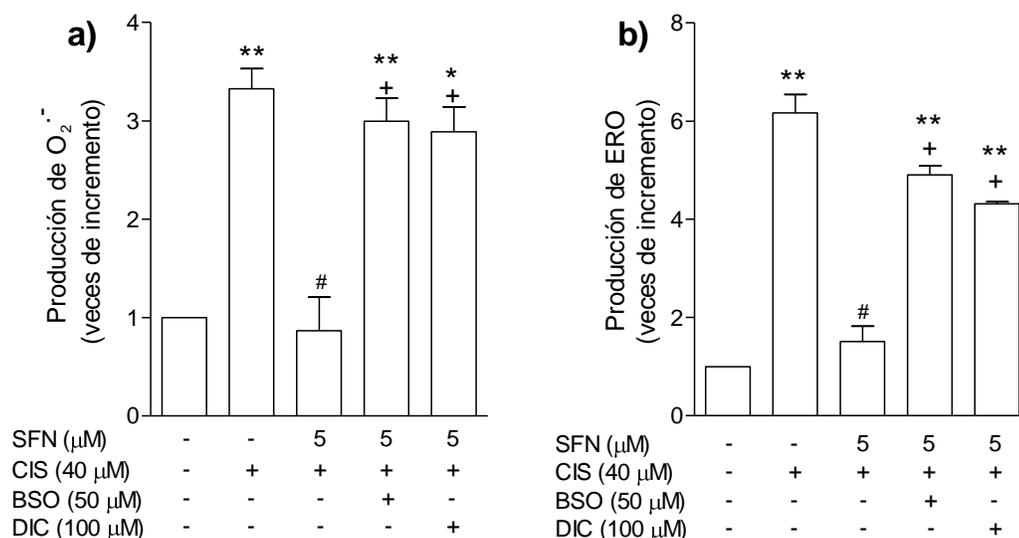


Figura 27. Producción de O₂^{•-} (panel a) y de ERO (panel b). Se realizó una incubación con SFN (0-5 μM) por 24 h seguida de la exposición a CIS 40 μM por 2 h así como una incubación de SFN con DIC o BSO por 24 h seguida de la exposición a CIS 40 μM por 2 h. Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes. *p<0.01, **p<0.001 vs. CT, #p<0.001 vs. CIS, +p<0.001 vs. CIS+SFN 5 μM.

8.5. Efecto del SFN sobre la alteración del MMP inducida por CIS

En la Figura 28 se observa que las células control presentan una fluorescencia roja-naranja en la mitocondria, sin embargo cuando las células fueron expuestas a CIS 40 μM por 5 h, esta fluorescencia cambió a verde y se localizó en el citoplasma indicando una redistribución de la sonda JC-1 debida a la pérdida del potencial en la membrana mitocondrial. El pretratamiento de las células con diferentes concentraciones de SFN (0-5 μM) previno la pérdida del potencial, hecho reflejado por la presencia de agregados de JC-1 dentro de la mitocondria.

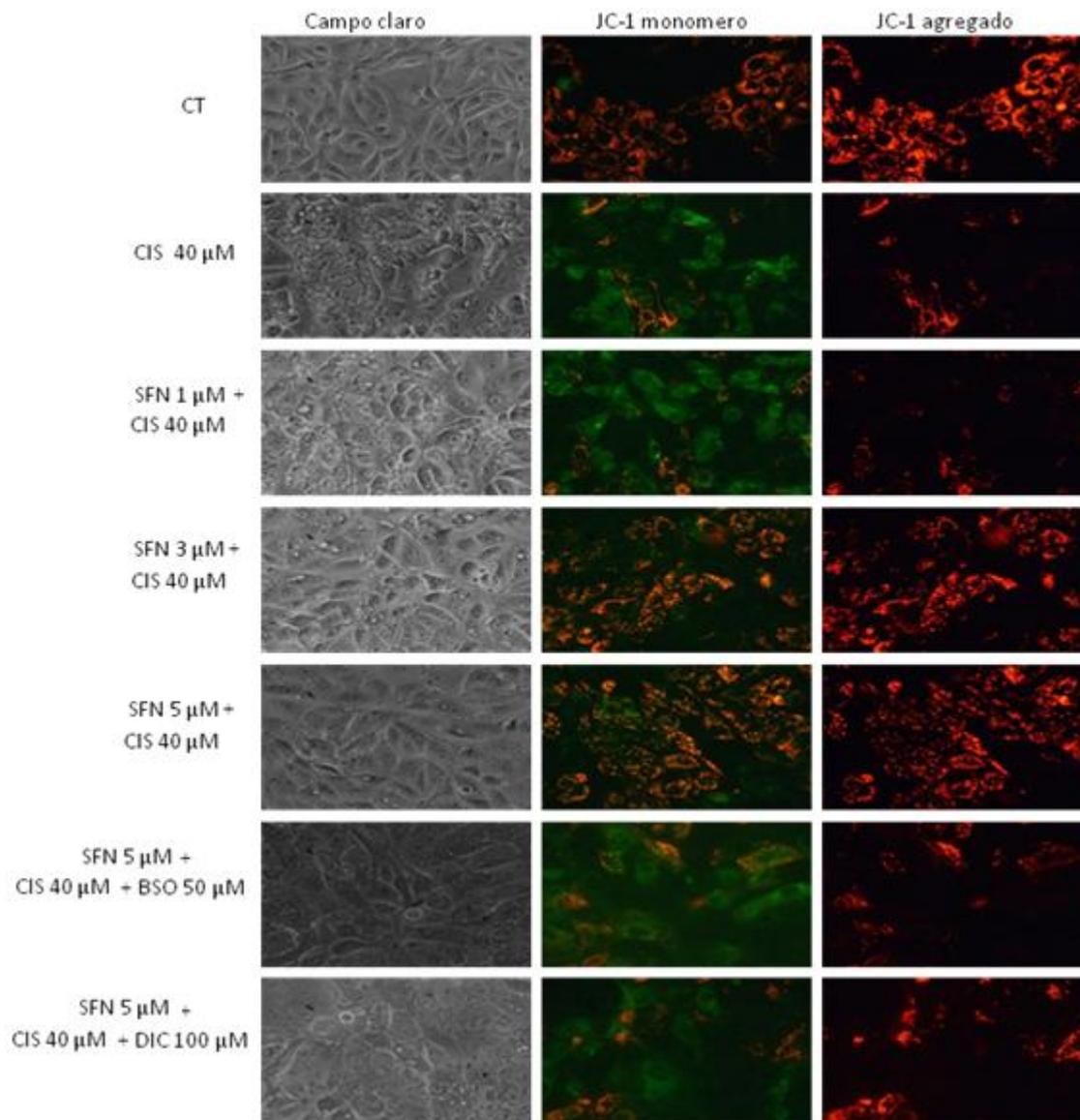


Figura 28. El SFN previene la despolarización de la membrana mitocondrial inducida por CIS. Las células se preincubaron con SFN (0-5 μ M) por 24 h y luego se expusieron a CIS 40 μ M por 2 h. También se realizó una preincubación con SFN y con DIC o BSO por 24 h y una incubación posterior con CIS 40 μ M por 2 h.

La Figura 29 muestra la cuantificación de la fluorescencia emitida tanto por el monómero como por el agregado de JC-1, y se observa que el tratamiento con CIS causó la pérdida del potencial de membrana, la cual se previno con el pretratamiento con SFN de manera dependiente de la concentración. De manera similar a los resultados de producción de ERO y de $O_2^{\bullet-}$, la inhibición de NQO1 y GCL anuló el efecto protector del SFN sobre el potencial de membrana. Estos resultados sugieren también la participación de estas enzimas en la protección por SFN evitando la desaparición del potencial de membrana mitocondrial.

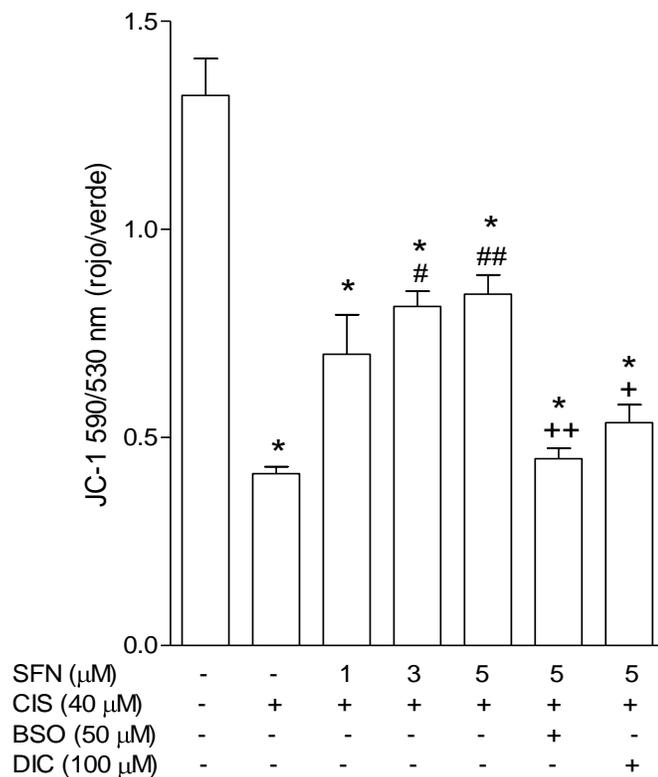


Figura 29. Cuantificación del ensayo fluorométrico del potencial de membrana. Preincubación con SFN (0-5 μ M) por 24 h seguida de la exposición a 40 μ M de CIS por 2 h o bien preincubación de SFN mas inhibidor (DIC ó BSO) por 24 h seguida de la exposición a CIS 40 μ M por 2 h. Los datos se obtuvieron de 3 a 6 experimentos independientes. * p <0.001 vs. CT, # p <0.01, ## p <0.001 vs. CIS, + p <0.05, ++ p <0.01 vs. CIS+SFN 5 μ M.

8.6. Efecto de la preincubación y coincubación con SFN sobre la muerte celular

En la Figura 30 se muestran los resultados de viabilidad celular cuando las células fueron preincubadas y coincubadas con SFN (0-5 μ M). Se observó que la preincubación (Fig. 30a) y coincubación (Fig. 30b) con SFN previeron la muerte celular inducida por CIS. Sin embargo el SFN no presentó un efecto protector cuando las células fueron incubadas con SFN 2 h después del tratamiento con CIS (Fig. 30c), además se observó que el postratamiento con SFN exacerbó la muerte celular.

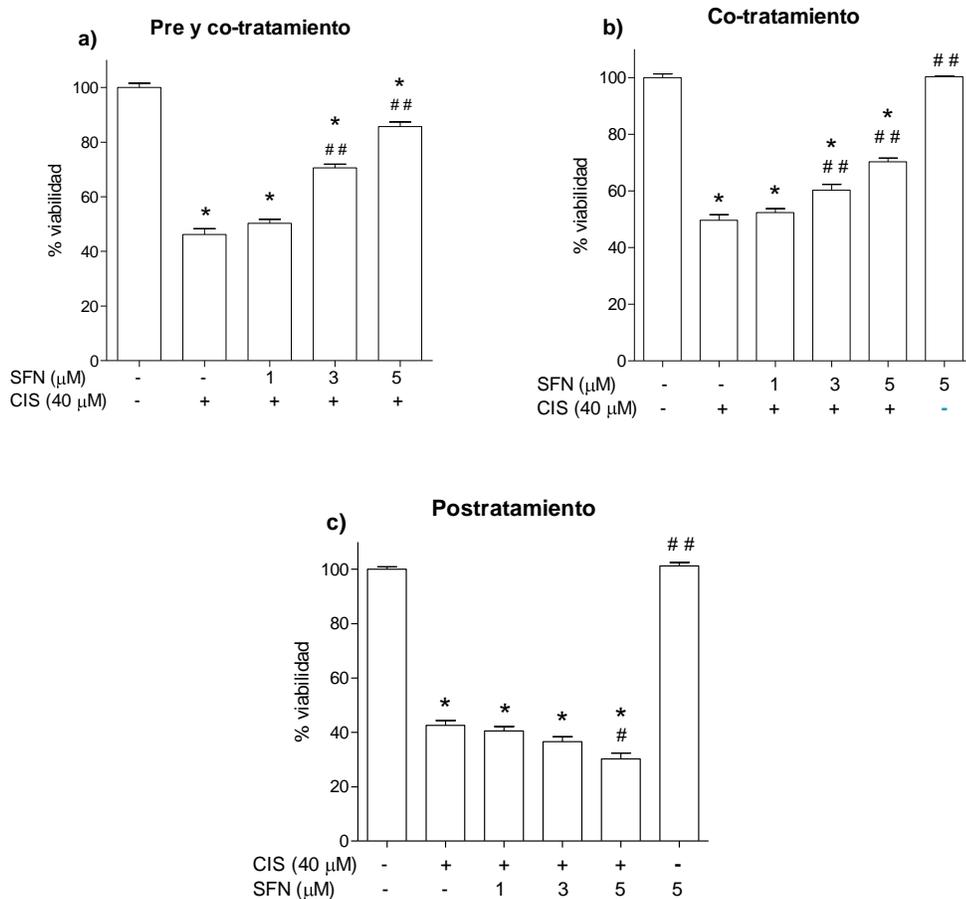


Figura 30. El SFN previene la muerte celular inducida por CIS. Las células LLCPK1 se preincubaron con SFN por 24 h y después se incubaron con CIS $40 \mu\text{M}$ y SFN por 24 h más (panel a). Las células LLCPK1 se incubaron con CIS $40 \mu\text{M}$ y con SFN por 24 h (panel b). Las células LLCPK1 se incubaron con CIS $40 \mu\text{M}$ por 2 h y después se les adicionó SFN por 24 h más (panel c). La viabilidad se determinó por el método de MTT. Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes. * $p < 0.001$ vs. CT; # $p < 0.01$, ## $p < 0.001$ vs. CIS.

Además se midió la actividad de las enzimas NQO1 y GCL bajo el esquema de co-tratamiento de SFN con CIS.

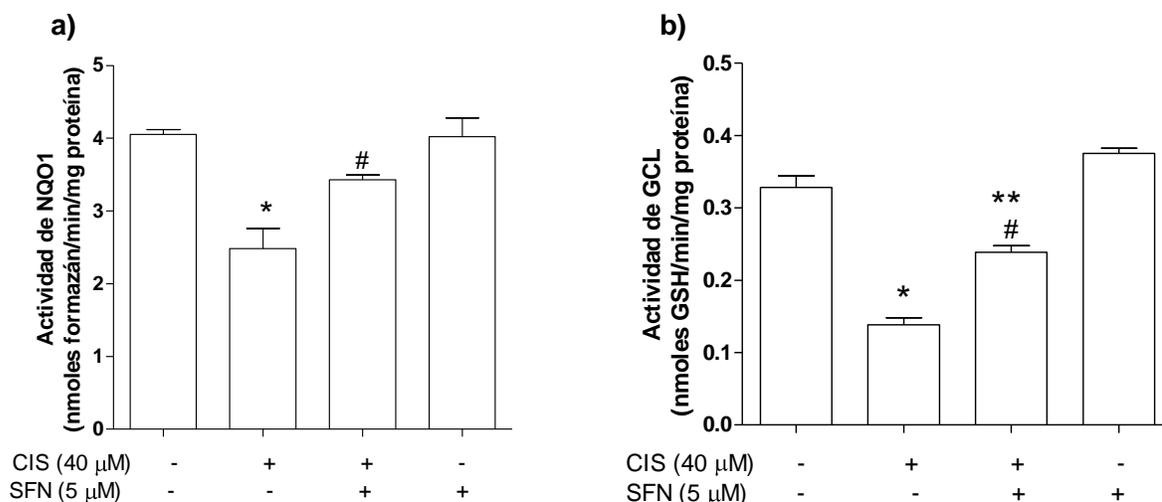


Figura 31. La coincubación con SFN previene la disminución en la actividad de NQO1 (panel a) y de GCL (panel b) inducida por CIS. Las células se coincubaron por 24 h con SFN y CIS. Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.5$ vs. CT, # $p < 0.05$ vs. CIS.

De acuerdo a los datos de viabilidad celular bajo el esquema de coincubación de SFN 5 μ M con CIS 40 μ M, en los que se observó que las células son resistentes a la toxicidad del CIS, se decidió evaluar la capacidad atrapadora del SFN para determinar si parte de esta protección fue debida a una acción antioxidante o capacidad atrapadora hacia alguna ERO.

8.7. Capacidad antioxidante *in vitro* del SFN

En todas las concentraciones estudiadas (0-100 μ M), el SFN no mostró capacidad atrapadora hacia RO_2^\bullet y H_2O_2 . A la concentración de 0.25 μ M este compuesto mostró capacidad atrapadora hacia $ONOO^-$ (1.8 \pm 0.3%) pero no así hacia 1O_2 , $O_2^{\bullet-}$ y OH^\bullet (0% de actividad atrapadora). La capacidad atrapadora hacia $ONOO^-$, $O_2^{\bullet-}$, 1O_2 y OH^\bullet mostró una respuesta dependiente de la concentración. Sin embargo en ninguna concentración estudiada fue capaz de atrapar el 50% de las ERO por lo que no se pudo calcular el valor de IC_{50} , es decir, la concentración a la cual un compuesto atrapa o inactiva el 50% de una ERO o de una ERN. La capacidad atrapadora más alta que presentó el SFN fue para $O_2^{\bullet-}$ a una concentración de 100 μ M (33.7%). Los compuestos atrapadores de referencia presentaron los siguientes IC_{50} (en μ M): ácido úrico (para $ONOO^-$) 10.7 \pm 1.1, penicilamina (para $ONOO^-$) 26.6 \pm 0.3, NDGA (para $O_2^{\bullet-}$) 17.3 \pm 2.9, NDGA (para RO_2^\bullet) 0.025 \pm 0.013, histidina (para 1O_2) 17.6 \pm 2.3, piruvato (para H_2O_2) 43.2 \pm 1.3, DMTU (para OH^\bullet) 408 \pm 1.2 y ácido ascórbico (para HOCl) 25.11 \pm 3.25. Los resultados anteriores se obtuvieron de tres experimentos independientes.

En la Tabla 6 se presenta el resumen de los resultados obtenidos de los diferentes métodos de capacidad atrapadora del SFN.

Tabla 6. Capacidad atrapadora de ERO o ERN del SFN (%).

SFN (μM)	ONOO ⁻	O ₂ ^{•-}	¹ O ₂	ROO [•]	H ₂ O ₂	OH [•]	HOCl
0.25	1.8±0.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.5	2.1±0.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	2.8±0.6	1.3±0.02	ND	ND	ND	0.8±0.01	ND
5	3.3±1.8	2.8±0.2	ND	ND	ND	1.2±0.2	1.2±0.9
10	11.5±3.5	23.2±2.8	1.9±0.7	ND	ND	4.8±1.2	5.6±1.1
50	14.6±1.5	28.6±4.0	5.4±2.1	ND	ND	10.3±2.5	10.8±1.6
100	24.0±2.6	33.7±3.4	13.7±1.4	ND	ND	22.9±1.6	25.74±3.3

ND= 0% de atrapamiento.

9. DISCUSIÓN

Por más de una década se ha informado que el estrés oxidante es un factor importante que contribuye en la nefrotoxicidad inducida por CIS pues se ha reportado que hay un incremento de varias ERO en diversos modelos de estudio tanto *in vivo* e *in vitro*, en cultivos de células renales tubulares, en cortes de riñón y en animales enteros (Pabla y Dong, 2008). Se han propuesto varios mecanismos por los cuales el CIS induce dicho estrés y uno de ellos, tal vez el más aceptado, es que este agente antineoplásico ocasiona una disfunción mitocondrial al interrumpir el flujo de electrones en la cadena respiratoria causando con ello un incremento en la producción de ERO (Kruidering et al., 1997) puesto que la mitocondria es la principal fuente de ERO en organismos aerobios (Jezek y Hlavatá, 2005). Se ha informado que en células epiteliales de túbulo proximal aisladas de cerdo, el tratamiento con CIS de 50 a 500 μM por 20 min, redujo entre un 15 y 55% la respiración mitocondrial en los complejos I a IV y causó un incremento dependiente de la concentración y del tiempo en la producción de ERO (Kruidering et al., 1997). Así mismo se ha reportado en ratas que la administración de CIS (10 mg/kg i.p.) disminuye los niveles de ATP, disipa el potencial de membrana, aumenta la captación de O₂ en el estado 3 de la mitocondria e impide la entrada de calcio en este organelo (Rodrigues et al., 2010), lo que son indicativos de que el CIS inhibe la cadena respiratoria e incrementa la producción de ERO. Con estos antecedentes se decidió evaluar en células LLCPK1 la producción de ERO inducida por CIS y observar si la preincubación con SFN, un compuesto que activa la expresión de enzimas citoprotectoras, tiene algún efecto sobre esta condición.

En la Figura 19 se muestra claramente como el CIS (40 μM) indujo un aumento significativo en la producción de ERO después de 1 h (3.4 ± 0.63 veces; $p < 0.001$ vs. 0 h), alcanzando un máximo valor a las 2 h (5.86 ± 0.23 veces; $p < 0.001$ vs. 0 h) que se redujo gradualmente hasta que a las 5 h (2.13 ± 0.08 veces, $p > 0.05$) fue estadísticamente similar a las células control. Este aumento en la producción de ERO concuerda con estudios previos en diversos sistemas tanto *in vivo* como *in vitro* en los que se observó que el tratamiento con CIS a

diferentes concentraciones y tiempos de exposición indujo la producción de ERO, principalmente de OH^\bullet , H_2O_2 y $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009).

En las Figuras 20 y 21 se presentan los resultados de la producción de ERO por CIS y el efecto que el SFN tiene sobre esta condición y se observa que el SFN fue capaz de disminuir la producción de ERO ocasionada por el CIS, lo cual es un indicativo de que la protección del SFN en la toxicidad inducida por este agente antineoplásico está relacionada por la inducción de enzimas antioxidantes las cuales contrarrestan la producción de ERO puesto que este compuesto no mostró actividad atrapadora sobre ERO ó ERN (Tabla 6).

Otro mecanismo por el cual el CIS produce estrés oxidante es que reacciona rápidamente con moléculas que contienen grupos tioles (como el GSH) causando así una disminución en su concentración (Arany y Safirstein, 2003; Pérez-Rojas et al., 2009; Guerrero-Beltrán et al., 2010). El GSH es el principal antioxidante endógeno de la célula y su contenido intracelular es aproximadamente de 1-8 mM (Griffith, 1999), además es un antioxidante muy importante en la mitocondria puesto que en las células de los túbulos renales proximales de un 15 a 30% del glutatión total se encuentra en las mitocondrias (Schnellmann, 1991). En el presente estudio se determinó la concentración de GSH después de que las células LLCPK1 fueron expuestas a CIS (con o sin preincubación de SFN), y se encontró que el CIS disminuyó la concentración de GSH, efecto que fue prevenido cuando las células se preincubaron con SFN y que mostró ser dependiente de la concentración de SFN (Fig. 22b). Saad y colaboradores (2002) y Kim y colaboradores (2006) encontraron que el CIS disminuyó la concentración de GSH de manera paralela al estrés oxidante y se ha reportado además la formación de complejos CIS-GSH, los cuales están implicados en la nefrotoxicidad inducida por CIS (Hanigan et al., 2001; Townsend et al., 2003; Wainford et al., 2008). La disminución de GSH debida al CIS observada en los resultados de este trabajo es consistente con estos reportes previos, sin embargo, el SFN no impidió la disminución de GSH causada por el CIS puesto que la preincubación con SFN (Fig. 22a) aumentó los niveles de esta molécula antioxidante pero la incubación posterior con CIS redujo el contenido de GSH.

La formación de ERO por el CIS se debe en parte a la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, GPx y GR. En nuestro modelo experimental inducido por CIS se observó una disminución significativa en la actividad de las enzimas NQO1 y GCL, mientras que la preincubación con SFN causó un aumento en la actividad de estas dos enzimas con respecto a las células sin preincubación de SFN. El CIS puede unirse a las proteínas en los residuos de las cisteínas y metioninas (Cullen et al., 2007), lo cual puede explicar en parte la disminución en la actividad de NQO1 y GCL, ya que en el sitio catalítico de la enzima GCL existen residuos de cisteínas conservadas e importantes para su catálisis (Griffith y Mulcahy, 1999). Se sabe que el SFN es capaz de inducir la transcripción de enzimas citoprotectoras (Hu et al., 2004; Tarozzi et al., 2009; Lii et al., 2010; Yeh et al., 2009) como la NQO1 (una flavoproteína que previene el ciclo redox de las quinonas, disminuye el nivel de las quinonas electrofílicas y mantiene a la coenzima Q en su forma reducida) y la GCL (una enzima que cataliza la unión de la cisteína con el ácido glutámico, que es la primera reacción y el paso limitante en la síntesis *de novo* del GSH) (Franklin et al., 2009). En nuestro modelo de estudio se demostró la importancia de las enzimas antioxidantes NQO1 y GCL puesto que la muerte celular no se previno cuando las células fueron incubadas con SFN y con los inhibidores de esas enzimas (DIC y BSO, respectivamente). El DIC es un inhibidor irreversible de la enzima NQO1 que compete con

el NADPH en el sitio de unión (Asher et al., 2006) y la BSO es un inhibidor irreversible de la GCL. Esto indica que el mecanismo por el cual el SFN protege a las células LLCPK1 del daño inducido por CIS se relaciona con la disminución del estrés oxidante al inducir la actividad de enzimas antioxidantes como NQO1 y GCL. Cabe mencionar que otra propiedad antioxidante que posee la NQO1 es que tiene capacidad atrapadora hacia $O_2^{\bullet-}$ aunque con menos eficiencia que la SOD, lo que le confiere a los tejidos que posean por una expresión baja de SOD una protección adicional como en algunas células cardiovasculares (Dinkova-Kostova y Talalay, 2010), lo que podría explicar en parte la disminución de la producción de ERO y de estrés oxidante en nuestro modelo experimental.

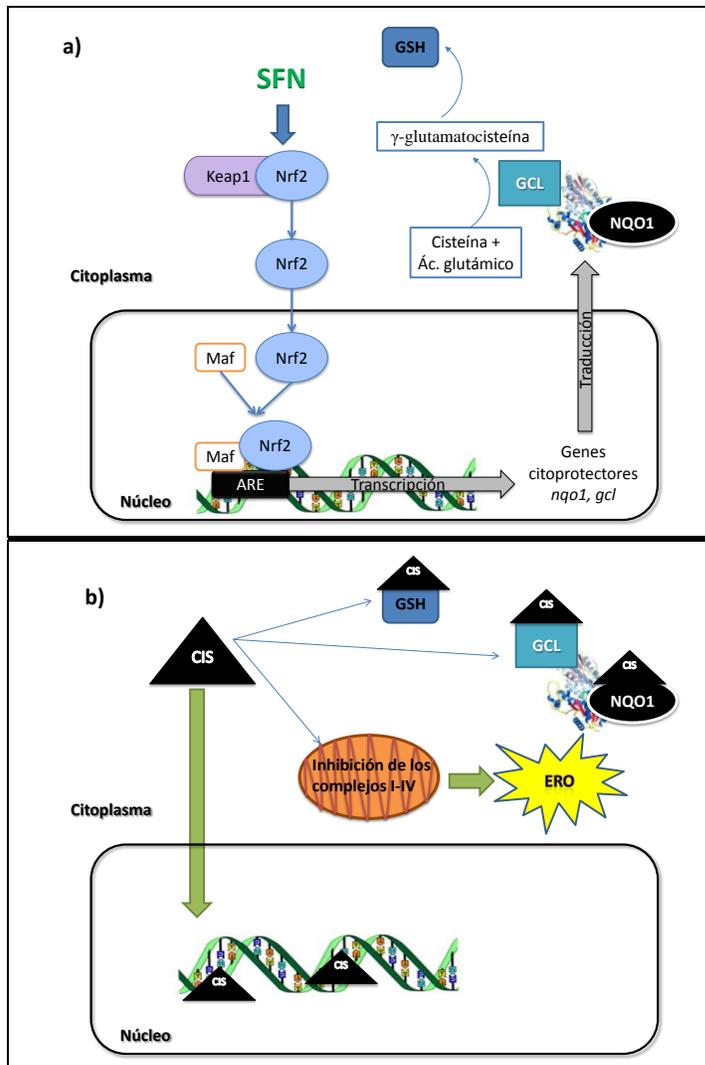


Figura 32. Mecanismo propuesto por el cual el SFN disminuye la citotoxicidad del CIS en las células LLCPK1. El SFN favorece la disociación del el complejo Keap1-Nrf2 y Nrf2 se traslada al núcleo para unirse a la secuencia ARE y activar la transcripción de genes citoprotectores que codifican para proteínas de respuesta al estrés como NQO1 y GCL. El aumento en la actividad de la enzima GCL permite la síntesis *de novo* de GSH (panel a). El CIS induce muerte celular por varios mecanismos mediante su unión al ADN, daño

mitocondrial por la inhibición de los complejos mitocondriales con posterior producción de ERO, así como la unión del CIS a los grupos tioles del GSH y de algunas proteínas (panel b).

Los datos obtenidos demuestran que el efecto protector del SFN sobre el daño celular inducido por CIS está asociado a la disminución de la actividad de las enzimas citoprotectoras NQO1 y GCL, así como a la disminución de los niveles de GSH. Como se ha mencionado anteriormente, este efecto del SFN está asociado al incremento en la expresión de enzimas inducido por la traslación del factor transcripcional Nrf2 al núcleo en esta línea celular (Guerrero-Beltrán et al., 2010, Fig. 6) mecanismo ejemplificado por el aumento en las actividades de las enzimas NQO1 y GCL. La inducción de ambas enzimas está asociada a las disminuciones en la producción de ERO (Figs. 26 y 27) y en la muerte celular (Fig. 25) causadas por la exposición a CIS. Estos resultados son consistentes con datos obtenidos previamente en un estudio *in vivo* con ratas, en donde el efecto protector del SFN se asoció con la prevención del estrés oxidante renal medido como lipoperoxidación, proteínas carboniladas, excreción urinaria de H₂O₂, GSH y actividad enzimática de GST, CAT y GPx (Guerrero-Beltrán et al., 2010).

El incremento en la actividad de GCL está asociado al incremento en los niveles de GSH ya que la inhibición de esta enzima disminuyó el contenido de GSH en las células tratadas con SFN y CIS, y también en las tratadas solo con SFN, lo que indica que ambos, tanto la enzima GCL como el GSH, son importantes para una respuesta de protección. También con la inhibición de GCL se observó la anulación del efecto protector del SFN ya que no hubo disminución en la producción de ERO ni aumento en los niveles de GSH. El mismo efecto se observó al incubar las células con el inhibidor de la enzima NQO1, ya que la inhibición de esta proteína también disminuyó el efecto protector del SFN, lo que indica la importancia de ambas enzimas en la protección contra la muerte celular inducida por cisplatino.

Como se mencionó al inicio de la discusión, se ha reportado que el CIS causa disfunción mitocondrial (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009; Rodrigues et al., 2010) y por lo tanto una mayor producción de ERO, por ello uno de los objetivos fue determinar si el SFN evita el establecimiento de estas 2 condiciones y se encontró que el SFN disminuyó ambos parámetros debidos a la exposición por CIS. Además la protección observada con SFN se previno cuando las células fueron incubadas con los inhibidores DIC y BSO, lo que sugiere que las enzimas NQO1 y GCL participaron en la prevención de estas alteraciones. También ambas enzimas participan en la prevención de la muerte celular cuando las células fueron coincubadas al mismo tiempo con SFN y CIS.

El efecto protector del SFN se debió a la inducción de enzimas antioxidantes, ya que al incubar las células con SFN y CIS al mismo tiempo ó en la incubación con SFN después del tratamiento con CIS, el SFN no tuvo un efecto protector y al hecho de que el SFN no es un compuesto con capacidad antioxidante directa, ya que en concentraciones micromolares no fue capaz de “atrapar” diversas ERO, aunque hay datos que indican que puede atrapar algunas ERO como O₂^{•-} y OH[•] pero a concentraciones molares (Yuan et al., 2010).

10. CONCLUSIÓN

El SFN disminuyó el estrés oxidante generado por la exposición a CIS. Dicho efecto está mediado en parte por la actividad de las enzimas NQO1 y GCL, así como una disminución en el daño mitocondrial y una prevención en la disminución de GSH. Lo que indica que el SFN, al activar la vía Keap1/Nrf2/ARE y disminuir el estrés oxidante, es un buen candidato para el tratamiento de la nefrotoxicidad inducida por CIS.

11. PERSPECTIVAS

- Determinar la actividad de enzimas citoprotectoras implicadas en la disminución del estrés oxidante como HO-1 y enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión.
- Determinar el efecto protector del SFN en presencia de algunos inhibidores de enzimas citoprotectoras como HO-1.
- Determinar los niveles de proteína de enzimas antioxidantes.
- Determinar si el efecto protector del SFN no interviene con la función antineoplásica del CIS.

12. REFERENCIAS

- 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: 1173-83.
- Angeloni C, Leoncini E, Malaguti M, Angelini S, Hrelia P, Hrelia S. 2009. Modulation of phase II enzymes by sulforaphane: implications for its cardioprotective potential. *J Agric Food Chem.* 57:5615-22.
- Apopa PL, He X, Ma Q. 2008. Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J Biochem Mol Toxicol.* 22:63-76.
- Arany I, Safirstein RL. 2003. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol.* 23:460-4.
- Asher G, Dym O, Tsvetkov P, Adler J, Shaul Y. 2006. The crystal structure of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 in complex with its potent inhibitor dicoumarol. *Biochemistry.* 45:6372-8.
- 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: 116-23.
- Badary OA, Abdel-Maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. 2005. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci.* 76:2125-35.
- Baird L, Dinkova-Kostova AT. 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol.* 85:241-72.
- 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: 474-82.
- Bindokas VP, Jordán J, Lee CC, Miller RJ. 1996. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci.* 16:1324-36.
- Bogaards 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.* 15:1073-5.

Botero-Omary M, Brovelli E, Pusateri D, David P, Rushing J, Fonseca J. 2002. Sulforaphane potential and vitamin C concentration in developing heads and leaves of broccoli (*Brassica oleracea* var ITALICA). *J Food Qual* 26: 523-30.

Brooks JD, Paton VG, Vidanes G. 2001. Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10:949-54.

Campas-Baypoli ON, Bueno-Solano C, Martínez-Ibarra DM, Camacho-Gil F, Villa-Lerma AG, Rodríguez-Núñez JR, Lóez-Cervantes J, Sánchez-Machado DI. 2009. Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos. *Arch Latinoam Nutr.* 59:95-100.

Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química.* 12:164-73.

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.* 26:42-6.

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.* 61:223-42.

Chirino YI, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Pedraza-Chaverri J. 2008a. Protective effects of apocynin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology.* 245:18-23.

Chirino YI, Trujillo J, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Bobadilla NA, Pedraza-Chaverri J. 2008b. Selective iNOS inhibition reduces renal damage induced by cisplatin. *Toxicol Lett.* 176:48-57.

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.* 167:1477-84.

Cullen KJ, Yang Z, Schumaker L, Guo Z. 2007. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J Bioenerg Biomembr.* 39(1):43-50.

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.* 12:2683-90.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P. 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res.* 52:5128-38.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P. 2010. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch Biochem Biophys.* 501:116-23.

Dwivedi C, Agrawal P, Natarajan K, Sharma H. 2005. Antioxidant and protective effects of Amrit Nectar tablets on adriamycin- and cisplatin-induced toxicities. *J Altern Complement Med.* 11:143-8.

Fahey JW, Talalay P. 1999. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol.* 37: 973-79.

Fernández-Checa JC, Kaplowitz N. 1990. The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Anal Biochem.* 190:212-9.

Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ. 2009. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med.* 30:86-98.

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:S130-5.

Gonzales-Vitale JC, Hayes DM, Cvitkovic E, Sternberg SS. 1977. The renal pathology in clinical trials of cis-platinum (II) diamminedichloride. *Cancer.* 39:1362-71.

Griffith OW, Mulcahy RT. 1999. The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 73:209-67.

Griffith OW. 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med.* 27:922-35.

Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Tapia E, Medina-Campos ON, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Ortiz-Vega KM, Franco M, Pedraza-Chaverri J. 2010. Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett.* 192:278-85.

Halliwell B, Gutteridge M. 2007. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. Nueva York. USA.

Hanigan MH, Lykissa ED, Townsend DM, Ou CN, Barrios R, Lieberman MW. 2001. Gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice are resistant to the nephrotoxic effects of cisplatin. *Am J Pathol.* 159:1889-94.

Hernández-Fonseca K, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L. 2008. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 86:1768-80.

Hong F, Freeman ML, Liebler DC. 2005. Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chem Res Toxicol.* 18:1917-26.

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

Howard JA, Mendenhall GD. 1975. Autoxidation and Photooxidation of 1,3-Diphenylisobenzofuran: A Kinetic and Product Study. *Can J Chem.* 53: 2199-201.

Hu R, Hebbar V, Kim BR, Chen C, Winnik B, Buckley B, Soteropoulos P, Toliás P, Hart RP, Kong AN. 2004. In vivo pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate sulforaphane in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 310:263-71.

Hu R, Xu C, Shen G, Jain MR, Khor TO, Gopalkrishnan A, Lin W, Reddy B, Chan JY, Kong AN. 2006. Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Cancer Lett.* 243:170-92.

Husain K, Morris C, Whitworth C, Trammell GL, Rybak LP, Somani SM. 1998. Protection by ebselen against cisplatin-induced nephrotoxicity: antioxidant system. *Mol Cell Biochem* 78:127-33.

Jakubíková J, Sedlák J, Mithen R, Bao Y. 2005. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol.* 69:1543-52.

Jamieson ER, Lippard SJ. 1999. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev.* 99: 2467-98.

Jezek P, Hlavatá L. 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:2478-503.

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.* 72:2243-53.

Juge N, Mithen RF, Traka M. 2007. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci.* 64:1105-27.

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.* 23:29-34.

Kassahun K, Davis M, Hu P, Martin B, Baillie T. 1997. Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat: identification of phase I metabolites and glutathione conjugates. *Chem Res Toxicol.* 10:1228-33.

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.* 100:65-72.

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

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 LLCPK1 cells and rats. *Biol Pharm Bull.* 29:2436-41.

Kobayashi M, Yamamoto M. 2006. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul.* 46:113-40.

Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H. 1997. Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite. *Free Radic Res.* 27:245-54.

Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF. 1997. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther.* 280:638-49.

Kuhad A, Pilkhwal S, Sharma S, Tirkey N, Chopra K. 2007. Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. *J Agric Food Chem.* 55:10150-5.

Lampe JW. 2003. Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* 78:579S-83S.

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

Lii CK, Liu KL, Cheng YP, Lin AH, Chen HW, Tsai CW. 2010. Sulforaphane and alpha-lipoic acid upregulate the expression of the pi class of glutathione S-transferase through c-jun and Nrf2 activation. *J Nutr.* 140:885-92.

Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD. 1995. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med.* 18:153-8.

Maliakel DM, Kagiya TV, Nair CK. 2008. Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Exp Toxicol Pathol.* 60:521-7.

Mansour MA, Al-Shabanah OA, El-Khashef HA. 2003. L-arginine ameliorates kidney function and urinary bladder sensitivity in experimentally-induced renal dysfunction in rats. *J Biochem Mol Biol.* 36:373-8.

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: 1175-80.

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: 518-26.

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.* 49:5743-49.

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.* 90:687-97.

McWalter GK, Higgins LG, McLellan LI, Henderson CJ, Song L, Thornalley PJ, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. 2004. Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates. *J Nutr.* 134:3499S-506S.

Medina-Campos ON, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado PD, Mendoza-Patiño N, Pedraza-Chaverri J. 2007. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK(1) cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food Chem Toxicol.* 45:2030-39.

Minamiyama Y, Takemura S, Toyokuni S, Nishino Y, Yamasaki K, Hai S, Yamamoto S, Okada S. 2002. Amelioration of cisplatin toxicity by a fermented grain food product. *Biofactors.* 16:105-15.

Mohan IK, Khan M, Shobha JC, Naidu MU, Prayag A, Kuppusamy P, Kutala VK. 2006. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by *Spirulina* in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 58:802-8.

Morales González JA, Fernández Sánchez AM, Bautista Ávila M, Vargas Mendoza M, Madrigal Santillán EO. 2009. 1ª ed. Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas. Tomo I. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

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

Motohashi H, Yamamoto M. 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*. 10:549-57.

Munday R, Munday CM. 2004. Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. *J Agric Food Chem*. 52:1867-71.

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: 221-30.

Nishikawa M, Nagatomi H, Chang BJ, Sato E, Inoue M. 2001. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits mitochondrial injury and renal dysfunction induced by cisplatin. *Arch Biochem Biophys*. 387:78-84.

Orwar O, Fishman HA, Ziv NE, Scheller RH, Zare RN. 1995. Use of 2,3-naphthalenedicarboxaldehyde derivatization for single-cell analysis of glutathione by capillary electrophoresis and histochemical localization by fluorescence microscopy. *Anal Chem*. 67:4261-8.

Pabla N, Dong Z. 2008. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int*. 73:994-1007.

Pedraza-Chaverrí J, Reyes-Fermín LM, Nolasco-Amaya EG, Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, González-Cuahutencos O, Rivero-Cruz I, Mata R. 2009. ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of alpha-mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Exp Toxicol Pathol*. 61:491-501.

Pérez-Rojas JM, Cruz C, García-López P, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Ceballos G, Espinosa M, Meléndez-Zajgla J, Pedraza-Chaverri J. 2009. Renoprotection by alpha-mangostin is related to the attenuation in renal oxidative/nitrosative stress induced by cisplatin nephrotoxicity. *Free Radic Res*. 43:1122-32.

Prochaska HJ, Santamaria AB. 1988. Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal Biochem*. 169:328-36.

Qu X, Kirschenbaum LJ, Borish ET. 2000. Hydroxyterephthalate as a fluorescent probe for hydroxyl radicals: application to hair melanin. *Photochem Photobiol*. 71: 307-13.

Razo-Rodríguez AC, Chirino YI, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Pedraza-Chaverri J. 2008. Garlic powder ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress. *J Med Food*. 11:582-6.

Robinson KM, Janes MS, Beckman JS. 2008. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat Protoc*. 3:941-7.

Rodrigues MA, Rodrigues JL, Martins NM, Barbosa F, Curti C, Santos NA, Santos AC. 2010. Carvedilol protects against the renal mitochondrial toxicity induced by cisplatin in rats. *Mitochondrion*. 10:46-53.

Saad SY, Najjar TA, Daba MH, Al-Rikabi AC. 2002. Inhibition of nitric oxide synthase aggravates cisplatin-induced nephrotoxicity: effect of 2-amino-4-methylpyridine. *Chemotherapy*. 48:309-15.

Schnellmann RG. 1991. Renal mitochondrial glutathione transport. *Life Sci*. 49:393-8.

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*. 7:1091-100.

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*. 10:501-8.

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*. 580:1771-4.

Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB. 1991. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:3671-5.

Son K, Kim YM. 1995. In vivo cisplatin-exposed macrophages increase immunostimulant-induced nitric oxide synthesis for tumor cell killing. *Cancer Res*. 55:5524-7.

Song MY, Kim EK, Moon WS, Park JW, Kim HJ, So HS, Park R, Kwon KB, Park BH. 2009. Sulforaphane protects against cytokine- and streptozotocin-induced beta-cell damage by suppressing the NF-kappaB pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 235:57-67.

Srivastava RC, Farookh A, Ahmad N, Misra M, Hasan SK, Husain MM. 1996. Evidence for the involvement of nitric oxide in cisplatin-induced toxicity in rats. *Biometals*. 9:139-42.

Sueishi K, Mishima K, Makino K, Itoh Y, Tsuruya K, Hirakata H, Oishi R. 2002. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol*. 451:203-8.

Surh YJ, Kundu JK, Na HK. 2008. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med.* 74:1526-39.

Tarozzi A, Morroni F, Merlicco A, Hrelia S, Angeloni C, Cantelli-Forti G, Hrelia P. 2009. Sulforaphane as an inducer of glutathione prevents oxidative stress-induced cell death in a dopaminergic-like neuroblastoma cell line. *J Neurochem.* 111:1161-71.

Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lopus MG, Hanigan MH. 2003. Metabolism of Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol.* 14:1-10.

Tsutsumishita Y, Onda T, Okada K, Takeda M, Endou H, Futaki S, Niwa M. 1998. Involvement Of H₂O₂ production in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 242:310-12.

Van Eylen D, Bellostas N, Strobel BW, Oey I, Hendrickx M, Van Loey A, Sørensen H, Sørensen JC. 2009. Influence of pressure/temperature treatments on glucosinolate conversion in broccoli (*Brassica oleraceae L. cv Italica*) heads. *Food Chem.* 112: 646-653.

Vermeulen M, Klöpping-Ketelaars IW, van den Berg R, Vaes WH. 2008. Bioavailability and kinetics of sulforaphane in humans after consumption of cooked versus raw broccoli. *J Agric Food Chem.* 56:10505-9.

Wainford RD, Weaver RJ, Stewart KN, Brown P, Hawksworth GM. 2008. Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway. *Toxicology.* 249:184-93.

Weijl NI, Elsendoorn TJ, Lentjes EG, Hopman GD, Wipkink-Bakker A, Zwinderman AH, Cleton FJ, Osanto S. 2004. Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Cancer.* 40:1713-23.

Weiner MW, Jacobs C. 1983. Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *Fed Proc.* 42:2974-8.

White CC, Viernes H, Krejsa CM, Botta D, Kavanagh TJ. 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal Biochem.* 318:175-80.

Wozniak M, Tanfani F, Bertoli E, Zolese G, Antosiewicz J. 1991. A new fluorescence method to detect singlet oxygen inside phospholipid model membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1082:94-100.

Wu L, Noyan Ashraf MH, Facci M, Wang R, Paterson PG, Ferrie A, Juurlink BH. 2004. Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:7094-9.

Xiao T, Choudhary S, Zhang W, Ansari NH, Salahudeen A. 2003. Possible involvement of oxidative stress in cisplatin-induced apoptosis in LLCPK1 cells. *J Toxicol Environ Health A*. 66:469-79.

Yamaguchi S, Kishikawa N, Ohyama K, Ohba Y, Kohno M, Masuda T, Takadate A, Nakashima K, Kuroda N. 2010. Evaluation of chemiluminescence reagents for selective detection of reactive oxygen species. *Anal Chim Acta*. 665:74-78.

Yeh CT, Chiu HF, Yen GC. 2009. Protective effect of sulforaphane on indomethacin-induced cytotoxicity via heme oxygenase-1 expression in human intestinal Int 407 cells. *Mol Nutr Food Res*. 53:1166-76.

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*. 75:2214-23.

Yoshida M, Fukuda A, Hara M, Terada A, Kitanaka Y, Owada S. 2003. Melatonin prevents the increase in hydroxyl radical-spin trap adduct formation caused by the addition of cisplatin in vitro. *Life Sci* 72:1773-80.

Yuan H, Yao S, You Y, Xiao G, You Qi. 2010. Antioxidant activity of isothiocyanate extracts from broccoli. *Chin J Chem Eng* 18:312-21.

Zhang DD. 2006. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug. Metab. Rev.* 38:769-89.

Zhang Y, Callaway EC. 2002. High cellular accumulation of sulphoraphane, a dietary anticarcinogen, is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate. *Biochem J*. 364:301-7.

Zhang Y, Talalay P. 1994. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: Chemistry and mechanism. *Cancer Res*. 54:1976s-81s.

Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B. 2003. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med*. 34:1359-68.