



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL ANTIOXIDANTE CURCUMINA SOBRE LA INSUFICIENCIA
RENAL CRÓNICA EN RATAS CON NEFRECTOMÍA 5/6.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

GUILLERMO ZARCO MÁRQUEZ



MÉXICO, D.F. 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor: Rebecca Elizabeth Franco y Bourland
VOCAL:	Profesor: J. Eleazar Martínez Barajas
SECRETARIO:	Profesor: José Pedraza Chaverri
1er. SUPLENTE:	Profesor: Vanessa Rebeca Maya Ampudia
2° SUPLENTE:	Profesor: Laura Carmona Salazar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

El presente trabajo se llevó acabo en el Laboratorio 209 del Edificio “F” del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM y en el Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” con apoyo de los proyectos: DGAPA PAPIIT Clave No. IN201910 y CONACYT clave No. 129838.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Pedraza Chaverri

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Edilia Tapia Rodríguez

SUSTENTANTE:

Guillermo Zarco Márquez

*Para **Delia Cruz Rodríguez**, te
llevo en mí corazón siempre.*

AGRADECIMIENTOS

A la **VIDA** por enviarme a una familia maravillosa, por ser tan generosa al haberme dado la oportunidad de estudiar, y por seguir dándome la oportunidad de vivir.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mí casa, por haberme brindado la oportunidad de formarme en esta institución.

A la Facultad de Química por acogerme en sus aulas y laboratorios, y también por darme compañeros y a los mejores profesores, que dieron lo mejor de sí y de sus conocimientos para hacer de mí lo que soy.

A la Dra. Edilia Tapia Rodríguez y al Dr. José Pedraza Chaverri por depositar su confianza en mí para la realización de este proyecto y apoyarme en todo momento. Gracias por toda su paciencia.

A mis sinodales, por las aportaciones a esta tesis, y aceptar compartir conmigo este momento tan importante para mí.

Al M. en C. Adverqueydi Zúñiga Toalá por sus valiosos comentarios hacia este trabajo. Gracias por tu amistad, apoyo y paciencia.

A mis padres Ma. Del Consuelo Márquez Aguirre y Daniel Zarco Cruz por darme la vida, por confiar en mí, por darme su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, no solo en lo profesional sino también en lo personal. Gracias a ambos por darme lo mejor de sí, los amo.

A mi hermana Nadia Zarco Márquez por enseñarme con su ejemplo, a vivir dando lo mejor de mí todos los días. A mi hermana Sugehily Zarco Márquez y hermano Daniel Zarco Márquez. Gracias a los tres por existir y estar a mi lado, los amo.

A mi tío Joaquín Zarco Cruz por brindarme sus sabios consejos y apoyo incondicional en todo momento, gracias por ser mi hermano. Te amo.

A Karla Marina Ortiz Vega, Eduardo Molina Jijón, Fabiola Monroy Sánchez, Fernando Enrique García Arroyo, Horacio Osorio Alonso, Abraham Said Arellano Buendia, Ursino Pacheco García, Israel Coronel Morales, Juan Alfredo Alvarado Cortés y Anibal Josué Martínez Muñoz por su amistad y apoyo durante la realización de este trabajo.

Y por último, y no menos importantes a mis familiares, amigos y compañeros que no puedo mencionar por falta de espacio en este escrito, por acompañarme a lo largo de mi vida. Los llevo en mi corazón siempre.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	10
3. ANTECEDENTES	13
3.1 INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA	13
3.2 ESTRÉS OXIDANTE E INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA	15
3.3 CURCUMINA	18
4. OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	23
5. HIPÓTESIS	24
6. MATERIALES	25
6.1 REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS	25
7. METODOLOGÍA	27
7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	27
7.2 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	29
7.3 MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA	29
7.4 MEDICIÓN DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE PROTEÍNAS	29
7.5 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	30
7.6 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	30
7.6.1 HOMOGENIZADOS DE RIÑÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL MALONDIALDEHÍDO Y DEL 4-HIDROXINONENAL	30
7.6.2 HOMOGENIZADOS DE RIÑÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA	30
7.6.3 HOMOGENIZADOS DE RIÑÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA TOTAL, CATALASA, GLUTATIÓN REDUCTASA Y GLUTATIÓN PEROXIDASA	31
7.7 DETERMINACIÓN DE LA CREATININA Y DEL NITRÓGENO UREICO EN PLASMA	31
7.8 DETERMINACIÓN DEL MALONDIALDEHÍDO Y DEL 4-HIDROXINONENAL	32
7.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATALASA	33
7.10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA TOTAL	34
7.11 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA	35
7.12 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA	36
7.13 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA	37
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
9. RESULTADOS	39
9.1 EFECTO DE LA CURCUMINA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA	39

9.2 EFECTO DE LA CURCUMINA SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA DE PROTEÍNAS	40
9.3 DETERMINACIÓN DE LA CREATININA EN PLASMA	41
9.4 DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO UREICO EN PLASMA	42
9.5 DETERMINACIÓN DEL MALONDIALDEHÍDO Y DEL 4-HIDROXINONENAL	43
9.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATALASA	45
9.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA TOTAL	46
9.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA	47
9.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA	48
9.10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓ-S-TRANSFERASA	50
10. DISCUSIÓN	52
11. CONCLUSIÓN	56
12. PERSPECTIVAS	57
13. REFERENCIAS	58

ABREVIATURAS

1M2F	1-metil-2-fenilindol
4-HNE	4-Hidroxinonenal
BHT	Butilhidroxitolueno
BUN	Nitrógeno de urea en sangre
CAT	Catalasa
CDNB	1-cloro-2-dinitrobenceno
CMC	Carboximetilcelulosa
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación-S-transferasa
HO-1	Hemoxigenasa-1
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IRC	Insuficiencia renal crónica
MDA	Malondialdehído
NADPH	Nicotín-adenina-dinucleótido fosfato (forma reducida)
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NO	Óxido nítrico
NQO1	NADPH:quinona oxidorreductasa 1
Nx 5/6	Nefrectomía 5/6
O ₂ ^{•-}	Radical anión superóxido
O ₂	Oxígeno molecular
¹ O ₂	Oxígeno <i>singulete</i>
OH [•]	Radical hidroxilo
p/v	Peso/volumen
PAS	Presión arterial sistólica
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ácido tricloroacético
TMPO	Tetrametoxipropano
Uprot	Excreción urinaria de proteínas
XO	Xantina oxidasa

1. RESUMEN

La insuficiencia renal crónica (IRC) es una enfermedad caracterizada por la disminución progresiva de la función renal, debido a múltiples factores como la diabetes *mellitus* tipo 2 y la hipertensión. Se clasifica como una enfermedad emergente debido al aumento de los casos, al rezago y elevados costos en la atención, los recursos limitados para su tratamiento y la alta mortalidad. Por eso es importante determinar nuevas estrategias de renoprotección frente a la progresión del daño renal con ayuda de modelos de estudio como el de nefrectomía 5/6; en el riñón remanente, está claramente asociada la progresión de la enfermedad con el estrés oxidante, por eso emprendimos el **objetivo** de evaluar la administración vía orogástrica del antioxidante curcumina como una alternativa para atenuar y/o proteger de las alteraciones presentes en la IRC.

En el presente trabajo se estudiaron ratas macho de la cepa Wistar durante 30 días después de ser sometidas a Nx 5/6 o laparotomía (simuladas o sim). Los animales se dividieron en 4 grupos: Nx 5/6 + vehículo (N=6), Nx 5/6 + curcumina (N=6), Sim + curcumina (N=6) y Sim + vehículo (N=6) (este último grupo se usó como control), los cuales recibieron carboximetilcelulosa (vehículo) o curcumina mezclada con vehículo 7 días antes, y durante 30 días después de la cirugía. La disfunción renal en el grupo de Nx 5/6 sin tratamiento con la curcumina se evidenció por elevación de: presión arterial sistólica, proteinuria, creatinina y nitrógeno ureico en plasma, así como del malondialdehído y del 4-hidroxinonenal en tejido renal. Concomitantemente con estas alteraciones se encontró una disminución en las actividades enzimáticas de la catalasa, superóxido dismutasa total, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión-S-transferasa. El tratamiento con la curcumina redujo significativamente las alteraciones antes mencionadas en el riñón remanente. El deterioro de la función renal y el estrés oxidante asociado a la IRC resultado de la ablación renal se redujo significativamente con el tratamiento de curcumina. En conclusión, la administración de curcumina (60 mg/kg de rata/día) mejoró las alteraciones originadas a partir de la Nx 5/6, aunque son necesarios más estudios para definir el potencial de este tratamiento por ejemplo en pacientes con IRC.

“EFECTO DEL ANTIOXIDANTE CURCUMINA SOBRE LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA EN RATAS CON NEFRECTOMÍA 5/6”

2. INTRODUCCIÓN

En México la insuficiencia renal crónica (IRC) constituye un problema de salud pública que se origina principalmente como consecuencia de enfermedades tales como: la diabetes *mellitus* tipo 2 y la hipertensión arterial. De acuerdo con Correa-Rotter y Cusumano (2008) esto no solo se circunscribe a México sino que la incidencia de las enfermedades renales crónicas es un problema creciente en América Latina y en todo el mundo.

En un estudio comparativo realizado por Amato et al. (2005) en una población urbana en México, se encontró que la prevalencia de la IRC es similar a la observada en países industrializados. Si los datos obtenidos en dicho estudio representan al total de la población mexicana, se estima que sólo 1 de cada 4 pacientes con IRC que requieren trasplante renal tendrían acceso a este.

Por lo tanto, hay una gran necesidad de identificar estrategias capaces de detener o de reducir la progresión de la enfermedad renal crónica para evitar la necesidad de trasplante renal, hemodiálisis o diálisis peritoneal. Los estudios en modelos experimentales de daño renal crónico, como el de nefrectomía 5/6 (Nx 5/6), son de gran utilidad para tratar de comprender los mecanismos que generan la enfermedad renal.

Dicho modelo puede ser utilizado para establecer mejores estrategias de tratamiento, evitando y/o retardando la progresión de nefropatías hasta la IRC y con ello lograr disminuir el número de pacientes que requieren de tratamiento sustitutivo con diálisis y/o trasplante renal (Tapia et al., 2003).

La reducción significativa de masa renal por nefrectomía en animales experimentales o por varias enfermedades en humanos dispara una cadena de eventos que conducen a lesión túbulointersticial, glomeruloesclerosis, proteinuria y la progresión a la fase final de la enfermedad renal. El deterioro progresivo de la función renal y la estructura en el riñón remanente es mediado por un gran número de anomalías en la hemodinámica renal, a saber, hipertensión e hiperfiltración glomerular así como estrés oxidante e inflamación (Vaziri et al., 2003).

Kim y Vaziri (2010) mencionan que el estrés oxidante y la inflamación son características comunes de la enfermedad renal crónica y los mediadores principales de numerosas complicaciones entre las cuales se encuentran las complicaciones cardiovasculares. Además, explica que el estrés oxidante en la IRC es causado por una combinación de: 1) incremento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) y 2) deterioro en la capacidad antioxidante de las células; o bien una combinación de ambas.

Un incremento en la generación de las ROS por arriba del nivel fisiológico conduce a ciertos daños en los tejidos y disfunción por modificación de moléculas estructurales y funcionales, activación de vías de transducción de señales y ciertos

factores de transcripción sensibles a mecanismos de oxido-reducción que tratan de compensar el efecto originado por las ROS. Estos eventos, a su vez, promueven necrosis, apoptosis, inflamación, fibrosis; por lo que, las células cuentan con sistemas redox, enzimas antioxidantes, los genes de la fase II de detoxificación y antioxidantes endógenos que brindan protección contra las ROS inducidas por daño tisular.

Se ha establecido que el estrés oxidante y la deficiencia de enzimas antioxidantes juegan un papel muy importante en el desarrollo del daño renal en el modelo de Nx 5/6 (Vaziri et al., 2003; Tain et al., 2007). En este contexto, la siguiente investigación pretende evaluar una estrategia para retardar la progresión del daño renal basada en el uso del antioxidante curcumina, que tiene la ventaja de ser un componente de la dieta en humanos.

3. ANTECEDENTES

3.1 INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

La IRC es un proceso fisiopatológico irreversible de la función renal por múltiples causas, cuyas consecuencias son la pérdida irreparable del número y funcionamiento de las nefronas. Dicha enfermedad es un problema de salud pública emergente que afecta a un porcentaje importante de la población mexicana, la cual es tratada con procedimientos tales como diálisis peritoneal y finalmente con trasplante renal que consumen gran cantidad de recursos monetarios que solo permite atender a un porcentaje muy limitado de estos pacientes (Amato et al., 2005; Paniagua et al., 2007; Correa-Rotter y Cusumano, 2008).

La pérdida inicial de masa renal por nefropatías o modelos experimentales trae consigo adaptaciones funcionales y estructurales en las nefronas remanentes que permiten suplir parcialmente la función de aquellas que se han perdido. La capacidad de filtración glomerular se eleva notoriamente debido al aumento del flujo plasmático, hay un aumento de la presión capilar debido a la dilatación de los vasos pre-glomerulares (Dworkin et al., 1986; Meyer et al., 1987), y una hipertrofia del glomérulo y de los segmentos tubulares. Cuando la masa renal se reduce más del 70%, estas adaptaciones son capaces por sí mismas de producir daño renal progresivo. Esta hipótesis propuesta inicialmente por Hostetter et al. (1981) se basa en estudios en los que se redujo la masa renal más del 75%, lo cual produjo en las nefronas residuales un aumento súbito de la presión glomerular y del flujo

en los capilares glomerulares; produciendo lesiones glomerulares que progresaron a esclerosis y más tarde en un aumento en el nivel de proteína en orina (proteinuria).

La reducción del número de unidades de nefronas por enfermedades renales primarias dispara una cadena de eventos que conducen a la inflamación del glomérulo y del túbulo intersticial, pérdida progresiva de las nefronas remanentes y el desarrollo de la IRC (Brenner et al., 1982; Quiroz et al., 2008). En un estudio, se observó que la prevención del aumento de la presión y el flujo glomerular con dieta hipoproteica evitó el daño glomerular, demostrándose así la participación de las alteraciones hemodinámicas en el desarrollo de los cambios estructurales (Hostetter et al., 1981). Por otra parte, se ha demostrado que el factor predominante que conduce a una hiperfunción del daño renal es el aumento de la presión intraglomerular (Hostetter 1981; Zatz et al., 1985, Tapia et al., 2003). Por lo que controlar o regular la presión sanguínea puede aportar un efecto benéfico particularmente en el modelo experimental de Nx 5/6 (Griffin et al., 1994; Bidani et al., 2000, Tapia et al., 2003).

Tapia et al. (2003) demostraron que uno de los factores más importantes que influye en el deterioro de la función renal es la hipertensión arterial, esta es mediada por el aumento en: la presión capilar glomerular, el flujo plasmático y la filtración glomerular; este aumento produce daño renal, donde la progresión de lesiones renales invariablemente conduce a la hipertrofia, debido a este último el peso de la masa renal remanente aumenta de 2 a 3 veces y el proceso hipertrófico afecta por igual a estructuras tubulares como glomerulares.

3.2 ESTRÉS OXIDANTE E IRC

El estrés oxidante juega un papel determinante en la patogénesis de varias enfermedades como: la isquemia miocárdica, lesión cerebral por isquemia-reperfusión, hemorragias, hipoxia y cáncer (Maheshwari et al., 2006).

Vaziri et al. (2003) demostraron que las reacciones de oxido-reducción que se requieren en los mecanismos bioquímicos de los organismos aeróbicos están acopladas con la generación continua de las ROS altamente reactivas y potencialmente citotóxicas. En condiciones fisiológicas normales, las ROS producidas en el curso del metabolismo son neutralizadas por el sistema antioxidante endógeno que protege a las moléculas funcionales y estructurales en contra de las modificaciones mediadas por estas, lo que impide la citotoxicidad y el daño tisular. Este sistema consiste en una serie de enzimas antioxidantes, así como de compuestos antioxidantes que son capaces de contrarrestar el efecto de las ROS.

Bajo una variedad de condiciones patológicas, la tasa de producción de las ROS puede exceder a la capacidad antioxidante natural, conduciendo a estrés celular en la que las concentraciones elevadas de las ROS pueden alterar las moléculas funcionales y estructurales, y por lo tanto producir un daño tisular (Vaziri et al., 2003; Shimizu et al., 2005).

La especie reactiva de oxígeno primaria producida en el curso del metabolismo del oxígeno es el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que es extremadamente reactivo y altamente citotóxico. Las células cuenta con la capacidad de dismutar el $O_2^{\bullet-}$ a un

producto mucho menos reactivo, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), por una familia de metaloenzimas conocidas como dismutasas de superóxido (SOD). Siendo, las SOD la primer línea de defensa que poseen las células contra las lesiones mediadas por las ROS (Vaziri et al., 2003).

Vaziri et al. (2003) encontraron que el deterioro progresivo de la función y la estructura renal a partir de la reducción de masa es mediado por una variedad de mecanismos, entre los que se encuentran el estrés oxidante e inflamación; el primero se ha convertido en una característica importante de la IRC. Esta conclusión se basa en las siguientes observaciones: a) la concentración plasmática de los productos de peroxidación lipídica es notablemente elevada, lo que indica una mayor interacción de las ROS con las moléculas de lípidos en la IRC (Vaziri et al., 2003), b) la IRC favorece la acumulación de proteínas glicosiladas y productos de peroxidación lipídica apuntando a la modificación de moléculas de origen proteico por compuestos carbonílicos y lipoperóxidos reactivos generados por las ROS (Vaziri et al., 2003) y c) estudios realizados por Vaziri et al. (2003) en el modelo de IRC han demostrado una mayor inactivación y/o deficiencia de la óxido nítrico sintasa mediada por las ROS, nitración de proteínas, una deficiencia óxido nítrico (NO) e hipertensión arterial. Recientemente, Kim y Vaziri (2010) encontraron que en tejidos de animales con IRC la expresión y la actividad de las enzimas antioxidantes están disminuidas; así como lipoproteínas de alta densidad en plasma y los tioles en su forma reducida están disminuidos en pacientes con insuficiencia renal.

Por lo tanto el estrés por las ROS desempeñan uno de los mecanismos principales en la progresión del daño renal (Cruz et al., 2007; Lim y Vaziri, 2004; Modlinger et al., 2004; Romero et al., 1999; Vaziri et al., 1998,2003; Vaziri y Rodríguez-Iturbe, 2006; Tain et al., 2007). En nuestro modelo de estudio de la Nx 5/6, el estrés oxidante se origina por un aumento en la producción de las ROS y una disminución en la capacidad de las enzimas antioxidantes.

Hasta el momento, los datos disponibles sobre el efecto de la terapia antioxidante en la progresión de la enfermedad renal son limitados. Se conoce que la administración de antioxidantes ampliamente utilizados como la vitamina E y la N-acetilcisteína tienen efectos benéficos en las ratas con riñón remanente (Tain et al., 2007; Shimizu et al., 2005). También, se encontró que la administración de superóxido dismutasa de origen biotecnológico durante 2 semanas mejora la presión arterial, sin alterar la función renal en ratas con Nx 5/6 (Vaziri et al., 2003). Tain et al. (2007) encontraron una reducción significativa de glomeruloesclerosis pero no de la depuración de creatinina o proteinuria debido a la administración de suplementos como la vitamina E durante 15 semanas en ratas después de la Nx 5/6. Van den Branden et al. (1997) y Hahn et al. (1999) describieron hallazgos similares y en los cuales se encontró, adicionalmente, que la administración de vitamina E (de 11 a 16 semanas durante la Nx 5/6) indujo un incremento en la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) y de la SOD y una disminución en la producción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) que es una citocina pro-fibrogénica involucrada en el proceso de inflamación y del daño tisular (Klahr y Morrissey, 2003).

3.3 CURCUMINA

La curcumina (diferuloilmetano, Figura 1), un polifenol, es el principio activo de la planta perenne *Curcuma longa* (comúnmente conocida como cúrcuma). Dentro de la fracción de la pigmentación amarilla de la cúrcuma contiene curcuminoides, que están químicamente relacionados con su principal ingrediente, la curcumina (Goel et al., 2008).

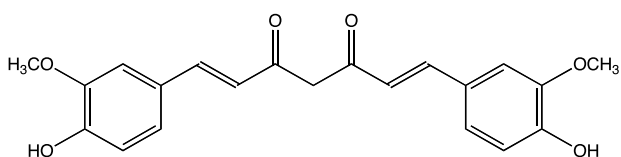


Figura 1. Estructura química de la curcumina.

Los curcuminoides presentes principalmente en la cúrcuma son: la demetoxicurcumina, la bisdemetoxicurcumina y la ciclocurcumina (Goel et al., 2008). Estas moléculas se encuentran presentes del 3-5% en la cúrcuma. Los principales componentes de la curcumina comercial son: curcumina (~77%), demetoxicurcumina (~17%) y bisdemetoxicurcumina (~3%) (Figura 2).

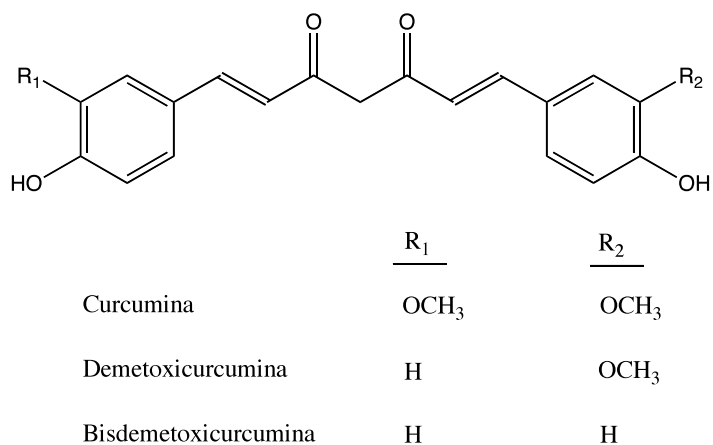


Figura 2. Curcuminoides presentes en la cúrcuma. Donde R₁ y R₂ representan a los grupos sustituyentes en la estructura química.

La curcumina se cultiva principalmente en la India, el sudeste asiático, China, y en regiones tropicales; esta planta también es común en otras partes del mundo y es reconocida por diferentes nombres como: azafrán de la India, jengibre amarillo, raíz amarilla, *Kacha haldi*, *Ukon* ó amarillo natural 3. Inicialmente, la curcumina se aisló por primera vez en 1815, se obtuvo su forma cristalina en 1870, y finalmente se identificó cómo 1,6-hepta-dieno-3,5-dieno-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-(1E,6E) o diferuloilmetano. En 1910 Lampe confirmó y sintetizó la estructura del feruloilmetano componente de la curcumina (Goel et al., 2008).

La curcumina es un polvo amarillo-naranja que es insoluble en agua y éter, pero soluble en etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) y acetona. La curcumina tiene un punto de fusión de 183°C, una fórmula molecular de $C_{21}H_{20}O_6$ y una masa molecular de 386.37 g/mol. También tiene una tonalidad amarillo brillante a pH 2.5-7 y rojo a pH>7. La curcumina existe en la forma enólica y β -dicetona. El hecho que esta molécula en solución esté en su forma enólica principalmente, tiene como beneficio importante la capacidad de atrapar radicales libres. La curcumina es estable a pH ácido pero inestable a pH básico o neutro, bajo estas condiciones es degradado a ácido ferúlico y ferulometano; aunque el mecanismo exacto de degradación aún no se conoce, parece ser que ocurre por un mecanismo oxidante, ya que la presencia de ácido ascórbico, N-acetilcisteína o glutatión previene completamente su degradación a pH 7.4 (Goel et al., 2008; Maheshwari et al., 2006; Mesa et al., 2000).

Tonneses y Karlsen (1985) y Mesa et al. (2000) han descrito que este compuesto es estable en el estómago (pH 1-2) y en el intestino delgado (pH 6.5), debido a

que su degradación es extremadamente lenta a pH entre 1 y 7; su elevada lipofilia le permite una rápida absorción gastrointestinal por difusión pasiva y tras su administración se excreta principalmente por la bilis, las heces y por la orina, por lo que la administración vía orogástrica no representaría ningún problema.

La curcumina, exhibe una notable actividad antioxidante comparable a la vitamina C y vitamina E (Toda et al., 1985); tiene la capacidad de ser un potente neutralizador y/o eliminar una variedad de ROS (Zhao et al., 1989; Priyadarsini, 1997) incluyendo oxígeno *singulete* (1O_2) (Rao et al., 1995), $O^{\bullet-}$ (Sreejayan y Rao, 1996), radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Parshad et al., 1998; Reddy y Lokesh, 1994), dióxido de nitrógeno (Unnikrishnan y Rao, 1992,1995) y NO (Sreejayan y Rao, 1997). Estas evidencias demuestran que la curcumina es un antioxidante directo. En estudios en modelos *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que la curcumina inhibe la peroxidación de lípidos (Reddy y Lokesh, 1992; Sreejayan y Rao, 1994): a) Cohly et al. (1998) demostraron que hay protección de células renales (LLC-PK₁) del daño celular oxidante por inhibición de la degradación lipídica, peroxidación lipídica y citólisis, b) en células endoteliales vasculares se previno el daño oxidante por un incremento en la inducción de la hemo oxigenasa-1 (HO-1) (Motterlini et al., 2000) y c) en un modelo felino se reportó una disminución de malondialdehído (MDA) en corazones sometidos a isquemia por 4 horas (Dikshit et al., 1995).

En humanos se ha descrito que la curcumina reduce la inflamación y la artritis reumatoide (Doedhar et al., 1980) inhibiendo la lipoperoxidación y disminuyendo la generación de ROS en diversos tejidos como músculo, colon y pulmón (Sreejayan

y Rao, 1994). De forma muy interesante, se ha demostrado que el metabolito de la curcumina, la tetrahidrocurcumina, también inhibe la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos y en membranas de eritrocito (Osawa et al., 1995; Sugiyama et al., 1996).

La actividad antioxidante directa de la curcumina es atribuida según a los grupos hidroxilo (Figura 1) presentes en los fenoles (Sharma, 1976) de esta molécula, lo cual se corroboró en otros estudios (Ligeret et al., 2004; Venkatesan y Rao, 2000) donde, además, se describió que la presencia del grupo metoxilo en posición orto al grupo OH, favorecen la actividad antioxidante de la curcumina.

Dinkova-Kostova y Talalay (2008) describieron a la curcumina como un antioxidante bifuncional debido a sus efectos antioxidantes directos e indirectos. Esta última propiedad se define por su capacidad de inducir la expresión de diversas proteínas citoprotectoras como catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) a través de la vía Keap1/Nrf2/ARE.

Se ha demostrado que el efecto neuroprotector de curcumina es mediado por la expresión de la enzima HO-1 en cerebro que a su vez es inducida por la vía Keap1/Nrf2/ARE (Chenhui et al., 2009). En el riñón también se ha encontrado que la curcumina induce la actividad de las enzimas CAT, GR, GPx, glutatión-S-transferasa (GST) y NQO1 (Iqbal et al., 2003). Los datos previos sugieren que la curcumina es capaz de inducir la expresión y la actividad de diferentes enzimas citoprotectoras al actuar como un antioxidante indirecto por medio del factor de

transcripción Nrf2.

Hasta el momento no se ha determinado si la curcumina tienen la capacidad de disminuir el estrés oxidante en modelos de daño renal progresivo. Por lo que el presente trabajo plantea estudiar el efecto de la curcumina sobre la progresión del daño renal en ratas por Nx 5/6 bajo la hipótesis de que la capacidad antioxidante bifuncional de la curcumina protegerá del estrés oxidante, ejerciendo un efecto renoprotector en el modelo de progresión de daño renal por Nx 5/6.

La protección por parte de la curcumina sobre la Nx 5/6 se espera que ocurra de dos formas: a) actuando como antioxidante directo, neutralizando las ROS originadas en la Nx 5/6 y b) tal vez actuando como un antioxidante indirecto, induciendo las enzimas de la fase 2. Aunque este trabajo no tiene como objetivo evaluar si hay inducción de las enzimas citoprotectoras de la fase 2 por la administración de curcumina, sería muy útil estudiar si las enzimas presentes son funcionales.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la administración orogástrica de la curcumina sobre la progresión del daño renal, la hipertensión y el estrés oxidante en ratas con IRC inducida por Nx 5/6.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- (a) Determinar la presión arterial sistólica (PAS) de las ratas en condiciones basales, a los 15 días y 30 días después de la Nx 5/6, como un indicador de la progresión del daño renal.
- (b) Determinar el nivel de proteínas en la excreción urinaria de 24 horas (proteinuria) en condiciones basales y cada 15 días hasta el final del tratamiento después de la Nx 5/6, como un indicador de la progresión del daño renal.
- (c) Cuantificar los niveles de la creatinina y nitrógeno de urea en plasma (BUN) al final del tratamiento, como indicador de la función renal.
- (d) Determinar la concentración del malondialdehído (MDA) y del 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) en el tejido renal, como marcador de daño por lipoperoxidación.
- (e) Determinar en los riñones de las ratas al final del tratamiento la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD, GST, GPx y GR. Como indicadores de la respuesta al estrés oxidante.

5. HIPÓTESIS

Evaluar si la curcumina ejerce un efecto renoprotector y antihipertensivo en el modelo de la IRC por Nx 5/6 y si este efecto está asociado a una disminución del estrés oxidante.

6. MATERIALES

6.1 REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA): curcumina (Cat No. C1386), carboximetilcelulosa (CMC, Cat No. C9481), glutatión reducido (GSH, Cat No. G4251), glutatión oxidado (GSSG, Cat No. G9027), xantina (Cat No. X7375), nitroazul de tetrazolio (NBT, Cat No. N-6876), albúmina sérica bovina (ASB, Cat No. A4503), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, Cat No. N-1630), GR (Cat No. G-4751), GST (Cat No. G-6511), xantina oxidasa (XO, Cat No. X-4500), 1-metil-2-fenilindol (1M2F, Cat No. 404888), tetrametoxipropano (TMPO, Cat No. 108383), cloruro de hierro (III) (FeCl_3 , Cat No. 236489), 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB, Cat No. 138630), bicarbonato de sodio (NaHCO_3 , Cat No. 90421C), cloruro de sodio (NaCl , Cat No. S-7653), etanol (Cat No. 459844) y acetato de etilo (Cat No. 270989).

Los siguientes reactivos se compraron de J. T. Baker (México, D.F.): ácido tricloroacético (TCA, Cat No. 0414-04), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 , Cat No. 3246-01), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4 , Cat No. 3828-05), metanol absoluto (CH_3OH , Cat No. 909603), ácido etilendiaminotetracético disódico (EDTA-Na_2 , Cat No. 8993), sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Cat No. 34782), cloruro de cobre (II) dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Cat No. 0097), acetonitrilo (CH_3CN , Cat No. 9255), ácido clorhídrico concentrado (HCl , Cat No. 6081), ácido metanesulfónico concentrado ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$, Cat No. P684-07).

De la compañía Merck, se utilizó la azida de sodio (NaN_3 , Cat No. 822335). El H_2O_2 (Cat No. 5240) y el carbonato de sodio (Na_2CO_3 , Cat No. 3598-01) que se utilizaron fueron de la empresa Mallinckrodt Specialty (Paris, Kentucky). Todos los reactivos fueron grado analítico.

Para realizar las mediciones espectrofotométricas se usó un espectrofotómetro Beckman Coulter, modelo DU640.

7. METODOLOGÍA

7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se estudiaron ratas macho de la cepa Wistar del bioterio del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, con un peso corporal entre 280-300 g. Al llegar al laboratorio se procedió a dividir a las ratas en los siguientes grupos:

Grupo 1. Ratas con cirugía simulada + vehículo (Sim + vehículo), 4 semanas de evolución.

Grupo 2. Ratas con cirugía simulada + 60 mg curcumina/kg de rata/día (Sim + 60 mg curcumina), 4 semanas de evolución.

Grupo 3. Ratas con Nx 5/6 + vehículo (Nx 5/6 + vehículo), 4 semanas de evolución.

Grupo 4. Ratas con Nx 5/6 + 60 mg/kg de rata/día (Nx 5/6 + 60 mg curcumina), 4 semanas de evolución.

Se puede observar en el esquema de la Figura 3, los 4 grupos del protocolo y el compuesto que se utilizó en cada uno de ellos, donde la curcumina y/o vehículo (CMC al 0.5%) se administraron vía orogástrica (Kuhad et al., 2007) a las dosis descritas anteriormente iniciando 1 semana antes de la Nx 5/6 o de la cirugía simulada, y a lo largo de los 30 días después del procedimiento quirúrgico. La curcumina administrada por vía orogástrica se resuspendió en CMC a la concentración de 0.5%. Al finalizar el estudio se obtuvo una población de 6 ratas

por cada grupo. La PAS y la proteinuria se determinaron al inicio del estudio y cada 2 semanas. Al final del tratamiento se sacrificaron a los animales y se obtuvieron muestras de plasma para la determinar creatinina y el BUN, y finalmente se obtuvieron los riñones para evaluar el estrés oxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes planteados en los objetivos.

Los procedimientos experimentales que se desarrollaron estuvieron apegados a los lineamientos del Comité de Ética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

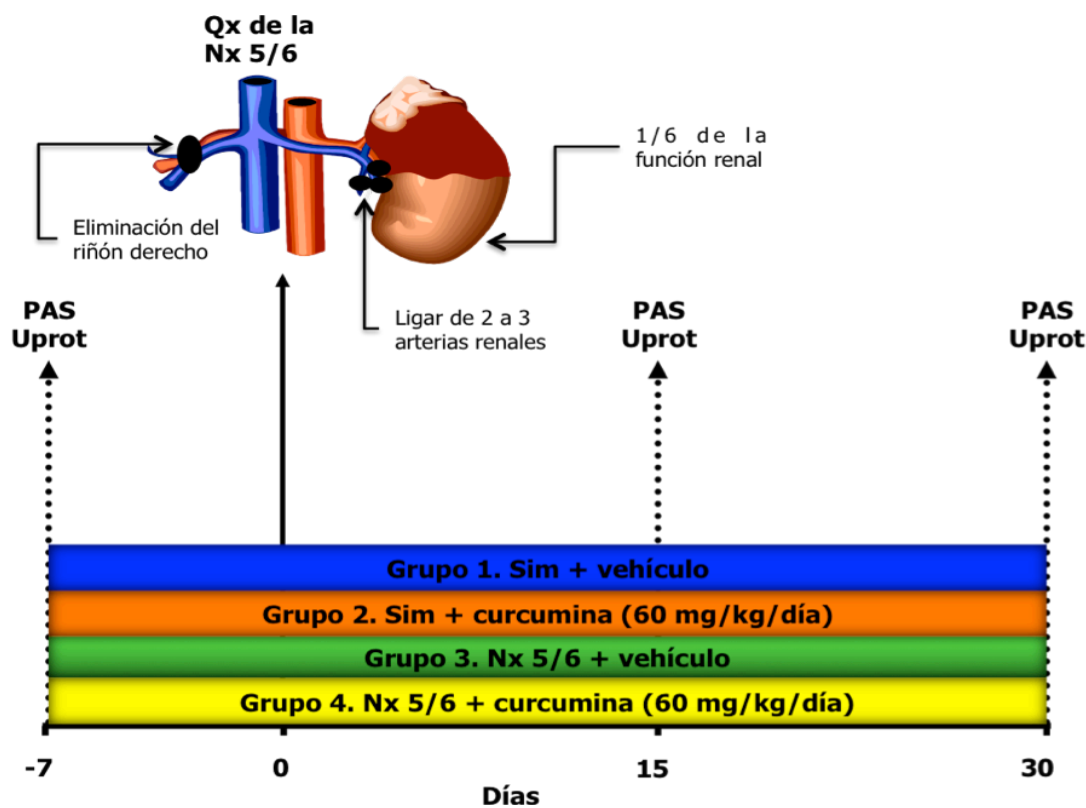


Figura 3. Representación esquemática del diseño experimental. Donde PAS: es la determinación de la presión arterial sistólica en los diferentes periodos, Uprot: es la cuantificación de la excreción urinaria de proteínas de 24 h en los diferentes periodos y Qx: es el procedimiento quirúrgico para realizar la nefrectomía 5/6.

7.2 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Mediante anestesia general con pentobarbital sódico (60 mg/kg), se efectuó la ablación renal subtotal en un sólo procedimiento quirúrgico; donde se removió el riñón derecho y se efectuó un infarto selectivo del riñón izquierdo mediante la ligadura de 2 a 3 ramas de la arteria renal, dejando aproximadamente una sexta parte de tejido renal funcional (Tapia et al., 1990, 2003). Las ratas con cirugía simulada o Sim se sometieron a un procedimiento similar, pero solamente se manipularon los riñones y el pedículo renal sin ligar las arterias.

7.3 MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA

Se determinó la presión arterial sistólica mediante un sistema no invasivo en ratas no anestesiadas, colocadas en una jaula de restricción, previa aclimatación a 40°C durante 10 minutos para mantener un flujo sanguíneo constante. Mediante pletismografía con un manguillo colocado en la cola de la rata y acoplado a un polígrafo (Kent Scientific Corporation) se determinó la PAS.

7.4 MEDICIÓN DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE PROTEÍNAS

Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas con agua y se recolectó la orina durante 24 h. Para la determinación de las proteínas totales en la orina se utilizó el método turbidimétrico de Henry et al. (1956) utilizando TCA al 12.5% como agente precipitante.

7.5 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg de rata). Se obtuvo sangre mediante la punción de la arteria aorta abdominal usando una jeringa con el anticoagulante heparina. El plasma se obtuvo mediante centrifugación a 2,100 x g durante 10 minutos.

Finalmente, se retiraron los riñones con el 100% de la masa renal funcional o el riñón con 1/6 de la masa renal funcional y se colocaron en solución salina (0.9% de NaCl) a 4°C. Los riñones se rebanaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para estudios posteriores.

7.6 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

7.6.1 Homogenados de riñón para la determinación MDA y 4-HNE. El tejido se homogenizó en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.4 en una dilución 1:10 peso/volumen (p/v), el amortiguador contenía además butilhidroxitolueno (BHT) 0.5 M en acetonitrilo. Las muestras se centrifugaron a 3,000 x g por a 4°C por 10 min. El homogenado se guardó a -80°C hasta las determinaciones bioquímicas correspondientes. Se midió el contenido de proteínas en el homogenado por el método de Lowry et al. (1951).

7.6.2 Homogenados de riñón para la determinación de GST. Se prepararon diluciones 1:10 (p/v) en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4,

se centrifugaron a 10,500 x g a 4°C por 20 min para obtener el sobrenadante el cual se almacenó a -80°C hasta la determinación de GST.

7.6.3 Homogenados de riñón para la determinación de la actividad enzimática de la CAT, GR, GPx y SOD. Se obtuvieron homogenados mezclando 1:10 (p/v) en amortiguador de fosfatos 50 mM con tritón al 0.1%, se centrifugó a 3,000 x g a 4°C por 1 h para obtener el sobrenadante el cual se almacenó a -80°C hasta la determinación de la actividad enzimática.

7.7 DETERMINACIÓN DE CREATININA Y DE BUN

Fundamento: Creatinina en plasma. La determinación de creatinina en plasma se realizó mediante un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Jaffé; ésta reacción consiste en la formación de un complejo colorido picrato-creatinina en medio alcalino el cual se puede medir a una λ de 492 nm (Figura 4). Los resultados se expresaron como mg de creatinina/dL.

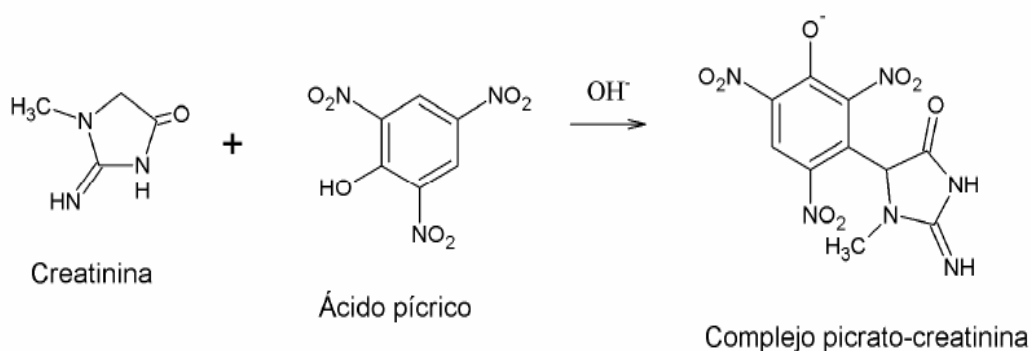


Figura 4. Reacción de Jaffé. La creatinina reacciona con el ácido pícrico en medio alcalino para producir el complejo colorido picrato-creatinina que se puede medir a una λ de 492 nm.

Fundamento: BUN en plasma. La concentración de BUN se determinó mediante un ensayo colorimétrico. 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 ortoformaldehído-urea que absorbe a una λ de 510 nm (Figura 5). Los resultados se expresaron en mg/dL.

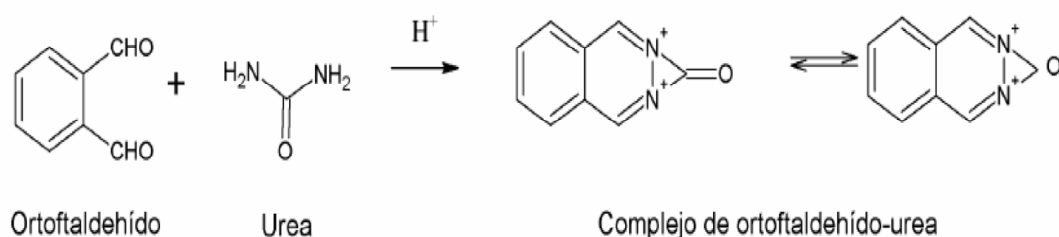


Figura 5. Reacción de formación del complejo ortoformaldehído-urea. El ortoformaldehído reacciona con la urea en medio ácido para producir el complejo colorido ortoformaldehído-urea que se puede medir a una λ de 510 nm.

7.8 DETERMINACIÓN DE MDA Y DE 4-HNE

Fundamento: El MDA y el 4-HNE (Figura 6) son importantes productos tóxicos de la peroxidación de lípidos. La determinación de estos aldehídos se ha usado ampliamente como un indicador de la oxidación de lípidos *in vitro* e *in vivo*. Bajo condiciones de acidez y baja temperatura, el 1M2F reacciona con el MDA y con el 4-HNE y se produce un cromóforo estable que presenta una λ máxima de absorbencia a 586 nm. El uso de ácido metanesulfónico optimiza el rendimiento del cromóforo producido a partir del MDA y del 4-HNE.

Metodología: Se preparó la mezcla de reacción; al tubo blanco se le añadió amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.4, solución de 1M2F 15.4 mM en acetonitrilo: metanol (3:1) y ácido metanesulfónico con Fe (III); a los tubos

estándares se les añadió a cada uno TMPO, solución de 1M2F 15.4 mM en acetonitrilo: metanol (3:1) y ácido metanesulfónico con Fe (III); al tubo muestra se le añadió aproximadamente 1 mg de proteína de la muestra del tejido renal, solución de 1M2F 15.4 mM en acetonitrilo: metanol (3:1) y ácido metanesulfónico. Al tubo blanco de la muestra se le añadió aproximadamente 1 mg de proteína de la muestra del tejido renal, ácido metanesulfónico con Fe (III) y solución de acetonitrilo:metanol (3:1). Una vez realizada la mezcla de reacción se incubó 40 minutos a 45°C, se centrifugó a 3,000 x g durante 5 min. Finalmente, se determinó la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una λ de 586 nm y se extrapoló con la curva estándar de TMPO.

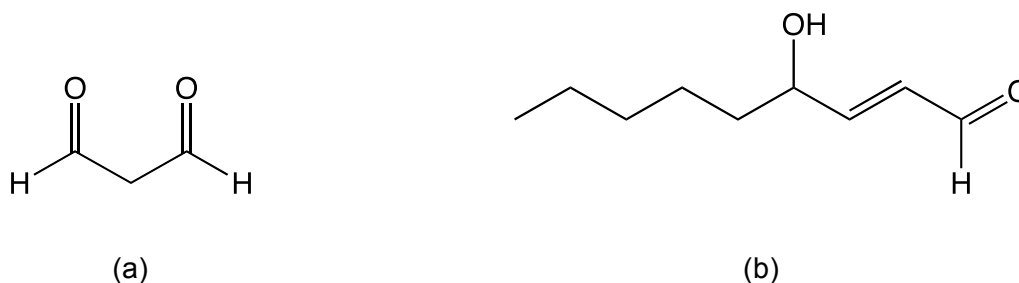


Figura 6. Estructura química del MDA (a) y del 4-HNE (b).

7.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CAT

Fundamento: La CAT es una hemoproteína tetramérica con un peso molecular de 240 kDa. En tejidos de mamíferos, está presente en altas concentraciones en hígado, riñón y en bajos niveles en tejido conectivo. La técnica para determinar la actividad de esta enzima se basa en una disminución de absorbencia a una λ de 240 nm, debido a la degradación del H_2O_2 por la CAT que se encuentra presente en la muestra a evaluar de acuerdo al método de Aebi (1984). Se lee la absorbencia a una λ de 240 nm cada 15 s durante 30 s, debido a que es el

período en el que la descomposición de H_2O_2 sigue una cinética de primer orden.

Metodología: Se tomaron 25 μL de una dilución 1:30 del sobrenadante renal y se le agregaron 725 μL de H_2O_2 30 mM, se agitó y se midió la absorbencia a una λ de 240 nm. El espectrofotómetro se calibró a la misma longitud de onda con amortiguador de fosfatos 10 mM a pH 7.0.

7.10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SOD TOTAL

Fundamento: Las SOD son metaloenzimas que dismutan el $\text{O}_2^{\bullet-}$ en oxígeno molecular y H_2O_2 . La actividad de la SOD se mide por su capacidad que posee esta enzima de inhibir la reducción del NBT por los $\text{O}_2^{\bullet-}$ generados por el sistema de la xantina-XO como lo describe Oberley et al. (1984).

Metodología: Se verificó que el sistema generador de $\text{O}_2^{\bullet-}$ funcionara mezclando amortiguador, XO y mezcla de reacción (xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 μM , albúmina 0.006% y Na_2CO_3). Se incubó a 27°C durante 15 min, después se le agregó CuCl_2 0.8 mM y se midió a una λ de 560 nm. Una vez constatado que el funcionamiento del sistema se procedió hacer el ensayo con las muestras; estas se prepararon por duplicado (mezcla de reacción, muestra y XO) y un blanco de la misma (mezcla de reacción, muestra y amortiguador). Además de los tubos correspondientes para las muestras se consideraron 4 tubos adicionales 2 al principio de la serie y 2 al final; los cuales contienen mezcla de reacción, amortiguador y XO. Esto corresponde al 100% de reducción de NBT en los que no hay SOD que impida la reducción de este compuesto.

Se adicionó la mezcla de reacción, se incubó a 27°C y se empezó la reacción al agregar XO, amortiguador de fosfatos y/o muestra según fuera el caso, y al final se le agregó el CuCl₂ para detener la reacción. El tiempo total de incubación fue de 15 minutos. Se calibró el espectrofotómetro con la mezcla de reacción a una λ de 560 nm y las muestras se cuantificaron.

7.11 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GPX

Fundamento: La GPx cataliza la descomposición del H₂O₂ o de otros peróxidos orgánicos a H₂O con la concomitante oxidación del GSH el que se transforma en GSSG. El GSSG es, a su vez, reducido a GSH por la GR en presencia de NADPH formando un ciclo redox, impidiendo que se agoten las reservas de GSH en la célula. La actividad de la GPx se midió de manera indirecta por una reacción acoplada con GR y se basa en la disminución de la absorbencia a una λ de 340 nm debido a la desaparición de NADPH. La GPx, al reducir los hidroperóxidos, consume el GSH, el cual es regenerado por la GR a partir de GSSG, proceso donde se consume NADPH.

Metodología: Se preparó la mezcla de reacción la cual contenía: EDTA (1 mM), azida de sodio (1 mM), NADPH (0.2 mM), GSH (1 mM), GR (1 U/mL) y amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0, la cual se almacenó a 4°C durante todo el ensayo.

Se preparó un tubo inespecífico (blanco) que contenía mezcla de reacción y amortiguador, los tubos con muestra contenían una dilución 1:10 volumen/volumen (v/v) del homogenizado (30 μ L de muestra + 270 μ L de

amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0) y la mezcla de reacción. Se incubaron 5 min a temperatura ambiente.

Después de los 5 min de incubación se adicionó H_2O_2 1.25 mM, se agitó y se midió la absorbencia a una λ de 340 nm cada minuto durante tres minutos. El espectrofotómetro se calibró con amortiguador de fosfatos.

7.12 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GR

Fundamento: La GR es una enzima que requiere NADPH y que cataliza la conversión de GSSG a GSH. Esta enzima es esencial para mantener el ciclo redox del GSH debido a que mantiene los niveles fisiológicos de GSH, el cual sirve como un antioxidante endógeno al reaccionar con radicales libres y peróxidos orgánicos; además es sustrato de la GPx y de la GST durante la detoxificación celular. Se siguió el método de Calberg y Mannervik, (1975), en el cual se evalúa la desaparición de NADPH a una λ de 340 nm.

Metodología: Se preparó una mezcla de reacción con GSSG 1.25 mM, EDTA 0.5 mM, NADPH 0.1 mM y amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.6. La reacción se inició agregando el homogenado (diluido 1:5 con amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.6) a la mezcla de reacción.

Se agitó y la absorbencia se midió a una λ de 340 nm cada minuto durante 3 minutos. El equipo se calibró con amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.6.

7.13 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GST

Fundamento: Las GST juegan un papel fisiológico en la iniciación de la detoxificación de potentes agentes alquilantes, incluyendo compuestos farmacológicos activos. Estas enzimas transfieren el grupo (-SH) del GSH a los compuestos mencionados anteriormente, neutralizando sus sitios activos, y haciendo a los productos más solubles. Los conjugados del GSH se metabolizan más eficientemente por la adhesión de los residuos de glutamato y glicina, seguida de la acetilación del grupo amino libre del residuo de cisteína, para producir finalmente ácido mercaptúrico. Estos, es decir, los derivados S-alkilados de N-acetilcisteína, son excretados con mayor facilidad (Habig et al., 1974). La actividad de la GST se cuantifica mediante la medición de la conjugación de CDNB con el GSH, el cual es reducido en dicha reacción. La conjugación se evidencia por un aumento en la absorbencia a una λ de 340 nm. La tasa de aumento del CDNB-GSH es directamente proporcional a la actividad de la GST en la muestra.

Metodología: Se inició la reacción enzimática al poner en contacto la mezcla de reacción (amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 6.5, GSH 0.1 M y CDNB 0.02 M) con el homogenado de la muestra. Se midió la absorbencia a una λ de 340 nm cada minuto durante 3 minutos. El espectrofotómetro se calibró con mezcla de reacción y H₂O en lugar de muestra.

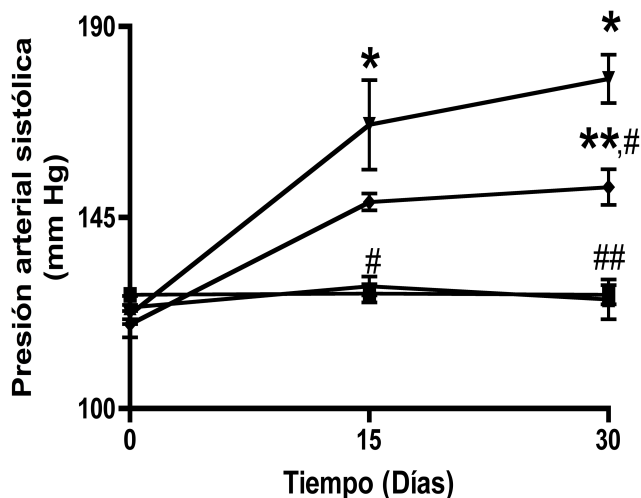
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron utilizando el *software* GraphPad Prism versión 4 (GraphPad Software Inc.) usando la prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media. Las diferencias se consideraron significativas con valores de $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1 EFECTO DE LA CURCUMINA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA

La dosis administrada de curcumina contrarrestó el aumento de la presión arterial sistólica en el grupo de Nx 5/6 + 60 mg de curcumina (grupo 4) con respecto al grupo Nx 5/6 + vehículo (Grupo 3) (Gráfica 1). A los 15 días, en el grupo 4 el cambio en la presión no fue significativo con respecto al grupo Sim + vehículo (grupo 1), tampoco cuando se compara con el grupo 3, mientras que a los 30 días se observó diferencia significativa con respecto al grupo 1 y al grupo 3 (Gráfica 1). El grupo 1 y el grupo 2, que corresponden a los grupos simulados no presentaron variaciones de la presión arterial sistólica durante todo el tratamiento. El grupo 3 y 4 desarrollaron hipertensión desde los 15 días (significativamente diferente en el caso del grupo 3 con respecto al grupo 1) y hasta el final del experimento (significativamente diferentes entre los grupos 3 y 4 con respecto al grupo 1), aunque para el caso del grupo 4 este aumento de PAS fue menor con respecto al grupo 3, como se puede observar en la gráfica 1.

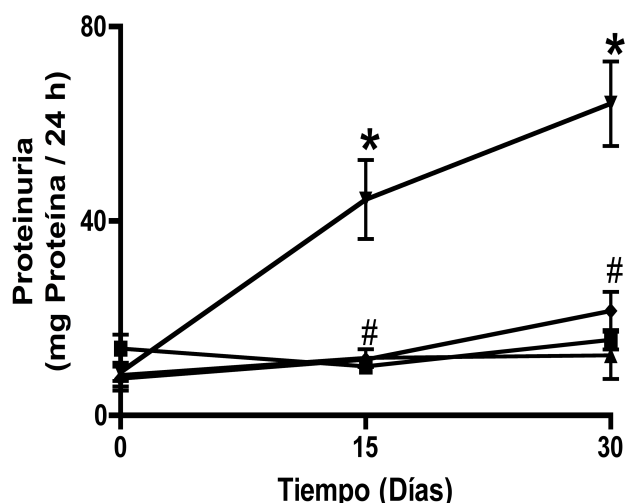


Gráfica 1. Registro de la presión arterial sistólica (mm Hg). Grupos: (■) Grupo 1. Sim + vehículo, (▲) Grupo 2. Sim + 60 mg curcumina, (▼) Grupo 3. Nx 5/6 + vehículo, (◆) Grupo 4. Nx 5/6 + 60 mg curcumina. Los datos representan el promedio \pm SEM de 6 experimentos. * $p < 0.001$ vs Sim + vehículo, ** $p < 0.01$ vs Sim + vehículo, # $p < 0.001$ vs Nx 5/6 + vehículo y ## $p < 0.01$ vs Nx 5/6 + vehículo.

Con base a los datos anteriores podemos concluir que la administración de la curcumina a la dosis de 60 mg en ratas con IRC debido a la Nx 5/6 disminuyó la hipertensión de forma notable, desde los 15 días y hasta el final del tratamiento cuando se compara el grupo 4 con respecto al grupo 3.

9.2 EFECTO DE LA CURCUMINA SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA DE PROTEÍNAS

En la gráfica 2 se observa que la proteinuria en el grupo 1 no presentó variaciones significativas durante el tratamiento, al igual que en el grupo 2. La administración de la curcumina en el grupo 4 disminuyó significativamente la excreción urinaria de proteínas a valores similares a los del grupo 1 durante los 30 días de evolución de la Nx 5/6 (Gráfica 2). En cuanto al grupo 3, al cual se le provocó IRC por Nx 5/6 presentó un aumento de proteinuria (significativamente diferente frente al grupo 1) a partir de los 15 días (44.41 mg proteína/ 24 h vs 10.07 mg proteína/ 24 h) y hasta el final del experimento (64.15 mg proteína/ 24 h vs 15.54 mg proteína/ 24 h) como se observa en la gráfica 2.

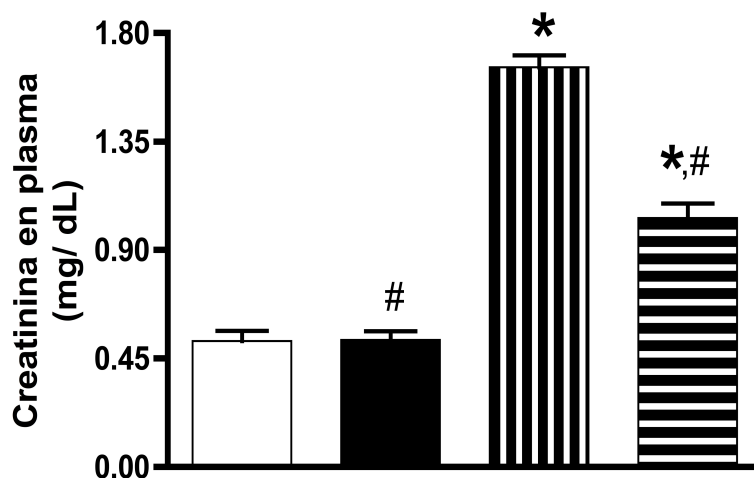


Gráfica 2. Determinación de proteinuria. Grupos: (■) Grupo 1. Sim + vehículo, (▲) Grupo 2. Sim + 60 mg curcumina, (▼) Grupo 3. Nx 5/6 + vehículo, (◆) Grupo 4. Nx 5/6 + 60 mg curcumina. Los datos representan el promedio \pm SEM de 6 experimentos. * $p < 0.001$ vs Sim + vehículo y # $p < 0.001$ vs Nx 5/6 + vehículo. Este método está basado en Henry et al. (1956) con TCA al 12.5%.

Estos resultados demuestran que la administración de la curcumina (60 mg/kg de rata/día) en el modelo de Nx 5/6 disminuye la presencia de proteínas en orina, por lo tanto este antioxidante tiene un efecto positivo evitando la proteinuria en la IRC originada por la Nx 5/6.

9.3 DETERMINACIÓN DE LA CREATININA EN PLASMA

Como siguiente objetivo, fue determinar la función renal, y la creatinina es un marcador de esta, debido a que esta molécula nitrogenada no proteica se filtra libremente al glomérulo, pero no es excreta ni reabsorbida por los túbulos renales y, además, no se elimina por otra vía de excreción. Por lo que un aumento en el torrente sanguíneo es un indicador de una disfunción en el sistema renal.



Gráfica 3. Concentración de creatinina en plasma a los 30 días de evolución de la Nx 5/6. Grupos: (□) Grupo 1. Sim + vehículo, (■) Grupo 2. Sim + 60 mg curcumina, (▤) Grupo 3. Nx 5/6 + vehículo, (▥) Grupo 4. Nx 5/6 + 60 mg curcumina. Los datos representan el promedio \pm SEM de 6 experimentos. * $p < 0.001$ vs Sim + vehículo y # $p < 0.001$ vs Nx 5/6 + vehículo.

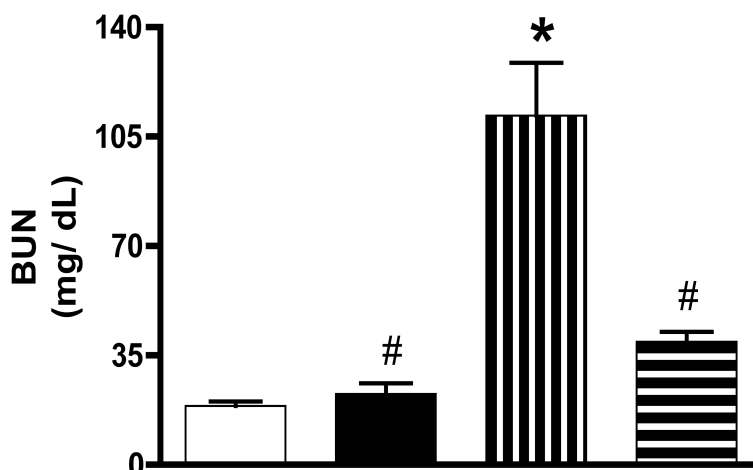
En la gráfica 3 podemos observar que la administración de la curcumina a la dosis de 60 mg/kg de rata/día, en las ratas del grupo 4 presentan una disminución en los niveles de creatinina en plasma (1.033 ± 0.059 mg/dL). Dicho grupo (Nx 5/6 + 60 mg de curcumina) presentó diferencias significativas con respecto al grupo 3 (1.658 ± 0.049 mg/dL) y al grupo 1 (0.523 ± 0.041 mg/dL); mientras que el grupo 2 presentó valores similares de la creatinina en plasma (0.527 ± 0.037 mg/dL) al del grupo 1. A partir de esto, podemos observar que la administración de curcumina en el grupo 4 disminuye la concentración de la creatinina en plasma, lo cual indica que se previene el mal funcionamiento de los túbulos renales y por lo tanto la hay un beneficio directo sobre la función renal.

9.4 DETERMINACIÓN DEL BUN

El BUN en plasma al igual que la creatinina son básicamente productos de desecho, por lo que la presencia de estos compuestos en altas concentraciones en plasma indican que la función renal está alterada.

Los niveles del BUN del grupo 4 tratado con curcumina (39.333 ± 3.169 mg/dL) no son diferentes a los del grupo 1 (18.833 ± 1.447 mg/dL) y disminuyeron significativamente frente al grupo 3 (111.667 ± 17.015 mg/dL), como se puede observar en la gráfica 4. El mismo efecto se observa para el grupo 2 (22.667 ± 3.412 mg/dL), donde no hay diferencia con respecto al grupo 1. En el caso del grupo 3 hay un incremento del BUN en plasma (111.667 ± 17.015 mg/dL) a los 30 días de evolución en las ratas con IRC originada por Nx 5/6, y por lo tanto una alteración de la función renal. Por otro lado se puede decir que la administración

de la curcumina (60 mg/kg de rata/día) presenta un efecto renoprotector frente a la IRC originada por la Nx 5/6 (grupo 3) debido a la disminución en la liberación del BUN en plasma.



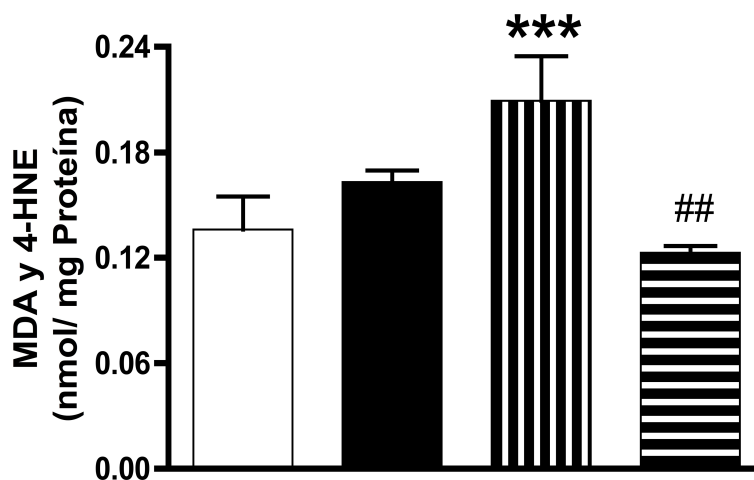
Gráfica 4. Concentración de nitrógeno ureico en plasma (BUN) a los 30 días de evolución de la Nx 5/6. Grupos: (□) Grupo 1. Sim + vehículo, (■) Grupo 2. Sim + 60 mg Curcumina, (▨) Grupo 3. Nx 5/6 + vehículo, (▩) Grupo 4. Nx 5/6 + 60 mg curcumina. Los datos representan el promedio \pm SEM de 6 experimentos. * $p < 0.001$ vs Sim + vehículo y # $p < 0.001$ vs Nx 5/6 + vehículo.

9.5 DETERMINACIÓN DEL MDA Y DEL 4-HNE

El MDA y el 4-HNE son productos tóxicos generados de la peroxidación de lípidos, por lo que la concentración elevada de estas moléculas en la célula son un indicador del estrés oxidante en donde se encuentran estos compuestos.

En la gráfica 5 se observa un nivel más alto y significativamente diferente del MDA y del 4-HNE en los riñones del grupo 3 (0.200 ± 0.023 nmol/mg de proteína) respecto a los riñones del grupo 1 (0.150 ± 0.019 nmol/mg de proteína). Los valores de las ratas tratadas con 60 mg de curcumina/kg de rata/día del grupo 4

dieron el siguiente resultado: 0.130 ± 0.011 nmol/mg de proteína, estos datos son significativamente diferentes respecto a los valores del grupo 3 (0.200 ± 0.023 nmol/mg de proteína) e iguales con respecto al grupo 1 (0.150 ± 0.019 nmol/mg de proteína). En lo que respecta a los valores del grupo 2 se obtuvo un valor de 0.160 ± 0.008 nmol/mg de proteína el cual no es significativamente diferente respecto a los valores del grupo 1 (0.150 ± 0.019 nmol/mg de proteína). Estos resultados demuestran que la curcumina, en una dosis de 60 mg/kg de rata/día, previene el aumento del MDA y del 4-HNE causado por el daño producido por la Nx 5/6. Este daño es originado principalmente como consecuencia en un incremento de las ROS (como se puede ver en el aumento de la actividad enzimática de la CAT, SOD, etc. en presencia de curcumina), las cuales reaccionan con los lípidos presentes en la célula para generar MDA y 4-HNE entre otros productos.

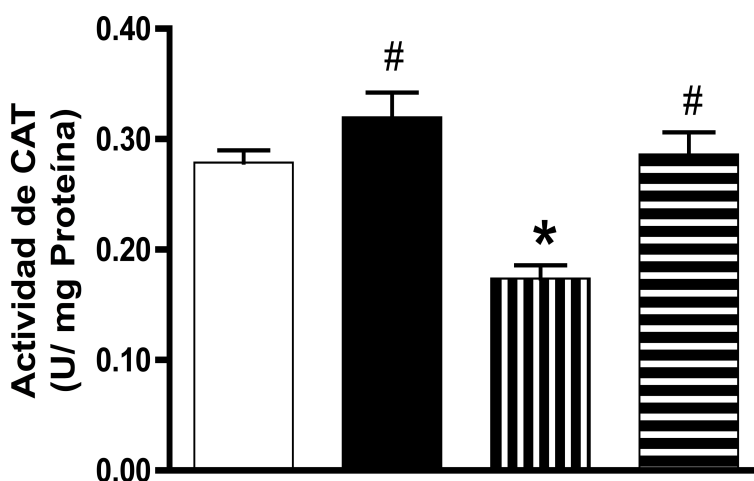


Gráfica 5. Concentración del MDA y del 4-HNE en el riñón remanente a los 30 días de evolución de la Nx 5/6. Grupos: (□) Grupo 1. Sim + vehículo, (■) Grupo 2. Sim + 60 mg curcumina, (▨) Grupo 3. Nx 5/6 + vehículo, (▩) Grupo 4. Nx 5/6 + 60 mg curcumina. Los datos representan el promedio \pm SEM de 6 experimentos. *** $p < 0.05$ vs Sim + vehículo y ## $p < 0.01$ vs Nx 5/6 + vehículo.

9.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CAT

La CAT es una enzima que reduce el H_2O_2 en H_2O y O_2 . La determinación enzimática a los 30 días permitió observar la respuesta de esta enzima frente al estrés oxidante generado por la Nx 5/6 en ratas.

En la gráfica 6 se observa un claro descenso en la actividad enzimática de la CAT en los riñones del grupo 3 (0.171 ± 0.013 U/mg de proteína) con respecto a los riñones del grupo 1 (0.279 ± 0.010 U/mg de proteína). La actividad enzimática en los riñones nefrectomizados del grupo 4 presentan una recuperación (0.285 ± 0.020 U/mg de proteína) frente al grupo 3 (0.171 ± 0.013 U/mg de proteína) y valores similares a los del grupo 1 (0.279 ± 0.01 U/mg de proteína).

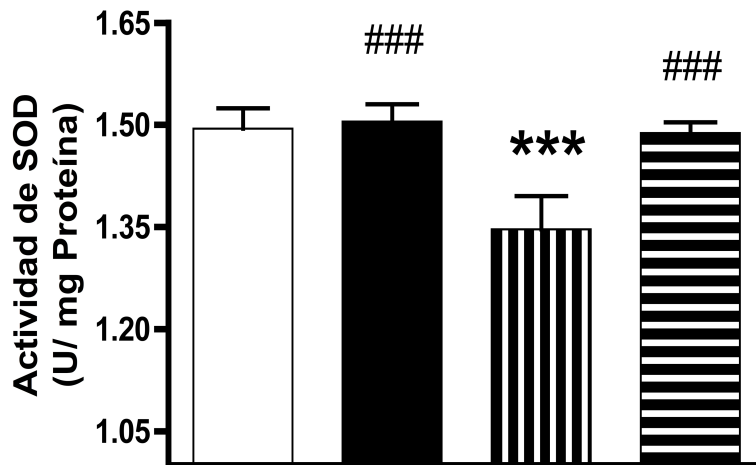


Gráfica 6. Actividad enzimática de la CAT en el riñón remanente a los 30 días de evolución de la Nx 5/6. Grupos: (□) Grupo 1. Sim + vehículo, (■) Grupo 2. Sim + 60 mg Curcumina, (▨) Grupo 3. Nx 5/6 + vehículo, (▩) Grupo 4. Nx 5/6 + 60 mg curcumina. Los datos representan el promedio \pm SEM de 6 experimentos. * $p < 0.001$ vs Sim + vehículo y # $p < 0.001$ vs Nx 5/6 + vehículo.

Para el caso del grupo 2 se observa un incremento en la actividad de la CAT (0.319 ± 0.022 U/mg de proteína) aunque no es diferente con respecto al grupo 1 (0.279 ± 0.010 U/mg de proteína). Esto demuestra que la administración de curcumina en la Nx 5/6 aumenta la actividad enzimática de la CAT, lo que no ocurre en ausencia de este antioxidante en el modelo experimental, sugiriendo una posible inducción de la CAT y de otros genes de la fase II.

9.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SOD TOTAL

La SOD cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ (altamente citotóxico) en O_2 y H_2O_2 , por lo que es una importante defensa antioxidante frente a las ROS generadas por el estrés oxidante. En la gráfica 7 se observa un nivel más bajo y significativamente diferente de la actividad enzimática de la SOD total en los riñones remanentes del grupo 3 (1.347 ± 0.049 U/mg de proteína) con respecto al grupo 1 (1.495 ± 0.030 U/mg de proteína). Los niveles del grupo 4, tratados con 60 mg de curcumina/kg de rata/día presentaron una actividad enzimática de 1.488 ± 0.0158 U/mg de proteína, estos datos son significativamente diferentes respecto a los riñones del grupo 3 (1.347 ± 0.049 U/mg de proteína) e iguales con respecto al grupo 1 (1.495 ± 0.030 U/mg de proteína). En lo que respecta a la actividad enzimática de los riñones del grupo 2 se obtuvo un resultado de 1.505 ± 0.025 U/mg de proteína el cual no es diferente significativamente respecto al grupo 1 (1.495 ± 0.030 U/mg de proteína). Esto demuestra, que la administración de curcumina previno la disminución de la actividad enzimática de la SOD en la IRC originada por la Nx 5/6.

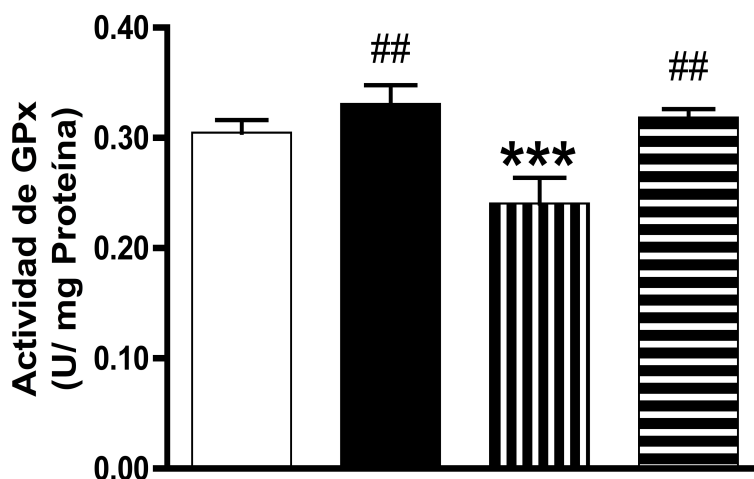


Gráfica 7. Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) en el riñón remanente a los 30 días de evolución de la Nx 5/6. Grupos: (□) Grupo 1. Sim + vehículo, (■) Grupo 2. Sim + 60 mg curcumina, (▨) Grupo 3. Nx 5/6 + vehículo, (▩) Grupo 4. Nx 5/6 + 60 mg curcumina. Los datos representan el promedio \pm SEM de 6 experimentos. *** $p < 0.05$ vs Sim + vehículo y ### $p < 0.05$ vs Nx 5/6 + vehículo.

9.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GPX

La GPx cataliza la descomposición del H_2O_2 o de otros peróxidos orgánicos en H_2O , por lo que se le considera parte importante de la defensa que tiene la célula para neutralizar las ROS generadas en la Nx 5/6. En la gráfica 8 se observa que la actividad enzimática de la GPx del grupo 4 se mantuvo con la administración vía orogástrica de la curcumina (60 mg/kg de rata/día) en 0.319 ± 0.008 U/mg de proteína, debido a que presentó valores similares al grupo 1 (0.305 ± 0.011 U/mg de proteína) pero es significativamente diferente con respecto al grupo 3 (0.258 ± 0.020 U/mg de proteína). Para el caso del grupo 2 presentó una mayor actividad enzimática (0.331 ± 0.017 U/mg de proteína) con respecto al grupo 1, aunque dicha diferencia no es significativa.

Estos resultados demuestran que la administración de curcumina aumenta la actividad enzimática de la GPx frente al daño causado por Nx 5/6 (comparando el grupo 4 vs grupo 3 de la gráfica 8). Esto se debe a que en este modelo hay una pérdida de la capacidad antioxidante por parte de la célula y un aumento en la producción de las ROS (ver grupo 3).

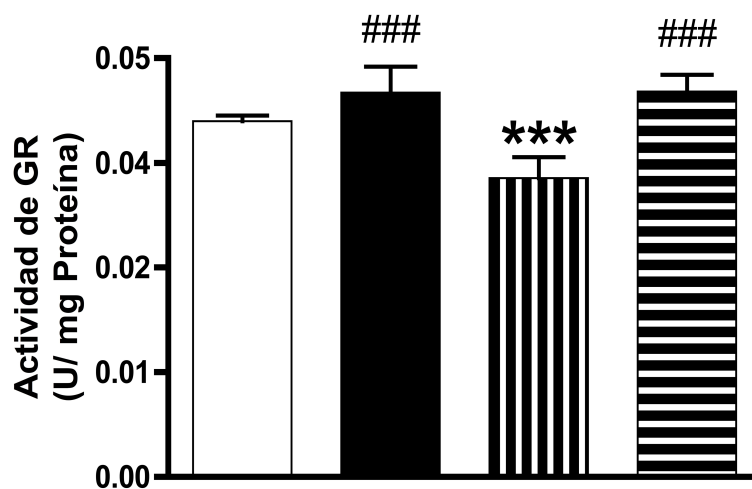


Gráfica 8. Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx) en el riñón remanente a los 30 días de evolución de la Nx 5/6. Grupos: (□) Grupo 1. Sim + vehículo, (■) Grupo 2. Sim + 60 mg curcumina, (▨) Grupo 3. Nx 5/6 + vehículo, (▩) grupo 4. Nx 5/6 + 60 mg curcumina. Los datos representan el promedio \pm SEM de 6 experimentos. *** $p < 0.05$ vs Sim + vehículo y ## $p < 0.01$ vs Nx 5/6 + vehículo.

9.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GR

La GR es una enzima que requiere NADPH y que cataliza la conversión de GSSG a GSH. Es esencial para mantener los niveles adecuados de GSH, el cual sirve como un antioxidante endógeno que reacciona con radicales libres y peróxidos orgánicos, y también es sustrato de la GPx y de la GST durante la detoxificación celular. En la gráfica 9 se puede observar que el grupo 2 tiene un aumento en la

actividad enzimática de 0.043 ± 0.003 U/mg de proteína con respecto al grupo 1 (0.041 ± 0.001 U/mg de proteína), aunque dicho aumento no es significativo. Para el caso del grupo 3 se observa un descenso significativo en la actividad enzimática (0.034 ± 0.002 U/mg de proteína) con respecto al grupo 1. También se observa diferencia significativa en la comparación entre los grupos 3 y 4 (0.044 ± 0.002 U/mg de proteína), al cual se le administró curcumina después de la Nx 5/6.



Gráfica 9. Actividad enzimática de glutatión reductasa (GR) en el riñón remanente a los 30 días de evolución de la Nx 5/6. Grupos: (□) Grupo 1. Sim + vehículo, (■) Grupo 2. Sim + 60 mg curcumina, (▤) Grupo 3. Nx 5/6 + vehículo, (▥) Grupo 4. Nx 5/6 + 60 mg curcumina. Los datos representan el promedio \pm SEM de 6 experimentos. *** $p < 0.05$ vs Sim + Vehículo y ### $p < 0.05$ vs Nx 5/6 + vehículo.

Observando estos resultados se puede decir, que la Nx 5/6 disminuye la actividad enzimática de GR debido al daño causado por dicho modelo experimental y que la administración orogástrica de curcumina aumentó la actividad de esta enzima ver grupos 2 (en este caso, es extremadamente sugestivo que la curcumina induce a

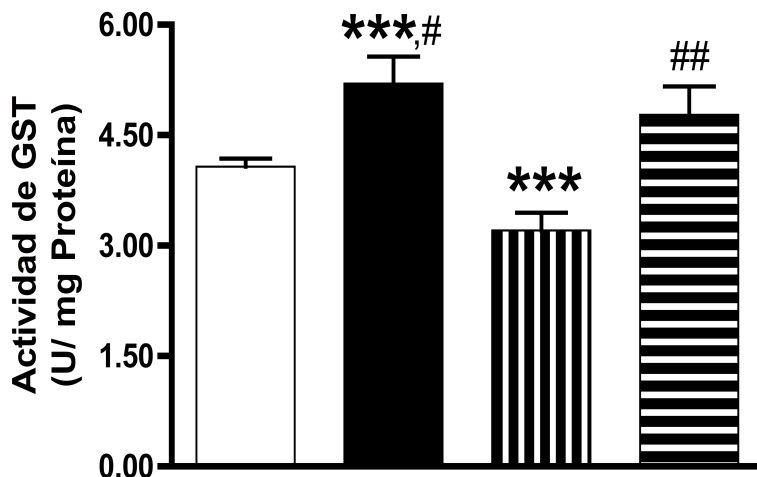
la GR) y 4. Sugiriendo que la GR regenera el GSH que reacciona con los radicales libres presentes en la IRC.

9.10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GST

La GST transfiere el grupo (-SH) del GST a potentes agentes alquilantes incluyendo compuestos farmacológicos activos, neutralizando así sus sitios activos, y haciendo los productos más solubles para ser excretados. En la gráfica 10 se observa que los niveles de la actividad enzimática de la GST en los riñones del grupo 3 (3.208 ± 0.240 U/mg de proteína) presenta un descenso significativo con respecto al grupo 1 (4.073 ± 0.108 U/mg de proteína). Mientras que el grupo 4 presenta un incremento en la actividad enzimática (4.778 ± 0.384 U/mg de proteína) a valores iguales al grupo 1 y diferentes del grupo 3 (Nx 5/6 + vehículo). Por lo que la administración de la curcumina aumento la actividad enzimática de la GST en la Nx 5/6. Para el caso del grupo 2 se observa un incremento en la actividad de la GST (5.204 ± 0.364 U/mg de proteína) con respecto al grupo 1, dicho incremento en la actividad es significativo. Por lo que resaltan 2 puntos: a) la presencia de curcumina en el modelo de Nx 5/6 previene la disminución de la actividad enzimática de la GST y b) la administración de curcumina en ratas sin Nx 5/6 aumenta significativamente la actividad enzimática de la GST.

Por lo que el efecto de la curcumina sobre la Nx 5/6 no sólo radica en su capacidad directa de atrapar ROS directamente, sino que manifiesta un incremento de la actividad enzimática de la GST; lo cual sugiere el potencial

bifuncional de la curcumina, como antioxidante directo e indirecto en nuestro modelo estudiado.



Gráfica 10. Actividad enzimática de la glutatión-S-transferasa (GST). Grupos: (□) Grupo 1. Sim + vehículo, (■) Grupo 2. Sim + 60 mg curcumina, (▨) Grupo 3. Nx 5/6 + vehículo, (▩) Grupo 4. Nx 5/6 + 60 mg curcumina. Los datos representan el promedio \pm SEM de 6 experimentos. *** $p < 0.05$ vs Sim + Vehículo, # $p < 0.001$ vs Nx 5/6 + vehículo, y ## $p < 0.01$ vs Nx 5/6 + vehículo.

10. DISCUSIÓN

En este trabajo se encontró que el tratamiento con curcumina (60 mg/kg de rata/día) atenuó la hipertensión, la proteinuria, la disfunción renal, el estrés oxidante (niveles de MDA y de 4-HNE) y favoreció el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx, GR y GST durante la Nx 5/6.

La dosis empleada se seleccionó de acuerdo a estudios realizados por Kuhad et al. (2007) quienes emplearon 15, 30 y 60 mg de curcumina/kg de rata administrada vía oral durante 5 días protegió de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. Aunque también se ha reportado que 100 mg de curcumina/kg de rata administrada vía oral protege frente al daño causado por cipermetrina (Sankar et al. 2011), mientras que Farombi y Ekor (2006) reportaron protección renal con 200 mg del antioxidante/kg de rata administrada vía oral durante 28 días frente al daño originado por gentamicina. Por lo que existe una amplia gama de dosis utilizadas de curcumina para la protección renal.

Por otra parte, se ha observado que la capacidad antioxidante de la curcumina es responsable de la protección contra el daño inducido por la Nx 5/6; y en los otros modelos, ya que se ha demostrado que la curcumina es una molécula muy reactiva frente a una variedad de las ROS como el $O_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet} (Reddy y Lokesh, 1994) y radicales de nitrógeno (Sreejayan y Rao, 1997; Unnikrishnan y Rao, 1995). También, otro de los mecanismos que se han establecido para la curcumina, es su capacidad de inducir la expresión de enzimas citoprotectoras de fase 2 al activar el factor transcripcional Nrf2 (Dinkova-Kostova y Talalay, 1999);

Nishinaka et al. (2007) demostraron que en células HepG2 tratadas con curcumina se induce la expresión de GST P1, donde los niveles de ARNm de GST P1 se incrementaron significativamente, lo que sugiere que el antioxidante tiene funciones protectoras en estas células hepáticas por su capacidad de inducir las enzimas citoprotectoras.

En estudios previos del modelo de Nx 5/6 se han descrito varias alteraciones, entre las que se encuentran hipertensión, proteinuria, estrés oxidante, inflamación, elevación de productos de peroxidación en plasma, disminución de la capacidad antioxidante por parte de la célula (Quiroz et al., 2008; Ghosh et al., 2009; Kim y Vaziri, 2010; Varizi et al., 2003; Shimizu et al., 2005). En nuestro modelo, la disfunción renal se hizo evidente por la hipertensión (gráfica 1), la proteinuria elevada (gráfica 2), los niveles de creatinina y del BUN elevados en plasma (gráfica 3 y 4), así como un aumento del 4-HNE y del MDA productos de la lipoperoxidación en el riñón remanente (gráfica 5), consecuencia de la Nx 5/6 (grupo 3), lo que validó nuestro estudio. Importante es resaltar que la administración de 60 mg de curcumina evitó el aumento de la PAS en el modelo de Nx 5/6 (gráfica 1). Por lo que el uso de este antioxidante en patologías emergentes como la IRC, la diabetes y la hipertensión podría llegar a ser una alternativa para atenuar el aumento de la presión arterial en dichas enfermedades. Es importante mencionar también que el estrés oxidante en IRC es causado por una combinación en la producción excesiva de ROS y pérdida de la capacidad antioxidante endógena. Se ha descrito un aumento significativo en la producción de NAD(P)H oxidasa, que es una fuente importante de las ROS, esto sugiere un

papel muy importante en el daño sobre el riñón remanente y en el tejido cardiovascular en ratas con Nx 5/6 (Quiroz et al., 2008).

Por otra parte se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD total, GPx, GR y GST y se encontró que la Nx 5/6 *per se* disminuyó la actividad de estas enzimas (grupo 3). El efecto protector de la curcumina frente al estrés oxidante inducido por Nx 5/6 encontrado en este trabajo, es evidente comparando con estudios previos en los que se ha demostrado la capacidad de esta molécula para interferir con procesos oxidantes como la lipoperoxidación de las membranas celulares (Sankat et al., 2011). Además, se observó que la actividad de las enzimas antioxidantes evaluadas en el grupo 4 (Nx 5/6 + 60 mg de curcumina): CAT (gráfica 6), SOD total (gráfica 7), GPx (gráfica 8), GR (gráfica 9) y GST (gráfica 10) se preservaron, lo que probablemente contribuyó a la protección de la función renal y del estrés oxidante inducido por Nx 5/6.

El GSH es el antioxidante endógeno mas abundante en las células eucarióticas y es un compuesto importante en la regulación del estado redox de la célula; el GSH mantiene el estado redox celular y afecta la señalización redox, la proliferación y la muerte celular, el GSH también ejerce una potente acción antioxidante directamente eliminando las ROS y sirviendo como sustrato en reacciones catalizadas por una serie de enzimas antioxidantes como la GPx y la GST. Es importante señalar que la inhibición selectiva de las enzimas del ciclo redox del glutati6n aumenta la susceptibilidad a la lesi6n celular mediada por las ROS, y en muchos estados patol6gicos como la aterosclerosis, la diabetes, enfermedad hepática e infartos, dichas enfermedades est1n asociados con niveles elevados de

GSSG y niveles disminuidos de GSH (Vaziri et al., 2003). Aunque en nuestro estudio no se cuantificó la cantidad de GSH en el tejido renal directamente, se puede plantear la hipótesis de que la curcumina mantuvo los niveles de GSH en la célula, donde el antioxidante administrado reaccionó con los radicales libres generados por la Nx 5/6 (gráfica 5) y así se evitó la disminución del GSH, por lo que este antioxidante endógeno se mantuvo constante como sustrato para las enzimas GPx y GST (gráfica 8 y 10). Las cuales tienen como función catalizar la reducción de H_2O_2 a H_2O y conjugan el GSH con electrófilos respectivamente, y de esta manera eliminarlos y prevenir el efecto tóxico de las ROS sobre las moléculas funcionales y estructurales, y así, el aumento en la actividad de estas enzimas pudo haber contribuido al efecto renoprotector de la curcumina en el modelo de Nx 5/6.

En resumen, los hallazgos anteriores sugieren que la curcumina indujo la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD total, GPx, GR y GST lo cual ayudó a atenuar la disfunción renal, la hipertensión y el estrés oxidante originados por la Nx 5/6.

11. CONCLUSIÓN

La curcumina, a una dosis de 60 mg/kg/día, ejerció un efecto renoprotector y antihipertensivo en la IRC originada por la Nx 5/6. La curcumina evitó el aumento de la presión arterial sistólica, la proteinuria, la creatinina y el BUN en plasma que se presentan en la Nx 5/6. Dicha protección se asoció con la prevención del estrés oxidante (medido como niveles de MDA y de 4-HNE) y e la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD total, GPx, GR y GST en el riñón remanente.

12. PERSPECTIVAS

Se ha planteado que la curcumina induce la expresión de enzimas antioxidantes de la fase 2 de detoxificación. Aunque en nuestro trabajo solo se evaluó la funcionalidad de estas enzimas y la actividad del antioxidante de forma directa, logramos observar que la actividad de la GST fue significativamente superior en el grupo 2 (donde solo se les administró curcumina) al grupo control y en la mayoría de los casos hubo una tendencia de aumento para las demás pruebas de actividad enzimática lo que sugiere una posible inducción de las enzimas citoprotectoras, y aun no se ha reportado hasta ahora si la curcumina induce dichas enzimas en el modelo de Nx 5/6, por lo que, sería muy importante investigar si esta molécula induce protección a través de la inducción de las enzimas evaluadas y actuando como antioxidante indirecto. Y por lo tanto así aclarar si la actividad enzimática esta mediada por la inducción de nuevas enzimas o por el efecto directo que la curcumina ejerció en la Nx 5/6.

También sería importante realizar estudios en pacientes con IRC para evaluar si tiene la capacidad de disminuir la progresión o magnitud del daño renal y algunas alteraciones asociadas al estrés oxidante.

13. REFERENCIAS

Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol 105:121-6

Amato D, Álvarez-Aguilar C, Castañeda-Limones R, Rodríguez E, Ávila-Díaz M, Arreola F, Gómez A, Ballesteros H, Becerril R, Paniagua R. 2005. Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population. Kidney Int Suppl 97:S11-7.

Correa-Rotter R, Cusumano AM. 2008. Present, prevention, and management of chronic kidney disease in Latin America. Blood Purif 26:90-4.

Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. 1982. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. N Engl J Med 307:652-9.

Bidani AK, Griffin KA, Bakris G, Picken MM. 2000. Lack of evidence of blood pressure-independent protection by renin-angiotensin system blockade after renal ablation. Kidney Int 57:1651-61.

Carlberg I, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. J Biol Chem 250:5475-80.

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 Res 1282:133-41.

Cohly HH, Taylor A, Angel MF, Salahudeen AK. 1998. Effect of turmeric, turmerin and curcumin on H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury. *Free Radic Biol Med* 24:49-54.

Cruz C, Correa-Rotter R, Sánchez-González DJ, Hernández-Pando R, Maldonado PD, Martínez-Martínez CM, Medina-Campos ON, Tapia E, Aguilar D, Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. 2007. Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F1691-8.

Dikshit M, Rasgoti L, Shukla R, Srimal RC. 1995. Prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin and quinidine in the cat heart. *Indian J Med Res* 101:31-5.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P. 1999. Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 20:911-4.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P. 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1:S128-38.

Doedhar SD, Sethi R, Srimal RC. 1980. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloylmethane). *Indian J Med Res* 71:632-4.

Dworkin DL, Feiner HD. 1986. Glomerular injury in uninephrectomized spontaneously hypertensive rats. A consequence of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 77:797-809.

Farombi EO, Ekor M. 2006. Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 44:1443-8.

Ghosh SS, Massey HD, Krieg R, Fazelbhoj ZA, Ghosh S, Sica DA, Fakhry I, Gehr TW. 2009. Curcumin ameliorates renal failure in 5/6 nephrectomized rats: role of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F1146-57.

Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. 2008. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 75:787-809.

Griffin KA, Picken M, Bidani AK. 1994. Radiotelemetric BP monitoring, antihypertensives and glomeruloprotection in remnant kidney model. *Kidney Int* 46:1010-8.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-9.

Hahn S, Krieg RJ Jr, Hisano S, Chan W, Kuemmerle NB, Saborino P, Chan JC. 1999. Vitamin E suppresses oxidative stress and glomerulosclerosis in rat remnant kidney. *Pediatr Nephrol* 13:195-8.

Henry RJ, Segalove M, Sobel C. 1956. Turbidimetric determination of proteins with sulfosalicylic and trichloroacetic acids. *Proc Soc Exp Biol Med* 92:748-51.

Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatchalam MA, Brenner BM. 1981. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 241:F85-93.

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* 92:33-8.

Jung D, Biggs H, Erikson J, Ledyard PU. 1975. New colorimetric reaction for end-point, continuous flow and kinetic measurement of urea. *Clin Chem* 21:1136-40.

Klahr S, Morrissey J. 2003. Obstructive nephropathy and renal fibrosis: The role of bone morphogenic protein-7 and hepatocyte growth factor. *Kidney Int* 87: S105–12.

Kim HJ, Vaziri ND. 2010. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F662-71.

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

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.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75.

Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. 2006. Multiple biological activities of curcumina: a short review. *Life Sci* 78:2081-7.

Mesa MD, Ramírez-Tortosa MC, Aguilera CM, Ramírez-Boscá AA. 2000. Pharmacological and nutritional effects of *Curcuma Longa L.* extracts and curcuminoids. *Ars Pharm* 41:307-21.

Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. 1987. Reversing glomerular hypertension stabilizes established glomerular injury. *Kidney Int* 31:752-9.

Modlinger PS, Wilcox CS, Aslam, S. 2004. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Semin Nephrol* 24:354-65.

Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Green CJ. 2000. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 28:1303-12.

Nishinaka T, Ichijo Y, Ito M, Kimura M, Katsuyama M, Iwata K, Miura T, Terada T, Yabe-Nishimura C. 2007. Curcumin activates human glutathione S-transferase P1 expression through antioxidant response element. *Toxicol Lett* 170:238-47.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Oberley LW, Spitz DR. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* 105:457-64.

Osawa T, Sugiyama Y, Inayoshi M, Kawakishi S. 1995. Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids. *Biosci Biotechnol Biochem* 59:1609-12.

Quiroz Y, Ferrebuz A, Romero F, Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. 2008. Melatonin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and progression of renal damage in rats with renal mass reduction. *Am J Physiol Renal Physiol* 294:F336-44.

Paniagua R, Ramos A, Fabian R, Lagunas J, Amato D. 2007 Chronic kidney disease and dialysis in Mexico. *Perit Dial Int* 27:405-9.

Parshad R, Sanford KK, Price FM, Steele VE, Tarone RE, Kelloff GJ, Boone CW. 1998. Protective action of plant polyphenols on radiation-induced chromatid breaks in cultured human cells. *Anticancer Res* 18:3263-6.

Priyadarsini KI. 1997. Free radical reactions of curcumin in membrane models. *Free Radic Biol Med* 23:838-43.

Rao VC, Rivenson A, Simi B, Reddy SB. 1995. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res* 55:259-66.

Reddy AC, Lokesh BR. 1992. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem* 111:117-24.

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.

Romero F, Rodríguez-Iturbe B, Parra G, González L, Herrera-Acosta J, Tapia E. 1999. Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. *Kidney Int* 55:945-55.

Sankar P, Telang AG, Manimaran A. 2011. Protective effect of curcumin on cypermethrin-induced oxidative stress in Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol*, en prensa.

Sharma OP. 1976. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem Pharmacol* 25:1811-2.

Shimizu MH, Coimbra TM, de Araujo M, Menezes LF, Seguro AC. 2005. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. *Kidney Int* 68:2208-17.

Sreejayan N, Rao MN. 1994. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J Pharm Pharmacol* 46:1013-6.

Sreejayan N, Rao MN. 1996. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung* 46:169-71.

Sreejayan N, Rao MNA. 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 49:105-7.

Sugiyama Y, Kawakishi S, Osawa T. 1996. Involvement of the beta-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem Pharmacol* 52:519-25.

Tain YL, Freshour G, Dikalova A, Griendling K, Baylis C. 2007. Vitamin E reduces glomerulosclerosis, restores renal neuronal NOS, and suppresses

oxidative stress in the 5/6 nephrectomized rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1404-10.

Tapia E, Gabbai FB, Calleja C, Franco M, Cermeño JL, Bobadilla NA, Pérez JM, Alvarado JA, Herrera-Acosta J. 1990. Determinants of renal damage in rats with systemic hypertension and partial renal ablation. *Kidney Int* 38:642-8.

Tapia E, Franco M, Sánchez-Lozada LG, Soto V, Ávila-Casado C, Santamaría J, Quiroz Y, Rodríguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J. 2003. Mycophenolate mofetil prevents arteriolopathy and renal injury in subtotal ablation despite persistent hypertension. *Kidney Int* 63:994-1002.

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* 33:1725-8.

Tonnesen HH, Karlsen J. 1985. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z Lebensm Forsch* 180:402-4.

Unnikrishnan MK, Rao MN. 1992. Curcumin inhibits nitrite-induced methemoglobin formation. *FEBS Lett* 301:195-6.

Unnikrishnan MK, Rao MN. 1995. Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin. *Mol Cell Biochem* 146:35-7.

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.

Van den Branden C, Verelst R, Vamecq J, Vanden Houte K, Verbeelen D. 1997. Effect of vitamin E on antioxidant enzymes, lipid peroxidation products and glomerulosclerosis in the rat remnant kidney. *Nephron* 76:77-81.

Vaziri ND. 2004. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13:93-9.

Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. 2003. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int* 63:179-85.

Vaziri ND, Oveisi F, Ding Y. 1998. Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. *Kidney Int* 53:1748-54.

Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. 2006. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:582-93.

Zatz R, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. 1985. Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5963-7.

Zhao BL, Li XJ, He RG, Cheng SJ, Xin WJ. 1989. Scavenging effects of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophys* 14:175-85.