



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

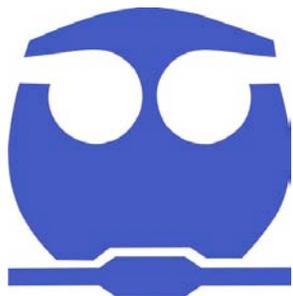
ESTUDIO SOBRE EL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA
CURCUMINA EN LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA
INDUCIDA POR DICROMATO DE POTASIO

T E S I S

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

P R E S E N T A :
QFB EDUARDO MOLINA JIJÓN

Tutor: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI



MÉXICO, D. F.

junio 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTUDIO SOBRE EL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA CURCUMINA EN LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR DICROMATO DE POTASIO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri en el laboratorio 209, 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. Norma Araceli Bobadilla Sandoval	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Rogelio Hernández Pando	Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán”
Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Edilia Tapia Rodríguez, del Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de función renal.

Se reconoce la colaboración del Dr. Rogelio Hernández Pando, del Departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán”, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los estudios histológicos.

Se reconoce la asesoría técnica del M. en C. Omar Noel Medina Campos en los experimentos de estrés oxidante y actividad de enzimas antioxidantes.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT clave No. 129838 y DGAPA (UNAM) clave No. IN201910. Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en el examen de grado presentado en junio de 2011

El Jurado de Examen de maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Rogelio Hernández Pando	Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán”
Vocal	Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Armando Tovar Palacio	Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán”
Suplente	Dra. Marta Menjívar Iraheta	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Amanda Gálvez Mariscal	Facultad de Química, UNAM

**Por su apoyo, paciencia y comprensión, con todo mi cariño:
a mi hermano Crispin**

CONTENIDO

Índice

	Página
Resumen.....	i
Abreviaturas.....	iii
1. Antecedentes.....	1
1.1 Curcumina.....	1
1.2 Usos tradicionales de la curcumina.....	2
1.3 Farmacocinética de la curcumina.....	2
1.4 Estrés oxidante.....	4
1.5 Antioxidantes directos e indirectos.....	4
1.6 Curcumina como antioxidante bifuncional.....	6
1.7 Papel de la curcumina en la prevención y atenuación del daño renal.....	7
1.8 Riñón.....	7
1.9 Insuficiencia renal aguda (IRA).....	9
1.10 Nefrotoxicidad por cromo hexavalente [Cr(VI)].....	10
2. Planteamiento del problema.....	12
3. Hipótesis.....	13
4. Objetivos.....	13
4.1 Objetivo general.....	13
4.2 Objetivos particulares.....	13
5. Reactivos, diseño experimental y métodos.....	13
5.1 Reactivos.....	13
5.2 Diseño experimental.....	14
5.3 Preparación de los homogenados de riñón.....	15
5.4 Evaluación de la función renal.....	15
5.5 Análisis histológicos.....	18
5.6 Evaluación del estrés oxidante.....	18
5.7 Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes.....	20
5.8 Cuantificación de Cr(VI).....	23
5.9 Análisis estadístico.....	23
6. Resultados.....	23
6.1 Efecto de la curcumina y el $K_2Cr_2O_7$ en el peso corporal y volumen urinario.....	23
6.2 La curcumina atenúa la disfunción renal inducida por $K_2Cr_2O_7$	23
6.3 La curcumina atenúa los daños histológicos inducidos por $K_2Cr_2O_7$	26
6.4 La curcumina atenúa el estrés oxidante inducido por $K_2Cr_2O_7$	28
6.5 La curcumina atenúa la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por $K_2Cr_2O_7$	28
6.6 La curcumina no modifica el contenido de Cr(VI) que llega al riñón.....	31
7. Discusión.....	31
8. Conclusión.....	34
9. Perspectivas.....	34
10. Referencias.....	35

Resumen

INTRODUCCIÓN. La curcumina (diferuloilmetano), es uno de los compuestos con mayor actividad biológica que se ha aislado del turmérico (*Curcuma longa L.*), y se ha descrito que posee actividad antioxidante directa e indirecta. Por otro lado, se conoce que los compuestos de cromo hexavalente [Cr(VI)] como el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) inducen nefrotoxicidad y que uno de los principales mecanismos de progresión del daño celular es a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). **JUSTIFICACIÓN.** Se ha estudiado el efecto protector de la curcumina en diferentes modelos de nefrotoxicidad. Sin embargo, se desconoce si la capacidad antioxidante de la curcumina previene o atenúa el daño renal inducido por $K_2Cr_2O_7$ en ratas, ya que se ha documentado que el estrés oxidante juega un papel importante en la progresión de la insuficiencia renal aguda (IRA) inducida por este compuesto. **HIPÓTESIS.** Si el antioxidante curcumina es capaz de reducir directamente las ERO y de inducir la transcripción de enzimas citoprotectoras de fase 2, entonces será capaz de prevenir o atenuar la disfunción renal y el daño oxidante inducidos por $K_2Cr_2O_7$ a través de su efecto antioxidante. **OBJETIVOS.** Evaluar si la curcumina ejerce efecto nefroprotector en la IRA inducida con $K_2Cr_2O_7$ y si este efecto está relacionado con su capacidad antioxidante. Para ello se determinará el efecto de este compuesto sobre las alteraciones inducidas por $K_2Cr_2O_7$ en la función renal, el estrés oxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes. **METODOLOGÍA.** Las ratas se trataron con curcumina cada 24 h vía oral bajo tres esquemas de tratamiento: (1) Tratamiento completo (100, 200 y 400 mg/kg de peso corporal, diez días antes y dos días después de la inyección de $K_2Cr_2O_7$), (2) pretratamiento (400 mg/kg de peso corporal, diez días antes de la inyección de $K_2Cr_2O_7$) y (3) postratamiento (400 mg/kg de peso corporal, dos días después de la inyección de $K_2Cr_2O_7$). Se administró una dosis única de $K_2Cr_2O_7$ vía subcutánea (15 mg/kg de peso corporal). Las ratas se sacrificaron 48 h después de la inyección de $K_2Cr_2O_7$ para evaluar la función renal, el daño histológico, el estrés oxidante, la actividad de las enzimas antioxidantes y el contenido de Cr(VI) en tejido renal. **RESULTADOS.** El tratamiento con curcumina (esquemas 1 y 2) atenuó la disfunción renal [proteinuria, la creatinina en plasma, el nitrógeno de urea en sangre (BUN), la excreción urinaria de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) y disminución de la depuración de creatinina y la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) en plasma], el daño histológico [necrosis tubular aguda (NTA)], el estrés oxidante [lipoperoxidación, oxidación de proteínas, contenido de glutatión reducido (GSH) y excreción urinaria de H_2O_2] y la disminución de la actividad de las enzimas

antioxidantes [catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), GPx, glutatión S-transferasa (GST) y superóxido dismutasa (SOD)] inducidos por el $K_2Cr_2O_7$. Se encontró que el postratamiento con curcumina (esquema 3) no atenuó la disfunción renal inducida por el $K_2Cr_2O_7$. Además se encontró que el tratamiento con curcumina no afectó el contenido renal de Cr(VI) lo que sugiere que este no es el mecanismo a través del cual la curcumina ejerce el efecto nefroprotector observado. También, se encontró que la curcumina indujo la actividad de la GST y aumentó el contenido renal de GSH. **CONCLUSIÓN.** Los resultados sugieren que el efecto nefroprotector que se observa de la curcumina contra la nefrotoxicidad inducida por $K_2Cr_2O_7$ está asociado con la preservación de la actividad de las enzimas antioxidantes, la inducción de la GST y el aumento en el contenido renal de GSH. **PERSPECTIVAS.** Se ha descrito que la mitocondria es la principal fuente de producción de ERO en condiciones fisiológicas y patológicas, por lo tanto, sería interesante investigar si el Cr(VI) induce disfunción mitocondrial en este modelo experimental y si la curcumina sería capaz de atenuar los efectos tóxicos del Cr(VI) a nivel mitocondrial.

Abreviaturas

ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
ANOVA	Análisis de varianza
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ASB	Albúmina sérica bovina
BUN	Nitrógeno de urea en sangre
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAT	Catalasa
CMC	Carboximetilcelulosa
CNDB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
Cr (III)	Cromo trivalente
Cr(IV)	Cromo tetravalente
Cr(V)	Cromo pentavalente
Cr (VI)	Cromo hexavalente
CUL 3	Culina 3
CUR	Curcumina (solo para describir los grupos experimentales)
DFC	Difenilcarbazida
DMPD	Dicloruro de <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -fenilendiamina
DNP	Dinitrofenilhidrazina
DPPH•	Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Fe²⁺	Hierro 2+
Fe-NTA	Nitrilotriacetato férrico
γ-GCL	γ- glutamato cisteína ligasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S-transferasa
4-HNE	4-hidroxinonenal
HO-1	Hemo oxigenasa-1
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
IRA	Insuficiencia renal aguda
i.p.	Vía intraperitoneal
k	Constante de reacción de primer orden
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1 (por sus siglas en inglés)
MCB	Monoclorobimano
MDA	Malondialdehído
NAG	N-acetil-b-D-glucosaminidasa
NBT	Nitro azul de tetrazolio
NQO1	NADPH quinona oxidoreductasa-1
Nrf2	NF-E2 p45-related Factor 2 (por sus siglas en inglés)

NTA	Necrosis tubular aguda
O₂⁻	Anión superóxido
OH[•]	Radical hidroxilo
OH⁻	Anión hidroxilo
PM	Peso molecular
Prx	Peroxirredoxina
Rbx1	RING-box proteína (por sus siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
SH	Grupos tiol
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ácido tricloroacético
TMPO	Tetrametoxipropano
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina reductasa
U	Unidades de actividad enzimática
Ub	Ubiquitinación

1. Antecedentes

1.1. Curcumina

La *Curcuma longa* L., es una planta de origen asiático que pertenece a la familia de plantas conocida como Zingiberáceas cuyo rizoma de color naranja se usa comúnmente como una especia principalmente en la cultura asiática donde se considera una planta “mágica” debido a las



Figura 1. *Curcuma longa* L.

características organolépticas y a las propiedades terapéuticas que posee (Goel *et al.*, 2008) (Fig. 1). Es por esta razón que los compuestos presentes en el rizoma de la cúrcuma se han estudiado ampliamente con la finalidad de optimizar el uso de esta planta.

Los componentes principales del extracto seco del rizoma de esta planta son: carbohidratos (4.7-8.2%), aceites esenciales (2.4-4.0%), ácidos grasos (1.7-3.0%), curcuminoides (curcumina, demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina y ciclocurcumina) cuyo contenido aproximado es de un 3-5% y otros polipéptidos como la turmerina (0.1% del extracto seco) (Srinivas *et al.*, 1992).

La curcumina o también llamado diferuloilmetano, es el componente mayoritario de los curcuminoides presentes en los extractos del rizoma de esta planta (~77%), es la sustancia que causa el color amarillo característico y es uno de los principales componentes que presenta actividad biológica (Ajay *et al.*, 2008). Es un compuesto insoluble en agua y éter, pero soluble en etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) y acetona. Es estable a pH ácido, aunque en medio acuoso es estable a pH elevado (>11.7) (Bernabe-Pineda *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1997). Tiene un punto de fusión de 183.8°C, su fórmula molecular es $C_{21}H_{20}O_6$ y su PM es de 368.37 g/mol, es de color amarillo (en un intervalo de pH de 2.5 – 7.0) o rojo (a un pH mayor a 7.0). La curcumina existe en forma de cetona o de enol, esta última es la isoforma que le confiere la característica de reaccionar con las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Fig. 2).

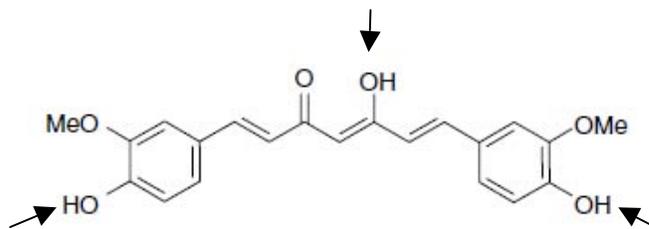


Figura 2. Estructura química de la curcumina. Con flechas se señalan los grupos OH los cuales son los responsables de la actividad antioxidante directo de la curcumina.

1.2. Usos tradicionales de la curcumina

La cúrcuma o turmérico es un compuesto ampliamente utilizado en la medicina tradicional asiática, su uso se recomienda para el tratamiento de varios padecimientos comunes como son dolor de estómago, flatulencia, disentería, úlceras, ictericia, artritis e infecciones (Ajay *et al.*, 2008). Se han descrito diversas actividades biológicas de la curcumina, entre las que se mencionan sus características como fungicida (Kim *et al.*, 2003), antiparasitario (Reddy *et al.*, 2005), antiinflamatorio (Srimal *et al.*, 1973), antiproliferativo (Kuttan *et al.*, 1985; Mahady *et al.*, 2002; Ruby *et al.*, 1995) y antioxidante (Ruby *et al.*, 1995; Sharma, 1976; Sugiyama *et al.*, 1996).

1.3. Farmacocinética de la curcumina

En diversos estudios se ha descrito que la curcumina tiene potente actividad biológica y por consiguiente es un agente terapéutico eficaz para el tratamiento de diversos padecimientos. Sin embargo, en los estudios que se han hecho con respecto a la absorción, distribución, metabolismo y excreción de este compuesto se ha descrito que la curcumina se absorbe poco y se metaboliza rápidamente, lo cual limita su biodisponibilidad siendo una de las principales limitantes para su eficacia (Anand *et al.*, 2007).

Absorción

Se ha documentado que la absorción gastrointestinal de la curcumina es muy baja en roedores y en humanos (Pan *et al.*, 1999; Perkins *et al.*, 2002; Wahlstrom y Blennow, 1978) debido a que los niveles plasmáticos detectados después de la administración oral de este compuesto son extremadamente bajos, el primer estudio de farmacocinética de la curcumina se realizó por

Wahlstrom y Blennow (1978) en ratas Sprague-Dowley. Después de 15 min de la administración por vía oral de 1 g/kg de curcumina, se encontraron bajos niveles plasmáticos de este compuesto (0.13 mg/ml); la concentración máxima se detectó a los 60 min (0.22 mg/ml). En otro estudio se demostró que se alcanza una concentración plasmática máxima de 0.36 mg/ml después de la administración intravenosa de 10 mg/kg de curcumina, mientras que la administración oral de una dosis de 500 mg/kg alcanzó niveles plasmáticos máximos de 0.06 mg/ml 41 min después de su administración (Yang *et al.*, 2007), es decir, la vía de administración de este compuesto juega un papel esencial en su biodisponibilidad.

Distribución

En un estudio realizado por Ravindranath y Chandrasekhara (1980), acerca de la distribución de la curcumina en los diferentes tejidos, se encontró que después de la administración oral de 400 mg/kg de curcumina en ratas, solo una pequeña cantidad de este compuesto se encontró en hígado y en riñón (~20 µg en cada tejido). En el estudio realizado por Suresh y Srinivasan (2010) en el cual se administró curcumina a una dosis de 500 mg/kg vía intragástrica a ratas macho Wistar, se encontró que la curcumina se distribuye en órganos tales como el hígado, el intestino, la sangre y el riñón; la cantidad encontrada 24 h después fue de 1.98±0.76 µg en tejido renal. Como se describió anteriormente la curcumina se absorbe poco. Sin embargo, se ha descrito que una vez que este compuesto llega al torrente sanguíneo se distribuye en diferentes órganos como riñón, hígado y cerebro (Ravindranath y Chandrasekhara, 1980, 1981). En la rata el volumen de distribución de la curcumina es de aproximadamente 190 litros, lo que sugiere que la curcumina se distribuye sistémicamente (Ravindranath y Chandrasekhara, 1980, 1981; Pan *et al.*, 1999; Perkins *et al.*, 2002; Garcea *et al.*, 2004).

Metabolismo

El hígado es el principal órgano responsable de la biotransformación de la curcumina (Pan *et al.*, 1999). Se han realizado estudios acerca del metabolismo de la curcumina en humanos y en roedores, se encontró que una vez que la curcumina se absorbe esta lleva a cabo reacciones de conjugación con sulfato o con glucorónidos en varios tejidos. Pan *et al.* (1999) demostraron que el 99% de la curcumina plasmática se encuentra conjugada con ácido glucorónico, este mismo grupo demostró también que los principales metabolitos estables *in vivo* de la curcumina son los glucorónidos de dihidrocurcumina y de tetrahidrocurcumina, los cuales también se ha descrito

que poseen actividad antioxidante y antiinflamatoria (Sugiyama *et al.*, 1996).

Excreción

En ratas y humanos las heces constituyen la mayor vía de excreción de la curcumina, en orina se ha encontrado que la cantidad de curcumina o sus derivados es mínima o indetectable. Maiti *et al.* (2007) encontraron que después de la administración vía oral de curcumina a dosis menores a 1 g/kg el tiempo de vida media de eliminación plasmática de este compuesto es de aproximadamente 1.5 h. Sin embargo, hasta la fecha no existe en la literatura evidencia suficiente para describir los factores que controlan la eliminación *in vivo* de este compuesto. La seguridad, la tolerancia y la baja toxicidad de este compuesto está bien establecida; los humanos toleran bien dosis orales de 12 g/día durante 30 días (Lao *et al.*, 2006).

1.4. Estrés oxidante

De manera normal, en la célula existe un equilibrio entre los sistemas productores de ERO y la capacidad neutralizante del sistema de defensa antioxidante (Cohen-Kerem y Koren, 2003). El balance entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes se puede perder debido a un aumento en la producción de ERO, a una disminución en los sistemas antioxidantes o a una combinación de ambos factores, a esta condición se le denomina *estrés oxidante*. El estrés oxidante se origina en situaciones fisiológicas anormales tales como la hipoxia/reperfusión, además es una de las características de progresión de muchas enfermedades, entre las cuales se encuentran el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades hepáticas, insuficiencia renal aguda, disfunción endotelial, retinopatías, etc (Konigsberg *et al.*, 2008).

1.5. Antioxidantes directos e indirectos

La protección celular contra la toxicidad oxidante y electrofílica está dada por dos tipos de moléculas antioxidantes: (i) antioxidantes directos, los cuales son compuestos que participan directamente en las reacciones de óxido-reducción por lo que ocurren modificaciones en su estructura durante el proceso de su acción antioxidante y necesitan ser reemplazados o regenerados, además bajo ciertas condiciones (un exceso) podrían actuar como agentes prooxidantes; y (ii) antioxidantes indirectos, este grupo de compuestos no participan en las reacciones de óxido-reducción, se ha descrito que uno de sus mecanismos de acción es a través de la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE, la cual induce la transcripción de genes citoprotectores

de fase 2 que dan origen a proteínas que actúan catalíticamente en la eliminación de compuestos tóxicos y que tienen tiempos de vida media mayores que los antioxidantes directos, además, se ha postulado que es poco probable que tengan efectos prooxidantes (Dinkova-Kostova y Talalay, 2008). Algunas de las proteínas citoprotectoras de fase 2 que se inducen vía Keap1/Nrf2/ARE se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Proteínas citoprotectoras de fase 2 y su función

Proteína	Función
Glutación S-transferasa (GST)	Conjugar electrófilos con glutación reducido (GSH) y reducir oxidantes y peróxidos $RX + GSH \rightarrow RSG + HX$
γ -Glutamato cisteína ligasa (γ GCL)	Catalizar la reacción limitante de la síntesis de GSH $Glu + Cisteína + ATP \rightarrow \gamma\text{-Glutamilo-Cisteína} + ADP + Pi$
Glutación reductasa (GR)	Regenerar GSH a partir de glutación oxidado (GSSG) $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$
Tiorredoxina reductasa (TrxR)	Regenerar tiorredoxina (Trx) reducida $Trx-S_2 + NADPH + H^+ \rightarrow Trx-(SH)_2 + NADP^+$
NADPH quinona óxidorreductasa-1 (NQO1)	Prevenir el ciclo redox de las quinonas, disminuye el nivel de las quinonas electrofílicas, mantiene a la coenzima Q en su forma reducida $Quinona + NADPH + H^+ \rightarrow \text{Hidroquinona} + NADP^+$
Hemo oxigenasa-1 (HO-1). Nota: la HO-1 cataliza la reacción (1) y la biliverdina reductasa cataliza la reacción (2)	Generar antioxidantes (bilirrubina y monóxido de carbono) y degradar el grupo hemo (prooxidante) (1) $Hemo + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow \text{monóxido de carbono} + Biliverdina + NADP^+$ (2) $Biliverdina + NADPH + H^+ \rightarrow \text{Bilirrubina} + NADP^+$
Glutación peroxidasa (GPx)	Descomponer hidroperóxidos y H_2O_2 $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$
Catalasa (CAT)	Descomponer H_2O_2 $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Peroxirredoxina (Prx)	Descomponer hidroperóxidos y H_2O_2 $H_2O_2 + Prx-(SH)_2 \rightarrow H_2O + Prx-S_2$
Superóxido dismutasa (SOD)	Convertir superóxido en H_2O_2 $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Tiorredoxina (Trx)	Reducir diversos compuestos $Trx-(SH)_2 + \text{proteína-S}_2 \rightarrow Trx-S_2 + \text{proteína-(SH)}_2$

El mecanismo de inducción de proteínas citoprotectoras a través de la vía Keap1/Nrf2/ARE se presenta en la Fig. 3. En resumen, se ha descrito que en condiciones basales, la proteína Keap1 forma un complejo con otra proteína denominada culina 3 (Cul 3) los cuales reprimen al factor de

transcripción Nrf2 al ubiquitarlo constantemente para su subsecuente degradación proteasomal. Se ha postulado que cuando un inductor entra a la célula modifica los residuos activos de cisteína de Keap1 causando un cambio conformacional que interrumpe la capacidad de Keap1 para reprimir a Nrf2, el cual se traslada al núcleo y en combinación heterodimérica con factores pequeños de transcripción Maf, se unen a las secuencias ARE que son secuencias que se encuentran río arriba de la región promotora de ciertos genes citoprotectores activando la transcripción de estos.

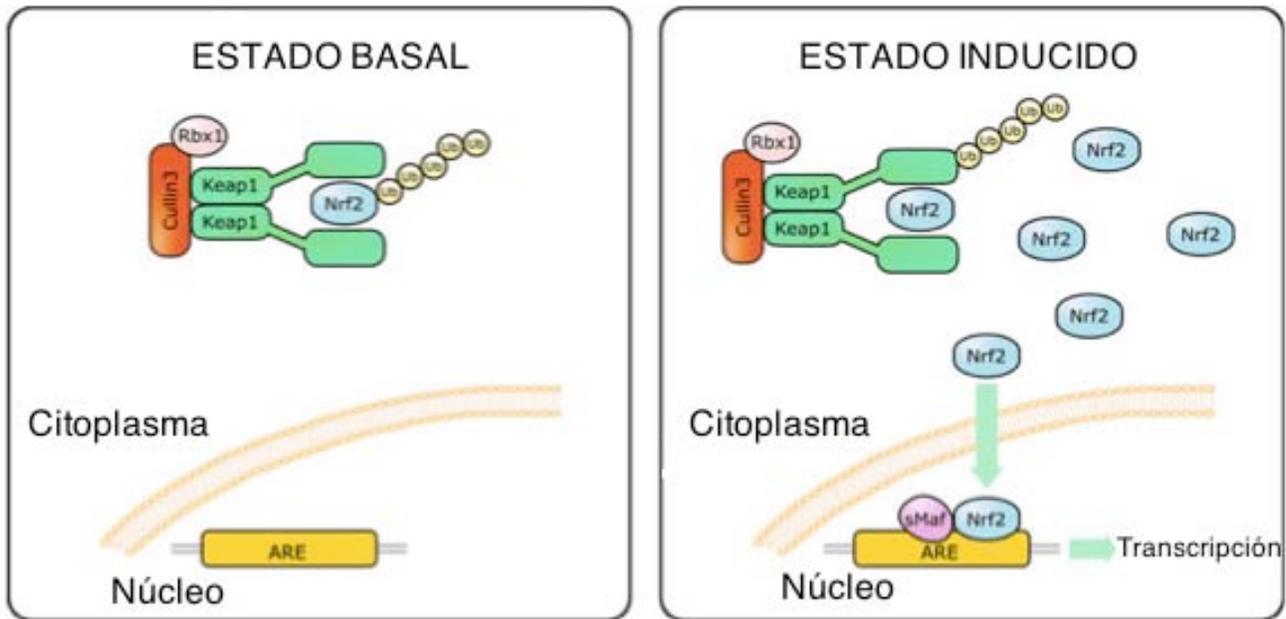


Figura 3. Mecanismo de inducción de proteínas citoprotectoras (Tomado de Dinkova-Kostova y Talalay., 2011)

Se ha clasificado otro grupo de antioxidantes denominados como bifuncionales, los cuales poseen las características de los antioxidantes directos e indirectos. Es interesante el hecho de que muchos inductores de proteínas citoprotectoras se han aislado a partir de extractos de vegetales o plantas, por ejemplo, el sulforafano (que se obtiene del brócoli), el ácido nordihidroguayaráctico (NDGA, que se extrae de la planta *Larrea tridentata*), el resveratrol (que se extrae de las uvas) y la curcumina (que se obtiene de la planta *Curcuma longa L.*).

1.6. Curcumina como antioxidante bifuncional

Se ha descrito que la curcumina es un antioxidante bifuncional pues ejerce efectos antioxidantes directos e indirectos. El efecto de la curcumina como antioxidante indirecto se

define por su capacidad de inducir la expresión de diversas proteínas citoprotectoras a través de la vía Keap1/Nrf2/ARE (Dinkova-Kostova y Talalay, 2008).

En experimentos realizados *in vivo*, se ha demostrado que la curcumina es capaz de inducir la expresión de la enzima HO-1 en cerebro, a través de la vía Keap1/Nrf2/ARE, con lo cual se le ha atribuido efecto neuroprotector (Chenhui *et al.*, 2009). También se ha descrito que induce las enzimas antioxidantes GST y NQO1 en células de adenocarcinoma de colon humano y que aumenta la concentración de Nrf2 en el núcleo (Ye *et al.*, 2007). En estudios llevados a cabo en riñón, se ha encontrado que induce la actividad de CAT, GR, GPx, GST y NQO1 en el ratón (Iqbal *et al.*, 2003). Además, en células renales de cerdo LLCPK-1 la curcumina indujo la expresión y actividad de HO-1 de una manera dependiente de la concentración además de aumentar la expresión del factor de transcripción Nrf2 (Balogun *et al.*, 2003). Los hallazgos anteriores sugieren que la curcumina es capaz de inducir la actividad de las diferentes enzimas citoprotectoras a través de la inducción del factor de transcripción Nrf2.

Con respecto a la capacidad antioxidante directa de la curcumina se han realizado diversos estudios. Tuba e Ilhami (2008) demostraron en estudios *in vitro* que la curcumina es capaz de reaccionar directamente con especies altamente reactivas como el 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS), dicloruro de *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMPD), anion superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) además de quelar metales como el Fe^{2+} , describieron también que la curcumina inhibe la lipoperoxidación en una magnitud comparable con la de otros compuestos antioxidantes conocidos, como el hidroxitolueno butilado (BHT), el α -tocoferol y el trólox.

Los aspectos mecanísticos de la actividad antioxidante de la curcumina se han investigado en varios modelos en los cuales se ha estudiado la capacidad que tiene la curcumina de reaccionar directamente con diversas ERO (Barclay *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006; Ligeret *et al.*, 2004; Priyadarsini *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2005; Venkatesan *et al.*, 2000; Wright 2002). Sharma en 1976 describió que los grupos hidroxilo (OH) de los fenoles (Fig. 2) de la curcumina son los responsables de la actividad antioxidante directa de este compuesto, lo cual se corroboró recientemente en otros estudios (Ligeret *et al.*, 2004; Venkatesan y Rao, 2000) donde, además, se describió que la presencia de los grupos metoxilo en posición orto al OH, favorecen la actividad antioxidante de la curcumina.

1.7. Papel de la curcumina en la prevención y atenuación del daño renal.

La curcumina se ha estudiado en varios modelos de daño renal oxidante (Tabla 2) y se ha propuesto como un potencial agente nefroprotector, pues el tratamiento con este compuesto ha prevenido o atenuado la disfunción renal inducida por compuestos nefrotóxicos.

Tabla 2. Modelos de daño renal en los que se ha estudiado el papel nefroprotector de la curcumina.

Compuesto nefrotóxico	Esquema de tratamiento con curcumina	Referencia
Cipermetrina	100 mg/kg, 28 días, vía oral	Sankar <i>et al.</i> (2011)
Vancomicina	200 mg/kg, 21 días, vía oral	Ahmida (2011)
Acetaminofén	200 mg/kg, 30 min antes, vía i.p	Cekmen <i>et al.</i> (2009)
Fe-NTA	1% en la dieta, 28 días	Iqbal <i>et al.</i> (2009)
Arsenito de sodio	15 mg/kg, 30 días, vía oral	El-Demerdash <i>et al.</i> (2008)
Aflatoxina	2 mg/kg, 45 días, vía oral	Verma y Mathuria (2008)
Fe-NTA	50 mg/kg, 3 días, vía oral	Eybl <i>et al.</i> (2008)
Cisplatino	15, 30 y 60 mg/kg, 5 días, vía oral	Kuhad <i>et al.</i> (2006)
Gentamicina	200 mg/kg, 21 días, vía oral	Farombi y Ekor (2006)
Ciclosporina A	5, 10 y 15 mg/kg, 21 días, vía oral	Tirkey <i>et al.</i> (2005)
Cisplatino	8 mg/kg, 1 día, vía i.p.	Antúnes <i>et al.</i> (2001)
Adriamicina	200 mg/kg, 30 días, vía oral	Venkatesan <i>et al.</i> (2000)

1.8. Riñón

Los riñones constituyen un órgano par, se localizan en la pared abdominal posterior, a ambos lados de la columna vertebral. Las dimensiones medias del riñón humano son de 12 x 6 x 3 cm. El peso promedio del riñón es de 125-170 g en el hombre y de 115-155 g en las mujeres. Tienen forma irregular y ovoidea aplanada en sentido anteroposterior. El riñón es el encargado de remover del cuerpo los productos terminales del metabolismo de las células, tales como urea, ácido úrico y creatinina. Por otro lado, el riñón tiene la capacidad de regular la presión sanguínea y de retener sustancias que son esenciales para la supervivencia de los individuos (agua, azúcares, aminoácidos, proteínas y electrolitos como el sodio, potasio, bicarbonato y cloruro). Por

consiguiente, el riñón es un órgano regulador que excreta y retiene determinadas sustancias, preservando así la homeostasis del medio ambiente interno del organismo (Heinz, 1983).

La nefrona es la unidad anatomo-funcional del riñón. Cada riñón humano contiene de 0.4×10^6 a 1.2×10^6 nefronas y cada riñón de rata contiene de 30,000 a 34,000 nefronas aproximadamente (Arturson *et al.*, 1971). La nefrona está compuesta por el corpúsculo renal y el sistema tubular.

El sistema tubular de la nefrona está compuesto por el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el sistema de túbulos colectores. El túbulo proximal mide aproximadamente 8 mm en el riñón de rata, 10 mm en el conejo y 14 mm en el humano, por microscopía óptica se distingue por la eosinofilia de las células tubulares, límites citoplasmáticos poco precisos, borde luminal en forma de cepillo y núcleos redondeados de localización mediobasal. En algunas especies como el conejo y la rata se pueden distinguir tres segmentos especializados (S1, S2 y S3) y morfológicamente diferenciables ultraestructuralmente en el túbulo proximal (Kaissling y Kriz, 1979).

Las células epiteliales que constituyen el túbulo contorneado proximal tienen una forma compleja, su superficie luminal tiene dos características fundamentales: gran riqueza de microvellosidades y un sistema de túbulos apicales. Esta modificación en forma de borde de cepillo se calcula que incrementa la superficie luminal 40 veces aumentando con ello la capacidad de reabsorción tubular (Welling y Welling, 1975), es en esta sección de la nefrona donde se lleva a cabo la reabsorción de la mayoría de las moléculas indispensables para el organismo (glucosa, aminoácidos, agua, iones y proteínas) (Heinz, 1983).

Se ha reportado que en los lisosomas del túbulo proximal se acumulan sustancias tales como antibióticos aminoglicósidos (Kaloyanides y Pastoriza-Muñoz, 1980) y ciertos metales pesados (Madsen, 1980) que dan lugar a cambios estructurales y funcionales en el sistema lisosomal.

1.9. Insuficiencia renal aguda (IRA)

La IRA se caracteriza por una disminución rápida de la filtración glomerular, lo que ocasiona la acumulación de productos finales del metabolismo, como los compuestos nitrogenados urea y creatinina. La IRA es generalmente asintomática y se detecta al realizar un perfil bioquímico, generalmente en pacientes intrahospitalarios, se detecta un aumento en los niveles plasmáticos de creatinina y nitrógeno de urea en sangre (BUN). La IRA está asociada con el aumento de la morbilidad y la mortalidad intrahospitalaria debido a la severidad de su naturaleza y la incidencia elevada de complicaciones.

La IRA se clasifica en tres categorías dependiendo de su origen:

1. IRA prerrenal. Que se caracteriza por una hipoperfusión renal en la cual la integridad del tejido renal es preservado y representa entre el 55 y el 60% de los casos de IRA.
2. IRA intrínseca. Enfermedad donde se ve comprometido el tejido renal. Desde el punto de vista clinicopatológico se clasifica en: 1) enfermedades que involucran vasos renales grandes; 2) enfermedades de la microvasculatura y del glomérulo; 3) necrosis tubular aguda isquémica y nefrotóxica, que representan el 90% de los casos de IRA intrínseca.
3. IRA postrenal. Tiene una frecuencia menor al 5%. Es una enfermedad asociada con la obstrucción aguda del flujo urinario entre la uretra y el cuello de la vejiga o una obstrucción bilateral de los uretéros.

La necrosis tubular aguda (NTA) se caracteriza por la generación de una serie de alteraciones estructurales y moleculares de las células tubulares, tales como aparición de ERO, pérdida del borde de cepillo, disminución o desaparición de los procesos de absorción y excreción, hipoxia, incremento de calcio citosólico, disfunción mitocondrial, descenso en los niveles de ATP y ADP, acidosis intracelular y abultamiento de las células epiteliales que junto con restos necróticos de estas células contribuyen a la obstrucción tubular (Brenner, 2000; Sánchez, 1993).

1.10. Nefrotoxicidad por cromo hexavalente [Cr(VI)]

Los compuestos de cromo trivalente [Cr(III)] y Cr(VI) son los más abundantes en el medio ambiente (Cohen *et al.*, 1993) y son utilizados frecuentemente en la industria química, metalúrgica y de material de alta resistencia al calor, constituyendo estas industrias las fuentes de exposición a este compuesto (Samitz *et al.*, 1962). A diferencia del Cr(III), los compuestos que contienen Cr(VI) son agentes oxidantes que inducen directamente daño tisular (Pederson, 1982; Tandon *et al.*, 1979) y esto se debe a que los compuestos de Cr(VI) son altamente solubles en agua y entran a la célula vía transportadores de sulfatos, en contraste, los compuestos con Cr(III) son insolubles y por lo tanto no entran fácilmente en la célula (Kortenkamp *et al.*, 1987). Por lo que se ha descrito en varios estudios que los compuestos de Cr(VI) son agentes potencialmente nefrotóxicos, hepatotóxicos y cardiotóxicos (Tandon *et al.*, 1979).

Se ha postulado que el Cr(VI) se acumula principalmente en hígado y en riñón, en este último órgano se acumula selectivamente en los túbulos proximales de las nefronas debido a que en este epitelio se reabsorbe, generando NTA a altas concentraciones (Kelly *et al.*, 1982; Laborda *et al.*, 1986; Mathur *et al.*, 1977; Schiffel *et al.*, 1982). En estudios en los que se utilizó ⁵¹Cr se encontró

que este metal se acumula selectivamente en la corteza renal a una concentración de 6-20 veces más elevada que en los eritrocitos e hígado (Weber, 1983). Durante la reducción intracelular del Cr(VI) a Cr(III) se induce la sobreproducción de ERO, lo que constituye el principal mecanismo de toxicidad de este elemento (Kortenkamp *et al.*, 1987) debido a que genera estrés oxidante y como consecuencia daño a macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Fig. 4).

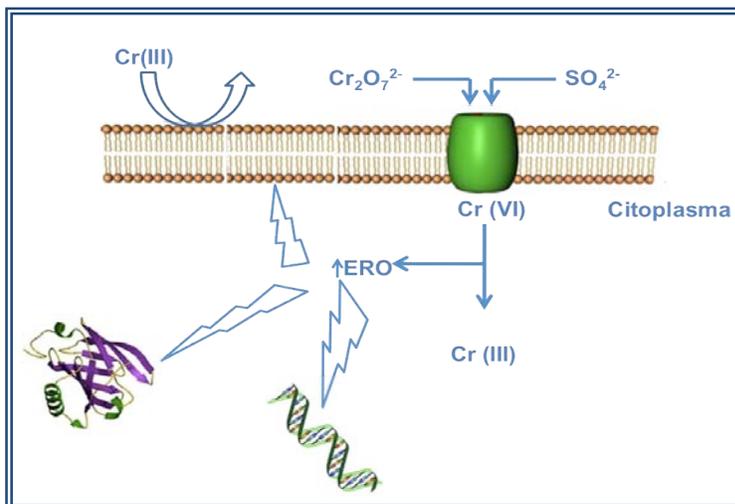
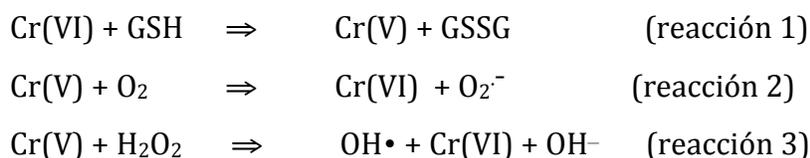


Figura 4. Mecanismo de toxicidad del Cr(VI)

La reducción intracelular del Cr(VI) se lleva a cabo por enzimas como el citocromo P450, por la mitocondria y por moléculas reductoras como el GSH y el ácido ascórbico generándose otros iones reactivos de cromo así como otros radicales. Los iones de cromo reactivo que se generan contienen al cromo con diferentes estados de valencia [cromo pentavalente [Cr(V)], cromo tetravalente [Cr(IV)] y Cr(III)]. En presencia de GPx y de NADPH, el Cr(VI) se reduce a Cr(V) generando OH• (Shi y Dalal, 1990). Otros estudios indican que el Cr(VI) puede interaccionar con grupos tioles como por ejemplo el del GSH (Appenroth *et al.*, 1998; Hojo y Satomi, 1991; O'Brien *et al.*, 1994), produciendo Cr(V) (reacción 1), el cual es capaz de reducir al O₂ para generar O₂⁻ (reacción 2). El O₂⁻ a su vez es reducido por la acción de la SOD, o bien por el proceso de dismutación se produce H₂O₂, que al reaccionar con el Cr(V) mediante una reacción tipo Fenton se produce la ruptura de la molécula de H₂O₂, generándose OH• (reacción 3) que es una de las especies mas reactivas (Aiyar *et al.*, 1990; Liu y Shi, 2001).



El dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) es uno de los compuestos de Cr(VI) más estables y tóxicos, se ha demostrado que induce nefrotoxicidad en humanos y animales (Liu y Shi, 2001; Norseth *et al.*, 1986; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2005). La IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$ se ha usado como un modelo experimental que permite estudiar la fisiopatología de este padecimiento (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1995; Seiken *et al.*, 1994). Se ha descrito que el estrés oxidante es una de las causas del daño renal inducido por $K_2Cr_2O_7$ (Bagchi *et al.*, 1995; Barrera *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 1999; Sengupta *et al.*, 1992; Stohs y Bagchi, 1995; Liu y Shi, 2001). Se han realizado estudios que demuestran que el tratamiento con antioxidantes previenen o atenúan los efectos tóxicos de este compuesto, protegiendo del daño oxidante renal inducido por $K_2Cr_2O_7$.

Por otro lado, en modelos experimentales de IRA se ha encontrado que hay modificaciones en la cantidad y actividad de las enzimas antioxidantes. Por ejemplo, en el modelo de isquemia-reperfusión renal la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GPx y SOD disminuye, así como la cantidad de proteína y niveles de ARNm de estas enzimas de fase 2 (Dobashi *et al.*, 2000). Con respecto al comportamiento del sistema antioxidante enzimático en la nefrotoxicidad inducida por $K_2Cr_2O_7$ algunos estudios indican que las enzimas antioxidantes como CAT, GPx y SOD son susceptibles de ser modificadas en su actividad después de la administración de 1.5 g/kg de $K_2Cr_2O_7$ vía intragástrica (Sengupta *et al.*, 1992). Existen una gran variedad de estudios en los que se ha descrito que la administración vía subcutánea de una dosis de 15 mg/kg de $K_2Cr_2O_7$ induce disfunción renal y daño oxidante, en el estudio llevado a cabo por Fatima y Mahmood (2007) además se encontró que la administración del $K_2Cr_2O_7$ indujo cambios estructurales en la membrana renal en borde de cepillo, disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD, además de la disminución en el contenido de grupos sulfhidrilo (SH).

2. Planteamiento del problema

La curcumina es un compuesto que se ha estudiado ampliamente, y se ha descrito que posee actividad antioxidante pues ejerce de manera directa e indirecta efectos citoprotectores en diferentes modelos de daño celular en los cuales está implicado el estrés oxidante. Por otro lado, se conoce que durante la reducción intracelular del Cr(VI) se producen ERO, lo que constituye el principal mecanismo toxicidad de este compuesto. Además se sabe que la administración de $K_2Cr_2O_7$ induce disfunción renal y daño oxidante. Por esta razón, este estudio se diseñó con la finalidad de conocer si la curcumina puede ejercer efectos benéficos contra la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$ en ratas a través de su actividad antioxidante, lo que permitirá proponer a la curcumina como un compuesto con potencial efecto nefroprotector.

3. Hipótesis

Si el antioxidante curcumina es capaz de reducir directamente las ERO y además inducir la transcripción de enzimas detoxificantes de fase 2 entonces será capaz de prevenir o atenuar la disfunción renal y el daño oxidante inducido por el $K_2Cr_2O_7$.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar el potencial efecto nefroprotector de la curcumina en la disfunción renal y el daño oxidante inducido por $K_2Cr_2O_7$.

4.2. Objetivos particulares

- Evaluar si la curcumina previene o atenúa la disfunción renal inducida por el $K_2Cr_2O_7$ en ratas bajo tres esquemas de tratamiento diferentes (tratamiento completo, pretratamiento y postratamiento).
- Evaluar si la curcumina previene o atenúa las alteraciones histológicas y el daño oxidante renal inducido por el $K_2Cr_2O_7$.
- Evaluar si el efecto de la curcumina está relacionado con la preservación o la inducción de la actividad de las enzimas antioxidantes.

5. Reactivos, diseño experimental y métodos

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): Curcumina (No. Cat. C1386, lote # 079K1756), $K_2Cr_2O_7$, (No. Cat. P-2588, lote #91K0081), p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminido, GSH, GSSG, nitroazul de tetrazolio (NBT), tetrametoxipropano (TMPO), sulfato de estreptomicina, GR, GST, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), xantina, xantina oxidasa, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1-metil-2-fenilindol, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato forma reducida (NADPH), nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida (NADH), aprotinina, leupeptina, pepstatina, N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico] (HEPES), BHT, albúmina sérica bovina (ASB) e hidrocloreuro de guanidina. Los kits comerciales para medir creatinina en plasma y BUN fueron de Spinreact (Girona, España). El monoclorobimano (MCB), la 1,5-difenilcarbazida (DFC) y el Amplex Red se compraron en Fluka (Schnelldorf, Alemania). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido tricloroacético (TCA) se obtuvieron de J.T. Baker (Xalostoc Edo. Méx, México). Los demás reactivos y compuestos que se usaron fueron de alta pureza y se obtuvieron comercialmente.

5.2. Diseño experimental

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200-250 g de peso, los cuales se mantuvieron durante todo el tratamiento en jaulas metabólicas con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12 h. Los animales se mantuvieron con alimentación y agua *ad libitum*. El trabajo experimental se apegó a las reglas de la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y para la disposición de los residuos biológicos (NOM-087- ECOL-1995).

Se estudiaron 10 grupos de ratas (n=6-8/grupo):

- 1) Grupo control, se trató diariamente por vía oral con carboximetilcelulosa al 0.05% (vehículo de la curcumina) durante 10 días antes y 2 días después de la inyección de solución salina isotónica (SSI, vehículo del $K_2Cr_2O_7$).
- 2) Grupo tratado con $K_2Cr_2O_7$, el $K_2Cr_2O_7$ se disolvió en SSI y se inyectó por vía subcutánea en una dosis única de 15 mg/kg de peso corporal (Yam-Canul *et al.*, 2008)
- 3) Grupo $K_2Cr_2O_7$ +curcumina (100 mg/kg, tratamiento completo), la curcumina se disolvió en carboximetilcelulosa y se administró diariamente por vía oral 10 días antes y 2 días después de la inyección del $K_2Cr_2O_7$.

- 4) Grupo $K_2Cr_2O_7$ +curcumina (200 mg/kg, tratamiento completo), la curcumina se disolvió en carboximetilcelulosa y se administró diariamente por vía oral 10 días antes y 2 días después de la inyección del $K_2Cr_2O_7$.
- 5) Grupo $K_2Cr_2O_7$ +curcumina (400 mg/kg, tratamiento completo), la curcumina se disolvió en carboximetilcelulosa y se administró diariamente por vía oral 10 días antes y 2 días después de la inyección del $K_2Cr_2O_7$.
- 6) Grupo $K_2Cr_2O_7$ +curcumina (400 mg/kg, pretratamiento), la curcumina se disolvió en carboximetilcelulosa y se administró diariamente por vía oral 10 días antes de la inyección del $K_2Cr_2O_7$.
- 7) Grupo $K_2Cr_2O_7$ +curcumina (400 mg/kg, postratamiento), la curcumina se disolvió en carboximetilcelulosa y se administró diariamente por vía oral 2 días después de la inyección del $K_2Cr_2O_7$.
- 8) Grupo curcumina (100 mg/kg), la curcumina se disolvió en carboximetilcelulosa y se administró diariamente por vía oral durante 10 días.
- 9) Grupo curcumina (200 mg/kg), la curcumina se disolvió en carboximetilcelulosa y se administró diariamente por vía oral durante 10 días.
- 10) Grupo curcumina (400 mg/kg), la curcumina se disolvió en carboximetilcelulosa y se administró diariamente por vía oral durante 10 días.

Las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 h y medir proteinuria, excreción urinaria de NAG, como marcador de daño tubular y de H_2O_2 como marcador de producción de ERO. Los animales se anestesiaron 48 h después de la inyección del $K_2Cr_2O_7$ o vehículo (SSI) y se recolectaron las muestras de sangre vía aorta, para ello se empleó una jeringa y una aguja #18 con EDTA como anticoagulante. La sangre se centrifugó durante 10 min a 300 x g y el plasma se separó y almacenó a 4°C hasta que se determinaron los siguientes parámetros: creatinina, BUN y actividad de GPx. Se removieron ambos riñones y se obtuvieron muestras de tejido para realizar los estudios histológicos y los análisis bioquímicos [lipoperoxidación, oxidación de proteínas, contenido de GSH, actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, GR, GPx, GST y SOD) y el contenido de Cr(VI)].

5.3. Preparación de los homogenados de riñón

Las muestras de tejido se homogenizaron en un politrón (modelo PT 2000, Brinkmann,

Westbury, NY, EUA) durante 10 s en amortiguador de fosfatos de potasio frío (50 mM, pH 7.0), adicionado con 0.1% de tritón X-100, 5 µg/mL de leupeptina, 7 µg/mL de pepstatina y 5 µg/mL de aprotinina. El homogenado se centrifugó a $19,000 \times g$ a 4°C durante 30 min, se separó el sobrenadante en el cuál se cuantificó la cantidad de proteínas totales por el método de Lowry como se describió previamente (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2005) la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, GR, GPx, GST y SOD), el contenido de GSH y de Cr(VI). Para medir los marcadores de estrés oxidante (lipoperoxidación y proteínas oxidadas) se adicinó BHT (0.5 M) como antioxidante al amortiguador de fosfatos de potasio (50 mM, pH 7.0) y las muestras se homogenizaron como se describió anteriormente.

5.4. Evaluación de la función renal

Proteinuria. La excreción urinaria de proteínas totales se determinó por turbidimetría a 420 nm después de su precipitación con TCA al 12.5% como se describió previamente (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1999). Los resultados de las densidades ópticas se intrapolaron en una curva patrón de ASB entre 0.04 y 0.8 mg/dL. Tomando en cuenta el volumen urinario excretado en 24 h, el resultado se expresó como mg de proteína/24 h.

Creatinina en plasma. La determinación de creatinina en plasma se realizó mediante un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Jaffé, empleando un kit comercial; la reacción se basa en la formación de un complejo colorido picrato-creatinina en medio alcalino que presenta una absorbencia máxima a 492 nm (Fig. 5). Los resultados se expresaron como mg de creatinina/dL.

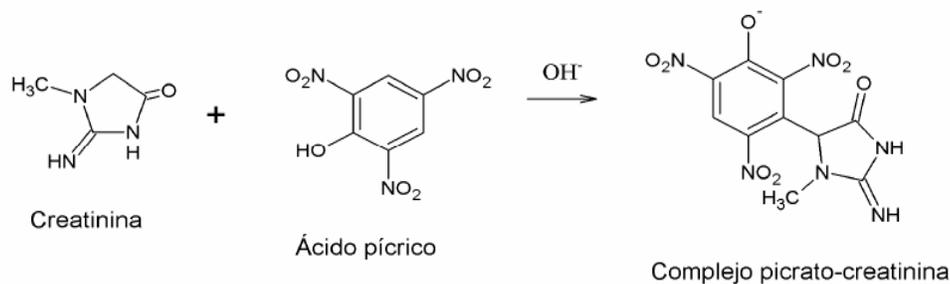


Figura 5. Reacción de Jaffé

Depuración de creatinina. Para ello fue necesario cuantificar la concentración de creatinina en orina, la cual se determinó por el método anteriormente descrito. Se calculó la depuración de

creatinina empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Depuración de creatinina} = \frac{(\text{Creatinina}_{\text{orina}} (\text{mg/dL}) * \text{Volumen urinario (mL)})}{(\text{Creatinina}_{\text{plasma}} (\text{mg/dL}) * 1440)}$$

El volumen urinario fue la cantidad de orina que se recolectó en 24 h y 1440 son los minutos que hay en 24 h. La depuración de creatinina se expresó en mL/min.

BUN. La concentración de urea en sangre se determinó mediante un ensayo colorimétrico empleando un kit comercial. Este ensayo es una adaptación de la reacción propuesta por Jung *et al.* (1975), que consiste en la formación en medio ácido de un complejo colorido ortoftaldehído-urea que absorbe a 510 nm (Fig. 6). La cantidad de BUN se calculó dividiendo la concentración de urea entre 2.14, factor que resulta del cociente entre el peso molecular de la urea y el peso de dos átomos de nitrógeno. Los resultados se expresaron en mg/dL.

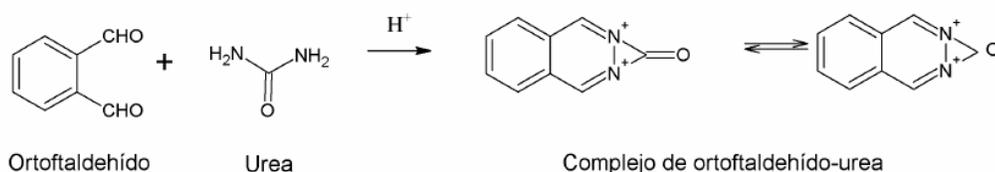


Figura 6. Reacción de formación del complejo ortoftaldehído-urea

Actividad de GPx en plasma. La actividad de esta enzima se midió indirectamente por el método de Lawrence y Burk (1976) por medio de un par de reacciones en las que en presencia de H₂O₂ se produce GSSG, el cual a su vez es reducido por la glutatión reductasa utilizando NADPH como cofactor. Debido a que el NADPH absorbe a 340 nm, la reacción se basa en la disminución de la intensidad óptica por la desaparición de NADPH (Fig. 7). Los resultados se expresaron en U/mL, donde una U es la cantidad de enzima que oxida 1 mmol de NADPH por min.

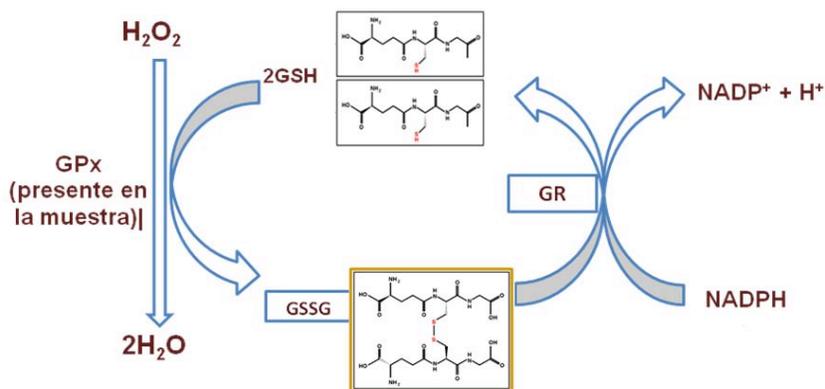


Figura 7. Reacción de determinación de la actividad de GPx.

Excreción de NAG. La excreción de la enzima NAG se determinó a través de un ensayo que se basa en la conversión de p-nitrofenil-N-acetil-β,D-glucosaminido en p-nitrofenol, que a pH ácido es incoloro. Al alcalinizar el medio el p-nitrofenol pasa de su forma protonada a su forma aniónica la cual absorbe a 405 nm (Jung *et al.*, 1991) (Fig. 8). Las densidades ópticas de la forma aniónica del p-nitrofenol se interpolaron en una curva de calibración de p-nitrofenol en un intervalo de 5-175 nM. Los resultados se expresaron como unidades de actividad enzimática (U) de NAG/24 h en donde una U se define como la cantidad de enzima que libera un mmol de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad de esta enzima en orina se empleó como marcador de daño tubular, ya que se sintetiza en los túbulos proximales y debido a su elevado peso molecular (130000 a 140000 Da) no se filtra por el glomérulo y se excreta en la orina (Skalova y Chladek, 2004).

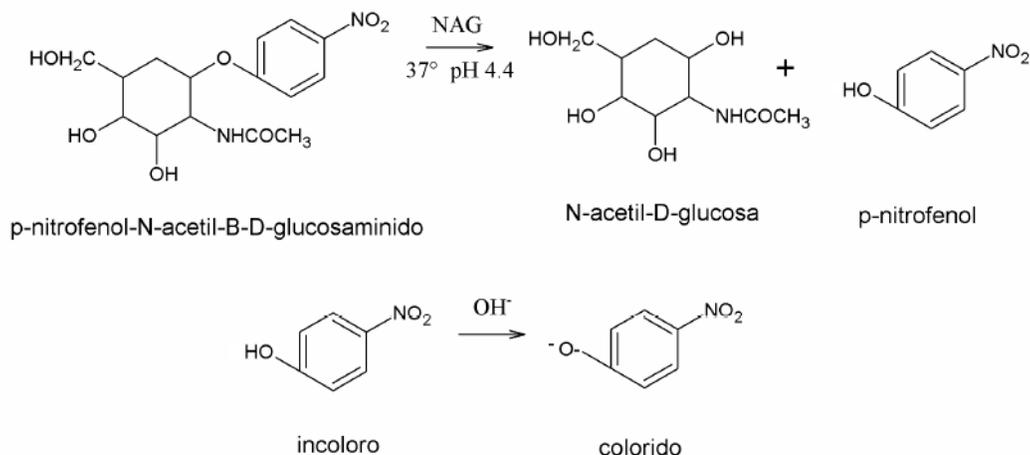


Figura 8. Reacción de determinación de la actividad de NAG.

5.5. Análisis histológicos

Un corte transversal de riñón con corteza y médula se fijó por inmersión en 1 ml de formalina al 10%. Las muestras se colocaron por separado en moldes para su inclusión en parafina y posteriormente se lavaron 3 veces con parafina fundida a 60°C, se desparafinó con tres lavados de xilol y se rehidrató con tres lavados de alcohol a concentraciones decrecientes hasta llegar a agua. Cuando se enfrió la parafina, el bloque se desmoldó y se procedió a realizar cortes de 4 μm con un microtomo de rotación. Los cortes se colocaron en portaobjetos esmerilados, se fijaron y

se realizó la tinción H&E en la cual la hematoxilina tiñe de morado los núcleos y la eosina tiñe de rosa el citoplasma y las membranas, las imágenes se analizaron con el software analizador de imágenes Leica QWIN (Cambridge, UK). Para realizar el perfil histológico se seleccionaron al azar 25 túbulos proximales por rata (4 ratas por grupo, n= 100 túbulos/grupo). Se registró el número de túbulos con necrosis y se cuantificó el porcentaje de area tubular con necrosis usando una morfometría automatizada en un microscopio óptico, se compararon los grupos de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$ y con $K_2Cr_2O_7$ +curcumina.

5.6. Evaluación del estrés oxidante

Lipoperoxidación. Se determinó midiendo malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE) (productos finales de este proceso), mediante un método colorimétrico que se basa en la detección de un complejo colorido entre el MDA y el 4-HNE con 1-metil-2-fenilindol en medio ácido (Gerard-Monnier *et al.*, 1998, Fig. 9). Los resultados de densidades ópticas se intrapolaron en una curva patrón de TMPO desde 0-23.68 mM. El resultado se expresó como nmol de MDA y 4-HNE/mg de proteína.

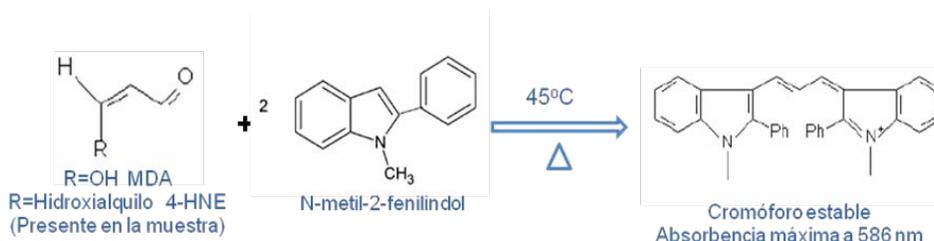


Figura 9. Reacción de determinación de lipoperoxidación

Determinación de proteínas oxidadas. Para determinar la cantidad de proteínas oxidadas se utilizó un método colorimétrico que se basa en la reactividad de los grupos carbonilo con DNPH para formar un complejo proteína-hidrazona que absorbe a 370 nm (Resnick y Packer, 1994) (Fig. 10). El contenido de carbonilos se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del DNPH ($22\ 000\ M^{-1}cm^{-1}$). Para cada muestra se utilizó un blanco sin DNPH en el cual se evaluó el contenido de proteína intrapolarando el valor de la densidad óptica a 280 nm en una curva patrón de ASB entre 0.25 y 2 mg/mL. El resultado se expresó como nmol de carbonilos/mg de proteína.

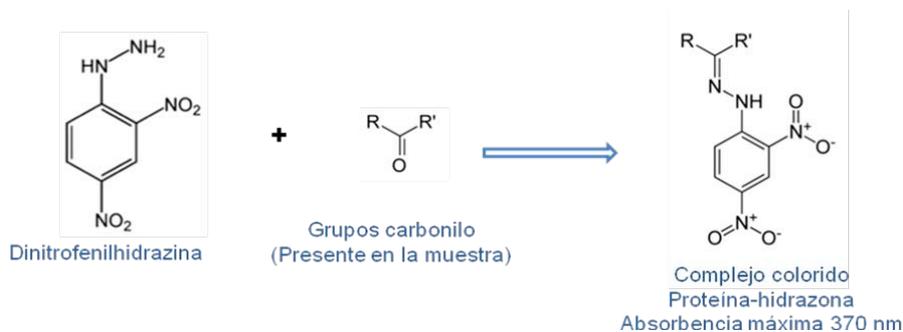


Figura 10. Reacción de determinación de proteínas oxidadas

Determinación de GSH. La determinación de GSH se realizó mediante el método descrito por Fernández-Checa y Kaplowitz (1990) que se basa en la formación de aductos de GSH con el MCB. El MCB fluoresce solo cuando está conjugado con el GSH, lo que permite cuantificar este compuesto por fluorescencia (Fig. 11). Los resultados se expresaron en mmol/mg de proteína.

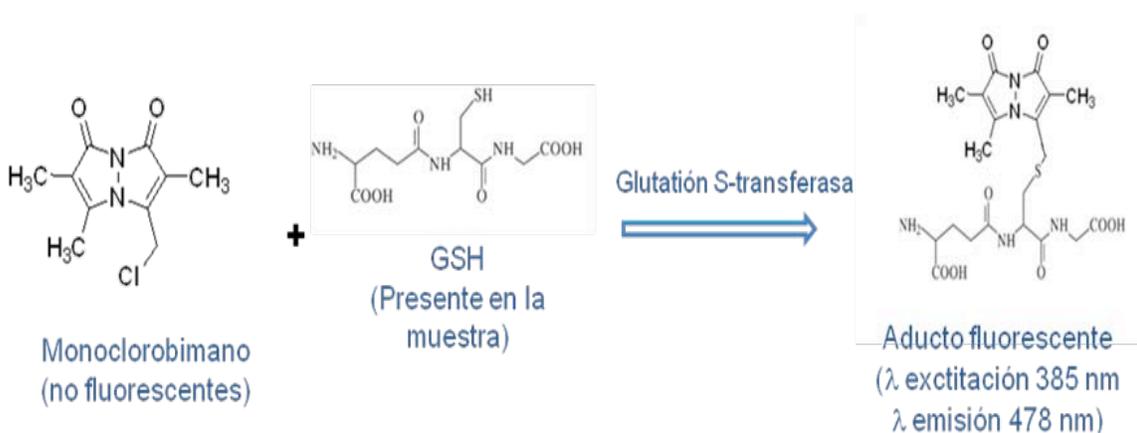


Figura 11. Reacción de determinación de GSH.

Excreción urinaria de H₂O₂. La determinación del H₂O₂ en orina se realizó mediante método fluorométrico empleando la sonda fluorescente Amplex Red, el método se basa en la reacción entre el Amplex Red y una peroxidasa que en presencia de H₂O₂ produce un compuesto fluorescente llamado resorufina que se detecta a una λ de excitación de 530 nm y a una λ de emisión de 590 nm (Fig. 12). Este parámetro se empleó como marcador de estrés oxidante (Yuen y Benzie, 2003).

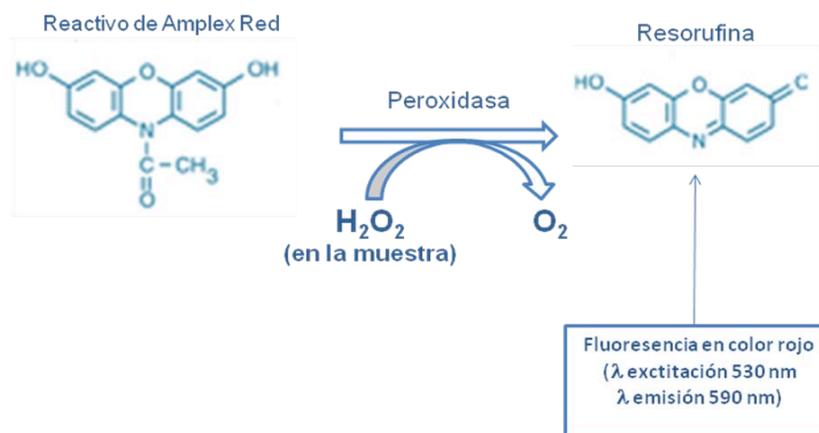


Figura 12. Reacción de determinación de H_2O_2 .

5.7. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

Actividad de CAT. Para esta determinación se empleó el método de Aebi (1984), el cual se basa en el cambio en la densidad óptica a 240 nm, debido a la desaparición de H_2O_2 debido a su degradación por la CAT (Fig. 13). De acuerdo a Aebi, se usa la constante de reacción de primer orden (k) como unidad de actividad de la CAT. Los resultados se expresan en k/mg de proteína.

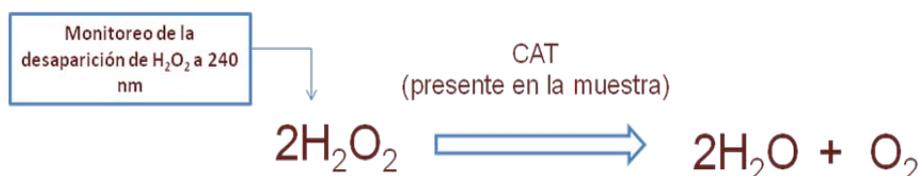


Figura 13. Reacción de la determinación de la actividad de CAT.

Actividad de GR. La actividad de esta enzima se determinó por medio de una reacción cinética en la cual la enzima convierte el GSSG a GSH en presencia de NADPH como cofactor. La reacción se basa en la disminución de la densidad óptica a 340 nm del NADPH (Carlberg y Mannervik, 1975) (Fig. 14). Los resultados se expresan en U/mg de proteína, donde 1 U = 1 mmol de NADPH consumido por min.

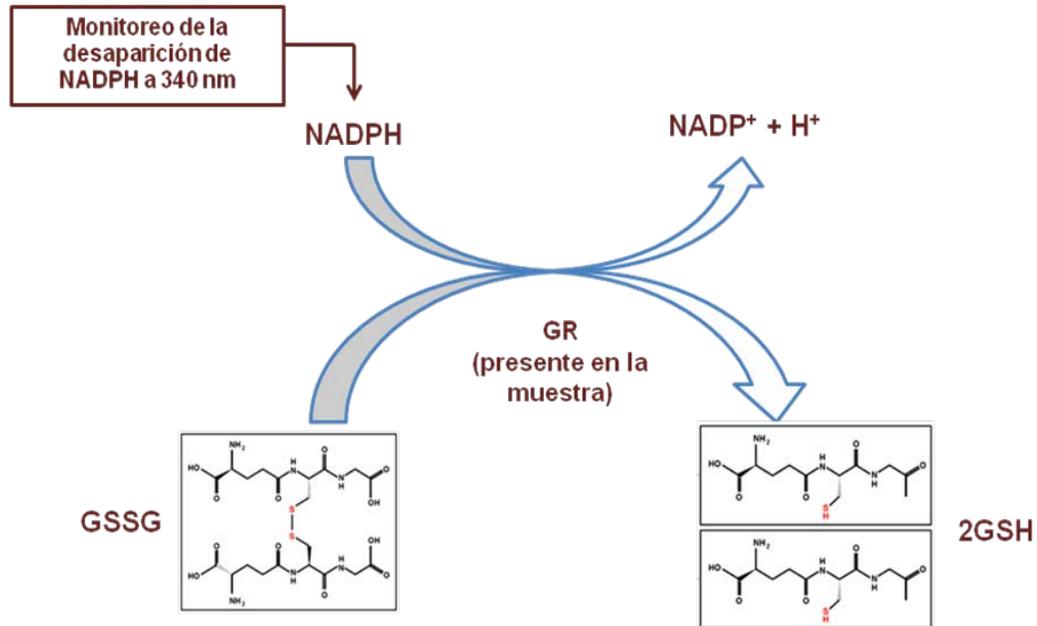


Figura 14. Reacción de la actividad de GR

Actividad de GPx. Se empleó el mismo método descrito anteriormente para la determinación de GPx en plasma (Fig. 7), la diferencia es que los resultados se expresaron en U/mg de proteína. Donde 1 U se define como la cantidad de enzima que consume 1 mmol de NADPH por min.

Actividad de GST. La actividad de GST se mide por el método de Habig *et al.* (1974). La GST cataliza la conjugación del GSH forma con CNDB, este conjugado absorbe a 340 nm (Fig. 15). El resultado se expresa como unidades de conjugado formado por mg de proteína. La unidad del conjugado se define como la cantidad de enzima que libera 1 mmol de conjugado/min bajo las condiciones del ensayo.

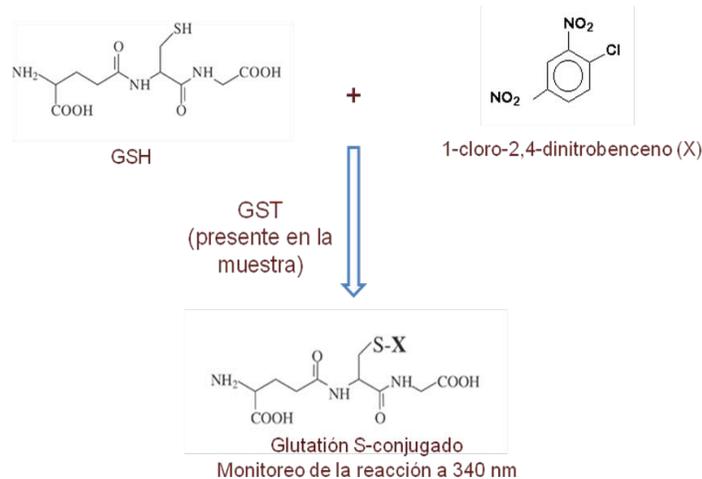


Figura 15: Reacción de determinación de la actividad de la GST.

Actividad de SOD. La actividad de SOD total se determinó por la reducción del NBT (Oberley y Spitz, 1984). Para ello se prepara una solución de xantina y xantina oxidasa para generar $O_2^{\cdot-}$ el cual reduce el NBT a formazán, cuando hay SOD el $O_2^{\cdot-}$ que se genera se descompone con lo cual se evita la reducción de NBT (Fig. 16). Los datos se expresaron como unidades de SOD por mg de proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción de NBT.

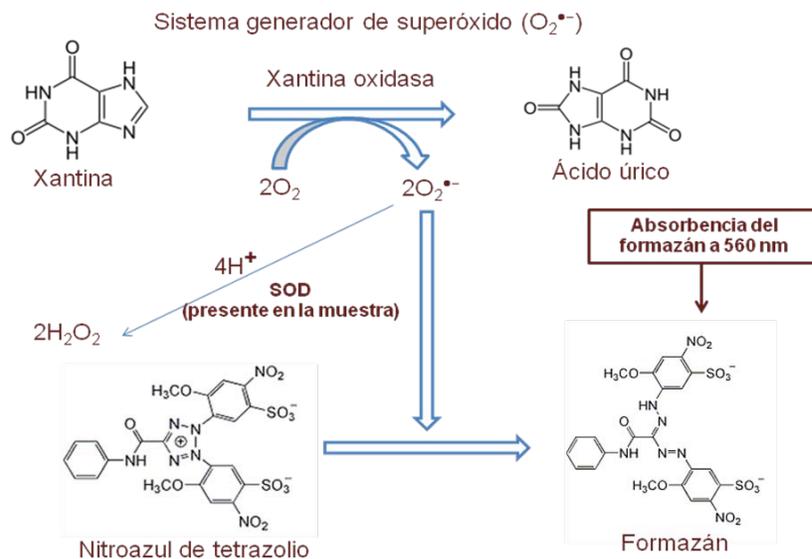


Figura 16. Reacción de actividad de la SOD.

5.8. Cuantificación de Cr(VI)

Las alícuotas de homogenado de riñón se digirieron como de la manera previamente descrita por Jasso-Chávez *et al.* (2010), para ello, 0.5 mL de las muestras se mezclaron con 0.5 mL de H_2SO_4 y 2.5 mL de HNO_3 y se incubaron durante 2 h a $100^\circ C$. Después de la digestión, 0.5 mL del sobrenadante se mezclaron con DFC (1 volumen de 100 mg de DFC en etanol al 95% y 1 volumen de H_2SO_4 al 10%)(Taras *et al.*, 1971). La absorbencia de la mezcla se midió a 540 nm. Para la calibración se empleó una curva estándar de $K_2Cr_2O_7$ [0-50 nmol de Cr(VI)]. La reacción fue lineal hasta 50 nmol Cr(VI).

5.9. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm EEM. Los datos se analizaron mediante la prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, para ello se empleó el software Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Un valor de $p \leq 0.05$ se

consideró estadísticamente significativo.

6. Resultados

6.1. Efecto de la curcumina y el $K_2Cr_2O_7$ en el peso corporal y en el volumen urinario

En este estudio no se observaron diferencias significativas en el peso corporal y el volumen urinario de los diferentes grupos experimentales tratados con curcumina, con $K_2Cr_2O_7$ o con ambos compuestos.

6.2. La curcumina atenúa la disfunción renal inducida por $K_2Cr_2O_7$

El tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ indujo disfunción renal, la cual se hizo evidente por: (a) proteinuria, (b) aumento en la creatinina en plasma, el BUN y la excreción urinaria de NAG y (c) disminución en la depuración de creatinina y la actividad de la GPx en plasma (Fig. 17). El tratamiento completo con curcumina con la dosis de 400 mg/kg, pero no con 100 mg/kg, atenuó la disfunción renal inducida con $K_2Cr_2O_7$. La protección de la función renal con la dosis de 200 mg/kg fue parcial, pues las alteraciones en la excreción de NAG y en la actividad de la GPx en plasma no se previnieron con esta dosis (Fig. 17). Con base en los datos anteriormente obtenidos, se seleccionó la dosis de curcumina de 400 mg/kg para realizar los estudios posteriores en los cuales se administró curcumina bajo los esquemas de pretratamiento y postratamiento. Se encontró que el pretratamiento con 400 mg/kg de curcumina protegió de la disfunción renal inducida por el $K_2Cr_2O_7$ en una magnitud muy similar que en el esquema de tratamiento completo utilizando la misma dosis (Fig. 17). En contraste, el postratamiento con 400 mg/kg de curcumina no confirió protección contra los cambios inducidos por el $K_2Cr_2O_7$ (Fig. 17), es por esta razón que en estos animales no se llevaron a cabo estudios adicionales de histología, estrés oxidante y actividad de enzimas antioxidantes.

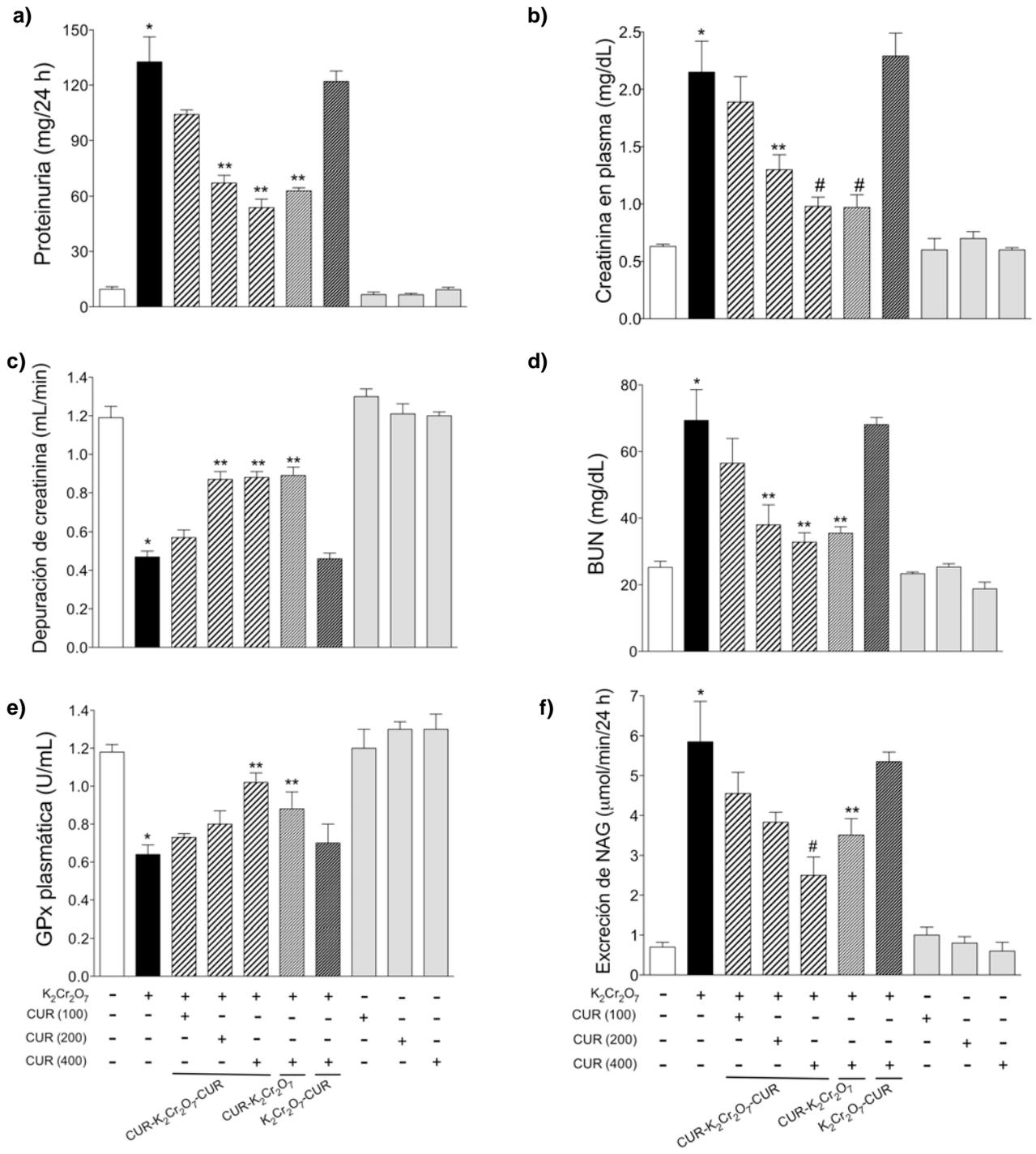


Figura 17. Efecto de la curcumina sobre la disfunción renal inducida por $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. (A) Proteinuria, (B) Creatinina en plasma, (C) Depuración de creatinina, (D) Nitrógeno de urea en sangre (BUN), (E) GPx plasmática (GPx) y (F) Excreción de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG). CUR- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -CUR = tratamiento completo (100, 200 y 400 mg/kg), CUR- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ = pretratamiento (400 mg/kg), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -CUR = postratamiento (400 mg/kg), CUR = curcumina. Los datos se expresan como promedio \pm EEM, $n=6-8$. * $p<0.001$ vs. CT, ** $p<0.05$, # $p<0.001$ vs. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

6.3. *La curcumina atenúa los daños histológicos inducidos por $K_2Cr_2O_7$*

El tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ indujo daño estructural, este daño se localizó únicamente en el epitelio del túbulo proximal. Se midió como marcador de daño el porcentaje de área dañada por túbulo, la cual se hizo evidente por la presencia de vacuolas y detritus, que son características de la necrosis (Fig. 18). Se cuantificó el área dañada por túbulo y se encontró que el $K_2Cr_2O_7$ indujo este daño en un $91.5 \pm 2.6\%$. El tratamiento completo con 200 y 400 mg/kg de curcumina atenuó el daño tubular inducido por el $K_2Cr_2O_7$ en un $61.3 \pm 3.9\%$ y $45.9 \pm 2.6\%$ respectivamente, mientras que el pretratamiento con 400 mg/kg de curcumina protegió de las alteraciones histológicas inducidas por el $K_2Cr_2O_7$ en una magnitud muy similar que la que se observó con la misma dosis en el esquema de tratamiento completo (Fig. 18). En contraste, el tratamiento completo con 100 mg/kg de curcumina no confirió protección contra las alteraciones histológicas inducidas por el $K_2Cr_2O_7$ (Fig. 18), mientras que en las ratas control tratadas con vehículo o curcumina no se observó daño tubular.

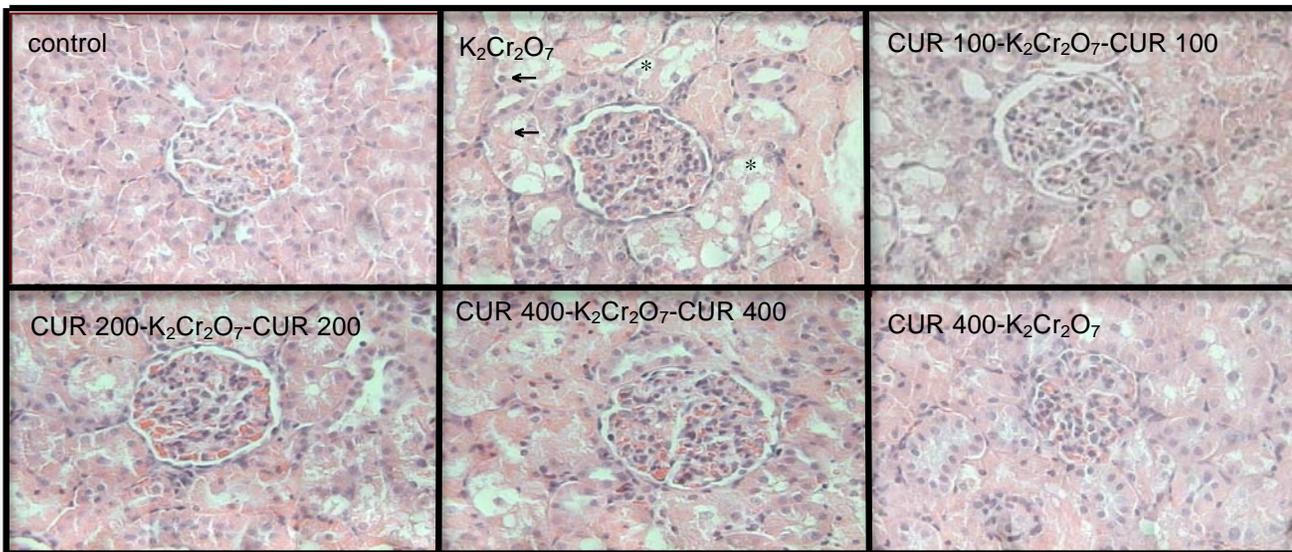
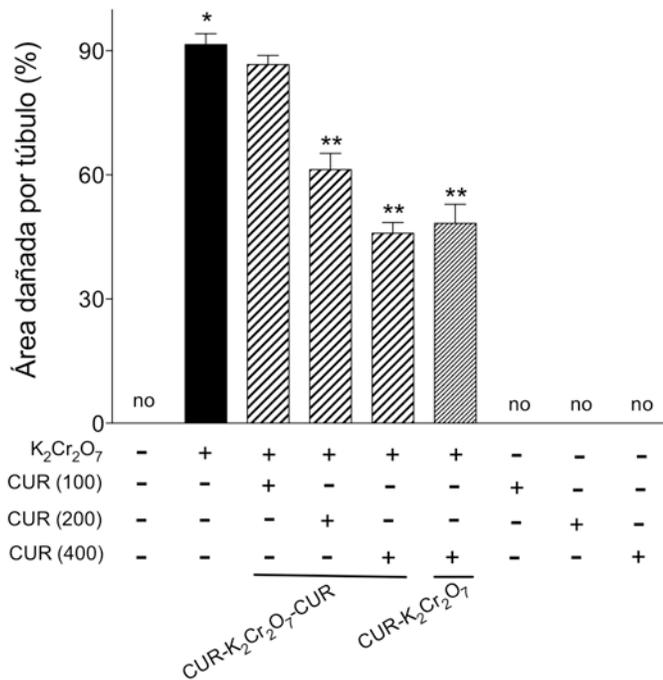


Figura 18. Efecto de la curcumina sobre las alteraciones histológicas inducidas por $K_2Cr_2O_7$. Las imágenes son representativas de los diferentes grupos estudiados (tratamiento completo y pretratamiento). Las ratas tratadas con vehículo y curcumina no mostraron alteraciones histológicas aparentes. El tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ indujo necrosis (flechas) y vacuolización (asteriscos) del epitelio del túbulo proximal. CUR- $K_2Cr_2O_7$ -CUR = tratamiento completo (100, 200 y 400 mg/kg), CUR- $K_2Cr_2O_7$ = pretratamiento (400 mg/kg), no = no se observó daño, CUR = curcumina. En el análisis morfológico se observa protección con el tratamiento completo (200 y 400 mg/kg) y con el pretratamiento (400 mg/kg) con curcumina. Los datos se expresan como promedio \pm EEM, n=4. * $p < 0.001$ vs. Control, ** $p < 0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$.



6.4. La curcumina atenúa el estrés oxidante inducido por $K_2Cr_2O_7$

El tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ indujo estrés oxidante, el cual se hizo evidente por: (a) un aumento en la lipoperoxidación, la oxidación de proteínas y la excreción urinaria de H_2O_2 y (b) la disminución del contenido de GSH (Fig. 19). El tratamiento completo con 400 mg/kg, pero no con 100 mg/kg de curcumina, atenuó el estrés oxidante inducido por el $K_2Cr_2O_7$ (Fig. 19). Consistente con los datos de disfunción renal, la dosis de 200 mg/kg de curcumina previno solamente de manera parcial el estrés oxidante; pues la oxidación de proteínas no se previno con esta dosis. El pretratamiento con 400 mg/kg de curcumina confirmó una protección muy similar que la que se observó con la misma dosis en el esquema de tratamiento completo. Por otra parte, se encontró que los niveles renales de GSH aumentaron en las ratas control tratadas con curcumina durante 10 días (Fig. 19).

6.5. La curcumina atenúa la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por $K_2Cr_2O_7$

El $K_2Cr_2O_7$ indujo la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GR, GPx, GST y SOD (Fig. 20). El tratamiento completo con 400 mg/kg, pero no con 100 mg/kg de curcumina, atenuó la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes inducidas por $K_2Cr_2O_7$ (Fig. 20). El tratamiento completo con la dosis de 200 mg/kg atenuó la disminución de la actividad de la GR, GST y SOD pero no la de CAT y GPx. El pretratamiento con 400 mg/kg de curcumina atenuó la disminución de la actividad de GR, GST y SOD pero no previno significativamente la disminución de la actividad de CAT y GPx (Fig. 20). Además, se encontró que la actividad de GST aumentó en las ratas tratadas con 200 y 400 mg/kg de curcumina durante 10 días (Fig. 20).

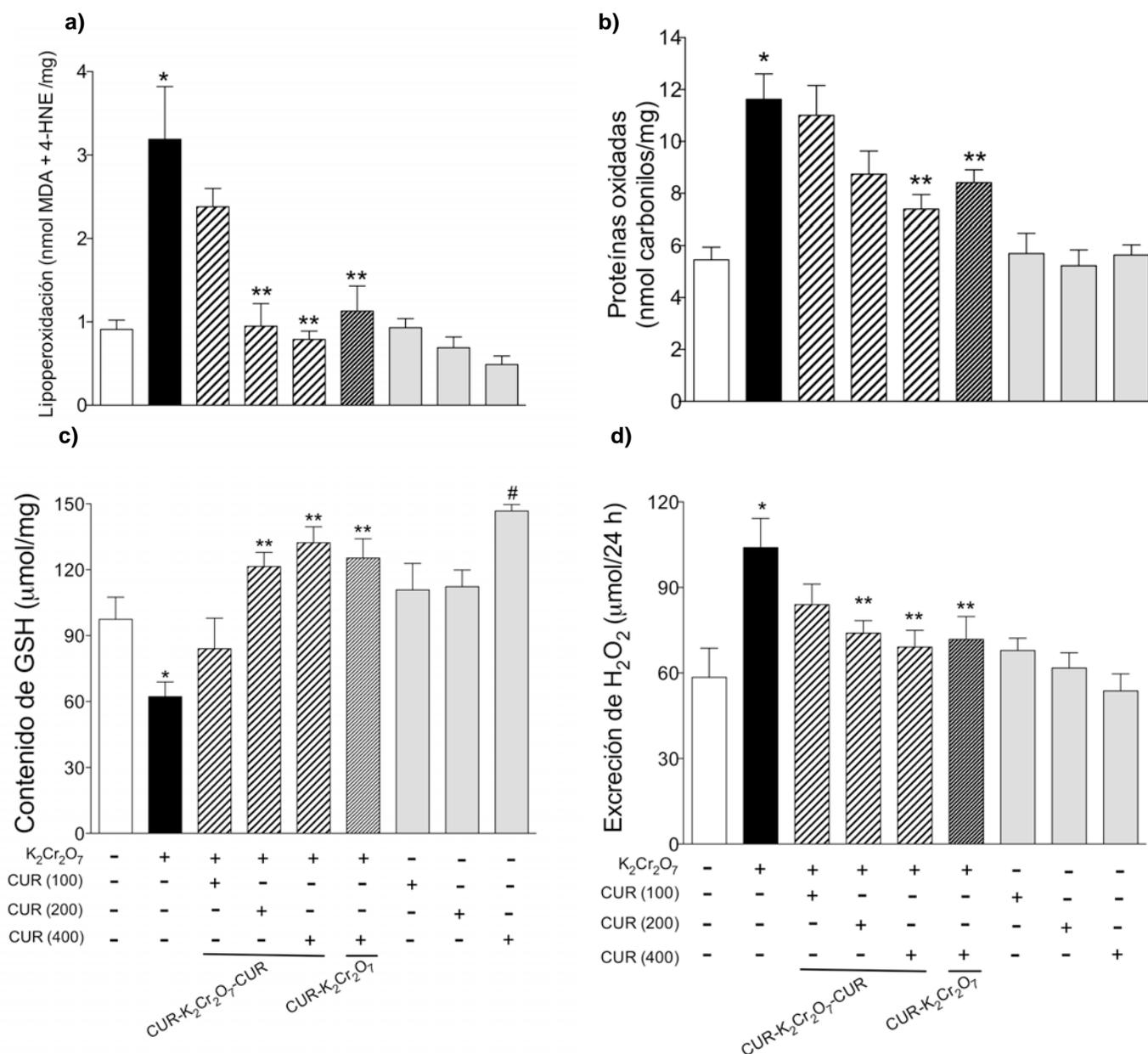


Figura 19. Efecto de la curcumina sobre el estrés oxidante inducido por K₂Cr₂O₇. (A) Lipoperoxidación, (B) Proteínas oxidadas, (C) contenido de GSH y (D) Excreción urinaria de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). CUR-K₂Cr₂O₇-CUR = tratamiento completo (100, 200 y 400 mg/kg), CUR-K₂Cr₂O₇ = pretratamiento (400 mg/kg), GSH = glutatión reducido, CUR = curcumina. Los datos se expresan como promedio±EEM, n=6-8. *p<0.05, #p<0.01 vs. control, **p<0.05 vs. K₂Cr₂O₇.

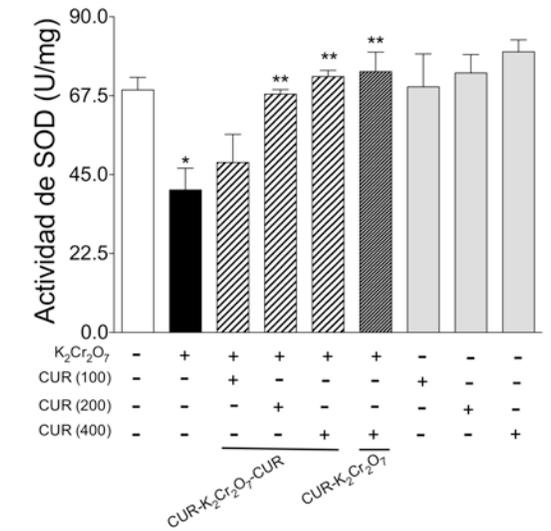
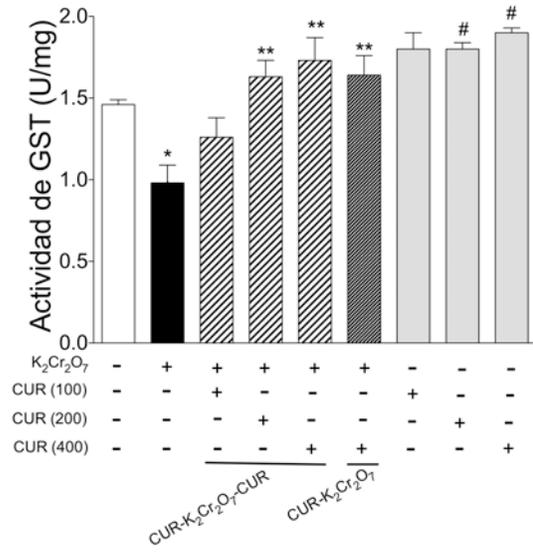
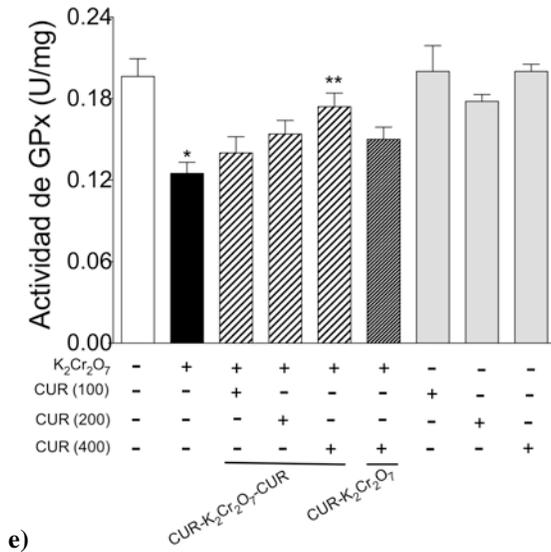
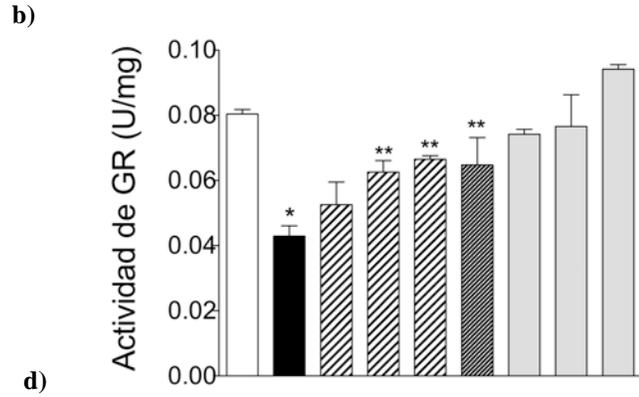
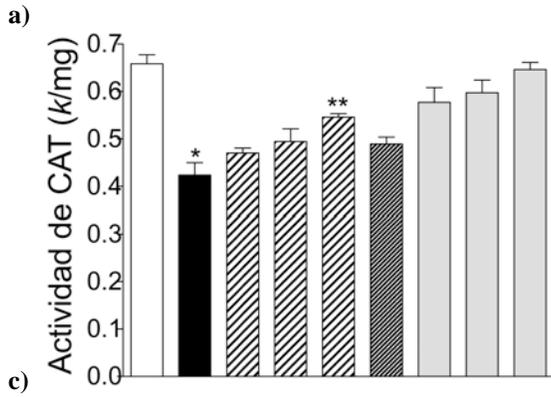


Figura 20. Efecto de la curcumina sobre la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por $K_2Cr_2O_7$. (A) Catalasa (CAT), (B) Glutathión reductasa (GR), (C) Glutathión peroxidasa (GPx), (D) Glutathión S-transferasa (GST) y (E) Superóxido dismutasa (SOD). CUR- $K_2Cr_2O_7$ -CUR = tratamiento completo (100, 200 y 400 mg/kg), CUR- $K_2Cr_2O_7$ = pretratamiento (400 mg/kg). CUR = curcumina. Los datos se expresan como promedio±EEM, n=6-8. *p<0.05, #p<0.01 vs. control, **p<0.05 vs. $K_2Cr_2O_7$.

6.6. La curcumina no modifica el contenido de Cr(VI) que llega al riñón

El contenido de Cr(VI) se midió en los homogenados de riñón en los diferentes grupos estudiados. No se detectó Cr(VI) en los homogenados renales de las ratas control tratadas solamente con curcumina (400 mg/kg) o con el vehículo. El contenido de Cr(VI) en los homogenados de las ratas tratadas con K₂Cr₂O₇ fue de 46±7.6 nmol/mg de proteína y en los grupos de K₂Cr₂O₇+CUR en el esquema de tratamiento completo y pretratamiento fue de 39±8.8 y 42±7.5 nmol/mg de proteína, respectivamente (promedio±EEM, n=4, P=NS). De los datos obtenidos se concluye que el tratamiento con curcumina no altera la cantidad de Cr(VI) se acumula en el riñón.

7. Discusión

En este estudio se encontró que el tratamiento completo (400 mg/kg, 10 días antes y 2 días después de la inyección de K₂Cr₂O₇) y el pretratamiento (400 mg/kg, 10 días antes de la inyección de K₂Cr₂O₇) con curcumina atenuaron la disfunción renal, el daño oxidante y la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes inducidos por K₂Cr₂O₇. Mientras que la protección renal con 200 mg/kg fue solamente parcial. Es por esta razón que se decidió probar únicamente la dosis de 400 mg/kg en el esquema de pretratamiento y postratamiento. La protección renal que se observó con la dosis de 400 mg/kg de curcumina en el esquema de tratamiento completo fue de una magnitud similar a la que se observó con la misma dosis en el esquema de pretratamiento. El postratamiento con curcumina (400 mg/kg, 2 días después de la inyección de K₂Cr₂O₇) no fue capaz de disminuir la nefrotoxicidad inducida por K₂Cr₂O₇. Las tres dosis empleadas se seleccionaron de acuerdo con estudios en los cuales la curcumina ejerció protección contra el daño oxidante inducido en diferentes órganos como el corazón (Tanwar *et al.*, 2010), el hígado (Shapiro *et al.*, 2006) y el riñón (Sankar *et al.*, 2011).

La curcumina es el compuesto con mayor actividad biológica y más abundante en el turmérico (*Curcuma longa*). Se ha descrito que posee propiedades antioxidantes (Sharma, 1976; Toda *et al.*, 1985), antiinflamatorias (Satoskar *et al.*, 1986; Shrimal y Dhawan, 1973), antimicrobianas (Negi *et al.*, 1999) y anticancerígenas (Kuttan *et al.*, 1985). También se han descrito efectos nefroprotectores de la curcumina en diferentes modelos de daño oxidante nefrotóxico (Tabla 2).

Se ha observado que la capacidad antioxidante de la curcumina es la principal responsable de la eficacia de este compuesto contra el daño renal inducido por compuestos tóxicos, pues se ha demostrado en estudios *in vitro* que la curcumina es un potente atrapador de una gran variedad de ERO como el O_2^- y $OH\cdot$ (Reddy y Lokesh, 1994) y radicales de nitrógeno (Sreejayan y Rao, 1997; Unnikrishnan y Rao, 1995). Además, otro de los mecanismos que se han establecido de la curcumina, es su capacidad de inducir la expresión de enzimas destoxicantes de fase 2 al activar el factor de transcripción Nrf2 (Dinkova-Kostova y Talalay, 1999). De hecho, se ha encontrado que la curcumina aumenta la actividad y ARNm de HO-1 en cerebro (Scapagnini *et al.*, 2006) y en células de epitelio de túbulo proximal renal LLCPK-1 a través de una vía dependiente de Nrf2 (Balogun *et al.*, 2003). También se ha demostrado la activación de Nrf2 en riñón, hígado y bazo de ratones tratados con curcumina (Balstad *et al.*, 2011).

Por otro lado, la toxicidad renal es frecuentemente citada como uno de los efectos adversos de la exposición a compuestos de Cr(VI) como el $K_2Cr_2O_7$ (Berndt, 1976; Wedeen y Quian, 1991). En estudios previos se ha reportado que la exposición de ratas a $K_2Cr_2O_7$ produce lesiones anatómicas in las células epiteliales del túbulo proximal, donde a dosis altas, induce NTA (Franchini *et al.*, 1978; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2005). En este estudio, la administración de una dosis única de $K_2Cr_2O_7$ indujo disfunción renal (Fig. 17) y daño oxidante (Fig. 19), acompañado de alteraciones histopatológicas (NTA, Fig. 18). La disfunción renal se hizo evidente por la proteinuria elevada, el aumento en la creatinina en plasma, el BUN y la excreciónn urinaria de NAG, así como la disminución de la depuración de creatinina y la actividad de la GPx en plasma que es un marcador de daño tubular (El-Far *et al.*, 2005). Se conoce que durante la reducción intracelular del Cr(VI) se producen ERO (Shi *et al.*, 1999) las cuales son las responsables del daño oxidante a las macromoléculas. En este estudio se encontró que el $K_2Cr_2O_7$ aumentó los niveles renales de los productos de lipoperoxidación (MDA y 4-HNE), de proteínas oxidadas y de excreción urinaria de H_2O_2 y disminuyó los niveles de GSH. La disminución del GSH pudo ser secundaria al aumento en las ERO o bien al hecho de que la reducción del Cr(VI) también se lleva a cabo por el GSH (Aaseth *et al.*, 1982).

Además se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GR, GPx, GST y SOD y se encontró que el tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ disminuyó la actividad de estas enzimas, lo que concuerda con estudios previos que han demostrado este mismo efecto (Barrera *et al.*, 2003; Parveen *et al.*, 2009; Pedraza-Cheverri *et al.*, 2005; Scibior *et al.*, 2006). El efecto protector de la curcumina contra el estrés oxidante inducido por $K_2Cr_2O_7$ encontrado en este estudio, es

consistente con reportes previos en los que se ha demostrado la habilidad de esta molécula para interferir con procesos oxidantes como la lipoperoxidación de las membranas celulares y carbonilación de proteínas (Sankar *et al.*, 2011; Jena y Chainy, 2011). Se observó que en el grupo tratado con curcumina y $K_2Cr_2O_7$ se preservó la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GR, GPx, GST y SOD, lo que probablemente contribuyó a la atenuación de la disfunción renal y el estrés oxidante inducido por $K_2Cr_2O_7$.

Se ha descrito que la enzima γ -glutamato cisteína ligasa (γ -GCL) es limitante en la síntesis del GSH, y que el estímulo de esta enzima se acompaña de un incremento en los niveles de GSH (Mizuno *et al.*, 2011). Además se ha encontrado que la curcumina es capaz de inducir la actividad y el ARNm de esta enzima en astrocitos *in vitro* (Lavoie *et al.* 2009) y en cultivos de células estrelladas hepáticas (Zheng *et al.*, 2007). Sin embargo, no se ha reportado que la curcumina pueda inducir la γ -GCL en riñón. En este estudio se encontró que el tratamiento con curcumina (400 mg/kg, durante 10 días) incrementó los niveles renales de GSH (Fig. 19). En contraste, las dosis de 100 y 200 mg/kg de curcumina no aumentaron el contenido de GSH. Aunque no se determinó la actividad de la enzima γ -GCL, se puede plantear la hipótesis que este es el mecanismo a través del cual la curcumina incrementó los niveles renales de GSH, el cual en parte pudo contribuir a la disminución del daño renal oxidante inducido con $K_2Cr_2O_7$. Iqbal *et al.* (2003) encontraron que la dieta suplementada con 2% de curcumina durante 30 días indujo la actividad renal de la enzima GST; en este estudio también se encontró que el tratamiento con curcumina (200 y 400 mg/kg) durante 10 días aumentó significativamente la actividad de esta enzima, mientras que la dosis de 100 mg/kg no tuvo ningún efecto (Fig. 20). La función de la enzima GST es conjugar al GSH con electrófilos, y de esta manera eliminarlos y prevenir el efecto tóxico de estas especies reactivas sobre las macromoléculas, de esta forma, el aumento en la actividad de esta enzima pudo haber contribuido al efecto nefroprotector de la curcumina. La actividad de las enzimas CAT, GR, GPx y SOD no se modificó por la curcumina (tratamiento completo), lo que sugiere que existe un efecto diferencial de este compuesto en la inducción de las enzimas antioxidantes renales. En resumen, los hallazgos anteriores sugieren que en este estudio la curcumina tuvo un efecto antioxidante indirecto pues indujo la actividad de GST y aumentó el contenido renal de GSH probablemente vía el aumento en la actividad de la enzima γ -GCL. También es probable que gracias al efecto directo de la curcumina se observara nefroprotección, ya que aunque la última dosis se administró 24 h antes de la inyección del

$K_2Cr_2O_7$ y se sabe que el tiempo de vida media de eliminación plasmática de la curcumina en ratas es de aproximadamente 1.5 h (Maiti *et al.*, 2007), en un estudio reciente se reportó que después de la administración de 500 mg/kg de curcumina vía oral en ratas se detectaron 1.98 μ g en tejido renal después de 24 h (Suresh y Srinivasan, 2010), es decir, cierta cantidad de curcumina permaneció en el riñón después de este tiempo, lo que pudo ejercer efectos directos atrapando e inactivando las ERO inducidas por la reducción intracelular de Cr(VI) y de esta manera conferir nefroprotección.

Finalmente, se quiso explorar si el tratamiento con curcumina pudiera afectar la cantidad de Cr(VI) que llegó al riñón, se encontró que la cantidad de Cr(VI) que llegó al riñón fue la misma en los grupos tratados con $K_2Cr_2O_7$ y con $K_2Cr_2O_7$ +curcumina, lo que sugiere que este no es el mecanismo a través del cual la curcumina ejerce su efecto nefroprotector.

8. Conclusión

Los resultados sugieren que el efecto nefroprotector que se observa de la curcumina contra la nefrotoxicidad inducida por $K_2Cr_2O_7$ está asociado con la preservación de la actividad de las enzimas antioxidantes, la inducción de la GST y el aumento en el contenido renal de GSH.

9. Perspectivas

Se ha descrito que la mitocondria es la principal fuente de producción de ERO en condiciones fisiológicas y patológicas, por lo tanto, sería interesante investigar si el Cr(VI) induce disfunción mitocondrial en este modelo experimental y si la curcumina sería capaz de atenuar los efectos tóxicos del Cr(VI) a nivel mitocondrial.

10.Referencias

- Aaseth J**, Alexander J, Norseth T. (1982). Uptake of 51Cr-chromate by human erythrocytes-a role of glutathione. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 50:310-5.
- Aebi H**. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121-6.
- Aiyar J**, Berkovits HJ, Floyd RA, Wetterhahn KE. (1991). Reaction of chromium(VI) with glutathione or with hydrogen peroxide: identification of reactive intermediates and their role in chromium(VI)-induced DNA damage. *Environ Health Perspect* 92:53-62.
- Ahmida**, (2011). Protective role of curcumin in oxidative and toxic damage induced by vancomycin in rats. *Exp Toxicol Pathol*. En prensa.
- Ajay G**, Ajaikumar BK, Bharat BA. (2008). Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 75:787-809.
- Anand P**, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharmacol* 4:807–18.
- Antúnes LM**, Darin JD, Bianchi Nde L. (2001). Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res* 43:145-50.
- Appenroth D**, Winnefeld K. (1998). Vitamin E and C in the prevention of metal nephrotoxicity in developing rats. *Exp Toxicol Pathol* 50:391-6.
- Arturson G**, Groth T, Grotte G. (1971). Human glomerular basement membrane porosity and filtration pressure: dextrane clearance analyzed by theoretical models. *Clin Sci* 40:137-58.
- Bagchi D**, Hassoun EA, Bagchi M, Stohs SJ. (1995). Chromium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, nitric oxide production, and generation of reactive oxygen species in Sprague-Dawley rats. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 110:177-87.
- Balogun E**, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R. (2003). Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 371:887-95.
- Balstad TR**, Carlsen H, Myhrstad MC, Kolberg M, Reiersen H, Gilen L, Ebihara K, Paur I, Blomhoff R. (2011). Coffee, broccoli and spices are strong inducers of electrophile response element-dependent transcription *in vitro* and *in vivo*-studies in electrophile response elements

transgenic mice. *Mol Nutr Food Res* 55:185-197.

- Barclay LR**, Vinqvist MR, Mukai K, Goto H, Hashimoto Y, Tokunaga A. (2000). On the antioxidant mechanism of curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity. *Org Lett* 2:2841-43.
- Barrera D**, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. (2003). HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by K2Cr2O7. *Free Radic Biol Med* 34:1390-98.
- Bernabe-Pineda M**, Ramirez-Silva MT, Romero-Romo M, Gonzalez-Vergara E, Rojas Hernandez A. (2004). Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 60:1091-97.
- Berndt WO**. (1976). Renal chromium accumulation and its relationship to chromium-induced nephrotoxicity. *J Toxicol Environ Health* 1:449-459.
- Brenner BM**. (2000). The kidney. Saunders Company. 6 ed. USA.
- Carlberg I**, Mannervik B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250:5475-80.
- Cekmen M**, Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Somay A, Ersoz C. (2009). Curcumin prevents oxidative renal damage induced by acetaminophen in rats. *Food Chem Toxicol* 47:1480-84.
- Chenhui Y**, Xiangjian Z, Hongguang F, Ying Liu. (2009). Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Research* 1282:133-41.
- Chen WF**, Deng SL, Zhou B, Yang L, Liu ZL. (2006). Curcumin and its analogues as potent inhibitors of low density lipoprotein oxidation: H-atom abstraction from the phenolic groups and possible involvement of the 4-hydroxy-3-methoxyphenyl groups. *Free Radic Biol Med* 40:526-35.
- Cohen MD**, Kargacin B, Klein CB, Costa M. (1993). Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 23:255-281.
- Cohen-Kerem R**, Koren G. (2003). Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity. I. Review of the experimental data and implications to humans. *Neurotoxicol Teratol* 25:1-9.
- Dinkova-Kostova AT**, Talalay P. (2011). The cytoprotective role of the keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* En prensa.

- Dinkova-Kostova AT**, Talalay P. (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52:128-38.
- Dobashi K**, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. (2000). Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem* 205:1-11.
- El-Demerdash FM**, Yousef MI, Radwan FM. (2008). Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food Chem Toxicol* 47:249-54.
- El-Far MA**, Bakr MA, Farahat SE, Abd El-Fattah EA. (2005). Glutathione peroxidase activity in patients with renal disorders. *Clin Exp Nephrol* 9:127-31.
- Eybl V**, Kotyzová D, Cerná P, Koutensky J. (2008). Effect of melatonin, curcumin, quercetin, and resveratrol on acute ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced renal oxidative damage in rats. *Hum Exp Toxicol* 27:347-53.
- Farombi EO**, Ekor M. (2006). Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 44:1443-8.
- Fatima S**, Mahmood R. (2007). Vitamin C attenuates potassium dichromate-induced nephrotoxicity and alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. *Clin Chim Acta* 386:94-99.
- Fernández-Checa JC**, Kaplowitz N. (1990). The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Anal Biochem* 190:212-9.
- Franchini I**, Mutti A, Cavatorta A, Corradi A, Cosi A, Olivette G, Borghetti A. (1978). Nephrotoxicity of chromium. *Contrib Nephrol* 10:98-110.
- Garcea G**, Jones DJ, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ, Berry DP. (2004). Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer* 90:1011-5.
- Gerard-Monnier D**, Eldermeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Acudiera J. (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde y 4-hidroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 11:1176-86.
- Goel A**, Jhurani S, Aggarwal BB. (2008). Multi-targeted therapy by curcumin: how spicy is it? *Mol Nutr Food Res*. 2008 52:1010-30.
- Habig WH**, Pabst MJ, Jakoby WB. (1974). Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-9.

- Heinz VMD.** (1983). Renal function: Mecanismos preserving fluid and solute balance in health. 2nd edition. Little, Brown and Company, USA. 1-10.
- Hojo Y,** Satomi Y. (1991). In vitro nephrotoxicity induced in mice by chromium (VI): involvement of glutathione and chromium (V). *Biol Trace Elem Res* 31:21-31.
- Huang YL,** Chen CY, Sheu JY, Chuang IC, Pan JH, Lin TH. (1999). Lipid peroxidation in workers exposed to hexavalent chromium. *J Toxicol Environ Health A* 56:235-47.
- Iqbal M,** Okazaki Y, Okada S. (2009). Curcumin attenuates oxidative damage in animals treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA): implications for cancer prevention. *Mol Cell Biochem* 324:157-64.
- Iqbal M,** Sharma SD, Okazaki Y, Fujisawa M, Okada S. (2003). Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol Toxicol* 92:33-38.
- Jasso-Chávez R,** Pacheco-Rosales A, Lira-Silva E, Gallardo-Pérez J, García N, Moreno-Sánchez R. (2010). Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. *Aquat Toxicol* 100:329-38.
- Jena S,** Chainy GB. (2011). Regulation of expression of antioxidant enzymes by vitamin E and curcumin in L-thyroxine-induced oxidative stress in rat renal cortex. *Mol Biol Rep* 38:1047-54.
- Jung D,** Biggs H, Erikson J, Ledyard PU. (1975). New colorimetric reaction for end-point, continuousflow and kinetic measurement of urea. *Clin Chem* 21:1136-40.
- Jung K,** Priem F, Klotzek S, Becker S, Henke W. (1991). Methods compared for determining activity of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: Different sensitivity and species effect. *Enzyme* 45:215-21.
- Kaissling B,** Kriz W. (1979). structural analysis of the rabbit kidney. *Adv Anal Embriol Cell Biol* 56:1-123.
- Kaloyanides GJ,** Pastoriza-Muñoz E. (1980). Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney Int.* 18:571-82.
- Kelly P,** Day JP, O'Hara M, Tye C, Burton C, Harris M. (1982). Cutaneous absorption of trivalente chromium: Tissue levels and treatment by Exchange transfusión. *Br J Ind Med* 29:390-400.
- Kim MK,** Choi GJ, Lee HS. (2003). Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived

curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. *J Agric Food Chem* 51:1578-81.

Konigsberg M. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual moderno. 331-459.

Kortenkamp A, Beyersmann D, O'Brien P. (1987). Uptake of chromium(III) complexes by erythrocytes. *Toxicol Environ Chem.* 14:23-32.

Kuhad A, Pikhwal S, Sharma S, Tirkey N, Chopra K. (2006). Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. *J Agric Food Chem* 55:10150-5.

Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, George MC. (1985). Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett* 29:197-202.

Laborda R, Díaz-Mayens J, Nunez A. (1986). Nephrotoxic and hepatotoxic effects of chromium compounds in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 36:332-6.

Lao CD, Demierre MF, Sondak VK. (2006). Targeting events in melanoma carcinogenesis for the prevention of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 11:1559-68.

Lavoie S, Chen Y, Dalton TP, Gysin R, Cuénod M, Steullet P, Do KQ. (2009). Curcumin, quercetin, and tBHQ modulate glutathione levels in astrocytes and neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit. *J Neurochem* 108:1410-22.

Lawrence RA, Burk RF. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-8.

Ligeret H, Barthelemy S, Zini R, Tillement JP, Labidalle S, Morin D. (2004). Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. *Free Radic Biol Med* 36:919-29.

Liu KJ, Shi X. (2001). In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation *Moll Cell Biochem* 222:41-7.

Madsen KM. (1980). Mercury accumulation in kidney lysosomes of proteinuric rats. *Kidney Int.* 18:445-53.

Mahady GB, Pendland SL, Yun G, Lu ZZ. (2002). Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. *Anticancer Res* 22:4179-81.

Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha, BP, Mukherjee PK. (2007). Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm* 330:155-63.

- Mathur AK**, Chandra SV, Tandon SK. (1977). Comparative toxicity of trivalente and hexavalent chromium to rabbits. *Toxicology* 8:53-61.
- Mizuno K**, Kume T, Muto C, Takada-Takatori Y, Izumi Y, Sugimoto H, Akaike A. (2011). Glutathione biosynthesis via activation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant-response element (ARE) pathway is essential for neuroprotective effects of sulforaphane and 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate. *J Pharmacol Sci*. En prensa.
- Negi PS**, Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. (1999). Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *J Agric Food Chem*. 47:4297-4300.
- Norseth T**. (1986). The carcinogenicity of chromium and its salts. *Br J Ind Med*. 43:649-51.
- Oberley LW** y Spitz DR. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* 105:457-64.
- O'Brien P**, Kortenkamp A. (1994). Chemical models important in understanding the way in which chromate can damage DNA. *Environ Health Perspect* 102:3-10.
- Pan MH**, Huang TM, Lin JK. (1999). Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metal Dispos* 27:486-94.
- Parveen K**, Khan MR, Siddiqui WA. (2009). Pycnogenol prevents potassium dichromate K₂Cr₂O₇-induced oxidative damage and nephrotoxicity in rats. *Chem Biol Interact* 181:343-50.
- Pederson NB**. (1982). The effects of chromium on the skin. in: Langard S (ed) *Biological and environmental aspects of chromium*. Elsevier Amsterdam 249-75.
- Pedraza-Chaverri J**, Moreno-Muñiz SI, Cruz C, Hernandez-Pando R, Larriva-Sahd J, Tapia E. (1995). Urinary Angiotensin I-converting enzyme activity is increased in experimental acute renal failure. *Clin Invest Med* 18:424-34.
- Pedraza-Chaverri J**, Maldonado PD, Olivares IM, Granados-Silvestre NA, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME. (2000). Garlic ameliorates gentamicin (GM) nephrotoxicity: Role of manganese superoxide dismutase (Mn-SOD). *Free Radic Biol Med*. 29:602-11.
- Pedraza-Chaverri J**, Barrera D, Medina-Campos ON, Carvajal RC, Hernández-Pando R, Macías-Ruvalcaba NA, Maldonado PD, Salcedo MI, Tapia E, Saldívar L, Castilla ME, Ibarra-Rubio ME. (2005). Time course study of oxidative and nitrosative stress and antioxidant enzymes in K₂Cr₂O₇-induced nephrotoxicity. *BMC Nephrology* 6:4.

- Perkins S**, Verschoyle RD, Hill K, Parveen I, Threadgill MD, Sharma RA, Williams ML, Steward WP, Gescher AJ. (2002). Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:535-40.
- Priyadarsini KI**, Maity DK, Naik GH, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Satav JG, et al. (2003). Role of phenolic OH and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic Biol Med* 35:475-84.
- Ravindranath V** y Chandrasekhara N. (1980). Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology* 16:259-65.
- Ravindranath V** y Chandrasekhara N. (1981). Metabolism of curcumin: studies with [³H]curcumin. *Toxicology* 22:337-44.
- Reddy AC**, Lokesh BR. (1994). Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol Cell Biochem.* 137:1-8.
- Reddy RC**, Vatsala PG, Keshamouni VG, Padmanaban G, Rangarajan PN. (2005). Curcumin for malaria therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 326:472-4.
- Resnick A y Packer L**. (1994). Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357-63.
- Ruby AJ**, Kuttan G, Babu KD, Rajasekharan KN, Kuttan R. (1995). Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett* 94:79-83.
- Samitz MH**, Shrager J, Katz S. (1962). Studies on the prevention of injurious effects of chromates in industry. *Ind Med Surg* 31:427-32.
- Sánchez L**. (1993). Insuficiencia renal aguda. Aspectos clínicos, ediciones Norma, 2da edición. Madrid pp. 548-88.
- Sankar P**, Telang AG, Manimaran A. (2011). Protective effect of curcumin on cypermethrin-induced oxidative stress in Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol*. En prensa.
- Satoskar RR**, Shah S, Shenoy SG. (1986). Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloylmethane) in patients with postoperative inflammation. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 24:651-4.
- Scapagnini, G.**; Colombrita, C.; Amadio, M. D.; Agata, V.; Arcelli, E.; Sapienza, M.; Quattrone, A.; Calabrese, V. (2006). Curcumin activates defensive genes and protects neurons against

oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8:395-403.

- Schiff H**, Weidman P, Weiss M, Massry SG. (1982). Dialysis treatment of acute chromium intoxication and comparative efficacy of peritoneal versus hemodialysis in chromium removal. (1982). *Min Electrolyte Metab* 7:28-35.
- Scibior A**, Zaporowska H, Wolinska, Ostrowski J. (2010). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in the blood of rats co-treated with vanadium (V(+5)) and chromium (Cr (+3)). *Cell Biol Toxicol.* 26:509-26.
- Sharma OP**. (1976). Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem Pharmacol* 25:1811-2.
- Seiken G**, Grillo FG, Schaudies RP, Johnson JP. (1994). Modulation of renal EGF in dichromate-induced acute renal failure treated with thyroid hormone. *Kidney Int* 45:1622-7
- Sengupta T**, Chattopadhyay D, Ghosh N, Maulik G, Chatterjee GC. (1992). Impact of chromium on lipoperoxidative processes and subsequent operation of the glutathione cycle in rat renal system. *Indian J Biochem Biophys* 29:287-90.
- Shapiro H**, Ashkenazi M, Weizman N, Shahmurov M, Aeed H, Bruck R. (2006). Curcumin ameliorates acute thioacetamide-induced hepatotoxicity. *J Gastroenterol Hepatol* 21:358-66.
- Sreejayan MN**. (1997). Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 49:105-7.
- Shi X**, Chiu A, Chen CT, Halliwell B, Castranova V, Vallyathan V. (1999). Reduction of chromium (VI) and its relationship to carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health* 2:87-104.
- Shi X y Dalal NS**. (1990). Evidence for a Fenton type mechanism for the generation of OH radicals in the reduction of Cr(VI) in cellular media. *Arch Biochem Biophys* 281:90-5.
- Skalova S, Chladek J**, (2004). Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in healthy children. *Nephrology* 9:19-21.
- Srimal RC**, Dhawan BN (1973). Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *J Pharm Pharmacol* 25:447-52.
- Srinivas L**, Shalini VK, Shylaja M. (1992). Turmerin: a water soluble antioxidant peptide from turmeric (*Curcuma longa*). *Arch Biochem Biophys* 292:617-23.
- Stohs SJ**, Bagchi D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18:321-36.
- Sugiyama Y**, Kawakishi S, Osawa T. (1996). Involvement of the -diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem Pharmacol* 52:519-25.

- Sun YM**, Zhang HY, Chen DZ, Liu CB. (2002). Theoretical elucidation on the antioxidant mechanism of curcumin: a DFT study. *Org Lett* 4:2909-11.
- Suresh D, Srinivasan K** (2010). Tissue distribution and elimination of capsaicin, piperine and curcumin following oral intake in rats. *Indian J Med Res rg Lett* 131:682-91.
- Suzuki M**, Nakamura T, Iyoki S, Fujiwara A, Watanabe Y, Mohri K. (2005). Elucidation of anti-allergic activities of curcumin-related compounds with a special reference to their anti-oxidative activities. *Biol Pharm Bull* 28:1438-43.
- Tandon SK**, Behari JR, Kachru DN. (1979). Distribution of chromium in poisoned rats. *Toxicology* 13:29-34.
- Tanwar V**, Sachdeva J, Golechha M, Kumari S, Arya DS. (2010). Curcumin protects rat myocardium against isoproterenol-induced ischemic injury: attenuation of ventricular dysfunction through increased expression of Hsp27 along with strengthening antioxidant defense system. *J Cardiovasc Pharmacol* 55:377-84.
- Taras M**, Greenberg A, Hoak RD, Rand MC. (1971). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. New York: American Public Health Association.
- Tirkey N**, Kaur G, Vij G, Chopra K. (2005). Curcumin, a diferuloylmethane, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rat kidneys. *BMC pharmacol* 15:5-15.
- Toda S**, Miyase T, Arichi H, Tanizawa H, Takino Y. (1985). Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 33:1725-1728.
- Tuba AK**, Ilhami G. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumina. *Chem Biol Interact* 174:27-37.
- Unnikrishnan MK**, Rao MN. (1995). Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin. *Mol Cell Biochem*. 146:35-37.
- Venkatesan P**, Rao MN. (2000). Structure-activity relationships for the inhibition of lipid peroxidation and the scavenging of free radicals by synthetic symmetrical curcumin analogues. *J Pharm Pharmacol* 52:1123-8.
- Venkatesan N**, Punithavathi D, Arumugam V. (2000). Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *Br J Pharmacol* 129:231-4.
- Verma RJ**, Mathuria N. (2008). Curcumin ameliorates aflatoxin-induced lipid-peroxidation in

liver and kidney of mice. *Acta Pol Pharm* 65:195-202.

- Wahlstrom B**, Blennow G A. (1978). Study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol* (Copenhagen) 43:86-92.
- Wang YJ**, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY. (1997). Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal* 15:1867-76.
- Weber H**. (1983). Long-term study of the distribution of soluble chromate-51 in the rat after intratracheal administration. *J Toxicol Environ Health* 11:749-64.
- Wedeen RP**, Qian LF. (1991). Chromium-induced kidney disease. *Environ Health Perspect* 92:71-4.
- Welling LW**, Welling DJ. (1975). Surface areas of brush and lateral cell walls in the rabbit proximal nephron. *Kidney Int.* 8:343-8.
- Wright JS**. (2002). Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. *J Mol Struct* 591:207-17.
- Yam-Canul P**, Chirino YI, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Pedraza-Chaverri J. (2008). PJ34, a poly adenosine diphosphate-ribose polymerase inhibitor, attenuates chromate-induced nephrotoxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:483-8.
- Yang KY**, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. (2007). Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 853:183-9.
- Ye SF**, Hou ZQ, Zhong LM, Zhang QQ. (2007). Effect of curcumin on the induction of glutathione S-transferases and NADP(H):quinone oxidoreductase and its possible mechanism of action. *Yao Xue Xue Bao* 42:376-80.
- Yuen JW, Benzie IF** (2003). Hydrogen peroxide in urine as a potential biomarker of whole body oxidative stress. *Free Radic Res* 37:1209-13.
- Zheng S**, Yumei F, Chen A. (2007). De novo synthesis of glutathione is a prerequisite for curcumin to inhibit hepatic stellate cell (HSC) activation. *Free Radic Biol Med* 43: 444-53.