



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
Facultad de Química

EFFECTO PROTECTOR DEL SULFORAFANO
EN LA TOXICIDAD TUBULAR Y LA
INSUFICIENCIA RENAL AGUDA
INDUCIDAS POR GENTAMICINA

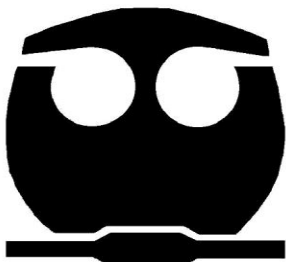
T E S I S

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

P R E S E N T A :

**Q. MARIO FELIPE NEGRETTE
GUZMÁN**

Tutor: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI



MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2012



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.

EFFECTO PROTECTOR DEL SULFORAFANO EN LA TOXICIDAD TUBULAR Y LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDAS POR GENTAMICINA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri en el laboratorio 209, edificio F, 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:

Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dr. Rogelio Hernández Pando	Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán
Dra. María E. Gonsebatt Bonaparte	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración y asesoría de la Dra. Edilia Tapia Rodríguez, del Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología - Ignacio Chávez, en los procedimientos practicados en animales.

Se reconoce la colaboración y asesoría de la Dra. Sara Huerta Yépez, de la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de TUNEL e inmuohistoquímica.

Se reconoce la asesoría técnica del M. en C. Omar Noel Medina Campos en los experimentos de actividades enzimáticas y el manejo de los cultivos celulares.

Esta tesis fue apoyada parcialmente por CONACYT (1298938) y PAPIIT (IN201910). Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT y un crédito educativo condonable otorgado por COLCIENCIAS (Colombia).

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día ____ de septiembre de 2012.

El Jurado de examen de maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Armando Tovar Palacio	Instituto Nacional de Nutrición
Vocal	Dra. María Amanda Gálvez Mariscal	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. José de Jesús García Valdés	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM

“Dijo Dios: Produzcan las aguas seres vivientes, y aves que vuelen sobre la tierra, en la abierta expansión de los cielos.”

Libro de Génesis, capítulo 1, versículo 20, Santa Biblia.

DEDICATORIA

Una vez más...

Al Dios que ilumina mis senderos: porque aún no entiendo las discrepancias que han armado entre la ciencia y Él.

A Edelmira, mi madre, el amor inagotable: sólo gracias a ti, Dios nunca se aleja de mí, a pesar de las discrepancias.

A Miguel, mi padre: parte del aire, parte del tiempo, parte de mí.

A Juan Miguel y Juan Miguel, mi hermano y mi sobrino: porque los quiero y los necesito apuntando siempre hacia adelante.

Y esta vez...

A Scarleth y Helena, mi esposa y mi hija: las mujeres que amo y hacen que ame lo que hago, lo que soy y lo que quiero ser; mi compañera de aventuras y el árbol de madera fina que empezamos a cuidar.

A Juan Mario, mi sobrino: porque también haces parte de este bosque.

A Colombia, mi patria: esa tierra hermosa y desventurada que tanto amo y tanto me hace sufrir.

AGRADECIMIENTOS

A los animales, cuyas vidas abusivamente tomé; espero de la naturaleza y de Dios, el perdón.

A la UNAM, por dejarme ser parte de ella, por enseñarme a hablar con el espíritu, por hacerme sentir más latinoamericano que nunca.

Al Dr. José Pedraza Chaverri, quien me abrió las puertas de su laboratorio y, de paso, las de esta gran institución y esta hermosa nación; muchas gracias por su confianza.

A la Dra. Edilia Tapia Rodríguez, por su valioso aporte a mi formación, que hasta el momento, había sido inanimada.

Al personal del Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología, que me brindaron su confianza, su atención y, en muy buenos casos, su amistad.

A los doctores Rogelio Hernández Pando y María Gonsebatt Bonaparte, por cada crítica, cada comentario y cada minuto que me regalaron en este proceso.

A la Dra. Sara Huerta Yépez, por integrarme tan amablemente a su laboratorio y dejarme aprender su riguroso y eficiente método de trabajo.

A Ana Belén Tirado y su disposición para enseñarme los trucos de las inmunos y el TUNEL.

A Zyanya Lucía Zatarain Barrón, por el tiempo invertido en esta empresa e introducir a un químico en el interesante campo de la histopatología.

Al Dr. Marco Velasco Velásquez, a quién no conozco personalmente, pero que en algún momento de poca claridad me proporcionó luz.

A Lety García, la mujer de todas las respuestas, de la permanente disposición, de la gran sonrisa y, sobre todo, de enorme bendición para mí cuando llegué a esta Máxima Casa de Estudios.

A Guillermo Zarco Márquez, con quién trabajamos muy duro al inicio de esta aventura ¡Lástima que no se dieron las cosas con el cromo!

A mis amigos profesores de la Universidad de Córdoba en Colombia: Yuri Pardo, Robert Paternina, José Luis Marrugo y Miriam Cantero, que de diferentes formas me dieron un impulso para llegar hasta aquí.

A mis amigos Luis Carlos Pérez e Irina Peniche, que me hicieron volver la vista hacia México, y el resultado no ha podido ser mejor.

A la familia Lizarazo Moreno, por los cafés, las comidas, los consejos, el soporte, por ser el “buffer” de nuestra llegada a México, pero sobre todo, por su amistad.

A Adver, Angy, Azalia, Bere, Lalo, Liz, Mariel, Omar, Ramsés, Susana y Tania, que aunque en algún momento, cada uno aportó algo a mi trabajo, eso a todos nos tiene sin cuidado; lo importante es que somos amigos y amigos, que nunca me sentí ajeno con ustedes y que, definitivamente, son una de las mejores razones por las que decidí quedarme en el 209.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	V
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO), ESTRÉS OXIDANTE, DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y MUERTE CELULAR.....	1
1.2. MECANISMOS CELULARES DE DEFENSA ANTIOXIDANTE.....	4
1.2.1. Regulación de la expresión génica de enzimas antioxidantes	4
1.2.2. Algunos de los principales sistemas antioxidantes enzimáticos celulares regulados bajo Nrf2.....	6
1.3. SULFORAFANO (SFN).....	10
1.4. FISIOLÓGÍA RENAL E INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA)	12
1.4.1. Organización estructural del riñón y la nefrona.....	13
1.4.2. Nefrotoxicidad e IRA.....	16
1.5. AMINOGLICÓSIDOS Y NEFROTOXICIDAD: GENTAMICINA (GM)	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS.....	22
4.1. Objetivo general.....	22
4.2. Objetivos Específicos.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1. Materiales.....	23
5.2. Estudio <i>in vitro</i>	24
5.2.1. Cultivos celulares.....	24
5.2.2. Diseño experimental.....	25
5.2.3. Viabilidad celular.....	25
5.3. Estudio <i>in vivo</i>	26
5.3.1. Animales y tratamiento	26
5.3.2. Diseño experimental.....	26
5.3.3. Muestras.....	28

5.3.4. Evaluación de la función renal.....	29
5.3.5. Histopatología renal.....	31
5.3.6. Detección y cuantificación de apoptosis.....	31
5.3.7. Evaluación inmunohistoquímica del daño por estrés oxidante/nitrante y de la proliferación celular (3-NT y PCNA).....	32
5.3.8. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes.....	33
5.4. Análisis estadístico.....	35
6. RESULTADOS.....	35
6.1. Estudio <i>in vitro</i>	35
6.1.1. El SFN incrementa la reducción de MTT y protege las células LLC- PK1 de la muerte inducida por GM.....	35
6.2. Estudio <i>in vivo</i>	36
6.2.1. El tratamiento con SFN atenúa la disfunción y el daño renal inducidos por GM en ratas	37
6.2.2. El tratamiento con SFN disminuye las alteraciones histológicas renales inducidas por GM	39
6.2.3. El SFN reduce la muerte tubular apoptótica inducida por GM en ratas	41
6.2.4. El SFN disminuye la nitración de proteínas inducida por GM en ratas.....	41
6.2.5. La actividad de las enzimas CAT y GPx se preserva parcialmente en ratas tratadas con GM y SFN.....	44
6.2.6. El SFN aumenta la tasa de regeneración tubular en riñón de ratas nefrotóxicas tratadas con GM.....	45
7. DISCUSIÓN.....	45
8. CONCLUSIONES.....	49
9. PERSPECTIVAS.....	51
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

ABREVIATURAS

3-NT	3-nitrotirosina
AB	Antibiótico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de varianza
AP-1	Proteína activadora-1
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASB	Albúmina sérica bovina
ATP	Trifosfato de adenosina
Bax	Proteína X asociada a Bcl2
Bcl2	Linfoma de célula B 2
BM	Biogénesis mitocondrial
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
Ca	Calcio
CaSR	Receptor sensible a calcio extracelular
CAT	Catalasa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
CT	Grupo de células/ratas control
CTE	Cadena de transporte de electrones
Cu	Cobre
Cu⁺	Ion cuproso
Cu, Zn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc
CYP	Citocromo P450
Cyt c	Citocromo c
DAB	3,3'-diaminobencidina
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle Medium"
DMSO	Dimetilsulfóxido

dUTP	Trifosfato de desoxiuridina
EAO	Enzimas antioxidantes
EC	Comisión enzimática
EC-SOD	Superóxido dismutasa extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Fe	Hierro
Fe²⁺	Ion ferroso
Fe³⁺	Ion férrico
GM	Gentamicina - Grupo de células/ratas tratadas sólo con gentamicina
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S-transferasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HO	Hemo oxigenasa
HO-1	Hemo oxigenasa-1
HO[·]	Radical hidroxilo
HRP	Peroxidasa de rábano
H&E	Hematoxilina y eosina
IHQ	Inmunohistoquímica
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP	Intraperitoneal
IRA	Insuficiencia renal aguda
ITC	Isotiocianato
Keap1	Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch

LLC-PK1	“Lily Laboratory Culture Porcine Kidney”
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
Mn	Manganeso
Mn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAG	N-acetil-β,D-glucosaminidasa
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NDGA	Ácido nordihidroguayarático
NF-κB	Factor nuclear kappa B
Ni	Níquel
NO[•]	Óxido nítrico
NQO-1	NAD(P)H:quinona oxidoreductasa
Nrf1, NRF-1	Factor nuclear respiratorio 1
Nrf2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2
O₂	Dioxígeno
O₂^{•-}	Anión superóxido
ONOO⁻	Anión peroxinitrito
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PMM	Potencial de membrana mitocondrial
Prx	Peroxiirredoxina
RO[•]	Radical alcoxilo
ROO[•], RO₂[•]	Radical peroxilo
ROOH	Hidroperóxido orgánico
S₁-S₂	Segmento contorneado del túbulo proximal
S₃	Segmento recto del túbulo proximal
SC	Subcutáneo
SFB	Suero fetal bovino

SFN	Sulforafano - Grupo de células/ratas tratadas sólo con sulforafano
SFN+GM	Grupo de células/ratas co-tratadas con sulforafano y gentamicina
SNC	Suero normal de cerdo
SOD	Superóxido dismutasa
SSI	Solución salina isotónica
TCA	Ácido tricloroacético
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal
TPM	Transición de permeabilidad mitocondrial
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina reductasa
TUNEL	Marcaje de extremos de “nicks” con dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal
UDP	Difosfato de uridina
UPR	Respuesta a proteínas no plegadas
γGCL	Gamma glutamilcisteinaligasa
Zn	Zinc

RESUMEN

Antecedentes: El principal efecto colateral del antibiótico gentamicina (GM) es la nefrotoxicidad. La insuficiencia renal aguda (IRA) inducida por GM ha alcanzado una incidencia de hasta un 25% de casos clínicos, limitando en gran medida su uso y eficacia. La IRA inducida por GM es mediada por la inducción de muerte apoptótica y necrosis del epitelio de túbulos proximales, que pueden iniciarse por fosfolipidosis lisosomal, estrés reticular y, principalmente, daño mitocondrial, con un concomitante aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno y desarrollo de estrés oxidante. El sulforafano (SFN) es un antioxidante indirecto, es decir, induce la transcripción de enzimas de la respuesta celular antioxidante y otras enzimas de fase II. Se ha descrito la capacidad citoprotectora del SFN en una amplia variedad de condiciones patológicas y, últimamente, se le han descrito actividades que implican protección mitocondrial.

Hipótesis: Dadas las cualidades descritas para el SFN, se anticipa que este compuesto disminuirá la muerte celular tubular, el daño renal y la IRA, inducidos por GM.

Objetivo: Evaluar el efecto del antioxidante indirecto SFN en la muerte celular tubular, el estrés oxidante, el daño y la disfunción renal, inducidos por GM.

Materiales y métodos: Se evaluó la viabilidad en células LLC-PK1 tratadas inicialmente con SFN en concentraciones de 1-10 μ M por 24 horas y luego co-incubadas con GM 8.0 mM y SFN por 72 horas. La viabilidad celular se determinó por el método de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Con ratas macho de la cepa Wistar, se corrió una serie experimental de 4 grupos (CT: control; SFN: sulforafano; GM: gentamicina; SFN+GM: sulforafano + gentamicina; n=8-12) a los que se les administró GM (70 mg/Kg/12 h subcutánea) y/o SFN (1 mg/Kg/día intraperitoneal) por cuatro días. Se obtuvo orina, sangre y riñones para determinar marcadores de daño y función renal, histopatología, muerte apoptótica, estrés oxidante/nitrante, regeneración tubular y actividad de enzimas antioxidantes.



Resultados, discusión y conclusiones: El tratamiento de 72 horas con GM en la línea LLC-PK1 redujo la viabilidad celular hasta un 60.4%. Se observó citoprotección en las células tratadas con SFN hasta en un 92.8% a la concentración de 5.0 μ M. Un aumento observado en la reducción de MTT en células tratadas sólo con SFN plantea la cuestión de si el SFN induce proliferación celular, o un aumento en la biogénesis y función mitocondrial. En el estudio *in vivo*, el SFN claramente atenuó las siguientes alteraciones inducidas por la GM: disfunción renal, daño en túbulo de la corteza renal, apoptosis tubular, estrés nitrante y disminución en la actividad cortical renal de las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión peroxidasa. La mayor inmunotinción contra el marcador de proliferación PCNA evidenció una tasa de regeneración tubular mayor en el grupo SFN+GM con respecto al grupo GM. La reducción en la muerte celular apoptótica inducida por GM en los túbulo proximales podría sugerir una preservación de la integridad mitocondrial. Es posible que la citoprotección observada esté soportada total o parcialmente en eventos de proliferación de células tubulares y/o de biogénesis mitocondrial. Sin embargo, estos aspectos deben ser estudiados con más detalle.

Perspectivas: Determinar en cultivos celulares, la generación mitocondrial del anión superóxido y la de óxido nítrico mediada por la óxido nítrico sintasa inducible y el factor NF- κ B, y así evaluar la participación de estos eventos en la prevención de la muerte celular. Verificar que la prevención en la apoptosis se da de manera dependiente de la mitocondria, estudiando la expresión de las caspasas 3 y 9, entre otros marcadores. Evaluar si el SFN induce biogénesis mitocondrial a través del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) y si esta se encuentra involucrada en la prevención de la muerte tubular inducida por GM. Paralelo a los estudios de biogénesis mitocondrial, se deben llevar a cabo estudios de proliferación celular inducida por SFN en cultivos. De observarse un aumento en la proliferación celular, sería interesante iniciar un estudio sobre los mecanismos y rutas implicadas en este efecto.



1. ANTECEDENTES

1.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO), ESTRÉS OXIDANTE, DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y MUERTE CELULAR

El oxígeno, esencial para la producción eficiente de energía en organismos aerobios, puede llegar a producir un estado de estrés tóxico crónico para las células (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009). El término especies reactivas de oxígeno (ERO) se refiere a radicales libres derivados del dioxígeno (O_2), tales como los radicales anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (HO^{\cdot}), peroxilo (RO_2^{\cdot}) y alcoxilo (RO^{\cdot}), así como a algunas especies no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las ERO, así como las especies reactivas de nitrógeno (ERN) son productos del metabolismo celular normal. Concentraciones moderadamente bajas de ERO pueden ejercer efectos benéficos involucrados en papeles fisiológicos celulares tan importantes como la defensa contra agentes infecciosos y en la función de un número de sistemas de señalización celular, por ejemplo, la inducción de la respuesta mitogénica (Circu y Aw, 2010; Valko *et al.*, 2007). Sin embargo, por su alta reactividad química, las ERO producen perturbaciones tales como la peroxidación de lípidos y la oxidación de ADN y proteínas, que son minimizadas por los sistemas antioxidantes propios de la célula. Cuando la generación de ERO se incrementa en una extensión tal que supera a estos sistemas antioxidantes, se produce lo que llamamos estrés oxidante (Matés, 2000).

Las mitocondrias son la mayor fuente celular de ERO. Entre un 1% y 2% del oxígeno total consumido por la mitocondria, diverge hacia la formación de ERO, principalmente, en los complejos I y III de la cadena respiratoria de transporte de electrones. Se han identificado alrededor de 10 sistemas generadores potenciales de ERO en la mitocondria, entre los que destacan: complejos enzimáticos del ciclo de Krebs como la α -cetoglutarato deshidrogenasa, el complejo de la piruvato deshidrogenasa, la enzima del espacio intermembranal p66^{Shc}, la enzima de la membrana externa mitocondrial monoamina oxidasa, el potencial de membrana mitocondrial alterado y el pH de la matriz (Circu y Aw, 2010).

Las mitocondrias no son sólo la mayor fuente de generación de ERO en las células aeróbicas, también son un objetivo sensible de los efectos dañinos de estas (Orrenius,



2007). En condiciones normales, las pequeñas cantidades de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 que se generan en la mitocondria son metabolizadas por las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), respectivamente, para así mantener la homeostasis redox mitocondrial (Figura 1). Sin embargo, un incremento en la generación de ERO puede ser promovido directa o indirectamente por la exposición a una variedad de tóxicos exógenos (Timbrell, 2009; Ma, 2010).

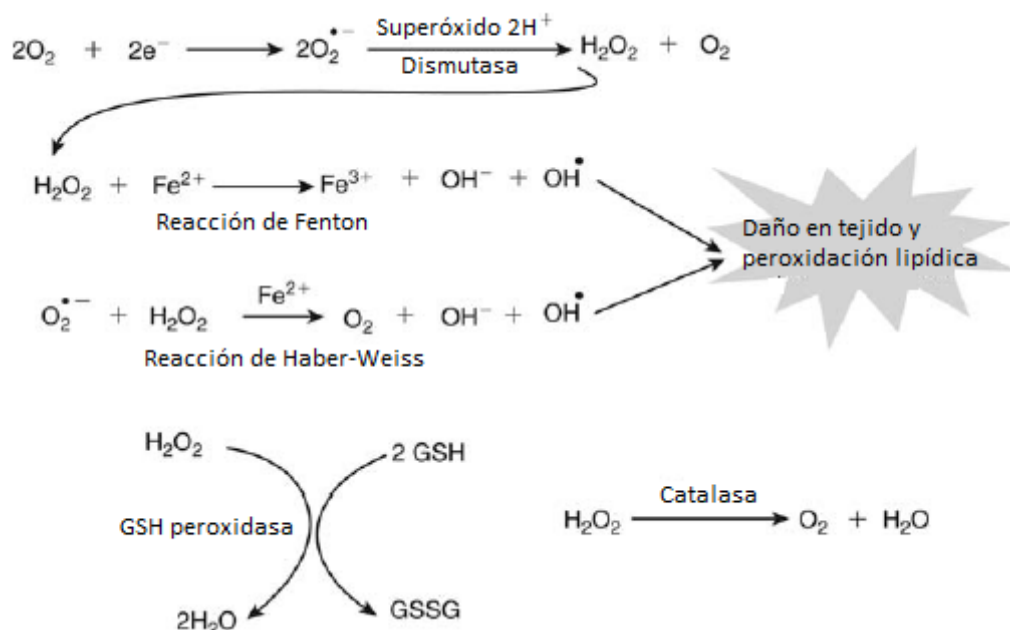


Figura 1. Generación de algunas ERO y su neutralización por enzimas antioxidantes (Timbrell, 2009).

El ADN mitocondrial, que codifica polipéptidos, ARN de transferencia y ARN ribosomal, esenciales para el transporte de electrones y la generación de ATP vía fosforilación oxidante, representa un blanco crítico de las ERO mitocondriales. El daño oxidante generado, a su vez puede conducir a la célula a un daño celular letal mediante disfunción respiratoria y pérdidas en la generación de ATP (Orrenius, 2007).

Las proteínas ferrosulfuradas como la aconitasa, son muy sensibles a la oxidación directa e inactivación por parte del anión $O_2^{\bullet-}$. Esta inactivación libera Fe^{2+} y H_2O_2 en el proceso, que participan en las reacciones de Haber-Weiss y de Fenton para la generación del HO^\bullet (Figura 1). Este último puede oxidar proteínas, ADN y lípidos

mitocondriales, amplificando así el daño oxidante iniciado por el $O_2^{\cdot-}$. La formación de ERO y la estimulación de la peroxidación lipídica en la mitocondria pueden conducir a la supresión del metabolismo mitocondrial (Orrenius, 2007). En la peroxidación lipídica, la cascada de reacciones oxidantes que se desata por la formación de más radicales libres lipídicos, eventualmente conduce a la destrucción del lípido y, posiblemente, de la estructura en la que está localizado. Los efectos resultantes son diversos, siendo claramente la integridad estructural de las membranas la inicialmente afectada. Por la acción de los radicales libres lipídicos propagados, los sitios de insaturación de lípidos vecinos cambian y la fluidez de la membrana se altera, así como la función de proteínas membranales. Debido a esto, la permeabilidad de la membrana se incrementa (Timbrell, 2009).

Las ERO pueden inducir la transición de permeabilidad mitocondrial (TPM), que ocurre cuando la membrana mitocondrial interna, impermeable normalmente incluso a protones, se hace permeable para compuestos de hasta 1.5 KDa. Esta permeabilización mitocondrial causa la liberación de elementos mitocondriales esenciales para un mejor proceso de transferencia de electrones entre complejos respiratorios y, por tanto, para el apropiado acoplamiento entre la oxidación y la fosforilación que da lugar a la generación de ATP. Uno de estos elementos es el citocromo *c* (Zorov, 2010). El mecanismo TPM juega un papel clave en ciertos tipos de muerte celular; puede conducir a necrosis debido a una disminución en el contenido de ATP, o puede conducir a apoptosis dependiente de caspasas cuando la inducción de TPM se da en una subpoblación de mitocondrias y todavía hay algunas capaces de mantener su potencial de membrana y producir ATP (Orrenius, 2007).

La necrosis es una forma de muerte celular caracterizada por una pérdida progresiva de la integridad de la membrana plasmática y un rápido influjo de Na^+ , Ca^{2+} y agua, que resulta en hinchazón citoplásmica y picnosis nuclear. Esta última característica conduce a la fragmentación celular, y liberación de los contenidos lisosomal y granular a los alrededores extracelulares, con la subsecuente inflamación del tejido (Padanilam, 2003). La apoptosis es mediada por rutas bioquímicas determinadas genéticamente y caracterizada morfológicamente por encogimiento de la célula, ampollamiento de la



membrana celular, condensación de la cromatina y fraccionamiento del núcleo. En las etapas finales, la célula se desintegra en múltiples “cuerpos apoptóticos”, que son fragmentos de cromatina rodeados por un poco de citoplasma residual y membrana plasmática íntegra. Posteriormente, células y cuerpos apoptóticos se fagocitan y se destruyen por células vecinas sin que haya inflamación o daño de los tejidos circundantes (Bonegio y Lieberthal, 2002). La apoptosis y la necrosis a menudo ocurren simultáneamente en una amplia variedad de condiciones patológicas, así como en cultivos celulares expuestos a activadores fisiológicos, trauma físico, o toxinas y químicos (Padanilam, 2003).

1.2. MECANISMOS CELULARES DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes son sustancias que directa o indirectamente protegen las células contra los efectos adversos de xenobióticos, fármacos, carcinógenos y reacciones de radicales tóxicos (Matés, 2000). Los mecanismos antioxidantes de los organismos aerobios incluyen: (i) la remoción catalítica de radicales libres y especies reactivas por factores tales como CAT, SOD, peroxidasa y antioxidantes tiol-específicos; (ii) el enlazamiento de proteínas (por ejemplo, transferrina, metalotioneína, haptoglobinas, ceruloplasmina) a iones metálicos pro-oxidantes, tales como Fe^{2+} , Fe^{3+} y Cu^{+} ; (iii) protección contra daño macromolecular por proteínas como las del estrés o shock calórico; y (iv) la reducción de radicales libres por donadores de electrones, tales como glutatión reducido (GSH), vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), bilirrubina y ácido úrico (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009).

1.2.1. Regulación de la expresión génica de enzimas antioxidantes

Los genes codificantes de varias enzimas destoxicantes son expresados de manera ubicua y se inducen coordinadamente en respuesta a antioxidantes y xenobióticos (Matés, 2000). Las ERO originadas por señales ambientales o por la actividad metabólica se modulan por antioxidantes a niveles no tóxicos, convirtiéndose en moléculas de señalización (Figura 2). Las ERO pueden activar la transcripción génica de enzimas destoxicantes vía factores de transcripción tales como el factor nuclear

kappa B (NF- κ B), la proteína activadora-1 (AP-1) y las proteínas de unión al elemento de respuesta antioxidante (ARE); o vía activación de cascadas de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK).

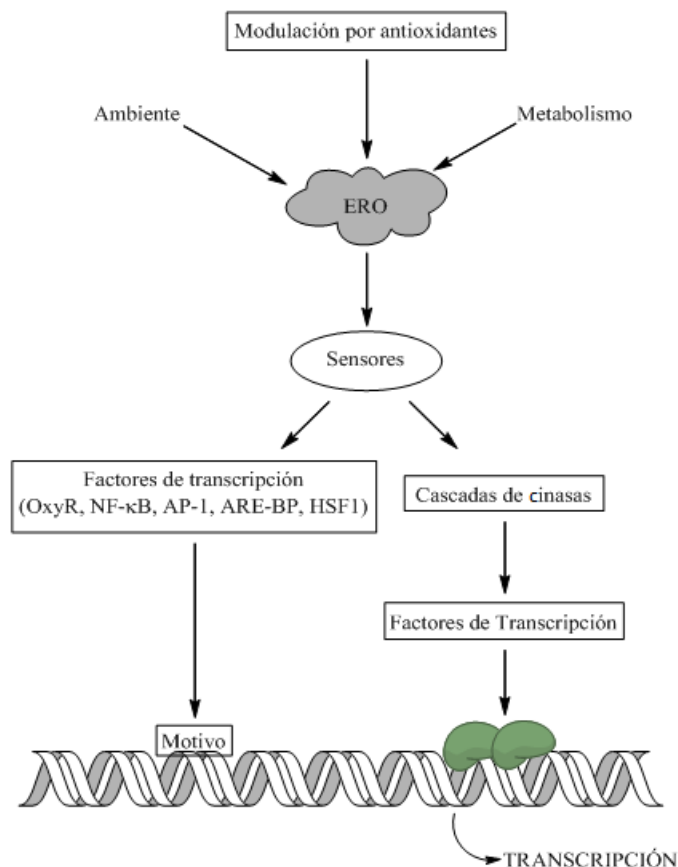


Figura 2. Principales rutas de señalización activadas por ERO (Scandalios, 2005).

Los genes que contienen ARE incluyen los de las enzimas de fase II y otros codificantes de enzimas antioxidantes (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009). Las enzimas de fase I se relacionan con la bioactivación de metabolitos carcinogénicos mediante oxidación, reducción o hidrólisis, mientras que las de fase II son relativas a la detoxificación carcinogénica y defensa ante estrés oxidante. Para estas últimas, en varios estudios se demostraron sus importantes efectos protectores a través de la neutralización de ERO y el metabolismo de xenobióticos (Cheung y Kong, 2009; Riedl *et al.*, 2009). Se ha informado que factores nucleares de transcripción tales como c-Jun, Jun-B, Jun-D, c-Fos, Fra1, Nrf1, Nrf2, YABP, ARE-BP1, el receptor Ah y el receptor de estrógenos, se unen a los ARE de varios genes (Matés, 2000).

Los antioxidantes indirectos de bajo peso molecular, que pueden tener actividad redox o no, inducen la transcripción de las enzimas de fase II a través de un mecanismo que implica al factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2), la ruta Keap1/Nrf2/ARE (Figura 3). El sulforafano (SFN) es uno de estos antioxidantes indirectos (Ahn *et al.*, 2010; Dinkova-Kostova y Talalay, 2008; Piao *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010).

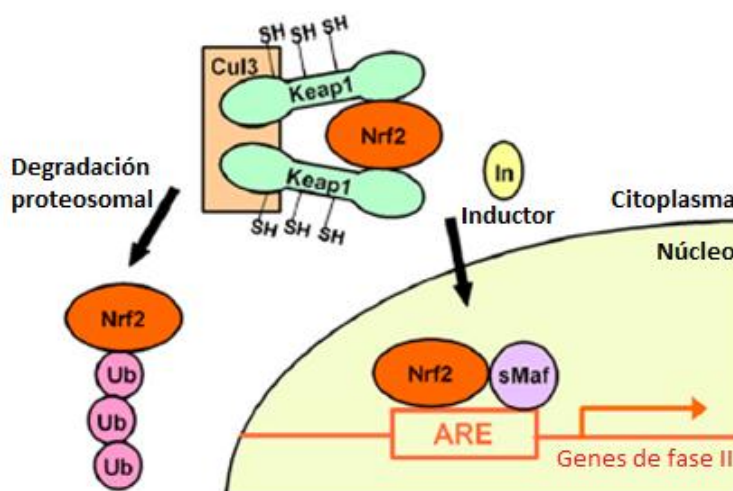
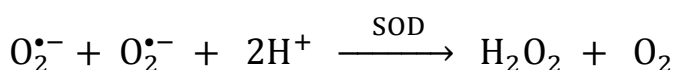


Figura 3. Mecanismo de inducción de enzimas de fase II (Ahn *et al.*, 2010).

1.2.2. Algunos de los principales sistemas antioxidantes enzimáticos celulares regulados bajo Nrf2

La superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) metaboliza el $O_2^{\bullet-}$ convirtiéndolo a H_2O_2 (Ecuación 1), que a su vez puede ser destruido por las reacciones de la CAT o la glutatión peroxidasa (GPx).



Ecuación 1

La SOD también protege las deshidratasas (dihidroxiácido deshidratasa, aconitasa, 6-fosfogluconato deshidratasa y fumarasas A y B) contra la inactivación por $O_2^{\bullet-}$. Se han identificado cuatro clases de SOD que contienen los cofactores mononucleares Fe, Mn o Ni, y la que contiene el factor dinuclear Cu, Zn. En humanos hay tres formas de SOD:

la SOD dependiente de cobre-zinc (Cu, Zn-SOD) citosólica; la SOD dependiente de manganeso (Mn-SOD) mitocondrial; y la SOD extracelular (EC-SOD), que también contiene Cu y Zn (Matés, 2000; Nozik-Grayck *et al.*, 2005).

En mamíferos, la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) es un homotetrámero con una masa molecular de 225-270 kD, que contiene un grupo ferriprotoporfirina-IX por cada subunidad y pertenece al grupo de las catalasas típicas o monofuncionales (Goyal y Basak, 2010; Kirkman y Gaetani, 2007). La CAT es mejor conocida por su reacción denominada 'catalítica' (Ecuación 2), en la que cataliza la degradación de dos moléculas de H₂O₂ para formar agua y oxígeno molecular; sin embargo, también tiene una actividad peroxidasa (Ecuación 3), que en las catalasas típicas es relativamente débil (Zamocky *et al.*, 2008).



La velocidad de la reacción de la ecuación 2 en mamíferos, está entre las más altas velocidades enzimáticas conocidas (Kirkman y Gaetani, 2007). A pesar del avance tecnológico en proteómica, no está completamente claro como la CAT mantiene una alta selectividad por el pequeño sustrato polar no cargado, H₂O₂, mientras que exhibe velocidades de recambio de más de 10⁶/s (Goyal y Basak, 2010).

Las glutatión peroxidadas (GPx, EC 1.11.1.19) protegen las células de mamíferos contra el daño oxidante, catalizando la reducción de una variedad de hidroperóxidos con el uso de GSH (Ecuación 4). En humanos se conocen cinco GPx, con residuos de seleno-cisteína en su estructura (Lu y Holmgren, 2009; Matés, 2000).



La glutatión reductasa (GR, EC 1.8.1.7) cataliza la reducción del disulfuro de glutatión o glutatión oxidado (GSSG) a dos moléculas de GSH usando NADPH (Ecuación 5),



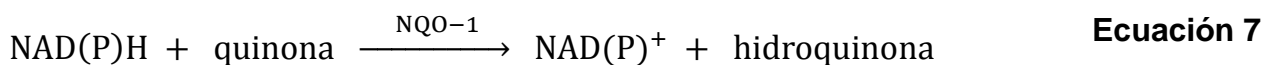
siendo así de una importancia mayor para todas las enzimas dependientes de GSH (Dammeyer y Arnér, 2010).



Las glutatión S-transferasas (GST, EC 2.5.1.18) constituyen una familia multigénica de isoenzimas de fase II que catalizan el ataque nucleofílico del átomo de azufre del GSH sobre los grupos electrofílicos de numerosos tipos de xenobióticos (Ecuación 6). Esta reacción reduce drásticamente la reactividad del xenobiótico y lo hace más soluble en agua, lo que favorece su eliminación (Sau *et al.*, 2010).



La NAD(P)H:quinona oxidoreductasa (NQO-1, EC 1.6.5.2) es una enzima de fase II que cataliza la reducción benéfica de quinonas a hidroquinonas con la transferencia de dos electrones (Ecuación 7), previniendo así la reducción de las quinonas por un electrón por medio de otras reductasas, con lo que resultaría en la generación de especies radicales (Cheung y Kong, 2009).

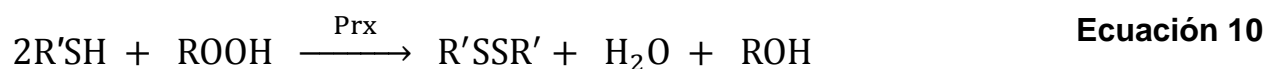


El sistema tiorredoxina consiste de isoformas de tiorredoxina (Trx) y tiorredoxina reductasa (TrxR, EC 1.8.1.9), proteínas dependientes de Trx y otros sistemas celulares. Este sistema está involucrado en defensa antioxidante, funciones regulatorias redox y soporte a la síntesis de desoxirribonucleótidos, entre otras funciones celulares. Funciona impulsado por isoformas de TrxR, que usando NADPH, reducen isoformas de Trx (Ecuación 8), que subsecuentemente actuarán sobre un número de proteínas y otros tipos de sustratos (Ecuación 9). Su papel general es el de disulfuro reductasas de proteínas (Dammeyer y Arnér, 2010; Holmgren y Lu, 2010).





Las isoformas de peroxirredoxina (Prx, EC 1.11.1.15) son una familia de proteínas que funcionan en la defensa antioxidante y en cascadas de señalización redox, catalizando reacciones con peróxidos (Ecuación 10).



Durante sus ciclos catalíticos, las especies oxidadas de Prx formadas por reducción de peróxidos, son reducidas y reactivadas de una manera tiol-dependiente, que fisiológicamente puede ser por Trx o GSH (Dammeyer y Arnér, 2010).

La hemo oxigenasa (HO, EC 1.14.99.3) es la enzima limitante de la velocidad en el catabolismo del grupo hemo. Cataliza el rompimiento oxidante del grupo hemo a biliverdina, monóxido de carbono y hierro (Ecuación 11). La biliverdina es subsecuentemente convertida a bilirrubina por la biliverdina reductasa (Ecuación 12). Su isoforma HO-1 se induce comúnmente por estrés oxidante y se ha descrito que protege contra algunos tipos de daño tisular agudo (Barrera *et al.*, 2003).



Si bien, no es un sistema antioxidante enzimático, el factor nuclear respiratorio-1 (NRF-1) regula la expresión de genes relacionados con el transporte en la membrana mitocondrial, el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones y la transcripción mitocondrial. Últimamente, se ha sugerido la existencia de un enlace directo entre la actividad transcripcional de NRF-1 y el estado redox celular, debido al incremento observado de esta actividad después de la inducción de estrés oxidante con



H₂O₂ (Li *et al.*, 2012). El factor Nrf2 sobrerregula el ARNm y la proteína para NRF-1 (Piantadosi *et al.*, 2008).

1.3. SULFORAFANO (SFN)

Recientemente, ha ganado enorme importancia el concepto de que los componentes bioactivos de alimentos funcionales son eficaces para el mejoramiento de la salud. En la era de la postgenómica, el objetivo de las farmacéuticas no es sólo encontrar blancos para nuevos fármacos, sino también hallar pequeñas moléculas que modulen la actividad biológica. Desde hace un tiempo existe la hipótesis modestamente soportada de que los altos consumos de vegetales crucíferos como el brócoli, el repollo, las coles de Bruselas y la coliflor reducen el riesgo de desórdenes degenerativos y enfermedades cardiovasculares. Los crucíferos son una excelente fuente de fitoquímicos como glucosinolatos y sus derivados, compuestos fenólicos y vitaminas, que median una variedad de funciones relacionadas con protección antioxidante, regulación enzimática y control de apoptosis y ciclo celular. De hecho, el brócoli se ha ganado el apelativo de “La Joya de la Corona de la Nutrición” por reunir con éxito todas estas cualidades (Vasanthi *et al.*, 2009).

Uno de los mecanismos más importantes de quimiopreención debido a plantas crucíferas parece ser la inducción de enzimas de fase II y la inhibición de enzimas de fase I. Varios isotiocianatos (ITC) son inductores de enzimas de fase II tales como GST, NQO-1 y UDP-glucuronosiltransferasa (Cheung y Kong, 2009; Fimognari *et al.*, 2008; Gullet *et al.*, 2010; Riedl *et al.*, 2009; Yoxall *et al.*, 2005). El SFN es un ITC extraordinariamente potente de ocurrencia natural en crucíferas, en los que se produce por la acción de la enzima mirosinasa sobre el glucosilato glucorafanina (Figura 4).

El SFN afecta varios blancos y rutas moleculares que incluyen, además de las enzimas de fase I y II, el factor NF-κB vinculado a la inflamación, la supervivencia de células cancerosas y la progresión, la detención del ciclo celular dependiente del tiempo en células cancerosas, la apoptosis como control para la proliferación celular y la expresión de receptores de estrógeno en células cancerosas (Cheung y Kong, 2009). No



obstante, en los últimos años, el SFN ha llamado más la atención como inductor natural de enzimas de fase II en humanos y animales. Los investigadores han comenzado a entender los mecanismos moleculares por los que el SFN induce enzimas detoxificantes antioxidantes de fase II. Se han propuesto dos mecanismos: la disrupción de las interacciones Nrf2 – Keap1 y la activación de las MAPK, con el SFN actuando ya sea sinérgica o separadamente (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2012; Vasanthi *et al.*, 2009). El papel del SFN en estos procesos se ha relacionado con su estructura, siendo el estado de oxidación de su átomo de azufre en el grupo metiltiol y la longitud del puente alquílico entre los grupos isotiocianato y sulfóxido, las características químicas de mayor responsabilidad en su actividad (Ahn *et al.*, 2010; Vasanthi *et al.*, 2009).

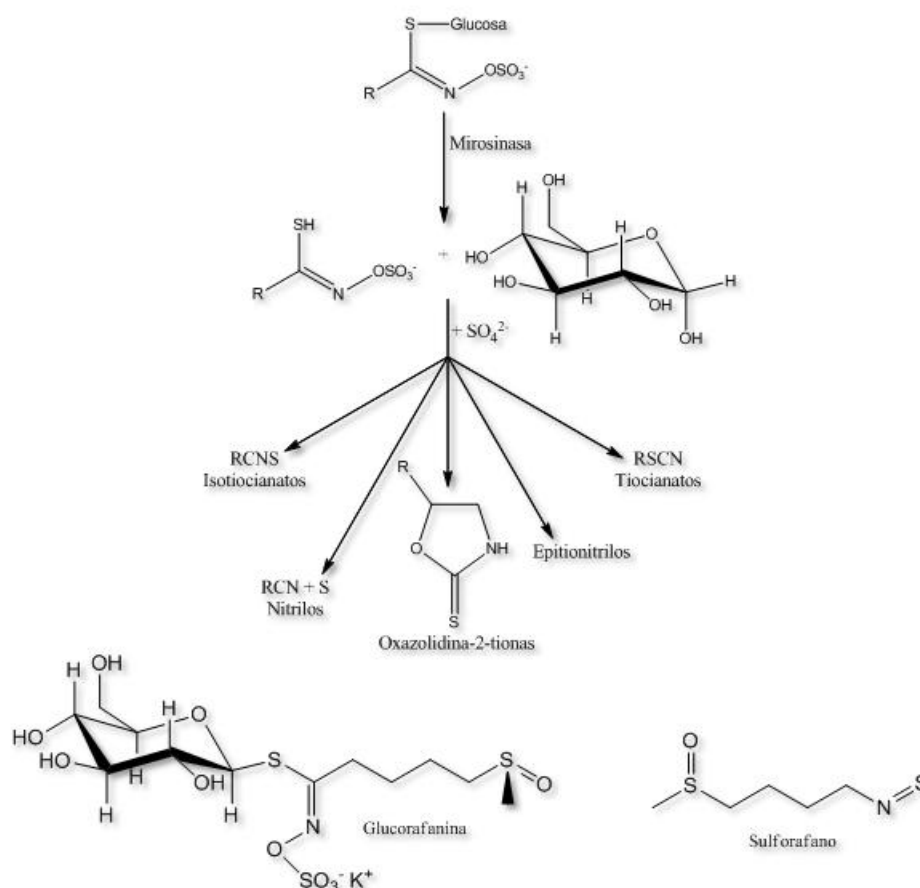


Figura 4. Hidrólisis de glucosinolatos y estructuras de la glucorafanina y el SFN (Vasanthi *et al.*, 2009).

La tabla 1 resume sólo una pequeña muestra de los efectos, actividades y mecanismos que se han informado para el SFN. La mayoría de los reportes se han involucrado con la inducción de enzimas de fase II mediante el sistema de control transcripcional Nrf2, pero también resulta particularmente interesante el hecho de que muchos de los mecanismos citoprotectores relacionados al SFN involucran la preservación de la función mitocondrial (Gaona-Gaona *et al.*, 2011; Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010; Juge *et al.*, 2007; Piao *et al.*, 2010; Priya *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011). Más interesante aún, el hecho de que esta preservación de la función mitocondrial, en algunos casos, se ha visto relacionada con una inhibición en la apertura de poros TPM (Greco *et al.*, 2011; Greco y Fiskum, 2010; Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010).

1.4. FISIOLÓGÍA RENAL E INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA)

Un punto de vista popular considera que el riñón es un órgano principalmente responsable de la remoción de residuos metabólicos del cuerpo. Aunque ciertamente esta es una de las mayores funciones de los riñones, hay otras funciones que podría decirse son igualmente importantes, entre éstas: la regulación del balance de agua y electrolitos, la excreción de sustancias bioactivas (hormonas y muchas sustancias extrañas, específicamente fármacos) que afectan la función corporal, la regulación de la presión arterial sanguínea, la regulación de la producción de eritrocitos, la regulación de la producción de vitamina D y la gluconeogénesis (Eaton y Pooler, 2009). El riñón es muy importante en la toxicología debido a que es la principal ruta de eliminación de metabolitos tóxicos hidrofílicos (junto con la vejiga), y a que uno de los mayores efectos adversos de las sustancias tóxicas es el daño sobre este, manifestado en una mala función renal (Manahan, 2003). Para poder evaluar los efectos de un tóxico sobre la función renal y sus estrategias de protección, es recomendable conocer sus principales aspectos morfofisiológicos.

Tabla 1. Algunas actividades y/o efectos informados para el SFN.

Actividad / efecto / modelo	Mecanismo	Referencia
Modulación de citocromos P450 en hígado de rata	Inhibición de CYP2B y CYP3A2; sobreexpresión de CYP1A2	Yoxall <i>et al.</i> , 2005
Antimetastático en pulmones de ratones en metástasis inducida	Inhibición de la activación de metaloproteinasas de matriz	Thejass y Kuttan, 2006
Inmunomodulador en ratones	Aumento en el título de anticuerpos circulantes, células formadoras de plaquetas en bazo y actividad fagocítica de macrófagos peritoneales	Thejass y Kuttan, 2007
Protector en daño renal inducido por isquemia-reperfusión en ratas	Inducción de enzimas de fase 2 dependiente de Nrf2	Yoon <i>et al.</i> , 2008
Protector de células endoteliales microvasculares humanas ante hiperglicemia	Activación de Nrf2 y expresión aumentada de transcetolasa	Xue <i>et al.</i> , 2008
Inhibidor del crecimiento de células cancerosas de colon y próstata en humanos	Inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas	Dashwood y Ho, 2008; Gibbs <i>et al.</i> , 2009
Protector de células β de daño inducido por citocina y estreptozotocina	Activación de Nrf2 e inhibición de NF- κ B	Song <i>et al.</i> , 2009
Protector en nefrotoxicidad inducida por cisplatino en células LLC-PK1	Protección mitocondrial, preservación actividad de NQO-1 y γ GCL	Guerrero-Beltrán <i>et al.</i> , 2010
Protector en nefrotoxicidad inducida por cisplatino en ratas	Atenuación de estrés oxidante/nitrante y preservación de enzimas antioxidantes	Guerrero-Beltrán <i>et al.</i> , 2010
Protector en corazones aislados de ratas dañados por isquemia	Activación de canales mitocondriales K_{ATP} y ruta antioxidante	Piao <i>et al.</i> , 2010
Protector en daño hepático inducido por isquemia-reperfusión intestinal en ratas	Inducción de enzimas antioxidantes a través de Nrf2-ARE	Zhao <i>et al.</i> , 2010
Estimulación de la fagocitosis en células RAW 264.7	Inactivación del factor inhibidor de la migración de macrófagos	Suganuma <i>et al.</i> , 2011
Protector en daño hepático inducido por cisplatino en ratas	Preservación de la función mitocondrial y enzimas antioxidantes	Gaona -Gaona <i>et al.</i> , 2011
Protector en carcinogénesis de pulmones inducida por benzo(a)pireno en ratones	Protección contra el estrés oxidante mediado por disfunción mitocondrial	Priya <i>et al.</i> , 2011
Ratas Fischer 344 inyectadas i.p. con SFN	Inhibición del poro TPM	Greco <i>et al.</i> , 2011

CYP: citocromo P450, Nrf2: factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2, NF- κ B: factor nuclear kappa-B, NQO-1: NAD(P)H:quinona oxidoreductasa-1, γ GCL: gamma glutamil cisteína ligasa, ARE: elemento de respuesta antioxidante, SFN: sulforafano, TPM: transición de permeabilidad mitocondrial.

1.4.1. Organización estructural del riñón y la nefrona

La corteza, la médula y las papilas son las mayores áreas que aparecen visibles en el riñón (Figura 5). La corteza es la porción más externa y contiene los túbulos proximales y distales, el glomérulo y los capilares peritubulares. El flujo sanguíneo cortical es relativamente alto, siendo aproximadamente el 90% del flujo sanguíneo renal total. Una sustancia tóxica circulante en la sangre se acumulará preferencialmente en la corteza



renal, resultando en un mayor potencial para afectar la función cortical, más que la función medular y papilar (Smart y Hogdson, 2008).

La porción media del riñón, la médula renal, consiste del asa de Henle, los vasos rectos y los ductos colectores. Las papilas renales son la porción anatómica más pequeña; el tejido papilar comprende principalmente las porciones terminales del sistema de ductos colectores y los vasos rectos (Smart y Hogdson, 2008).

La nefrona (Figura 6) es la unidad funcional del riñón y en cada riñón se pueden encontrar aproximadamente un millón de ellas. Cada nefrona consiste de un componente de filtración esférico llamado el corpúsculo renal y un túbulo que se extiende a partir de este (Manahan, 2003; Smart y Hogdson, 2008).

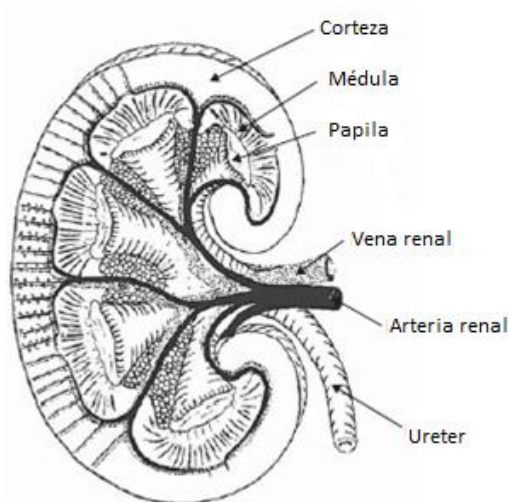


Figura 5. Sección sagital de un riñón humano (Smart y Hogdson, 2008).

El corpúsculo renal consiste de un penacho de asas capilares interconectadas, el glomérulo (o capilares glomerulares), rodeados por un cápsula hueca en forma de globo, la cápsula de Bowman. Los glomérulos son el sitio de filtración: alrededor de 180 L/día de volumen y cantidades proporcionales de soluto que son filtrados libremente, con excepción de las grandes proteínas plasmáticas. El glomérulo es donde la mayor cantidad de sustancias que van a ser excretadas entran a la nefrona (Eaton y Pooler, 2009).

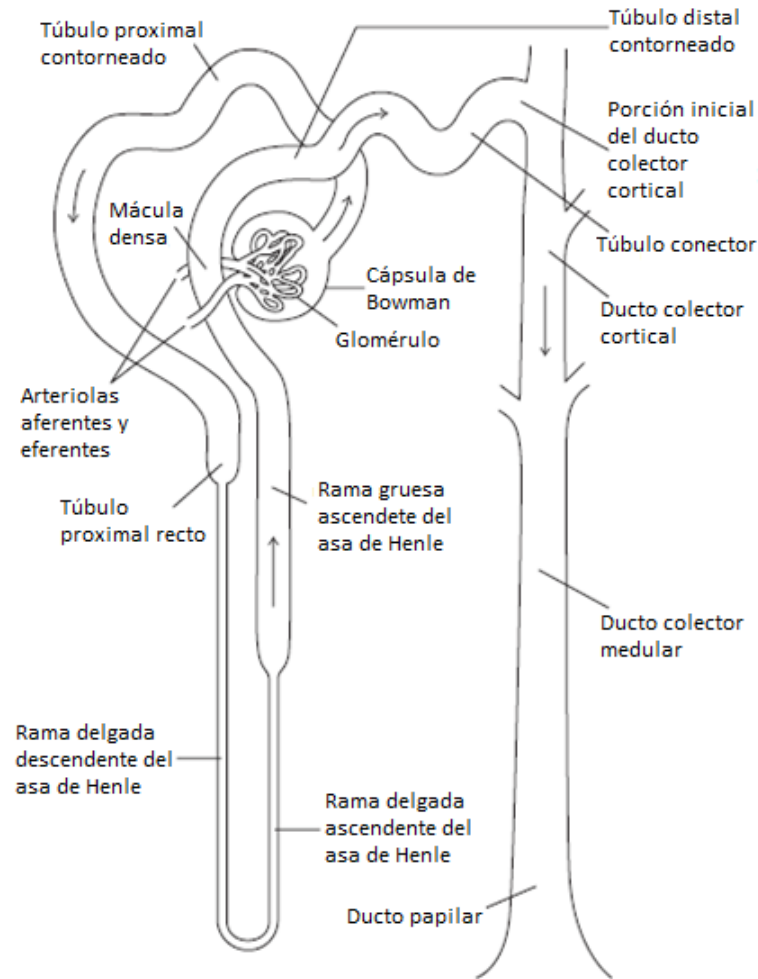


Figura 6. Componentes de una nefrona (Eaton y Pooler, 2009).

El túbulo comienza y conduce hacia afuera de la capsula de Bowman. Se compone de una capa simple de células epiteliales que descansan sobre una membrana basal. Estas células epiteliales varían en sus características estructurales e inmunocitoquímicas en cada uno de los segmentos que compone el túbulo. El túbulo proximal (contorneado y recto) reabsorbe cerca de las dos terceras partes del agua, el sodio y el cloruro filtrados. El túbulo proximal contorneado reabsorbe todas las moléculas orgánicas útiles que el cuerpo desea conservar (por ejemplo, glucosa y aminoácidos). También reabsorbe fracciones significativas de iones importantes como K^+ , PO_4^{3-} , Ca^{2+} y HCO_3^- . Es el sitio de secreción de un gran número de sustancias orgánicas como residuos del metabolismo o fármacos.

El asa de Henle reabsorbe cerca del 20% del sodio y el cloruro filtrado, y un 10% del agua filtrada. El túbulo distal y el túbulo conector juntos, reabsorben quizás un 5% más de agua y sales. Las células del ducto colector cortical responden y son fuertemente reguladas por las hormonas aldosterona y antidiurética (ADH), aumentando la reabsorción de sodio y excreción de potasio con la primera, y aumentando la reabsorción de agua con la segunda. El ducto colector medular cumple un papel mayoritario en la reabsorción de urea y en el balance ácido-base (Eaton y Pooler, 2009).

1.4.2. Nefrotoxicidad e IRA

El riñón es un órgano blanco para toxicidad por su flujo sanguíneo relativamente alto, por su capacidad concentradora, por el transporte activo de compuestos a través de sus células tubulares y por su activación metabólica (conversión metabólica de fármacos a especies químicamente reactivas). Queda claro que el tejido renal está expuesto más a menudo a mayores concentraciones de compuestos potencialmente tóxicos que otros tejidos (Timbrell, 2009). Los efectos de una sustancia tóxica sobre la función renal se pueden establecer a través de estudios *in vivo*, *in vitro* y de histopatología, dependiendo de la cuestión que quiera ser resuelta (Smart y Hogdson, 2008).

La IRA se caracteriza por una caída súbita de la filtración glomerular, la perturbación en el volumen de fluido extracelular, la pérdida de la homeostasis ácido-base y de electrolitos y la retención de residuos nitrogenados del catabolismo proteico (Brady y Singer, 1995). Clínicamente, puede clasificarse de acuerdo a la fuente probable del daño renal en: (i) IRA pre-renal, (ii) IRA parenquimal e (iii) IRA post-renal. En la IRA pre-renal, la mala función renal se debe predominantemente a factores sistémicos como el gasto cardíaco, la hipotensión o la presión intra-abdominal aumentada. La IRA post-renal es de tipo obstructivo y entre otras causas se puede dar por hipertrofia de la próstata, obstrucción ureteral por tumores pélvicos o fibrosis retroperitoneal, necrosis papilar o cálculos grandes (Bagshaw y Bellomo, 2007). La IRA parenquimal o intrínseca, involucra daño estructural en el parénquima renal, principalmente en los glomérulos y túbulos. La IRA intrínseca ha surgido como el subtipo más común y serio en pacientes hospitalizados y, como se puede ver en la Tabla 2, las nefrotoxinas



aparecen como su causa más importante (Bagshaw y Bellomo, 2007; Devarajan 2006; Evenepoel, 2004; Schrier, 1999).

Tabla 2. Fármacos y sustancias químicas asociadas con la IRA (Schrier, 1999).

Mecanismo						Fármaco o sustancia química
M1	M2	M3	M4	M5	M5	
†	†				†	Ciclosporina, tacrolimus
†	†					Amfotericina, agentes contrastantes
†				†		Antiinflamatorios no esteroideos
†						Captopril, interleucina 2
†	†		†			Metotrexato
	†					Aminoglicósidos, cisplatino, metales pesados
		†			†	Cocaína
		†				Etanol, lovastatina
			†	†		Sulfonamidas
			†			Aciclovir, agentes quimioterapéuticos
				†		Alopurinol, cefalosporinas, ciprofloxacina
					†	Estrógenos conjugados, mitomicina

M1: Reducción en la perfusión renal a través de la hemodinámica intrarenal; M2: Toxicidad tubular directa; M3: Toxicidad inducida por heme; M4: Obstrucción intratubular por precipitación de agentes o sus metabolitos o subproductos; M5: Nefritis intersticial alérgica; M6: síndrome hemolítico-urémico.

Muchos de los compuestos que han sido identificados como nefrotóxicos ejercen efectos múltiples sobre los sistemas intracelulares. Sin embargo, esto no quiere decir que ciertos nefrotóxicos no tengan blancos específicos en el riñón (Smart y Hogdson, 2008). Por ejemplo, varias sustancias xenobióticas dañan el túbulo proximal renal, la porción de la nefrona con mayor sensibilidad a los efectos nefrotóxicos (Figura 7). El túbulo proximal contorneado (segmentos S_1 y S_2) contiene un aparato de endocitosis y lisosomal muy activo, convirtiéndose en un sitio de daño relacionado con la sobrecarga lisosomal, así como con restos de proteínas enlazadas a tóxicos. El túbulo proximal recto (segmento S_3) representa el sitio más susceptible a daño por activación metabólica, acumulación asociada a transportadores e hipoxia/reperfusión. Entre las sustancias químicas que dañan el túbulo proximal encontramos fármacos antibacteriales como la cefaloridina y los aminoglicósidos, que dañan los segmentos S_1 y S_2 ; fármacos anticancerígenos como el cisplatino, que dañan el segmento S_3 ; sustancias químicas de uso industrial como el cadmio y el cromo hexavalente, que

afectan los segmentos S₁-S₂; o el mercurio y el paladio que afectan el segmento S₃ (Cristofori *et al.*, 2007).

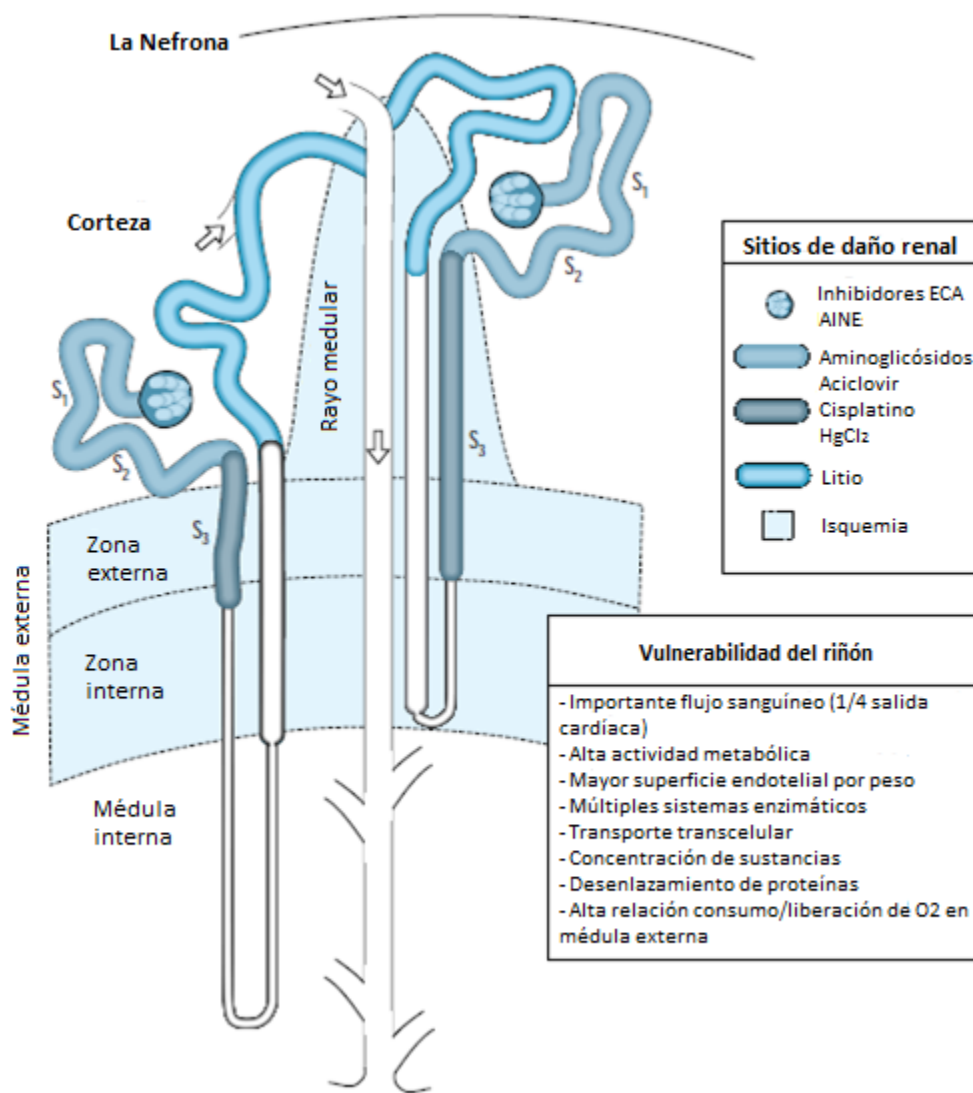


Figura 7. Daño tubular segmento-específico. ECA: enzima convertidora de la agiotensina; AINE: antiinflamatorios no esteroideos; HgCl₂: cloruro mercúrico (Schrier, 1999).

Se cuenta con evidencia concluyente de que las células tubulares mueren ya sea por apoptosis o por necrosis, en modelos experimentales de daño renal tanto isquémico como tóxico (Bonegio y Lieberthal., 2002). Además, en un buen número de estudios recientes se han demostrado los papeles patofisiológicos de las ERO en varias enfermedades renales y sobre todo el papel significativo del estrés oxidante como

mecanismo de la IRA (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2005; Razzaque y Taguchi, 2005; Timbrell, 2009).

1.5. AMINOGLICÓSIDOS Y NEFROTOXICIDAD: GENTAMICINA (GM)

La naturaleza compleja de enfermedades críticas a menudo requiere el uso de múltiples agentes terapéuticos, que pueden tener el potencial -individualmente o combinados- para causar daño renal agudo. Hasta 2008, en varios estudios epidemiológicos extensos se había demostrado que los fármacos nefrotóxicos fueron factores determinantes de IRA en el 19% a 25% de los casos de pacientes en estado crítico (Pannu y Nadim, 2008).

Los antibióticos aminoglicósidos son ampliamente usados a nivel mundial en el tratamiento de infecciones por bacterias Gram-negativas (Nagai y Takano, 2004). Constituyen la única alternativa efectiva contra gérmenes insensibles a otros antibióticos, principalmente debido a su estabilidad química, rápido efecto bactericida, sinergia con los antibióticos betalactámicos, baja resistencia y bajo costo (Lopez-Novoa *et al.*, 2011). Sin embargo, los aminoglicósidos tienen una actividad bactericida dependiente de la concentración, no del tiempo de exposición a las bacterias (Lacy *et al.*, 1998), e inducen resistencia adaptativa en bacterias expuestas a concentraciones sub-inhedoras e inhibitorias (Daikos *et al.*, 1990; Daikos *et al.*, 1991). Por esto, se ha propuesto que el objetivo de la terapia con aminoglicósidos debe ser el de optimizar las concentraciones pico, empleando la dosis más alta posible consistente con las consideraciones toxicológicas inherentes a su uso (Lacy *et al.*, 1998).

La nefrotoxicidad es la principal limitación de la eficacia terapéutica de los aminoglicósidos, especialmente de la GM, registrándose en un 10%-25% de los tratamientos incluso bajo un riguroso control y seguimiento de los pacientes (Lopez-Novoa *et al.*, 2011). La caracterización precisa de los mecanismos patofisiológicos y moleculares subyacentes a la nefrotoxicidad de la GM en los niveles orgánico, tisular, celular y molecular se han obtenido en gran parte a través de estudios en modelos animales y celulares. Está caracterizada típicamente por daños tubulares derivados de

la citotoxicidad de las células epiteliales tubulares, que por estudios en animales y en cultivos celulares, se sabe que pueden ser mediados por apoptosis o necrosis (Quiros *et al.*, 2011).

En la Figura 8 se resumen gráficamente los mecanismos y las rutas de señalización que se han relacionado con el efecto citotóxico de GM. La nefrotoxicidad inducida por GM ocurre por la acumulación selectiva del fármaco en los segmentos S₁ y S₂ de los túbulos proximales renales, lo que conduce a una pérdida de la integridad de sus estructuras en borde de cepillo (Balakumar *et al.*, 2010). La alta concentración que alcanza la GM en estas células es consistente con la expresión del complejo endocítico gigante conformado por las proteínas megalina y cubulina, un transportador de proteínas y cationes cuya expresión se restringe a las células del túbulo proximal. Este complejo internaliza a la GM y a los aminoglicósidos en general, por endocitosis, y desde el compartimento endosomal puede acumularse principalmente en lisosomas, aparato del Golgi y retículo endoplásmico (Lopez-Novoa *et al.*, 2011). La GM inhibe la actividad de fosfolipasas y esfingomielinasas lisosomales, inhibiendo de paso la degradación de membranas celulares ricas en fosfolípidos y conduciendo a una sobrecarga de fosfolípidos que comprometen la integridad de la membrana lisosomal. Esta fosfolipidosis lisosomal puede provocar la liberación del contenido enzimático lisosomal activo, en especial de las proteasas catepsinas, capaces de producir muerte celular activando rutas apoptóticas, o conducir rápidamente a un modo necrótico de muerte por medio de una proteólisis masiva en condiciones de bajo nivel celular de ATP (Lopez-Novoa *et al.*, 2011; Ozaki *et al.*, 2010).

La acumulación de GM en el retículo endoplásmico puede generar estrés reticular que a su vez puede activar la respuesta a proteínas no plegadas (UPR) y el arresto del ciclo celular. Con una UPR aumentada, la célula también puede ser llevada a apoptosis mediante la ruta clásica de calpaínas y caspasa 12, activada por la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico (Quiros *et al.*, 2011).

Adicionalmente, la permeabilización de los lisosomas puede causar la liberación de GM al citosol. La GM puede actuar directamente sobre la mitocondria causando la liberación de proteínas intermembranales, o indirectamente a través de la inhibición de la



degradación proteosomal de la proteína pro-apoptótica Bax, introduciendo a la célula en cualquier caso en la ruta intrínseca de apoptosis, además interrumpiendo la cadena respiratoria, interfiriendo con la producción de ATP y produciendo estrés oxidante por incremento en los radicales $O_2^{\cdot-}$ e HO^{\cdot} (Denamur *et al.*, 2011; Lopez-Novoa *et al.*, 2011). En efecto, recientemente se ha encontrado una relación más estrecha entre la nefrotoxicidad de GM y la función mitocondrial. Morales *et al.* (2010) hallaron que el tratamiento de mitocondrias aisladas con GM disminuye los componentes de la cadena mitocondrial probablemente debido a la apertura de poros TPM (Morales *et al.*, 2010). Todo esto ha llevado a la proposición de que todas las estrategias tendientes a preservar el funcionamiento normal de los riñones en pacientes bajo un esquema de tratamiento con aminoglicósidos requieren la protección de la mitocondria renal (Zorov, 2010).

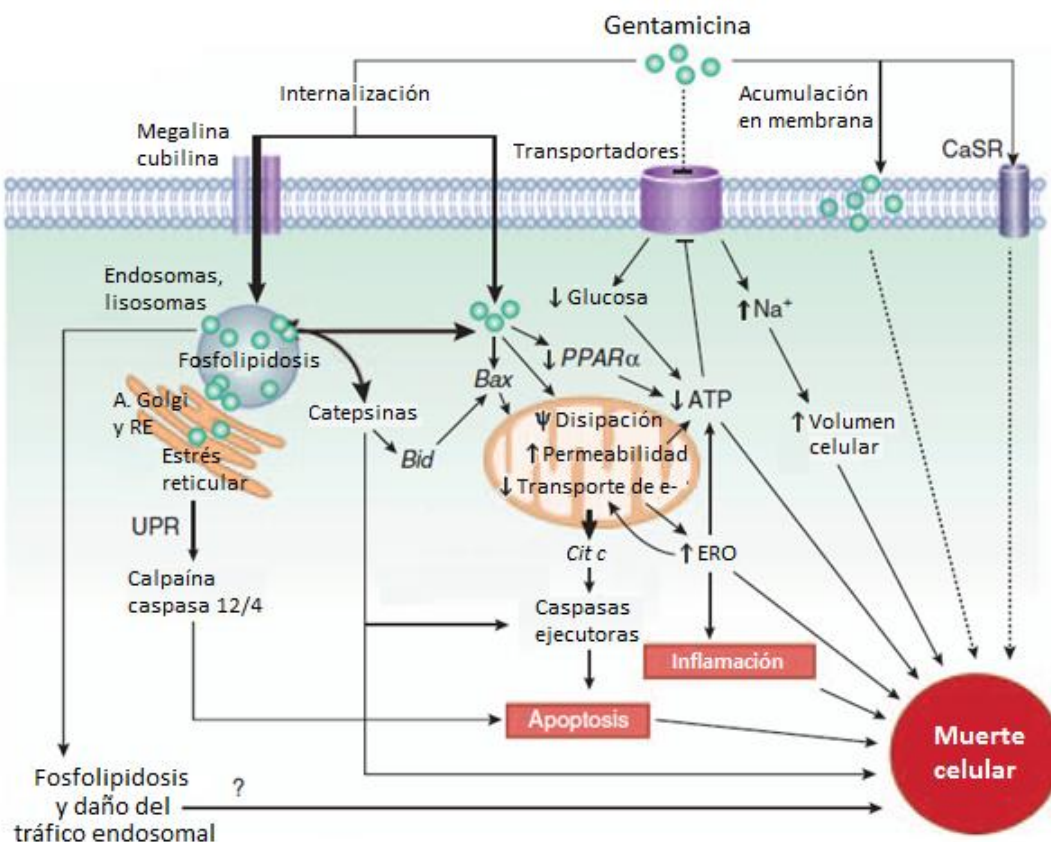


Figura 8. Mecanismos y rutas de señalización en la citotoxicidad de la GM (Lopez-Novoa *et al.*, 2011).

2. JUSTIFICACIÓN

La GM es ampliamente utilizada en la clínica a nivel mundial para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram-negativas, pero su eficacia -que depende básicamente de su concentración/dosis- está limitada por su nefrotoxicidad colateral. La incidencia de IRA inducida por este aminoglicósido ha alcanzado un 25% de los casos clínicos reportados en los que se usa. Se conocen relativamente bien los mecanismos de su toxicidad a partir de modelos experimentales y se ha comprobado que el estrés oxidante, la disfunción mitocondrial y los modos necrótico y apoptótico de muerte son ejes centrales. Por otra parte, se ha descrito en numerosas investigaciones que el SFN es un potente inductor de las enzimas de la respuesta celular antioxidante y, además, se ha relacionado con mecanismos que implican la preservación de la buena función mitocondrial en la prevención del daño renal inducido por nefrotóxicos.

Dada toda esta información, un modelo experimental de interacción del SFN y la GM resulta interesante. Se ha encontrado que el SFN es capaz de proteger ante la acción de otros nefrotóxicos túbulo-específicos, pero no se conoce el efecto que podría tener el SFN en un modelo de muerte celular tubular renal inducida por GM. En el presente estudio se busca establecer este efecto.

3. HIPÓTESIS

Dadas las cualidades descritas para el SFN, se anticipa que este compuesto disminuirá la muerte celular tubular, el daño renal y la IRA, inducidos por GM.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del antioxidante indirecto SFN en la muerte celular tubular, el estrés oxidante, el daño y la disfunción renal, inducidos por GM.

4.2. Objetivos específicos

Determinar la viabilidad de células epiteliales de túbulo proximal renal LLC-PK1 tratadas con GM como inductor de muerte celular y SFN como agente citoprotector.

Determinar marcadores de daño, estrés oxidante y proliferación celular renal en grupos de ratas Wistar bajo un modelo de tratamiento con SFN y daño renal agudo inducido por GM.

Evaluar los cambios estructurales en el tejido renal de rata inducidos por GM, así como el efecto del co-tratamiento con SFN.

Evaluar el efecto del SFN sobre el modo apoptótico de muerte inducido por GM en células tubulares de riñón de rata.

Evaluar el efecto del tratamiento con SFN y GM en ratas sobre la actividad de algunas enzimas citoprotectoras.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

Las células epiteliales renales de cerdo Lily Laboratory Culture Porcine Kidney (LLC-PK1, cat. CL-101) se adquirieron de American Type Culture Collection (Rockville, MD, EUA). El SFN (cat. S8044, lot. 26817812) se obtuvo de LKT Laboratories (St. Paul, MN, EUA). La GM (Garamicina G.U. 160 mg/2 mL, lotes 0DPDA006 y 1DPDA002) se adquirió de Schering-Plough (México, DF). El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), el suero fetal bovino (SFB), la tripsina, el antibiótico (10,000 U/mL de penicilina y 10,000 µg/mL de estreptomina), así como otros reactivos para cultivo de tejidos se obtuvieron de Gibco (México, DF). Los platos para cultivo celular los suministró Nunc (Roskilde, Dinamarca). El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el dimetilsulfóxido (DMSO), el paraformaldehído, el tritón X-100, la albúmina sérica bovina (ASB), el p-nitrofenil-*N*-acetil-β,D-glucosaminido, el NADPH, la enzima glutatión reductasa (GR), el glutatión reducido (GSH), el nitroazul de



tetrazolio (NBT), la xantina oxidasa y el 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA). El ácido tricloroacético (TCA) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se adquirieron de J.T. Baker (Xalostoc, Edo. de México, México). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-nitrotirosina (cat. 189542) se obtuvo de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA). El anticuerpo policlonal de conejo anti-PCNA – marcador de proliferación (cat. ab2426) se obtuvo de Abcam (Cambridge, MA, EUA). Los anticuerpos secundarios biotinilados anti-IgG-B de ratón (cat. sc-2098) y anti-IgB de conejo (cat. sc-2040) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EUA). El estuche para la detección de muerte celular *in situ*, POD (cat. 11 684 817 910), se adquirió de Roche Applied Science (Mannheim, Alemania). La estreptavidina-HRP (cat. K0690) y la 3,3'-diaminobencidina (DAB, cat. K3468) se adquirieron de Dako (Carpintería, CA, EUA). Todas las demás sustancias usadas fueron grado reactivo y se obtuvieron comercialmente.

5.2. Estudio *in vitro*

5.2.1. Cultivos celulares

El cultivo de la línea celular epitelial de túbulos renales derivados de cerdos Hampshire LLC-PK1 es un modelo aceptado para el estudio de la toxicidad de aminoglicósidos (de Arriba *et al.*, 2009., Pessoa *et al.*, 2009; Servais *et al.*, 2006; Tagliati *et al.*, 2012). Esta línea celular se cultivó en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y penicilina/estreptomina al 1%, y condiciones permisivas para el crecimiento, que consisten de una atmósfera de 95% aire – 5% CO_2 a 37°C. Las células se sub-cultivaron dos o tres veces por semana cuando alcanzaban aproximadamente el 80% de confluencia. Para esto, las células se despegaban de las cajas Petri incubándolas con tripsina por 5 minutos, se centrifugaban a 1,000 x g por 3 minutos y se re-suspendían en DMEM suplementado con SFB al 10% y antibiótico (AB) al 1%. Una fracción de células se sub-cultivó en cajas Petri para mantenerlas en crecimiento y la fracción restante se sembró en placas de 48 pozos a una densidad de 4×10^4 células/cm²; luego las células se incubaron 24 horas para permitir su adherencia y crecimiento, antes de iniciar los experimentos (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010).



5.2.2. Diseño experimental

Para los estudios de viabilidad celular, la placa de 48 pozos se dividió en 12 grupos de 4 pozos cada uno. Los ensayos tuvieron una duración total de 96 horas. Cada 24 horas el medio de cultivo se reemplazaba por medio fresco con características determinadas (Velasco-Velázquez *et al.*, 2006). La identificación de los grupos y los tratamientos se presentan en la Tabla 3. La evaluación de la viabilidad comprendió 3 experimentos independientes con el arreglo presentado en la Tabla 3.

Tabla 3. Diseño experimental y denominación de grupos para la determinación de viabilidad en células LLC-PK1 tratadas con SFN y GM.

Grupo	0-24 h	24-48 h	48-72 h	72-96 h
CT	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
SFN1	SFN 1.0 μ M en DMEM	SFN 1.0 μ M en DMEM	SFN 1.0 μ M en DMEM	SFN 1.0 μ M en DMEM
SFN3	SFN 3.0 μ M en DMEM	SFN 3.0 μ M en DMEM	SFN 3.0 μ M en DMEM	SFN 3.0 μ M en DMEM
SFN5	SFN 5.0 μ M en DMEM	SFN 5.0 μ M en DMEM	SFN 5.0 μ M en DMEM	SFN 5.0 μ M en DMEM
SFN7.5	SFN 7.5 μ M en DMEM	SFN 7.5 μ M en DMEM	SFN 7.5 μ M en DMEM	SFN 7.5 μ M en DMEM
SFN10	SFN 10.0 μ M en DMEM	SFN 10.0 μ M en DMEM	SFN 10.0 μ M en DMEM	SFN 10.0 μ M en DMEM
GM	DMEM	GM 8 mM en DMEM	GM 8 mM en DMEM	GM 8 mM en DMEM
SFN1+GM	SFN 1.0 μ M en DMEM	SFN 1.0 μ M y GM 8 mM en DMEM	SFN 1.0 μ M y GM 8 mM en DMEM	SFN 1.0 μ M y GM 8 mM en DMEM
SFN3+GM	SFN 3.0 μ M en DMEM	SFN 3.0 μ M y GM 8 mM en DMEM	SFN 3.0 μ M y GM 8 mM en DMEM	SFN 3.0 μ M y GM 8 mM en DMEM
SFN5+GM	SFN 5.0 μ M en DMEM	SFN 5.0 μ M y GM 8 mM en DMEM	SFN 5.0 μ M y GM 8 mM en DMEM	SFN 5.0 μ M y GM 8 mM en DMEM
SFN7.5+GM	SFN 7.5 μ M en DMEM	SFN 7.5 μ M y GM 8 mM en DMEM	SFN 7.5 μ M y GM 8 mM en DMEM	SFN 7.5 μ M y GM 8 mM en DMEM
SFN10+GM	SFN 10.0 μ M en DMEM	SFN 10.0 μ M y GM 8 mM en DMEM	SFN 10.0 μ M y GM 8 mM en DMEM	SFN 10.0 μ M y GM 8 mM en DMEM

CT: control (células sin tratamiento), DMEM: medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium, SFN: sulforafano, GM: gentamicina. DMEM se uso suplementado con SFB al 1% y AB al 1% en todos los tratamientos. El volumen fue de 200 μ L/pozo.

5.2.3. Viabilidad celular

El ensayo con MTT -un ensayo de actividad metabólica- mide la función mitocondrial y es usado frecuentemente para detectar pérdidas en la supervivencia/viabilidad celular debido a un fármaco o una toxina (Sumantran, 2011). La sal de tetrazolio soluble MTT se convierte a cristales insolubles de formazán por reducción (Stoddart, 2011).

Transcurridas las 96 horas del experimento el medio de cultivo se retiró y las células entonces se incubaron a 37°C en medio DMEM con MTT en una concentración de 0.125 mg/mL. Luego de una hora el medio con MTT se retiró y los cristales de formazán depositados en la placa se disolvieron en 200 μ L de solución HCl 0.1 N en isopropanol y se determinó la absorbancia a 570 nm de cada pozo en la placa. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad con respecto a las células del grupo CT.

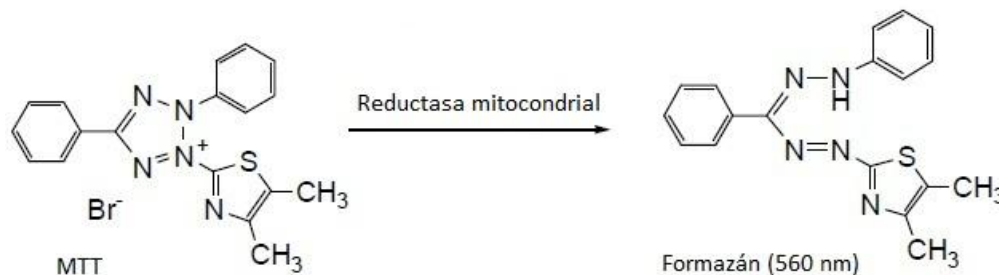


Figura 9. Reacción del MTT en la mitocondria celular.

5.3. Estudio *in vivo*

5.3.1. Animales y tratamiento

Para este estudio se usaron ratas macho Wistar con un peso corporal inicial de 230 g \pm 30 g, mantenidas en instalaciones, ambientes y condiciones, de acuerdo a las disposiciones contenidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. El protocolo de investigación utilizado fue revisado y aprobado por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM (OFICIO/FQ/CICUAL/038/12).

5.3.2. Diseño experimental

En la Figura 10 se esquematiza el protocolo *in vivo* desarrollado. Se corrió una serie experimental de 4 grupos de ratas, identificados así: grupo CT: control (n=8); grupo SFN: sulforafano (n=8); grupo GM: gentamicina (n=12); grupo SFN+GM: sulforafano + gentamicina (n=10). La inducción de daño renal se obtuvo mediante la administración subcutánea (SC) de 70 mg/Kg/12 h de GM por cuatro días (8 inyecciones) a las ratas

de los grupos GM y SFN+GM. A las ratas del grupo CT se les administró solución salina isotónica (SSI) en vez de GM (Maldonado *et al.*, 2003; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2003). A partir de una solución stock 100 mM de SFN en DMSO se prepara una solución 2 mM de SFN en SSI. Usando esta solución de trabajo, a las ratas de los grupo SFN y SFN+GM se les administró una dosis de 1,000 µg/Kg/día vía intraperitoneal (IP) durante los cuatro días del ensayo. A las ratas de los grupos CT y GM, se les administró del mismo modo el vehículo SSI. Todos los animales se colocaron en jaulas metabólicas el cuarto día del estudio para recolectar la orina de 24 horas. Cumplido este periodo las ratas se eutanizaron anestesiándose con una inyección IP de pentobarbital sódico (60 mg/Kg) y desangrándolas vía aorta. La sangre se recolectó en jeringas con heparina como anticoagulante, se obtuvo el plasma por centrifugación a 4,100 x g, por 10 minutos y se almacenó a -20°C hasta la determinación de los marcadores de daño renal.

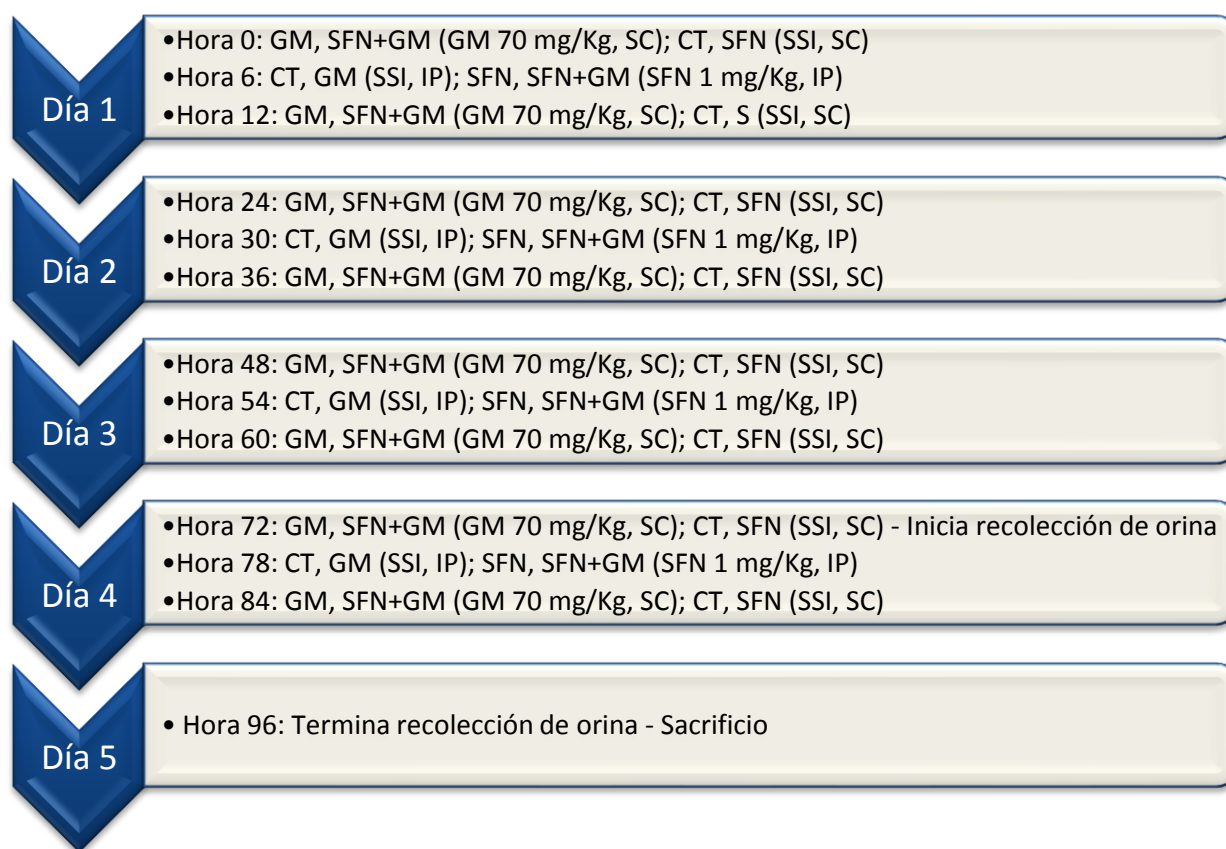


Figura 10. Esquema de tratamiento GM-SFN para ratas Wistar.

Después de retirar toda la sangre, rápidamente el riñón derecho se removió, se pesó, y se rebanó en pequeños cortes que se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento en análisis bioquímicos. El riñón restante se perfundió con amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4 y solución de formaldehído al 4% en PBS pH 7.4, se removió y se preservó en solución de formaldehído para estudios histopatológicos, de inmunohistoquímica (IHQ), y de marcaje enzimático y detección inmunohistoquímica (TUNEL).

5.3.3. Muestras

Orina: Para cada rata se registró el volumen urinario total para el período determinado. Posteriormente, se determinó la excreción de creatinina, N-acetil- β ,D-glucosaminidasa (NAG) y proteínas totales.

Plasma: Se determinaron los niveles de creatinina y nitrógeno ureico (BUN), y la actividad enzimática de GPx.

Cortes de tejido renal: De los cortes se separó la corteza renal. Una fracción pesada de este tejido se homogenizó en amortiguador de fosfatos (50 mM) pH 7.4 con EDTA 1 mM y Tritón X-100 al 0.1% enfriado en hielo, de modo que el homogenado resultó en una proporción peso:volumen 1:10. Este homogenado se centrifugó a $20,937 \times g$, por 1 hora, a 4°C y el sobrenadante se usó para la determinación de la actividad de las enzimas CAT, GPx, SOD total (citosólica y mitocondrial), Mn-SOD, GST y GR.

Riñón en formaldehído al 4%: Con el objeto de deshidratar el tejido, los riñones fijados se pasaron por un tren de solventes que inició con etanol acuoso en concentraciones crecientes, etanol absoluto, etanol-xilol y finalmente xilol. Luego se permitió la infiltración del tejido con parafina a una temperatura de 60°C por 2-3 horas, y cada riñón se puso en un molde y se incluyó en parafina. Cuando la parafina se enfrió, los bloques resultantes se desmontaron de sus moldes y se hicieron cortes de $3 \mu\text{m}$ con un micrótopo de rotación. Se realizaron cortes para estudios histopatológicos de tinción con hematoxilina y eosina (H&E), ensayo TUNEL y estudios de IHQ para determinar la

abundancia de 3-nitrotirosina (3-NT) y del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

5.3.4. Evaluación de la función renal.

Creatinina en plasma y orina. Se realizó mediante equipo automatizado basado en la reacción de formación del complejo colorido picrato-creatinina (reacción de Jaffé, Figura 11) el cual absorbe a 492 nm (Chinn *et al.*, 1978).

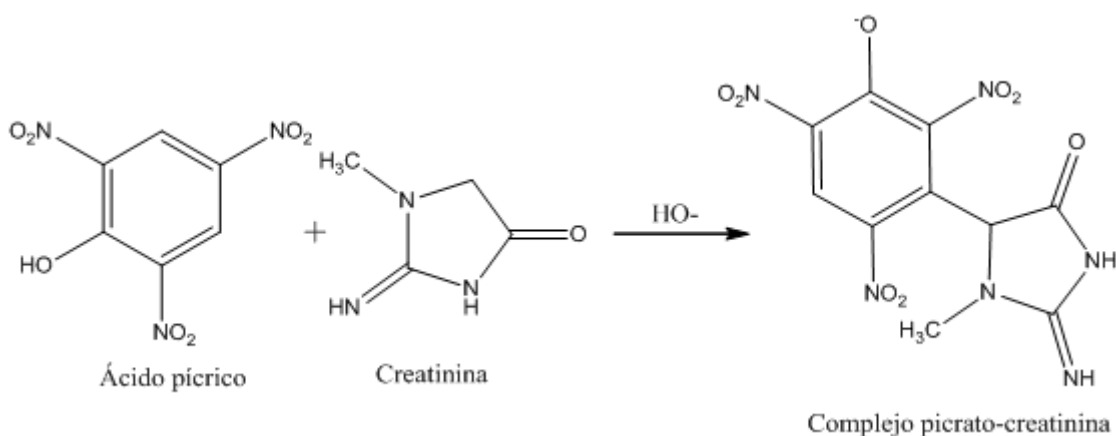


Figura 11. Reacción de Jaffé para la determinación de creatinina.

Depuración de creatinina. A partir de las determinaciones de creatinina en plasma y orina, se calculó la depuración de creatinina mediante la Ecuación 13:

$$D_{\text{creatinina}}(\text{mL}/\text{min}) = \frac{Cr_{\text{orina}}(\text{mg}/\text{dL}) * Q_{\text{orina}}(\text{mL}/\text{min})}{Cr_{\text{plasma}}(\text{mg}/\text{dL})} \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde, $D_{\text{creatinina}}$ es la depuración de creatinina, Cr_{orina} es la concentración de creatinina hallada en la orina, Cr_{plasma} es la concentración plasmática de creatinina y Q_{orina} es el gasto urinario (expresado en mL/min) en las 24 horas de recolección (Schwartz y Furth, 2007).

BUN. Se determinó mediante ensayo colorimétrico en equipo automatizado, que utiliza como principio el método propuesto por Jung *et al.* (1975). El método se basa en la

reacción de formación del complejo colorido ortoftaldehído-urea cuya mayor absorptividad molar se encuentra a 510 nm (figura 12).

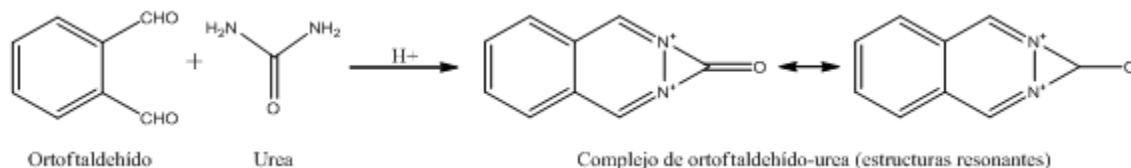


Figura 12. Formación del complejo ortoftaldehído-urea para la determinación de BUN.

Proteínas totales en orina (proteinuria). Las proteínas totales en la muestra se precipitaron con TCA al 12.5% y luego se determinaron por turbidimetría a 420 nm. Se cuantificó en una curva patrón de ASB entre 0.04 mg/dL y 0.8 mg/dL.

Excreción de NAG. La determinación de la NAG excretada se realizó midiendo el *p*-nitrofenol formado a partir de *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β ,D-glucosaminido, el cual es sustrato de la NAG. La forma aniónica del *p*-nitrofenol en medio alcalino puede leerse por colorimetría a 405 nm (Jung *et al.*, 1991) (Figura 13).

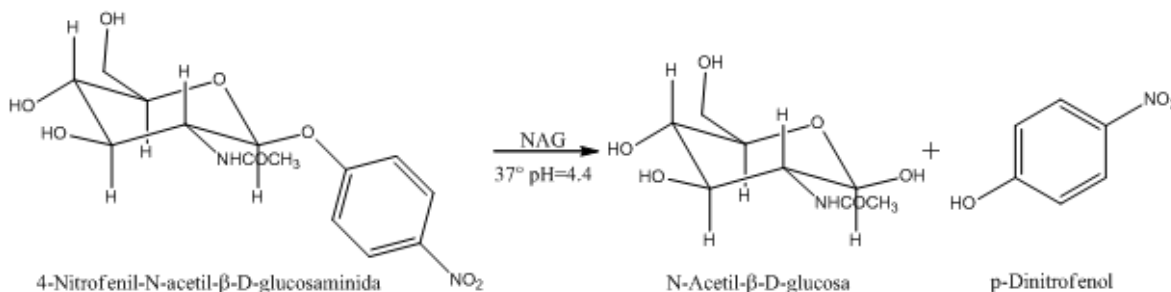


Figura 13. Formación de *p*-nitrofenol catalizada por la NAG.

Actividad de GPx en plasma. Se determinó por el método descrito por Lawrence y Burk (1976), el cual se basa en la medición de la disminución del NADPH a 340 nm, secundario a la reacción de reducción del GSSG por la GR. Este último se produce en presencia de H₂O₂ por la acción de la GPx (Figura 14).

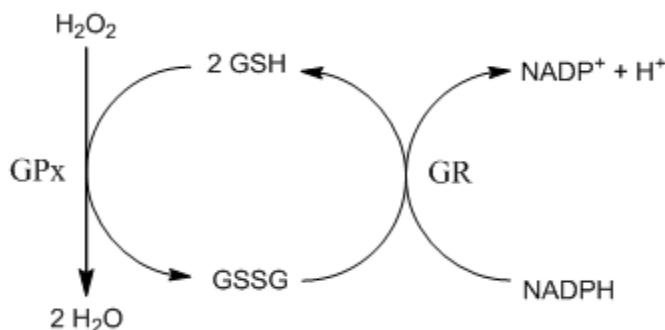


Figura 14. Oxidación del GSH catalizada por la GPx y reducción del GSSG catalizada por la GR.

5.3.5. Histopatología renal

Se usaron cortes de 3 μm que se tiñeron con H&E, donde la hematoxilina tiñe los núcleos en morado y la eosina tiñe de rosa el citoplasma y las membranas de las células tubulares. De este modo, las secciones dañadas son apreciables. Para la cuantificación del daño, se seleccionaron cinco glomérulos en diferentes regiones de la corteza renal de cada riñón, se contaron 10 túbulos proximales alrededor de cada glomérulo y, de estos, se contaron los túbulos dañados. Se usó el paquete Leica QWin (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, RU) para analizar las imágenes y cuantificar el área dañada para cada túbulo proximal en el campo.

5.3.6. Detección y cuantificación de apoptosis

Las células en apoptosis se detectaron en el tejido mediante la técnica de marcaje de extremos de “nicks” con dUTP mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling). Durante la apoptosis, el rompimiento en el ADN genómico puede dar lugar a fragmentos de ADN de cadena doble de bajo peso molecular (mono y oligonucleosomas) y cortes en cadenas sencillas (“nicks”) en ADN de alto peso molecular. Estos cortes se pueden identificar por marcaje de los extremos 3'-OH libres con nucleótidos modificados en una reacción enzimática (Roche, 2010). Los cortes histológicos de 3 μm contenidos en laminillas se desparafinaron a 70°C durante 20 minutos y se hidrataron en un tren de solventes que incluía xilol, xilol-etanol, etanol absoluto, etanol 90%, etanol 70% y agua, en este orden. Luego se hizo recuperación antigénica del tejido con citrato de sodio

0.01 M pH 6.0 a 90°C durante 20 minutos, seguido de tres lavados con PBS pH 7.4 y dos lavados con una mezcla de H₂O₂ al 3% en metanol para eliminar la peroxidasa endógena. Después de lavarse con agua destilada y con PBS, el tejido se bloqueó con suero normal de cerdo (SNC) al 2% en PBS durante 1 hora en cámara húmeda. Posteriormente, se llevó a cabo una nueva incubación de 50 minutos a 37°C en oscuridad, en mezcla de reacción para TUNEL (Estuche para detección de muerte celular In Situ, POD, Roche) que contiene la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y una mezcla de nucleótidos marcados con fluoresceína. Después de 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS, los tejidos se incubaron 30 minutos a 37°C en el reactivo convertidor-POD que contiene anticuerpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidasa de rábano (HRP). Después de tres lavados con PBS, la frecuencia de eventos de apoptosis se revela con DAB, sustrato de la HRP. Finalmente, se hace contratinción con hematoxilina, deshidratación del tejido con el mismo tren de solventes que en la hidratación inicial pero en sentido inverso y montaje de las laminillas para su análisis. Las imágenes de los tejidos y la cuantificación de las células positivas a TUNEL (color café) se obtuvieron por análisis digital usando el sistema de escaneo ScanScope® CS y el paquete Spectrum™ (Aperio, Vista, CA, EUA).

5.3.7. Evaluación inmunohistoquímica del daño por estrés oxidante/nitrante y de la proliferación celular (3-NT y PCNA)

El biomarcador estable de nitración de proteínas e indicador de formación de peroxinitrito (ONOO⁻) 3-NT y el marcador de proliferación celular PCNA se detectaron mediante análisis de IHQ (Mihm *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2001). Usando cortes de 3 µm, se siguió el mismo protocolo que para TUNEL hasta la etapa del bloqueo con SNC, pero en vez de incubar con TdT en mezcla de reacción, los tejidos se incubaron toda la noche con anticuerpo primario dirigido contra 3-NT o PCNA, en diluciones 1:250 y 1:500 en SNC (determinadas previamente en la estandarización del ensayo), respectivamente. Se incubaron tejidos adicionales con anticuerpos anti-IgG del mismo isotipo de los anticuerpos primarios, como controles negativos. Cumplida esta etapa, los cortes se sometieron a cinco lavados de 8 minutos con PBS y luego se incubaron con anticuerpos secundarios biotinilados anti-ratón (3-NT) o anti-conejo (PCNA) por 30



minutos. Después de tres lavados de 5 minutos con PBS, los tejidos se incubaron por 30 minutos con estreptavidina conjugada a HRP. Después de tres lavados más con PBS, la prevalencia de 3-NT o PCNA se reveló con DAB. Las laminillas se contratiñeron, se deshidrataron y se montaron para su análisis. Las imágenes de los tejidos se obtuvieron con el sistema de escaneo ScanScope® CS (Aperio, Vista, CA, USA). Las regiones inmunopositivas (color café) a 3-NT se cuantificaron mediante el paquete Spectrum™ (Aperio, Vista, CA, EUA) y la cuantificación de la proliferación celular se realizó por conteo de núcleos positivos a PCNA en 10 túbulos alrededor de un glomérulo; se contaron un total de 5 glomérulos por tejido.

5.3.8. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

Actividad de CAT. Se basa en el cambio de la absorbancia, medida a 240 nm, debido al decaimiento del H_2O_2 , catalizado por la CAT (Aebi, 1984). Los resultados se expresan en k/mg de proteína, donde k es la constante de reacción de primer orden determinada para la CAT.

Actividad de GPx. Se determinó de la misma manera que se hizo para las muestras de plasma. La actividad se informa como unidades/mg de proteína, donde una unidad se refiere a las μmol de NADPH oxidadas por minuto.

Actividad de SOD. Se determinó por el método descrito por Oberley y Spitz (1984), cuyo principio es la reducción del NBT a formazán, por $O_2^{\cdot-}$. El $O_2^{\cdot-}$ es producido mediante la reacción de la xantina oxidasa (Figura 15). No obstante, el SOD presente en la muestra captura el $O_2^{\cdot-}$ inhibiendo la reducción del NBT. Cuantificando por colorimetría a 560 nm el formazán generado, se obtuvo la actividad de la enzima en unidades de SOD/mg de proteína, donde una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD requerida para inhibir en un 50% la reducción de NBT.

La actividad Mn-SOD se obtuvo adicionando ion cianuro al sobrenadante del homogenado del tejido cortical, a una concentración final de 2 mM, con lo que se inhibe la Cu, Zn-SOD en más del 90% y la Mn-SOD no se altera. Luego se determina la actividad mediante generación de $O_2^{\cdot-}$ y reducción de NBT.

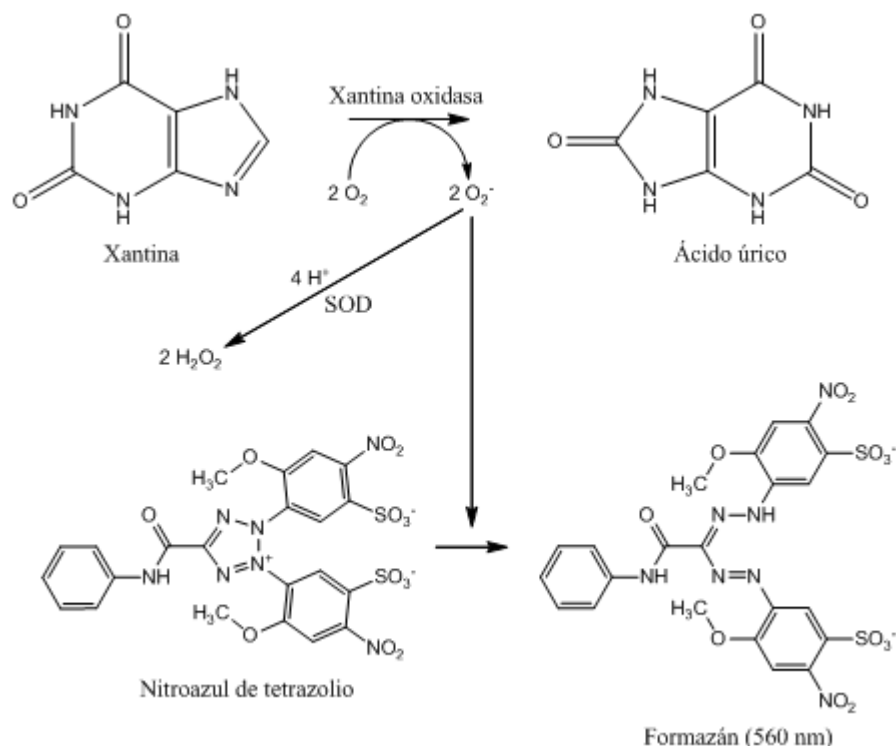


Figura 15. Principio químico aplicado en la determinación de la actividad de SOD.

Actividad de GST. Se obtuvo cuantificando coloriméticamente a 340 nm, la formación del conjugado entre GSH y CNDB, catalizada por la GST (Figura 16). La actividad enzimática de la GST se expresa como μmol de conjugado/min/mg de proteína, bajo las condiciones del ensayo (Habig *et al.*, 1974).

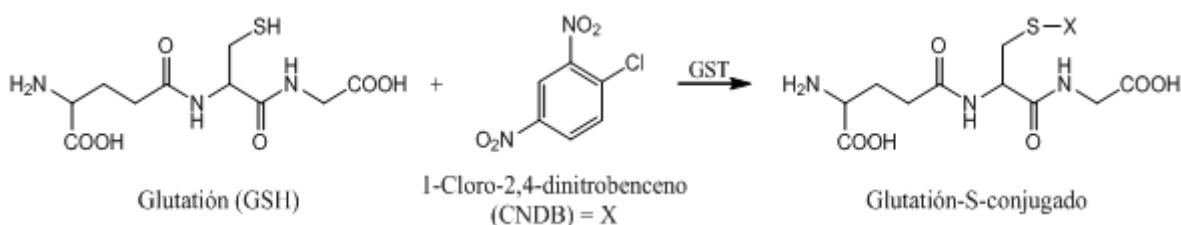


Figura 16. Conjugación del GSH con el CNDB catalizada por GST.

Actividad de GR. La actividad de GR se determinó de acuerdo al método descrito por Carlberg y Mannervick (1975). GR convierte GSSG en GSH usando NADPH como reductor (Figura 17). La disminución de NADPH se midió coloriméticamente a una

longitud de onda de 340 nm. La actividad se reportó como μmol de NADPH/min/mg de proteína, bajo las condiciones del ensayo.

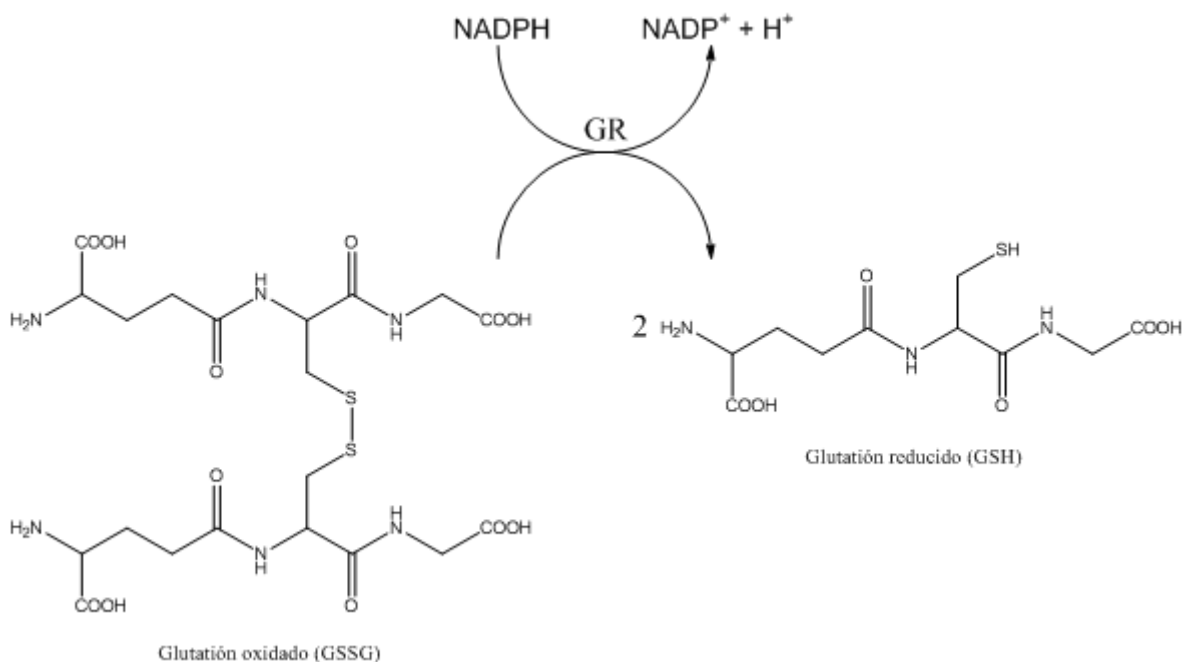


Figura 17. Reducción de GSSG en la determinación de la actividad de GR.

5.4. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar de la media (EEM) de las observaciones. Los valores se analizan mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido por un test de comparaciones múltiples de Bonferroni, usando el paquete GraphPad PRISM versión 5.00. Se consideran diferencias significativas los valores con $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Estudio *in vitro*

6.1.1. El SFN incrementa la reducción de MTT y protege las células LLC-PK1 de la muerte inducida por GM

Resulta interesante, el incremento que se obtuvo en la reducción de MTT en las células incubadas sólo con SFN a las concentraciones de 1-7.5 μM . La reducción de MTT a 5

μM fue 42.8% mayor que en las células sin tratamiento (Figura 18A). En este mismo rango de concentración se observó un efecto protector del SFN (Figura 18B). El tratamiento de 72 horas con GM redujo la viabilidad celular (expresada como porcentaje de reducción de MTT) hasta un 60.4%. La protección fue evidente, con viabilidades que van desde el 83.9% hasta el 92.8% de reducción de MTT con respecto al control. A la concentración de SFN de 5 μM se observó la mejor protección. A la concentración de 10 μM no se observó aumento en la reducción de MTT (Figura 18A) ni protección frente al reto con GM (Figura 18B).

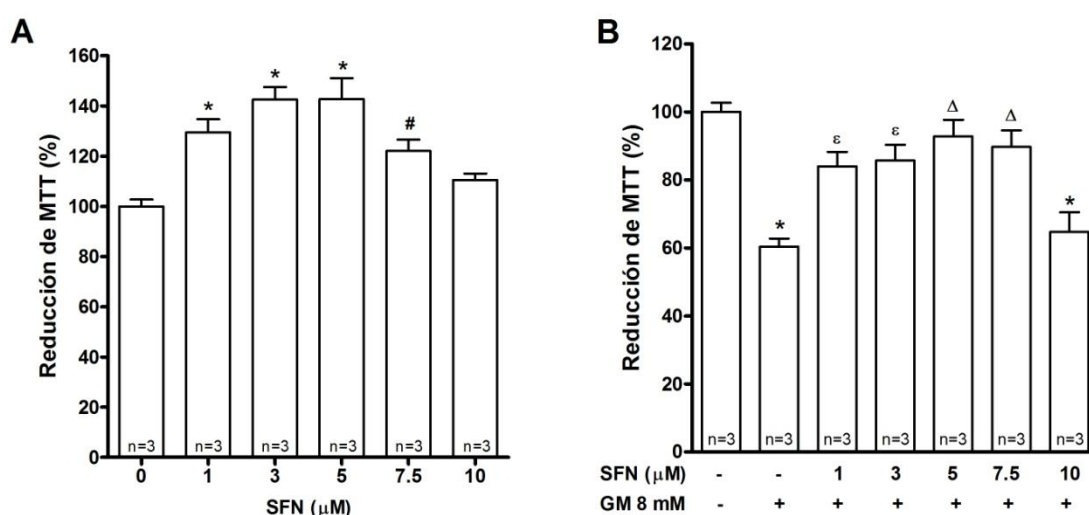


Figura 18. (A) Efecto del SFN sobre la viabilidad de células LLC-PK1. Las células se incubaron con SFN (1-10 μM) durante 96 h. (B) El SFN previene la muerte celular inducida por GM. Las células se incubaron con SFN (1-10 μM) por 24 h y luego se co-incubaron con SFN (1-10 μM) y GM (8 mM) durante 72 h. Las células control se incubaron sin SFN (A) o sin SFN y GM (B). La viabilidad celular es expresada como reducción de MTT. Los datos son promedio \pm EEM, n = 3. ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *P<0.001 vs. CT; #P<0.05 vs. CT; ϵ P<0.01 vs. GM; Δ P<0.001 vs. GM.

6.2. Estudio *in vivo*

En la Tabla 4 se presentan el efecto del tratamiento SFN/GM sobre el gasto urinario (normalizado con respecto al peso de los animales), el peso corporal, el peso del riñón derecho y la relación peso renal/peso corporal (PR/PC) de las ratas bajo estudio. No se observaron diferencias en los valores de gasto urinario entre los grupos experimentales.

Un ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Bonferroni ejecutados sobre los pesos corporales para el primer día de tratamiento no arrojó diferencias significativas a $p < 0.05$. Adicionalmente, se realizó un ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni para determinar si los diferentes tratamientos afectaron la tasa de variación de peso corporal y no se encontró un efecto significativo. El peso corporal al momento del sacrificio tampoco presentó diferencias entre los grupos estudiados (Tabla 4).

Tabla 4. Gasto urinario, peso corporal, peso del riñón derecho y relación peso renal/peso corporal al final del tratamiento en los grupos estudiados.

	CT	SFN	GM	SFN+GM
Gasto urinario (mL/día/100 g PC)	5.9±0.5	5.7±1.4	8.4±0.9	6.7±1.1
Peso corporal (g)	238.9±5.1	227.0±4.4	226.0±4.0	222.2±3.4
Peso riñón derecho (g)	0.89±0.02	0.91±0.03	1.13±0.04*	1.12±0.03*
Relación PR/PC (%)	0.37±0.01	0.40±0.01	0.50±0.01*	0.50±0.01*

PR: peso renal; PC: peso corporal. Los datos son promedio ± EEM (n=8-12). * $P < 0.001$ vs. CT.

Al momento del sacrificio, el riñón derecho de cada rata se removió y se pesó. Se encontró un aumento significativo en el peso promedio de los riñones, así como en la relación PR/PC, en las ratas de los grupos GM y SFN+GM, con respecto a los grupos CT y SFN (Tabla 4). Esta observación permitió vislumbrar un efecto de la GM sobre los riñones de las ratas tratadas.

6.2.1. El tratamiento con SFN atenúa la disfunción y el daño renal inducidos por GM en ratas

Los niveles de creatinina en plasma aumentaron significativamente debido al tratamiento con GM (Figura 19A). El grupo GM presentó un nivel de creatinina en plasma 2.2 veces mayor que el del grupo control. La protección en la función renal comienza a hacerse evidente con una disminución de alrededor del 33% de la creatinina plasmática en el grupo SFN+GM con respecto al grupo GM ($P < 0.01$ vs GM). La tendencia observada es correspondiente con las que se obtuvieron para los parámetros depuración de creatinina (Figura 19B), BUN (Figura 19C) y GPx en plasma (Figura 19D). La depuración de creatinina experimentó una caída en el grupo de daño (GM) de un poco más del 50% con respecto a las ratas tratadas con los vehículos. El

tratamiento con SFN en las ratas del grupo SFN+GM permitió una recuperación de casi un 75% de la capacidad de depuración con respecto a las ratas control. La acumulación de nitrógeno ureico en sangre, en el grupo de daño alcanzó aproximadamente el doble del nivel presentado en el grupo control ($P < 0.001$). En el grupo co-administrado con SFN y GM hay una recuperación parcial de los niveles de BUN ($P < 0.01$ vs. GM). La actividad de la enzima GPx experimenta una caída en el grupo GM de 1 U/mL con respecto al grupo control. Sin embargo, en el grupo de co-administración hay una recuperación parcial de la actividad, 75% la del control ($P < 0.01$) y 33% mayor que en GM ($P < 0.05$). Las actividades de GPx en plasma de los grupos CT y SFN fueron similares.

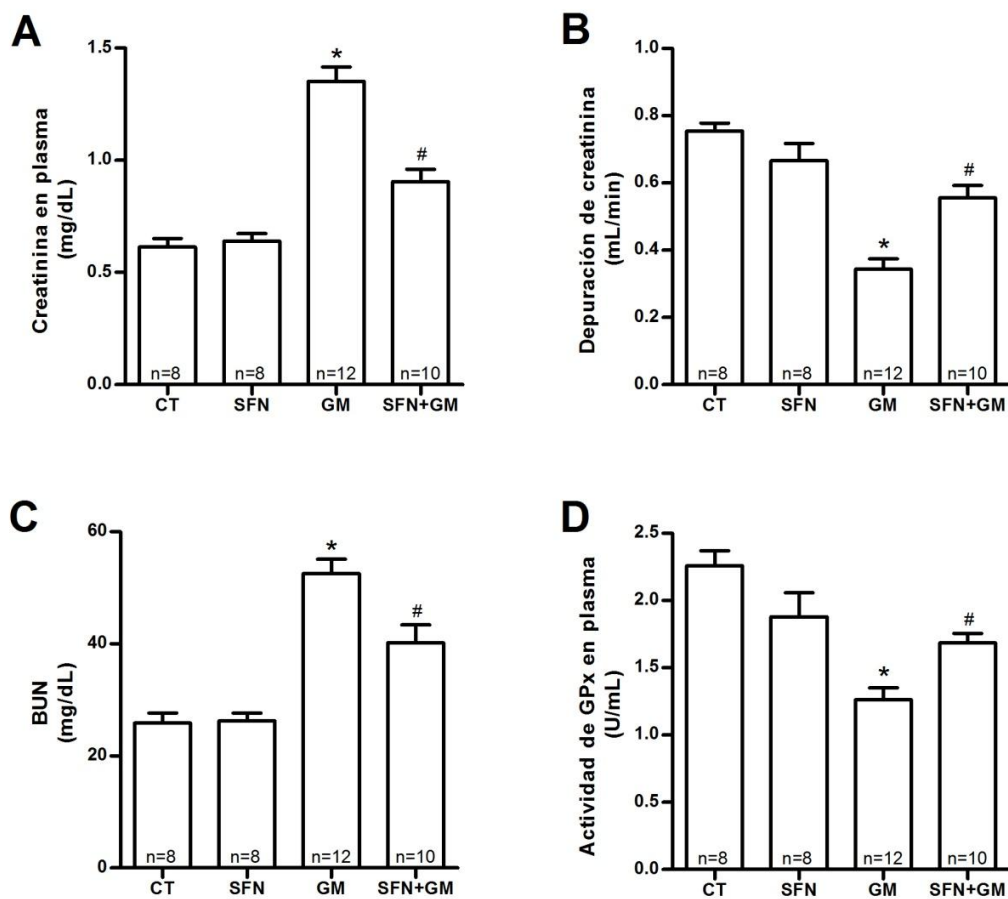


Figura 19. Creatinina en plasma (A), depuración de creatinina (B), BUN (C) y actividad de GPx en plasma (D). Los datos son promedio \pm EEM. ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $P < 0.001$ vs CT; # $P < 0.01$ vs GM.

La excreción urinaria elevada de proteínas totales (3.6 veces la del grupo CT) y de la enzima lisosomal NAG (12.2 veces la del grupo CT) en el grupo GM dan cuenta del marcado daño tubular inducido por la GM (figura 20A-B). Hay una atenuación importante en la proteinuria y la excreción de NAG debido al tratamiento con SFN, hasta valores 41% y 66% respectivamente, menores que en el grupo GM ($P < 0.001$).

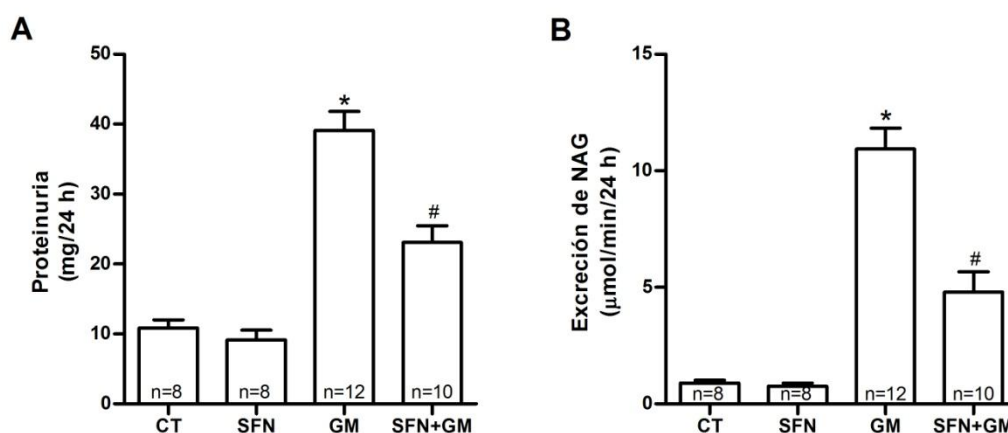


Figura 20. Excreción urinaria de proteína total (A) y NAG (B). Los datos son promedio \pm EEM. ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $P < 0.001$ vs CT y SFN; # $P < 0.001$ vs GM.

6.2.2. El tratamiento con SFN disminuye las alteraciones histológicas renales inducidas por GM

La tinción con H&E de los cortes renales obtenidos dan evidencia de un importante daño del tejido, situado principalmente hacia la corteza renal de las ratas del grupo GM. El edema, visible en el tejido (cruz en la Figura 21D), apoya la idea de que el daño es predominantemente por necrosis tubular; sin embargo, se observan núcleos pequeños teñidos intensamente con hematoxilina que indicarían también un fenotipo apoptótico de muerte. Se puede apreciar pérdida de la superficie en forma de cepillo del epitelio de túbulo proximales, así como restos celulares y contenido citoplásmico en la luz tubular. En algunos casos se encontró obstrucción total de los túbulo y pérdida completa de la estructura (asteriscos en la Figura 21D), así como aplanamiento de las paredes tubulares (flechas en la Figura 21D).

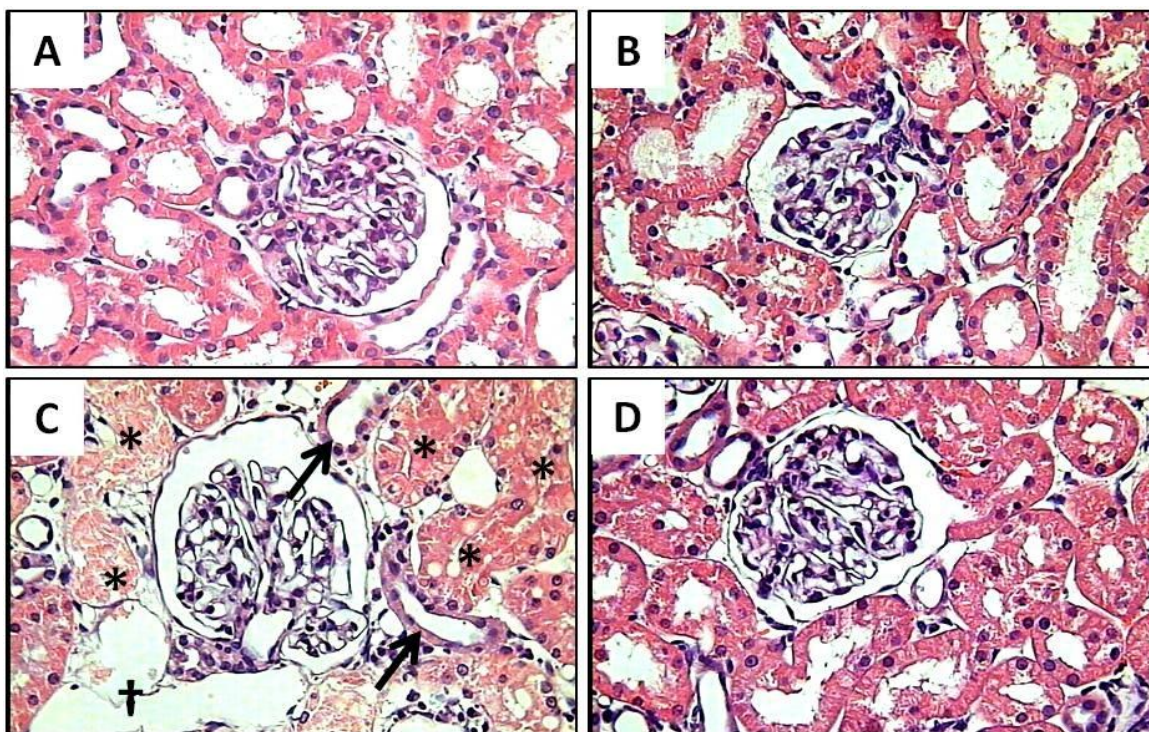


Figura 20. Histopatología renal representativa de las ratas estudiadas (tinción con H&E). Se observan secciones de la corteza renal con pérdidas en las estructuras en borde de cepillo del epitelio de túbulos proximales en el grupo GM (C). Los asteriscos representan obstrucción de la luz tubular o pérdida completa de la estructura tubular. Las flechas indican aplanamiento de las paredes tubulares. La cruz indica edema. Todas estas alteraciones se disminuyeron considerablemente en el grupo SFN+GM (D). Los grupos CT (A) y SFN (B) mostraron histologías normales (40X).

El porcentaje cuantificado de túbulos afectados fue de aproximadamente el 88% y el de área dañada por túbulo fue del 71% (Figura 22A-B). En el tejido del grupo SFN+GM el daño se manifestó en alrededor de un 31% de los túbulos cuantificados y el área dañada por túbulo fue del 17%, con diferencias significativas a $P < 0.001$. También en los riñones de ratas tratadas con GM y SFN, se percibieron células de mayor tamaño y algunos núcleos presentaron una apariencia pre-mitótica. Las secciones examinadas de las ratas de los grupos CT y SFN presentaron histologías normales sin alteraciones estructurales (Figuras 21A y 21B).

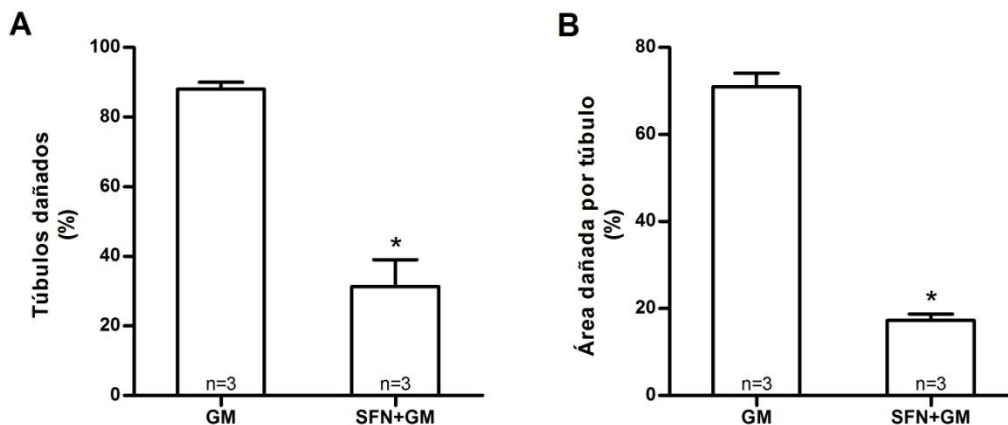


Figura 22. Porcentajes de túbulos dañados (A) y área dañada por túbulo (B). CT y SFN no presentaron túbulos dañados. Los datos son promedio \pm EEM. ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *P <0.001 vs GM.

6.2.3. El SFN reduce la muerte tubular apoptótica inducida por GM en ratas

En la figura 23C se pueden apreciar células tubulares -e incluso glomerulares- positivas a TUNEL en el grupo de ratas tratadas sólo con GM. Se observan núcleos teñidos intensamente representando apoptosis temprana, así como tinción citoplásmica más tenue que evidencia células apoptóticas en una fase más tardía. La positividad TUNEL, expresada como densidad total de tinción en $10^6 \mu\text{m}^2$, es mayor en el grupo GM, aproximadamente 3,3 veces, con respecto al grupo CT; mientras que en el grupo SFN+GM, la densidad es 1.6 veces mayor, con una diferencia significativa a $P < 0.01$, con respecto al grupo GM y sin diferencias con respecto al control (Figura 24).

6.2.4. El SFN disminuye la nitración de proteínas inducida por GM en ratas

Fue evidente la mayor inmunotinción de 3-NT en el grupo GM con relación al grupo control. Esta estuvo más localizada hacia los túbulos proximales e incluso se puede observar inmunotinción en el epitelio parietal de Bowman (Figura 25). También es notable que en el grupo en el que se co-administró GM y SFN, el marcaje 3-NT es menor con respecto al grupo de administración de GM solamente. La densidad de tinción en el grupo GM fue aproximadamente seis veces la observada en el grupo CT y aproximadamente 14 veces la observada en el grupo SFN+GM ($P < 0.05$, Figura 26).

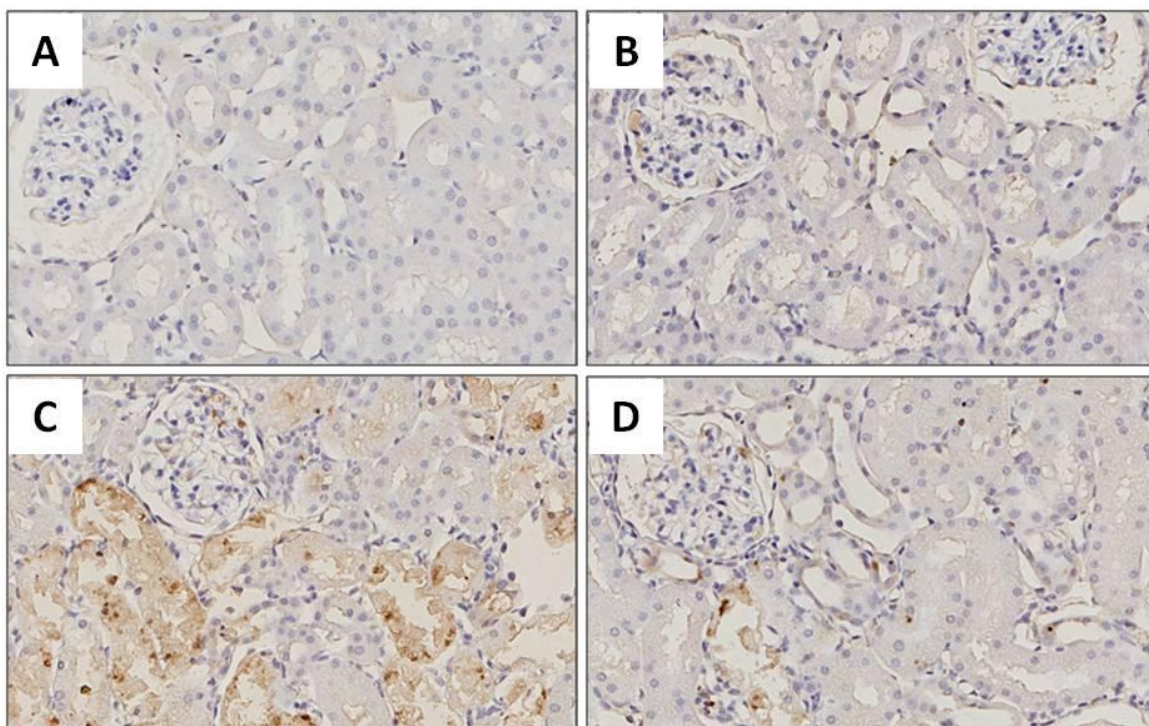


Figura 23. Detección de apoptosis por TUNEL. Las secciones de corteza renal de las ratas tratadas con GM muestran núcleos intensamente teñidos, indicando células tubulares en apoptosis temprana (C). Se ven varios núcleos positivos a TUNEL en los glomérulos (C). La tinción más débil representa células en fases más tardías de la apoptosis. La apoptosis fue atenuada significativamente en el grupo SFN+GM (D). Las secciones renales de los grupos CT (A) y SFN (B) muestran tinción basal (40X).

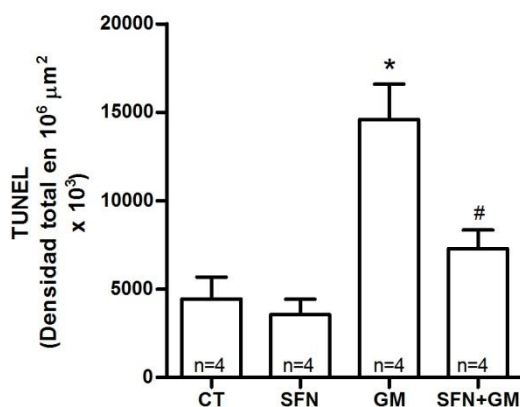


Figura 24. Análisis cuantitativo de apoptosis, detectada por TUNEL en tejido de ratas tratadas con GM y SFN. La inmunotinción se expresa como densidad total de tinción en $10^6 \mu\text{m}^2 \times 10^3$. Los datos son promedio \pm EEM. ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $P < 0.001$ vs CT y SFN; # $P < 0.001$ vs GM.

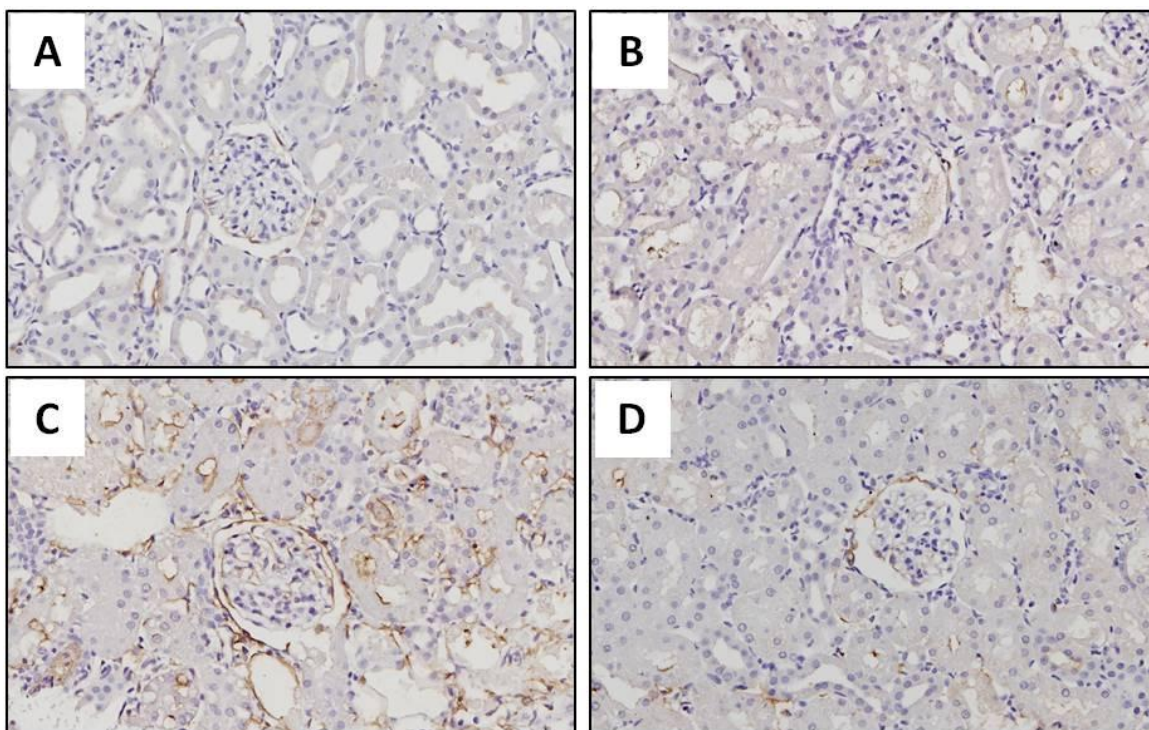


Figura 25. Detección inmunohistoquímica de 3-NT. Es notable la inmunoprevalencia de 3-NT en el grupo GM (C), con respecto a los grupos SFN+GM (D), CT (A) y SFN (B). Esta se expresó principalmente en el epitelio tubular y en el epitelio parietal de Bowman (40X).

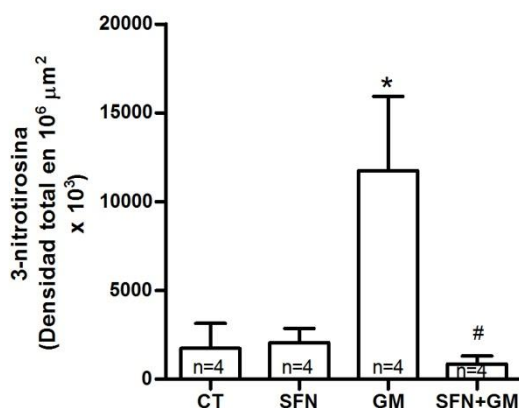


Figura 26. Cuantificación de la inmunotinción contra 3-NT en tejido de ratas tratadas con GM y SFN, expresada como densidad total de tinción en $10^6 \mu\text{m}^2 \times 10^3$. Los datos son promedio \pm EEM. ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $P < 0.05$ vs CT; # $P < 0.05$ vs GM.

6.2.5. La actividad de las enzimas CAT y GPx se preserva parcialmente en ratas tratadas con GM y SFN

Se observó una disminución importante en la actividad de CAT en riñón de las ratas del grupo GM con respecto al grupo CT ($P < 0.001$). El tratamiento con SFN en el grupo SFN+GM restableció parcialmente la actividad hasta aproximadamente un 71% de la observada en el grupo CT ($P < 0.05$ vs. GM; Figura 27A). Un comportamiento similar se observa con la GPx renal en el grupo de ratas tratadas con GM (Figura 27B). La actividad disminuye de manera significativa, hasta aproximadamente un 68% de la actividad observada en el grupo CT ($P < 0.001$). Se consigue una recuperación parcial de la actividad de GPx mediante el tratamiento con SFN; en el grupo SFN+GM la actividad es 23% mayor que en el grupo GM ($P < 0.05$).

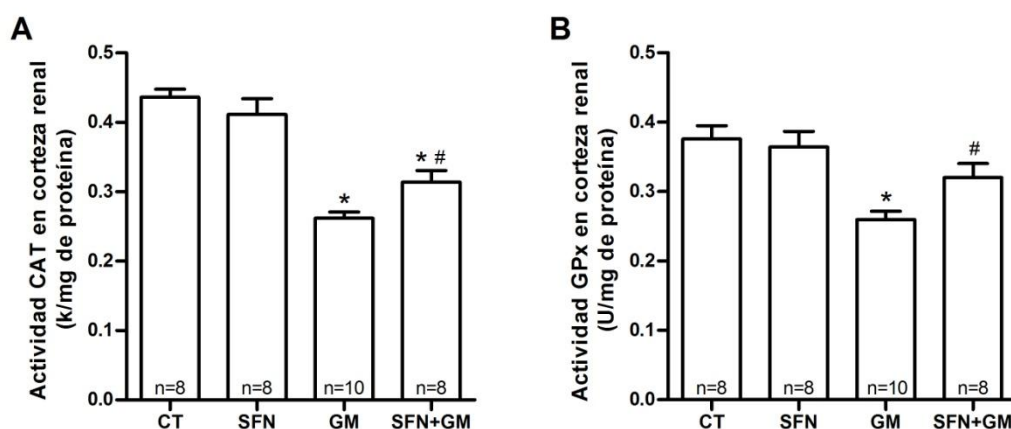


Figura 27. Actividades enzimáticas de CAT (A) y GPx (B) en riñón. Los datos son promedio \pm EEM. ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $P < 0.001$ vs CT; # $P < 0.05$ vs GM.

La Tabla 5 presenta los resultados obtenidos para la actividad de otras enzimas antioxidantes de la corteza renal. La actividad SOD total, la enzima mitocondrial Mn-SOD y GST no presentaron alteraciones por el tratamiento con GM. Sólo la actividad de GR resultó disminuida en aproximadamente un 16% con respecto al grupo CT ($P < 0.05$), sin que el tratamiento con SFN en el grupo SFN+GM consiguiera amortiguar este descenso.

Tabla 5. Actividad de las enzimas antioxidantes SOD total, Mn-SOD, GST y GR en corteza renal de las ratas bajo estudio.

	CT	SFN	GM	SFN+GM
SOD total (U/mg de proteína)	45.8±0.9	46.5±1.4	47.3±1.2	47.7±1.5
Mn-SOD (U/mg de proteína)	18.2±0.5	19.5±1.1	19.6±0.8	18.9±1.7
GST (µmol/min/mg de proteína)	0.15±0.00	0.14±0.00	0.13±0.00	0.14±0.01
GR (µmol/min/mg de proteína)	0.19±0.01	0.19±0.01	0.16±0.01*	0.17±0.01

SOD: superóxido dismutasa; Mn-SOD: superóxido dismutasa manganeso (mitocondrial); GST: glutatión S-transferasa; GR: glutatión reductasa. Los datos son promedio ± EEM (n=8-10). *P<0.05 vs. CT.

6.2.6. El SFN aumenta la tasa de regeneración tubular en riñón de ratas nefrotóxicas tratadas con GM

El marcador de proliferación celular, PCNA, presentó mayor inmunitinción en el grupo SFN+GM que en las ratas del grupo GM (Figuras 28C, 28D y 29). La regeneración celular fue más evidente en túbulos de la corteza renal. Si bien se aprecia un buen número de núcleos teñidos en el grupo GM (Figura 28C), no resultaron diferencias significativas con respecto al grupo CT (Figura 29). El tratamiento sólo con SFN no tiene ningún efecto en la proliferación de células del parénquima renal (Figuras 28B y 29).

7. DISCUSIÓN

Velasco-Velázquez y colaboradores (2006) obtuvieron una disminución en la viabilidad celular (determinada mediante el método de cristal violeta) de la magnitud observada en este ensayo usando el mismo protocolo de 72 horas de tratamiento con GM. Resulta llamativo el aumento que se ve en la reducción de MTT en los grupos tratados sólo con SFN, excepto a una concentración de 10 µM. Se ha observado que el SFN en bajas dosis promueve la proliferación de células troncales mesenquimales humanas, mientras que a altas dosis tiene efectos citotóxicos (Zanichelli *et al.*, 2012). Inicialmente, podría inferirse que el efecto protector que se observa se debe a un aumento en la proliferación celular provocado por el SFN, sin embargo, es preciso determinar esto evaluando la proliferación celular mediante una técnica adecuada para establecer si



existe tal aporte. Si bien los ensayos basados en la reducción de MTT se usan ampliamente para medir el potencial citotóxico de un compuesto y son aceptados en la detección de pérdidas en la supervivencia/viabilidad celular, estos miden la función mitocondrial (Sumantran, 2011). Es posible que el efecto que se esté observando en los grupos de incubación con sólo SFN, sea un aumento en la función mitocondrial o quizás un aumento en la biogénesis mitocondrial, y que esto pueda estar mediando la protección celular. Ya se ha planteado que la biogénesis mitocondrial puede ser mediada también por el factor Nrf2 (MacGarvey *et al.*, 2012; Piantadosi *et al.*, 2008), sin embargo, aún no se ha determinado que el SFN induzca tal efecto.

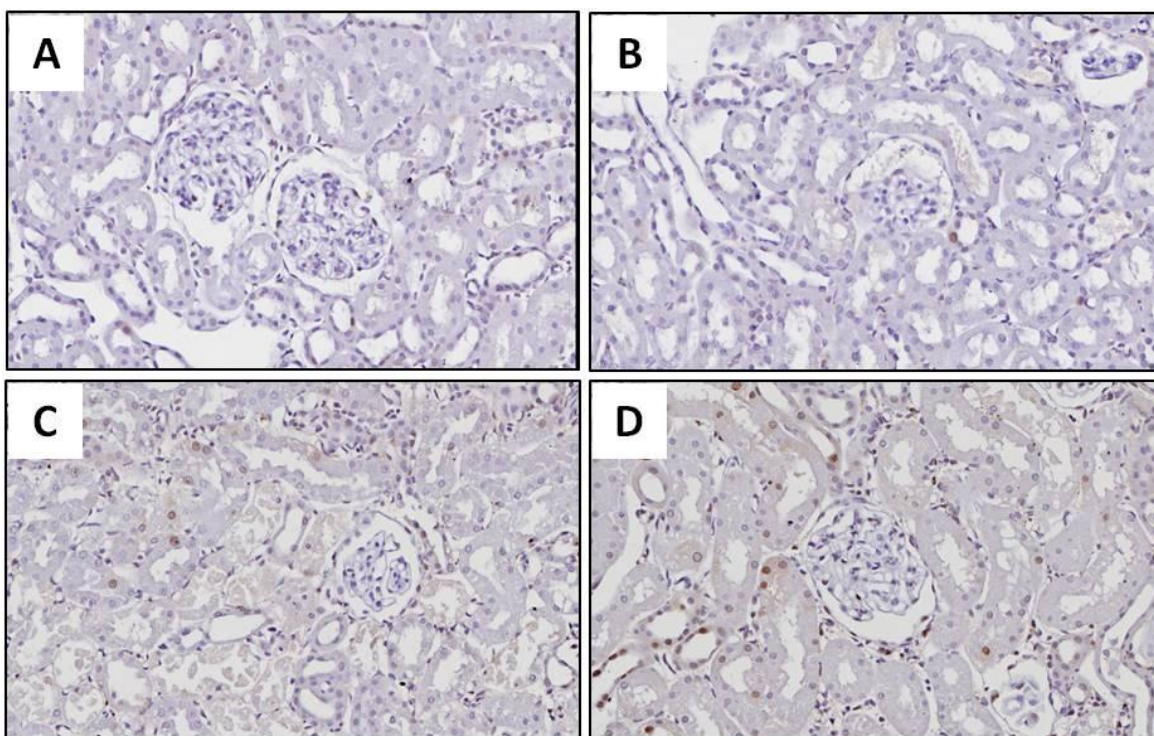


Figura 28. Detección inmunohistoquímica de PCNA. Se observan células de túbulo proximal positivas a PCNA en el grupo GM (C), sin que haya diferencias con respecto a CT (A) y SFN (B). En el grupo SFN+GM (D) se puede observar un número mayor de células positivas (40X).

En el estudio *in vivo*, se observa claramente el efecto nefrotóxico de la GM, traducido en una alta excreción de NAG, señales histológicas de daño, apoptosis e inmunodetección de proteínas nitradas, localizados principalmente en túbulos proximales (corteza renal) de ratas del grupo GM. Se confirma que la disfunción renal

es mediada por toxicidad tubular proximal directa, lo que concuerda con los reportes de nefrotoxicidad específica de los aminoglicósidos hacia el segmento S₁-S₂ de los túbulos (Cristofori *et al.*, 2007). Además, se encontró que la GM induce un aumento en el peso renal que puede relacionarse con el edema provocado por la predominante necrosis tubular. Este hallazgo está en acuerdo con informes previos (Murakami *et al.*, 1998; Said, 2011). En general, se observó una clara atenuación del daño renal y un mejoramiento en la función renal en las ratas co-administradas con SFN y GM.

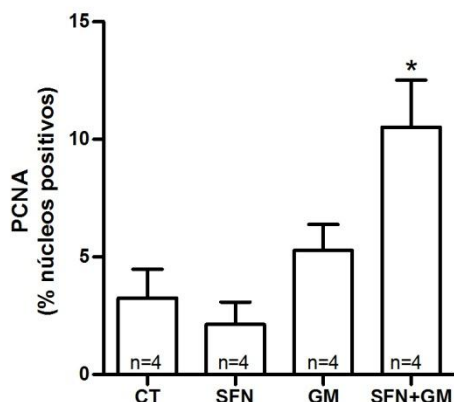


Figura 29. Cuantificación de la inmunotinción contra PCNA en tejido de ratas tratadas con GM y SFN, expresada como porcentaje de núcleos positivos a PCNA. Los datos son promedio \pm EEM. ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $P < 0.05$ vs GM.

El mayor número de células tubulares en regeneración visto mediante examen histológico y confirmado mediante inmunohistoquímica de PCNA en los cortes de ratas co-tratadas con SFN y GM, se suma al indicio de proliferación celular que se observa con los aumentos en la viabilidad (reducción de MTT) de las células tratadas sólo con SFN. Sin embargo, los argumentos para concluir que el efecto protector observado en ratas ocurrió por un aumento en la proliferación de las células tubulares no son completos. Xie y colaboradores (2001) observaron que después de un insulto con GM (150 mg/Kg/día) vía SC durante cinco días en ratas Wistar, el riñón comienza a recuperarse y a mostrar células positivas a PCNA el sexto día después de la primera inyección, con una mayor expresión sobre el décimo día. Es posible que el SFN, tras su efecto protector, sólo esté adelantando este periodo de recuperación, que

eventualmente ocurriría sin el tratamiento con SFN. Como ya se mencionó, un ensayo de proliferación celular en cultivo permitiría corroborar si existe mediación de una inducción en la proliferación celular.

Aunque no se estableció que la muerte apoptótica observada en túbulos de la corteza renal se diera a través de la ruta intrínseca mitocondrial, los reportes que señalan a la mitocondria como blanco de la GM en la nefrotoxicidad (Lopez-Novoa *et al.*, 2011; Morales *et al.*, 2010) y los informes de preservación de la función mitocondrial del SFN en diferentes modelos de nefropatía (Gaona-Gaona *et al.*, 2011; Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010), permiten sugerir que el SFN estaría previniendo la apoptosis intrínseca.

La menor abundancia de proteínas nitradas en el grupo de ratas SFN+GM con relación al grupo GM, permite hacer algunas aproximaciones: el ONOO⁻ puede reaccionar con diferentes biomoléculas incluyendo residuos de aminoácidos tales como cisteína, metionina, triptófano y tirosina, provocando cambios en la estructura y la función proteica. Se genera a partir de la reacción entre el O₂^{•-} y el óxido nítrico (NO[•]) (Chirino *et al.*, 2004). Está plenamente demostrado que en la toxicidad renal de la GM están implicadas la producción mitocondrial de O₂^{•-} y la producción de NO[•] a través de la inducción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), mediada por el factor transcripcional NF-κB (Manikandan *et al.*, 2011; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2004). Es posible que el efecto nefroprotector del SFN pueda estar relacionado con una inhibición en la producción mitocondrial de O₂^{•-} inducida por GM. Si bien en este estudio no se detectaron alteraciones significativas en la actividad de la enzima antioxidante Mn-SOD ni en la actividad SOD total, en ninguno de los grupos experimentales (Tabla 5), sí se informaron anteriormente deficiencias en la Mn-SOD en riñones de ratas tratadas con GM (Maldonado *et al.*, 2003; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2000). No obstante, se ha observado previamente el efecto protector del SFN en la actividad de enzimas citoprotectoras renales en modelos de toxicidad que involucran daño mitocondrial (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010). Por otra parte, el efecto nefroprotector del SFN también puede atribuirse, por lo menos en parte, a su actividad inhibitoria de NF-κB (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2009), controlando así la producción de NO[•].



Se ha demostrado que la actividad de CAT resulta afectada por su alta susceptibilidad a la carbonilación mediada por las ERO (Pena *et al.*, 2011) y que GPx puede inactivarse por NO[•], compuestos carbonílicos o una disminución en el nivel de GSH (Kinter y Roberts, 1996; Miyamoto *et al.*, 2003). Sin embargo, debe considerarse y discutirse la posibilidad de que las caídas en la actividad enzimática de CAT y GPx, observadas en este estudio, se relacionen con el grado de daño tisular y la consecuente disminución de células y estructuras celulares funcionales en el tejido. En este sentido, el alto porcentaje de túbulos dañados y de área dañada por túbulo (88% y 71%, respectivamente), no es consistente con la pérdida de actividad enzimática, que fue de alrededor del 30% en ambas enzimas. Debería observarse un patrón similar con las enzimas SOD, Mn-SOD y GST, pero en este estudio, no presentaron cambios en ninguno de los grupos (Tabla 5). A este respecto, medir actividades enzimáticas en túbulos proximales aislados, sería una práctica recomendable. Como se observa en los resultados de histopatología, TUNEL e IHQ para 3-NT, el daño se concentra en las estructuras tubulares. Se podría estar desestimando el aporte glomerular a la actividad enzimática total de la corteza renal, cuando se analiza una correlación con el tejido renal afectado.

La Figura 30 resume algunos de los aspectos discutidos hasta aquí, que podrían estar involucrados en el efecto renoprotector del SFN, observado en estos modelos de estudio.

8. CONCLUSIONES

El SFN protege las células epiteliales de túbulo proximal renal de la línea LLC-PK1 de la muerte inducida por el antibiótico GM cuando se incubó 24 horas antes y durante 72 horas de exposición al antibiótico. El SFN protegió las células cuando se incubó en concentraciones de 1, 3, 5 y 7.5 μM , presentando su mejor nivel de citoprotección a 5.0 μM .

El tratamiento con SFN administrado en dosis de 1 mg/Kg/día durante cuatro días atenúa el daño y las alteraciones en la función renal, las alteraciones histológicas, la



muerte tubular apoptótica, el daño oxidante/nitrante y la caída en la actividad de las enzimas antioxidantes renales CAT y GPx inducidos por GM (70 mg/Kg/12 h durante 4 días) en ratas Wistar. Además, el SFN permite una regeneración más rápida del parénquima renal cortical.

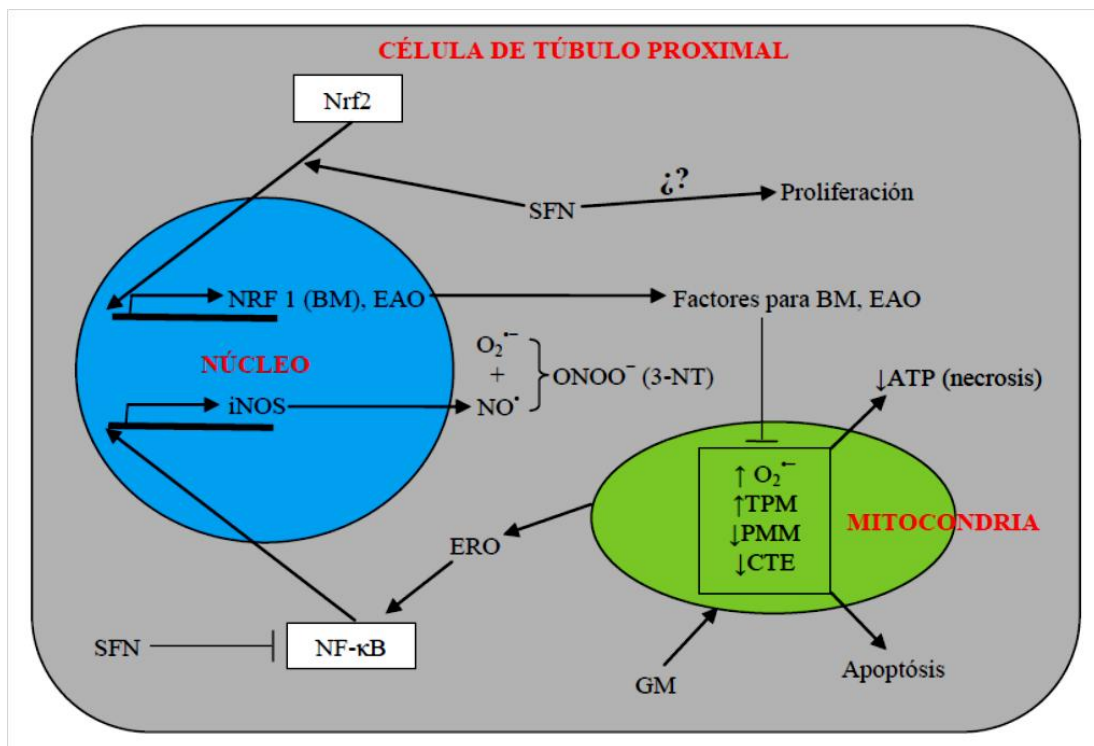


Figura 30. Posibles mecanismos involucrados en la protección del SFN en la nefrotoxicidad inducida por GM. BM: biogénesis mitocondrial; EAO: enzimas antioxidantes; ERO: especies reactivas de oxígeno; CTE: cadena de transporte de electrones; GM: gentamicina; iNOS: sintasa del óxido nítrico inducible; NF-κB: factor nuclear kappa B; NRF 1: factor nuclear respiratorio 1; Nrf2: factor 2 relacionado a NF-E2; PMM: potencial de membrana mitocondrial; SFN: sulforafano; TPM: transición de la permeabilidad mitocondrial; ¿?: mecanismo pobremente entendido.

Es posible que la citoprotección observada esté soportada total o parcialmente en eventos de proliferación de células tubulares y/o de biogénesis mitocondrial. Sin embargo, estos aspectos deben ser estudiados con más detalle.

9. PERSPECTIVAS

Determinar en cultivos celulares la producción celular de ERO, pero especialmente la generación mitocondrial de $O_2^{\cdot-}$, y la de NO^{\cdot} mediada por iNOS y NF- κ B, para así evaluar la participación de estos eventos en la prevención de la muerte celular. También evaluar el potencial de membrana mitocondrial (PMM) y la inducción del poro TPM, mecanismos que, se demostraron anteriormente, median la muerte celular inducida por GM.

Evaluar si el SFN induce la biogénesis mitocondrial a través del factor transcripcional Nrf2 y si esta se encuentra involucrada en la prevención de la muerte tubular inducida por GM. Este estudio, podría incluso hacerse extensivo a otros antioxidantes que inducen la traslocación nuclear de Nrf2, como la curcumina y el ácido nordihidrogüayarético (NDGA). Es importante verificar que la prevención en la muerte tubular apoptótica se da de manera dependiente de la mitocondria. Esto puede hacerse estudiando la expresión de caspasas 3 y 9, entre otros marcadores.

Paralelo a los estudios de biogénesis mitocondrial se deben llevar a cabo estudios de proliferación celular inducida por SFN en cultivo. De observarse un aumento en la proliferación celular mediado por el SFN, sería interesante iniciar un estudio de los mecanismos y rutas implicadas en este efecto.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121-126.

Ahn Y.-H., Hwang Y., Liu H., Wang X.J., Zhang Y., Stephenson K.K., Boronina T.N., Cole R.N., Dinkova-Kostova A.T., Talalay P., Cole P.A. (2010). Electrophilic tuning of the chemoprotective natural product sulforaphane. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:9590-9595.

Bagshaw S.M., Bellomo R (2007). Acute renal failure. *Surgery* 25:391-398.



Balakumar P., Rohilla A., Thangathirupathi A. (2010). Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacol Res* 62:179-186.

Barrera D., Maldonado P.D., Medina-Campos O.N., Hernández-Pando R., Ibarra-Rubio M.E., Pedraza-Chaverri J (2003). HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by $K_2Cr_2O_7$. *Free Radic Biol Med* 34:1390-1398.

Bonegio R., Lieberthal W. (2002). Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11:301-308.

Brady H.R., Singer G.G. (1995). Acute renal failure. *Lancet* 346:1533-1540.

Carlberg I., Mannervick B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250:5475-5480.

Chirino Y.I., Hernandez-Pando R., Pedraza-Chaverri J. (2004). Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol* 30:4-20.

Cheung K.L., Kong A.-N. (2009). Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *AAPS J* 12:87-97.

Chinn E.K., Batsakis J.G., Pilon H., Delbecg K. (1978). Serum creatinine. A CAP survey. *Am J Clin Pathol* 70:503-507.

Circu M.L., Aw T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48:749-762.

Cristofori P., Zanetti E., Fregona D., Piaia A., Trevisan A. (2007). Renal proximal tubule segment-specific nephrotoxicity: an overview on biomarkers and histopathology. *Toxicol Pathol* 35:270-275.



Daikos G.L., Jackson G.G., Lolans V.T., Livermore D.M. (1990). Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics from first-exposure down-regulation. *J Infect Dis* 162:414-420.

Daikos G.L., Lolans V.T., Jackson G.G. (1991). First-exposure adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in vivo with meaning for optimal clinical use. *Antimicrob Agents Chemother* 35:117-123.

Dammeyer P., Arnér E.S.J. (2010). Human Protein Atlas of redox systems – What can be learnt? *Biochim Biophys Acta* 1810:11-138.

Dashwood R.H., Ho E. (2008). Dietary agents as histone deacetylase inhibitors: sulforaphane and structurally related isothiocyanates. *Nutr Rev* 66:S36-S38.

de Arriba G., de Hornedo J.P., Rubio S.R., Fernández M.C., Martínez S.B., Camarero M.M., Cid T.P. (2009). Vitamin E protects against the mitochondrial damage caused by cyclosporin A in LLC-PK1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 239:241-250.

Denamur S., Tyteca D., Marchand-Brynaert J., Van Bambeke F., Tulkens P.M., Courtoy P.J., Mingeot-Leclercq M. (2011). Role of oxidative stress in lysosomal membrane permeabilization and apoptosis induced by gentamicin, an aminoglycoside antibiotic. *Free Radic Biol Med* 51:1656-1665.

Devarajan P. (2006). Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 17:1503-1520.

Dinkova-Kostova A.T., Talalay P. (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52:128-138.

Eaton D.C., Pooler J.P. (2009). Vander's renal physiology. McGraw-Hill Medical. USA. 7th Ed.

Evenepoel P. (2004). Acute toxic renal failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 18:37-52.

Fimognari C., Lenzi M., Hrelia P. (2008). Interaction of the isothiocyanate sulforaphane with drug disposition and metabolism: pharmacological and toxicological implications. *Curr Drug Metab* 9:668-678.

Gaona-Gaona L., Molina-Jijón E., Tapia E., Zazueta C., Hernández-Pando R., Calderón-Oliver M., Zarco-Márquez G., Pinzón E., Pedraza-Chaverri J. (2011). Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology* 286:20-27.

Gibbs A., Schwartzman J., Deng V., Alumkal J. (2009). Sulforaphane destabilizes the androgen receptor in prostate cancer cells by inactivating histone deacetylase 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:16663-16668.

Goyal M.M., Basak A. (2010). Human catalase: looking for complet identity. *Protein Cell* 1:888-897.

Greco T., Fiskum G. (2010). Brain mitochondria from rats treated with sulforaphane are resistant to redox-regulated permeability transition. *J Bioenerg Biomembr* 42:491-497.

Greco T., Shafer J., Fiskum G. (2011). Sulforaphane inhibits mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 51:2164-2171.

Guerrero-Beltrán C.E., Calderón-Oliver M., Martínez-Abundis E., Tapia E., Zarco-Márquez G., Zazueta C., Pedraza-Chaverri J. (2010). Protective effect of sulforaphane against cisplatin-induced mitochondrial alterations and impairment in the activity of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 and γ glutamyl cysteine ligase: Studies in mitochondria isolated from rat kidney and in LLC-PK1 cells. *Toxicol Lett* 199:80-82.

Guerrero-Beltrán C.E., Calderón-Oliver M., Tapia E., Medina-Campos O.N., Zarco-Márquez G., Zazueta C., Pedraza-Chaverri J. (2010). Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 192:278-285.

Guerrero-Beltrán C.E., Mukhopadhyay P., Horváth B., Rajesh M., Tapia E., García-Torres I., Pedraza-Chaverri J., Pacher P. (2012). Sulforaphane, a natural constituent of



broccoli, prevents cell death and inflammation in nephropathy. *J Nutr Biochem* 23:494-500.

Guerrero-Beltrán C.E., Calderón-Oliver M., Pedraza-Chaverri J., Chirino Y.I. (2012). Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp Toxicol Pathol* 64:503-508.

Gullett N.P., Amin A.R.M.R., Bayraktar S., Pezzuto J.M., Shin D.M., Khuri F.R., Aggarwal B.B., Surh Y.-J., Kucuk O. (2010). Cancer prevention with natural compounds. *Semin Oncol* 37:258-281.

Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974). Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139.

Holmgren A., Lu J. (2010). Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun* 396:120-124.

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

Jung D., Biggs H., Erikson J., Ledyard P.U. (1975). New colorimetric reaction for endpoint, continuousflow and kinetic measurement of urea. *Clin Chem* 21:1136-1140.

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* 45:215-221.

Kinter M., Roberts R.J. (1996). Glutathione consumption and glutathione peroxidase inactivation in fibroblast cell lines by 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic Biol Med* 21:457-462.

Kirkman H.N., Gaetani G.F. (2007). Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci* 32:44-50.



Lacy M.K., Nicolau D.P., Nightingale C.H., Quintiliani R. (1998). The pharmacodynamics of aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 27:23-27.

Lawrence R.A., Burk R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-958.

Li M., Vascotto C., Xu S., Dai N., Qing Y., Zhong Z., Tell G., Wang D. (2012). Human AP endonuclease/redox factor APE1/ref-1 modulates mitochondrial function after oxidative stress by regulating the transcriptional activity of NRF1. *Free Radic Bio Med* 53:237-248.

Limón-Pacheco J., Gonsebatt M.E. (2009). The role of antioxidants and antioxidants-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 674:137-147.

Lopez-Novoa J.M., Quiros Y., Vicente L., Morales A.I., Lopez-Hernandez F.J. (2011). New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int* 79:33-45.

Lu J., Holmgren A. (2009). Selenoproteins. *J Biol Chem* 284:723-727.

Ma Q. (2010). Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther* 125:376-393.

MacGarvey N.C., Suliman H.B., Bartz R.R., Fu P., Withers C.M., Welty-Wolf K.E., Piantadosi C.A. (2012). Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 185:851-861.

Maldonado P.D., Barrera D., Medina-Campos O.N., Hernández-Pando R., Ibarra-Rubio M.E., Pedraza-Chaverrí J. (2003). Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci* 73:2543-2556.

Manahan S.E. (2003). Toxicological chemistry and biochemistry. Lewis Publishers. USA. 3th Ed.



Manikandan R., Beulaja M., Thiagarajan R., Priyadarsini A., Saravanan R., Arumugam M. (2011). Ameliorative effects of curcumin against renal injuries mediated by inducible nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B during gentamicin-induced toxicity in Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 670:578-585.

Matés J.M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153:83-104.

Mihm M.J., Coyle C.M., Jing L., Bauer J.A. (1999). Vascular peroxynitrite formation during organic nitrate tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 291:194-198.

Miyamoto Y., Koh Y.H., Park Y.S., Fujiwara N., Sakiyama H., Misonou Y., Ookawara T., Suzuki K., Honke K., Taniguchi N. (2003). Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol Chem* 384:567-574.

Morales A.I., Demaille D., Prieto M., Puente A., Briones E., Arévalo M., Lèverve X., López-Novoa J.M., El-Mir M. (2010). Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondrial-dependent pathway. *Kidney Int* 77:861-869.

Murakami H., Yayama K., Chao L., Chao J. (1998). Human kallikrein gene delivery protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Kidney Int* 53:1305-1313.

Nagai J., Takano M. (2004). Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. *Drug Metab Pharmacokin* 19:159-170.

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

Nozik-Grayck E., Suliman H.B., Piantadosi C.A. (2005). Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2466-2471.

Oberley L.W., Spitz D.R. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* 105:457-464.



Orrenius S. (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev* 39:443-455.

Ozaki N., Matheis K.A., Gamber M., Feidl T., Nolte T., Kalkuhl A., Deschl U. (2010). Identification of genes involved in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats – A toxicogenomic investigation. *Exp Toxicol Pathol* 62:555-566.

Padanilam B.J. (2003). Cell death induced by acute renal injury: a perspective on contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F608-F627.

Pannu N., Nadim M.K. (2008). An overview of drug-induced acute kidney injury. *Crit Care Med* 36(Suppl.):S216-S223.

Pedraza-Chaverri J., Barrera D., Maldonado P.D., Chirino Y.I., Macías-Ruvalcaba N.A., Medina-Campos O.N., Castro L., Salcedo M.I., Hernández-Pando R. (2004). S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen *in vitro* and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage *in vivo*. *BMC Clin Pharmacol* 30:4-5.

Pedraza-Chaverrí J., Barrera D., Medina-Campos O.N., Carvajal R.C., Hernández-Pando R., Macías-Ruvalcaba N.A., Maldonado P.D., Salcedo M.I., Tapia E., Saldívar L., Castilla M.E., Ibarra-Rubio M.E. (2005). Time course study of oxidative and nitrosative stress and antioxidant enzymes in $K_2Cr_2O_7$ -induced nephrotoxicity. *BMC Nephrol* 6:4.

Pedraza-Chaverrí J., Gonzalez-Orozco A.E., Maldonado P.D., Barrera D., Medina-Campos O.N., Hernández-Pando R. (2003). Diallyl disulfide ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 473:71-78.

Pedraza-Chaverrí J., Maldonado P.D., Medina-Campos O.N., Olivares-Corichi I.M., Granados-Silvestre M.A., Hernández-Pando R., Ibarra-Rubio M.E. (2000). Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: Relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 29:602-611.



Pena L.B., Azpilicueta C.E., Gallego S.M. (2011). Sunflower cotyledons cope with copper stress by inducing of catalase subunits less sensitive to oxidation. *J Trace Elem Med Biol* 25:125-129.

Pessoa E.A., Convento M.B., Silva R.G., Oliveira., A.S., Borges F.T., Schor N. (2009). Gentamicin-induced preconditioning of proximal tubular LLC-PK1 cells stimulates nitric oxide production but not the synthesis of heat shock protein. *Braz J Med Biol Res* 42:614-620.

Piantadosi C.A., Carraway M.S., Babiker A., Sulinam H.B. (2008). Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res* 103:1232-1240.

Piao C.S., Gao S., Lee G.-H., Kim D.S., Park B.-H., Chae S.W., Chae H.-J., Kim S.H. (2010). Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial K_{ATP} channels. *Pharmacol Res* 61:342-348.

Priya D.K.D., Gayathri R., Gunassekaran G.R., Sakthisekaran D. (2011). Protective role of sulforaphane against oxidative stress mediated mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in female Swiss albino mice. *Pulm Pharmacol Ther* 24:110-117.

Quiros Y., Vicente-Vicente L., Morales A.I., López-Novoa J.M., López-Hernández F.J. (2011). An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin. *Toxicol Sci* 119:245-256.

Razzaque M.S., Taguchi T. (2005). Cellular stress responses in renal diseases. Karger. Switzerland.

Riedl M.A., Saxon A., Diaz-Sanchez D. (2009). Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. *Clin Immunol* 130:244-251.

Roche (2010). In situ cell death detection kit, POD. Version 13.0.

Said M.M. (2011). The protective effect of eugenol against gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Fundam Clin Pharmacol* 25:708-716.



Sau A., Tregno F.P., Valentino F., Federici G., Caccuri A.M. (2010). Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch Biochem Biophys* 500:116-122.

Scandalios J.G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38:995-1014.

Schwartz G.J., Furth S.L. (2007). Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 22:1839-1848.

Schrier R.W. (1999). Atlas of diseases of the kidney. Current Medicine. Philadelphia (PA), USA.

Servais H., Jossin Y., Van Bambeke F., Tulkens P.M., Mingeot-Leclercq M. (2006). Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK₁ cells subjected to electroporation. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1213-1221.

Smart R.C., Hodgson E. (2008). Molecular and biochemical toxicology. Wiley. USA. 4th Ed.

Song M.Y., Kim E.K., Moon W.S., Park J.W., Kim H.J., So H.S., Park R., Kwon K.B., Park B.H. (2009). Sulforaphane protects against cytokine- and streptozotocin-induced β -cell damage by suppressing the NF- κ B pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 235:57-67.

Stoddart M.J. (2011). Cell viability assays: introduction. *Methods Biol Mol* 740:1-6.

Suganuma H., Fahey J.W., Bryan K.E., Healy Z.R., Talalay P. (2011). Stimulation of phagocytosis by sulforaphane. *Biochem Biophys Res Commun* 405:146-151.

Sumantran V.N. (2011). Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods Mol Biol* 731:219-236.

Sun X., Mi L., Liu J., Song L., Chung F.L., Gan N. (2011). Sulforaphane prevents microcystin-LR-induced oxidative damage and apoptosis in BALB/c mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 255:9-17.



Tagliati C.A., Romero D., Dutra E.C., Hernández-García A., Martínez-López E., García-Fernández A.J. (2012). A comparison of BGM and LLC-PK1 cells for evaluation of nephrotoxicity. *Drug Chem Toxicol* 35:258-263.

Thejass P., Kuttan G. (2006). Antimetastatic activity of Sulforaphane. *Life Sci* 78:3043-3050.

Thejass P., Kuttan G. (2007). Immunomodulatory activity of Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate from broccoli (*Brassica oleracea*). *Phytomedicine* 14:538-545.

Timbrell J.A. (2009). Principles of biochemical toxicology. Informa Healthcare. USA. 4th Ed.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Manzur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84.

Vasanthi H.R., Mukherjee S., Das D.K. (2009). Potential health benefits of broccoli- A chemico-biological overview. *Mini Rev Med Chem* 9:749-759.

Velasco-Velázquez M.A., Maldonado P.D., Barrera D., Torres V., Zentella-Dehesa A., Pedraza-Chaverri J. (2006). Aged garlic extract induced proliferation and ameliorates gentamicin-induced toxicity in LLC-PK1 cells. *Phytother Res* 20:76-78.

Xie Y., Nishi S., Iguchi S., Imai N., Sakatsume M., Saito A., Ikegame M., Iino N., Shimada H., Ueno M., Kawashima H., Arakawa M., Gejyo F. (2001). Expression of osteopontin in gentamicin-induced acute tubular necrosis and its recovery process. *Kidney Int* 59:959-974.

Xue M., Qian Q., Adaikalakoteswari A., Rabbani N., Babaei-Jadidi R., Thornalley P.J. (2008). Activation of NF-E2-related factor-2 reverses biochemical dysfunction of endothelial cells induced by hyperglycemia linked to vascular disease. *Diabetes* 57:2809-2817.



Yoon H.Y., Kang N.I., Lee H.K., Jang K.Y., Park J.W., Park B.H. (2008). Sulforaphane protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through induction of the Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol* 75:2214-2223.

Yoxall V., Kentish P., Coldham N., Kuhnert N., Sauer M.J., Ioannides C. (2005). Modulation of hepatic cytochromes P450 and phase II enzymes by dietary doses of sulforaphane in rats: Implications for its chemopreventive activity. *Int J Cancer* 117:356-362.

Zamocky M., Furtmüller P.G., Obinger C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal* 10:1527-1548.

Zanichelli F., Capasso S., Cipollaro M., Pagnotta E., Carteni M., Casale F., Iori R., Galderisi U. (2012). Dose-dependent effects of R-sulforaphane isothiocyanate on the biology of human mesenchymal stem cells, at dietary amounts, it promotes cell proliferation and reduces senescence and apoptosis, while at anti-cancer drug doses, it has a cytotoxic effect. *Age* 34:281-293.

Zhao H.-D., Zhang F., Shen G., Li Y.-B., Li Y.-H., Jing H.-R., Ma L.-F., Yao J.-H., Tian X.-F. (2010). Sulforaphane protects liver injury induced by intestinal ischemia reperfusion through Nrf2-ARE pathway. *World J Gastroenterol* 16:3002-3010.

Zorov D.B. (2010). Amelioration of aminoglycoside nephrotoxicity requires protection of renal mitochondria. *Kidney Int* 77:841-843.

