



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UN/M
POSGRADO** 

U N A M

FACULTAD DE QUÍMICA.

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“Estudio sobre el mecanismo de acción
antioxidante del ácido nordihidroguayarático”.

Alumno: Adverqueydi Zúñiga Toalá.

Tutor: José Pedraza Chaverri.

México, D.F.

Agosto 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.

“ Estudio sobre el mecanismo de acción antioxidante del ácido nordihidroguayarático”

El desarrollo de esta tesis se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri en el laboratorio 209 del edificio “F” en el departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis fueron:

Dr. José Pedraza Chaverri.
Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre.
Dr. Rogelio Hernández Pando.

Se reconoce al M. en C. Omar Noel Medina Campos, por su valiosa asesoría técnica.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto 129838 y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN 201910.

El jurado de examen de grado estuvo formado por:

PRESIDENTE	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz.
VOCAL	Dra. Nimbe Torres y Torres.
VOCAL	Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte.
VOCAL	Dr. José de Jesús García Trejo.
SECRETARIO	Dr. Arturo Navarro Ocaña.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi cariño y amor a mi familia que me ha apoyado de forma incondicional:

Ma. ISOLINA TOALÁ ALBORES.

GUADALUPE ZÚÑIGA TOALÁ.

Altiora te ne quaesieris,

Volo ut per rivulos, non statim, in mare aligas introire.

- Tomás de Aquino

AGRADECIMIENTOS

Al **Divino Creador** por darme una vocación y por todo, todo,...

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** y a la **Facultad de Química** por permitirme desarrollarme académica y personalmente.

A los animales (ratas) que me permitieron desarrollar este trabajo.

Al los Institutos Nacionales de Salud “**Ignacio Chávez**” y “**Salvador Zubiran**” por permitirme utilizar sus instalaciones para desarrollar este trabajo.

Al **Dr. José Pedraza Chaverri** por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por todas sus enseñanzas, por su ayuda. Por todo, ¡Muchas gracias!

A la **Dra. Edilia Tapia Rodríguez**, por sus enseñanzas y consejos.

A la **Dra. Cecilia Zazueta**, por permitirme realizar parte de mis experimentos en su laboratorio.

Al **Dr. Rogelio Hernández Pando**, por permitirme realizar parte de mis experimentos en su laboratorio.

A **Omar Noel Medina Campos**, por su asesoría experimental, por enseñarme muchas cosas del laboratorio y sobre todo por su amistad.

Al **Q. Guillermo Zarco Márquez**, por su ayuda en el manejo de los animales.

A la **Med. Cir. Lucía Zatarain Barrón**, por su ayuda en la parte de las inmunocitoquímicas.

Al **Dr. Francisco Correa**, por su ayuda en la parte de las mitocondrias.

A **Leticia García**, por todo su apoyo durante la realización de mis estudios.

A **Adelina Gonzáles**, por todo su apoyo durante la realización de mis estudios.

A mis **compañeros del laboratorio**: Eduardo, Mariel, Mario, Willy, Angy, Tania, Azalia, Susi, Liz , que me hicieron más grato el ambiente del laboratorio; a mis compañeros de Cardiología y a todos los que conocí durante el desarrollo de esta tesis.

A mi amigo **Valentín Mendoza** por todos los momentos que hemos pasado juntos.

A la **Sra. Soledad Rodríguez** por todos sus consejos.

A la **Dra. Gavito**, al **Dr. Aviña** por hacer un magnífico trabajo médico y permitirme finalmente terminar esta tesis.

A mi **Sra. Madre**, por su amor, por su paciencia, por su apoyo incondicional, por todo, todo... por ser una gran Mamá.

A mi **hermana**, por estar en el "*campo de batalla*" en las buenas y en las malas; por no darse por vencida en los momentos más críticos. "La partida es nuestra".

A todos los que de una u otra manera me permitieron el desarrollo de esta tesis (y en este momento no me acuerdo de sus nombres).

Abreviaturas	iii
Resumen	v
1. Introducción	
1.1 Estrés oxidante y los mecanismos de defensa antioxidante	1
1.2 Producción de ERO en los seres vivos	3
1.3 Sistemas de antioxidantes	5
1.3.1 Antioxidantes no enzimáticos	5
1.3.2 Antioxidantes enzimáticos	7
1.4 Ácido Nordihidroguayerético, NDGA	9
1.5 Nrf2 y la vía de señalización para activar genes citoprotectores	10
1.6 Keap1, represor del factor transcripcional Nrf2	15
1.7 Riñón	15
1.8 Insuficiencia renal aguda (IRA)	17
1.9 Isquemia –reperfusión renal	18
1.10 Nefrotoxicidad inducida por gentamicina	19
1.11 Estrés oxidativo en la isquemia-reperfusión y en el daño ocasionado por gentamicina	19
1.12 Mitocondria y cadena respiratoria	21
2. Justificación	25
3. Hipótesis	26
4. Objetivos	26
4.1 General	26
4.2 Particulares	26
5. Materiales y Métodos	27
5.1 Reactivos	
5.2 Estudios in vivo	27
5.2.1 Efecto del NDGA sobre el daño renal inducido por I/R	27
5.2.1.1 Diseño experimental	27
5.2.1.2 Evaluación de la función renal	28
Nitrógeno de urea en sangre (BUN)	28
Creatinina en plasma	28
5.2.1.3 Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos	28
Cortes histológicos	
28	
Tinción de hematoxilina y eosina (H&E) y cuantificación del daño	29
Estudios inmunohistoquímicos	29
5.2.1.4 Preparación de los homogenados renales	30

5.2.1.5 Actividad de enzimas antioxidantes	30
Actividad de CAT	30
Actividad de GPx	31
Actividad de GST	31
Actividad de GR	31
Actividad de SOD	31
5.2.1.6 Estudios en mitocondrias aisladas	31
Aislamiento de mitocondrias renales	31
Consumo de oxígeno mitocondrial	32
Actividad del complejo mitocondrial	32
Lipoperoxidación	33
5.2.2 Efecto del NDGA sobre el daño renal inducido por gentamicina	33
5.2.2.1. Diseño experimental	33
5.2.2.2. Determinación de la función renal	34
Creatinina y BUN	34
Determinación de proteinuria	34
5.2.2.3 Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos	34
Cuantificación del daño histológico	34
Estudios de inmunohistoquímica	34
5.3 Estudios <i>in vitro</i>	34
5.3.1 Cultivo de células	34
5.3.2 Tripsinización	35
5.3.2.1 Siembra de células (crecimiento)	35
5.3.2.2 Siembra de células (experimentos)	35
5.3.3 Viabilidad celular	36
5.3.4 Visualización de ROS y O ₂ ⁻	36
5.3.5 Potencial de membrana mitocondrial	36
5.3.6 Estudios de las vías de señalización	37
Diseño experimental	37
Western blot	37
5.3.7 Efecto de los inhibidores de las vías de señalización sobre la expresión de HO-1 y sobre la citoprotección inducida por NDGA ante el daño por H ₂ O ₂	38
5.3.8 Efecto del NDGA sobre la actividad de otras enzimas antioxidantes en las células LLC-PK1	38
5.3.9 Papel del Nrf2 en la inducción de HO-1 por NDGA en MEFs	38
5.3.10 Papel de Keap1 en la inducción de HO-1 y Nrf2 por NDGA en MEFs	39
5.3.11 Papel de la vía GSK3β en la citoprotección inducida por NDGA	39
5.3.12 Análisis estadístico	39
6. Resultados	40
6.1 Estudios <i>in vivo</i>	40

6.1.1 El NDGA protege del daño renal inducido por la isquemia-reperfu sión (I/R) y por gentamicina	40
6.1.2 Estudios histopatológicos	40
6.1.3 Marcadores de estrés oxidante y nitrante	44
6.1.4 Efecto del NDGA sobre el gen de estrés celular MPO en la I/R	44
6.1.5 Participación de Nrf2	45
6.1.6 Efecto del tratamiento del NDGA sobre HO-1 en la I/R	46
6.1.7 Efecto del tratamiento del NDGA sobre HO-1 y MPO en la nefrotoxicidad inducida por gentamicina	47
6.1.8 Enzimas antioxidantes	48
6.1.9 Efecto del NDGA sobre la respiración mitocondrial	49
6.1.10 Determinación de 4-HNE y MDA en la mitocondria	52
6.2 Estudios <i>in vitro</i>	52
6.2.1 Estudios en células LLC-PK1	52
6.2.1.1 El NDGA induce la expresión de HO-1	52
6.2.1.2 Producción de especies de oxígeno reactivas (ROS)	54
6.2.1.3 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial	54
6.2.1.4 El NDGA induce las vías de Erk1/2 y PI3K/AKT	57
6.2.1.5 La vía de supervivencia PI3K/AKT participa en la inducción de HO-1 por el NDGA	58
6.2.1.6 El NDGA induce la actividad de enzimas citoprotectoras	59
6.2.2 Estudios en células embrionarias murinas (MEFs)	59
6.2.2.1 El NDGA induce la expresión de las vías de estrés celular y la vía de supervivencia celular	59
6.2.2.2 El NDGA induce la expresión de HO-1 a través de Nrf2	59
6.2.2.3 La inducción de HO-1 es independiente de Keap1	61
6.2.2.4 La vía de GSK-3 regula la citoprotección inducida por el NDGA	62
7. Discusión	64
8. Conclusiones	66
9. Perspectivas	67
10. Bibliografía	68

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AP1	Factor transcripcional, AP1
ARF	Insuficiencia renal aguda
ARE	Elementos que responden a estrés oxidativo (<i>antioxidant response elements</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
Bach	Represores transcripcionales
BUN	Nitrógeno de urea en sangre
BSA	Albúmina sérica bovina
CAT	Catalasa
CR	Control respiratorio
CT	Control
DMSO	Dimetil sulfoxido
Erk	Cinasas reguladas por señales extracelulares
ERK 1/2	Proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares
ERO	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
ERN	Especies reactivas de nitrogeno.
GCL	Glutamato cisteína ligasa
GEN	Gentamicina
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GS	Glutación sintasa
GSH	Glutación
GSK3 β	Kinasa de ser/thr, GSK3 β .
GSSH	Glutación reducido
GST	Glutación S-transferasa
GSTs	Glutathion S-transferasas
JC1	Colorante catiónico mitocondrial
JNK	Cinasa janus, MAPK
4-HNE	Hidroxinonenal
HO-1	hemoxygenasa-1
H ⁺	Átomo de hidrógeno
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO-1	Hemo-oxigenasa 1
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal

iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRA	Insuficiencia renal aguda
I/R	Isquemia-reperfusión
Keap1	Represor de Nrf2
LLC-PK1	Epitelio renal porcino
LOX	Lipoxigenasa
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MEF	Fibroblastos embrionarios murinos
MDA	Malondialdehído
3-NT	3-Nitrotirosina
NDGA	Ácido nordihidroguayarético
NF κ B	Factor transcripcional, NF κ B
Nrf2	Factor transcripcional, Nrf2.
NQO1	NAD(P)H: quinona oxidoreductasa
NO \cdot	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ \cdot^-	Anión superóxido
¹ O ₂	Oxígeno en singulete
OH	Radical hidroxilo
ONOO \cdot^-	Peroxinitrilo
p38	Proteína de la familia de las MAPK
PI3K/AKT	Fosfatidil inositol 3 cinasa (<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
O ₂ \cdot^-	Anión superóxido
PBS	Solución de buffer fostatos
PKC	Proteína cinasa C
ROS	Especies de oxígeno reactivas
TGF β	Citocina, factor de crecimiento transformante
SFB	Suero fetal bovino
SH	Grupos sulfhídricos
SnMP	Mesoporfirina de estaño
SOD	Superoxido dismutasa
TA	Temperatura ambiente
TNF- α	Factor de necrosis tubular alfa
UV	Luz ultravioleta
WB	Western blot

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. El estrés oxidante es un mecanismo muy importante durante la progresión de enfermedades neurodegenerativas, en el cáncer e incluso en procesos de envejecimiento. El estrés oxidante es una condición muy frecuente en el riñón, ya que este órgano es el encargado de filtrar la sangre en nuestro cuerpo. El ácido nordihidroguayarático (NDGA) es un compuesto con propiedades antioxidantes ampliamente utilizado en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades; entre ellas las enfermedades renales, como son la eliminación de los cálculos. Sin embargo, también el tratamiento crónico de este compuesto se ha asociado a nefrotoxicidad. **JUSTIFICACIÓN.** Es necesario hacer mas estudios tanto *in vivo* como *in vitro* que nos permitan dilucidar el mecanismo de acción antioxidante del NDGA. Por ejemplo, estudiar el efecto que tiene este compuesto ante un daño renal agudo causado por la I/R ó a la gentamicina, más aún en un modelo *in vitro*, podriamos determinar la activación de alguna de las vías de señalización que participan en el efecto citoprotector del NDGA. **HIPÓTESIS.** Si el antioxidante NDGA es capaz de reducir las especies reactivas de oxígeno y/o activar enzimas citoprotectoras entonces será capaz de disminuir el daño renal agudo producido por la I/R ó la gentamicina. Además, podría inducir alguna vía de sobrevivencia celular que participe en este efecto citoprotector. **OBJETIVOS.** Evaluar el efecto renoprotector del NDGA en modelos de insuficiencia renal aguda y determinar la posible participación de alguna vía de señalización celular de sobrevivencia en células en cultivo. **METODOLOGÍA.** Se utilizaron 4 grupos (CT, NDGA, I/R e I/R+NDGA) de ratas macho de la cepa Wistar. Se les administró 3 veces el NDGA por vía intraperitoneal en una dosis de 10 mg/kg/día,

empezando 48 h, 24 h y 2 h antes de inducir el daño renal agudo debido a un período de 30 min de isquemia (eliminación del riñón derecho) y el bloqueo sanguíneo de la arteria renal izquierda, seguido de un período de 24 h de reperfusión; para el modelo de gentamicina se utilizaron los mismos grupos arriba señalados con una administración de dos dosis de 80 mg/kg por un intervalo de 12 horas por 4 días de forma subcutánea. Para los experimentos *in vitro*, se utilizó una concentración de 15 μ M de NDGA a diferentes tiempos. **RESULTADOS.** El tratamiento con el NDGA disminuyó la disfunción renal (BUN y creatinina en plasma), marcadores de estrés oxidante (3-NT, 4-HNE y MDA), actividad enzimática (GPx, GST y CAT), la disfunción mitocondrial (Edo. 3, actividad del complejo I) y el contenido mitocondrial de marcadores de estrés (MDA y 4-HNE) por el daño inducido por la I/R y también disminuyó la disfunción renal (BUN y creatinina en plasma, proteinuria) así como una disminución de área necrótica inducida por gentamicina. Por otro lado, el NDGA previno de la producción de estrés oxidante (ROS y $O_2^{\cdot-}$), de la despolarización de la mitocondria, e indujo que el factor transcripcional Nrf2 (gen maestro de la regulación de estrés oxidante), migrara del citoplasma al núcleo, con la consecuente inducción de la expresión del gen citoprotector HO-1. Es muy notable indicar que encontramos una vía de citoprotección (PI3K/AKT/GSK3 β) inducida por el NDGA, pero que es independiente del correpressor Keap1. **CONCLUSIÓN.** Los resultados indican claramente que el NDGA tiene efectos renoprotectores *in vivo* e induce la expresión del gen HO-1 a través del factor transcripcional Nrf2 en MEF y en la línea celular. **PERSPECTIVAS.** Determinar el efecto que tiene Nrf2 en la insuficiencia renal aguda *in vivo*, a través de ratones que carecen de este factor transcripcional. También, sería interesante estudiar con mayor detalle el mecanismo

citoprotector del NDGA en el daño renal inducido por gentamicina.

ABSTRACT

INTRODUCTION. The oxidative stress is involved in the progression of several diseases including renal diseases. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) is a potent antioxidant compound found in the long-lived creosote bush. The plant has been used to treat a variety of illnesses including infertility, inflammation and gallbladder and kidney stones.

JUSTIFICATION. Additional studies, both *in vivo* and *in vitro*, are required to further explore the mechanism of the antioxidant action of NDGA.

HYPOTHESIS. If the antioxidant NDGA is able to reduce reactive oxygen species and/or induce cytoprotective enzymes, then it will be able to reduce the damage produced by acute renal failure (ARF) induced by ischemia and reperfusion (I/R) or gentamicin. It can be also induce a cell survival pathway involved in this cytoprotective effect.

OBJECTIVE. To evaluate the renoprotective effect of NDGA on rats with acute renal damage induced by I/R or gentamicin and to evaluate any signaling pathway involved in the cytoprotective effect of NDGA.

EXPERIMENTAL DESIGN. NDGA was given to Wistar rats at a dose of 10 mg/kg/per day/three days. The kidneys were obtained 24 h after the last dose. The LLC-PK1 and murine embryonic fibroblast (MEFs) were used for *in vitro* studies, the NDGA was used at 15 μ M.

RESULTS. Treatment with NDGA decreased ARF-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Moreover, NDGA induced Nrf2 nuclear translocation in rats' kidney. On the other hand, *in vitro* the NDGA prevented H₂O₂-induced oxidative stress and mitochondrial depolarization. In addition, the PI3K/AKT pathway was involved in the NDGA-induced cytoprotection and HO-1 expression. Finally, it was found in MEFs that the GSK-3 β pathway regulates the expression of Nrf2 and HO-1.

CONCLUSIONS. NDGA has cytoprotective effects *in vivo* and *in vitro*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés oxidante y los mecanismos de defensa antioxidante:

El oxígeno molecular (O_2) es uno de los gases más abundante en la tierra, constituye el 21 % de la atmósfera y casi todos los seres vivos lo utilizan para respirar y obtener energía. A partir de esta molécula, durante la respiración celular, se forman moléculas más reactivas que se le conocen como especies de oxígeno reactivas (ERO) [Han *et al.*, 2008]. Cada vez la investigación nos va revelando la gran transcendencia que tienen los radicales libres en la biología de los organismos; éstos pueden ser producto del metabolismo del oxígeno o del metabolismo del nitrógeno y son conocidos como especies reactivas del nitrógeno (ERN). Las especies reactivas tanto de oxígeno como las de nitrógeno son producidas a partir de diversas condiciones: I) debido a la exposición de rayos UV, rayos X y rayos gamma; II) durante las reacciones catalizadas por los transportadores de electrones de la mitocondria; III) por reacciones catalizadas por metales; IV) durante la inflamación por células especializadas como los macrófagos; y además, V) están presentes en los contaminantes atmosféricos [Beckman *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2008]. Es notorio señalar que las ERO regulan diversos procesos fisiológicos, aunque la pérdida de la homeostasis tiene consecuencias dañinas para el mismo organismo [Gutteridge *et al.*, 2000; Gutteridge *et al.*, 2010].

Cuando las células no pueden controlar la homeostasis redox, y como consecuencia se elevan los niveles de ERO, se produce un fenómeno biológico conocido como estrés oxidante, el cual favorece la oxidación de macromoléculas celulares teniendo como consecuencia final, la muerte de la célula. Para mantener la homeostasis redox, las células aeróbicas han desarrollado un sistema antioxidante que incluye a una gama de genes citoprotectores como hemo-oxigenasa-1 (HO-1), por mencionar un ejemplo [Itoh *et al.*, 1999; Rushmore *et al.*, 2002].

Cuando el O_2 acepta un electrón, el primer producto que se forma es un radical libre (posee un electrón desapareado), conocido como

anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). La adición de otro electrón produce el ión peróxido; finalmente, el ambiente celular trata de contrarrestar la presencia de radicales libres y le agrega un protón al peróxido para generar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), compuesto que es estable dentro de la célula [Gutteridge *et al.*, 2010]. El H_2O_2 acepta de forma relativamente fácil un electrón generando el radical hidroxilo (OH), y el ión hidroxilo (OH^-). Finalmente, el OH^- se protona para formar agua, y, el OH acepta un electrón y un átomo de hidrógeno (H^+) formando también agua. Una ERO conocida como oxígeno en singulete (1O_2) se forma cuando el O_2 absorbe energía y desaparece uno de sus electrones. De esta forma, la célula regula de una forma elegantemente sencilla la formación de compuestos estables. Las ERO pueden ser de dos tipos: radicales libres y no radicales (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las ERO en radicales libres y no radicales.

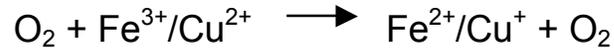
Radicales Libres	No radicales
$O_2^{\cdot-}$ Anión superóxido	H_2O_2 Peróxido de hidrógeno
$\cdot OH$ Radical hidroxilo	1O_2 Oxígeno en singulete
1O_2 Oxígeno en singulete	

NOTA: El oxígeno en singulete (1O_2) presenta dos formas, una que es radical libre debido a que conserva dos electrones desapareados en su último orbital y la otra forma donde estos electrones están apareados.

El H_2O_2 es un compuesto oxidante débil. En 1984 Fenton describió que el H_2O_2 puede reaccionar con algunos metales de transición como Fe^{2+} y Cu^+ generando $\cdot OH$, mecanismo conocido como reacción de Fenton:



En presencia del $O_2^{\cdot-}$ los iones oxidados de los metales de transición son reducidos por el $O_2^{\cdot-}$ y reciclados para volver a reaccionar:



Ambas reacciones acopladas se conoce como el ciclo de Haber-Weiss.



El $\cdot OH$ es la especie de oxígeno más reactiva, por lo que reacciona prácticamente con casi todas las moléculas de la célula.

1.2 Producción de ERO en los seres vivos:

El O_2 es una molécula necesaria para la sobrevivencia de los organismos aeróbicos, sin embargo, en este proceso se forman moléculas inestables conocidas como ERO. Los organismos necesitan de ATP para prácticamente todas sus funciones; la cadena de transporte de electrones brinda componentes necesarios para la formación del ATP, sin embargo, también produce el radical libre, $O_2^{\cdot-}$, que es la principal fuente de producción de este radical en los seres vivos [Gutteridge *et al.*, 2010]. La cadena de transporte de electrones es la encargada de acarrear los electrones al complejo citocromo c oxidasa para reducir el O_2 en H_2O . Aunque la principal fuente de producción de $O_2^{\cdot-}$ es la cadena respiratoria, existen enzimas como la oxidasa del NADPH y la oxidasa de xantina que lo producen en menor cantidad [Cochemé *et al.*, 2010; Maher *et al.*, 2010].

La superóxido dismutasa es la enzima encargada de dismutar el $O_2^{\cdot-}$, produciendo H_2O_2 . Otras fuentes también son productoras de H_2O_2 como son: 1) en la degradación de ácidos grasos, aminoácidos y las bases nitrogenadas; 2) en la fotosíntesis; 3) en la fotorespiración de las plantas; y, 4) en la radiólisis del agua [Stocker *et al.*, 1991]. En mamíferos, tanto las células con capacidad de

fagocitosis como las que no poseen esta capacidad, son lugares de producción del H_2O_2 ; dentro de las primeras, la oxidasa de NADPH encontrada en su membrana es la encargada de producir el H_2O_2 , y en las segundas, la oxidasa es diferente [Spector A, 1991]. En el plasma sanguíneo y en tejidos oculares de los humanos la oxidación del glutatión y de la vitamina C genera el H_2O_2 [Long *et al.*, 2000; Spector A, 1991].

En los seres vivos el 1O_2 se forma mediante reacciones de fotosensibilización en las que intervienen moléculas como los pigmentos y sus derivados. En la reacción de Haber-Weiss, la dismutación espontánea de $O_2^{\cdot-}$, produce el 1O_2 [Spector A, 1991].

Niveles altos de ERO causan diversos daños a las células; y cada vez existen más evidencias que indican una asociación directa en la etiología de diversas patologías como enfermedades neurodegenerativas, aterosclerosis, diabetes y cáncer [Cooke *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2003]. Cada vez más se utilizan compuestos con propiedades anti-oxidantes que pueden ayudar a prevenir o disminuir los efectos del estrés oxidante en estas condiciones de enfermedad [Arteaga *et al.*, 2005].

Diversos estudios *in vitro* demuestran que varias cinasas, entre ellas las vías reguladas por respuestas a estrés como las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos): p38, Erk 1/2 y JNK; regulan la expresión de genes que poseen en su promotor uno o varios elementos que responden a antioxidantes [Haagenson *et al.*, 2010; Myatt 2010]. También, se ha implicado a la vía de transducción de señales conocida como la de sobrevivencia celular, PI3K/AKT (*phosphatidyl inositol 3-kinase*) en la regulación de estos elementos [Kang *et al.*, 2000; Dieter *et al.*, 2001]. Además, la proteína cinasa C (PKC), también participa en la inducción de genes citoprotectores con secuencias AREs presentes en sus promotores [Huang *et al.*, 2000].

Los antioxidantes y xenobóticos permiten la disociación del factor transcripcional Nrf2 de Keap1 resultando en la estabilidad y migración nuclear de Nrf2. Permitiendo que Nrf2 se una a los AREs de los promotores de enzimas de fase II, como por ejemplos:

NAD(P)H:quinona oxidoreductasa, glutatión S-transferasa, sintetasa de glutatión, sintetasa de δ -glutamylcisteina y hemo-oxigenasa 1 (HO-1); favoreciendo la transcripción de estos genes [Dinkova-Kostova *et al.*, 2001; Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Iqbal *et al.*, 2003]. El factor Nrf2 se degrada por el proteosoma, ya que Keap1 recluta a la E3-ubiquitin ligasa, favoreciendo que este complejo se degrade por el proteosoma 26S [Dinkova-Kostova *et al.*, 2002].

1.3 Sistemas de antioxidantes :

La protección celular contra el daño tóxico oxidante y electrófilo está dado por dos tipos de moléculas antioxidantes:

A) Antioxidantes directos, son moléculas que participan directamente en las reacciones químicas, por lo que sufren modificaciones químicas en su estructura y necesitan ser remplazados o regenerados;

B) Antioxidantes indirectos, son compuestos o moléculas que no participan directamente en las reacciones químicas, se ha propuesto que ejercen su función a través de la vía Nrf2/Keap1/ARE, la cual participa activamente en la inducción de genes citoprotectores de fase II, siendo estas enzimas que actúan catalíticamente para la eliminación de compuestos tóxicos [Dinkova-Kostova *et al.*, 2008]

1.3.1 Antioxidantes no enzimáticos:

Existen moléculas que permiten eliminar o disminuir el efecto dañino de las ERO.

Un **antioxidante** es una molécula o sustancia que cuando está presente a concentraciones bajas comparadas con un sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato [Dinkova-Kostova *et al.*, 2008]

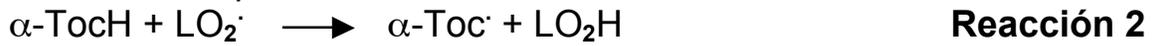
Un antioxidante no enzimático: son moléculas que incrementan la capacidad del organismo de eliminar las ERO. Entre estas encontramos:

Vitamina C (Ácido Ascórbico): Se caracteriza por neutralizar $^1\text{O}_2$, O_2^- y H_2O_2 generando un radical ascorbilo, el cual puede ser reciclado a ácido ascórbico por el sistema reductor tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (reacción 1); es un compuesto

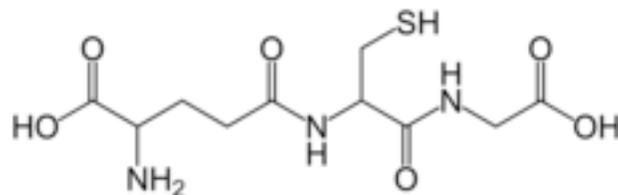
hidrosoluble que se localiza en fluidos extracelulares [Victor et al., 2011].



Vitamina E (α -tocoferol): Esta vitamina se encuentra principalmente en las membranas de las células y su principal función es mantener la integridad de la membrana. Esta vitamina tiene la capacidad de bloquear la lipoperoxidación, ya que reacciona directamente con los lipoperoxidos y los alcoxis (reacción 2) [Burton et al., 1982], también se ha reportado que neutraliza y captura el $^1\text{O}_2$, OH^\cdot , H_2O_2 y O_2^\cdot y se le considera el principal antioxidante liposoluble en los seres vivos.



Glutathión reducido (GSH): Es considerado el principal antioxidante de la célula, esta formado por los aminoácidos ácido glutámico, glicina y cisteína; este tripéptido tiene la capacidad de reaccionar con las ERO, donándoles electrones e impidiendo la oxidación de los grupos sulfhidrilo (SH) de las proteínas celulares. La capacidad antioxidante del GSH se debe al grupo tiol de la cisteína del tripéptido (esquema 5). La concentración de GSH en la célula es relativamente alta (5 mM en hígado), lo que hace que reaccione con relativa facilidad con otra molécula de GSH formando GSSH. Así que el GSH puede ser regenerado mediante la enzima glutathión reductasa (GR). Tanto en reacciones de conjugación como de reducción el GSH es un sustrato de la enzima glutathión S-transferasa en el citosol, en las mitocondrias y es un cofactor para la enzima glutathión peroxidasa (GPx). El GSH también participa en la conjugación no enzimática con algunos productos químicos, como peróxidos orgánicos y en la eliminación de xenobióticos [Ghanta et al 2011].

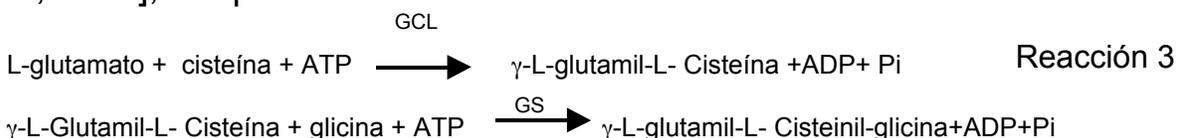


Esquema 5. Estructura del glutathión (GSH). Obsérvese el grupo tiol de esta molécula (SH).

1.3.2 Antioxidantes enzimáticos:

El sistema antioxidante enzimático, está formado por enzimas que pueden convertir las ERO en moléculas menos reactivas. Entre estas, encontramos:

Glutamato cisteína ligasa (GCL) y glutatión sintasa (GS): Es una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad “catalítica” (GCL-C) y una subunidad “moduladora” (GCL-M). La subunidad catalítica es la que lleva a cabo la actividad enzimática, mientras que la segunda favorece la actividad de la primera (reacción 3) [Forman et al, 2003], aunque esta enzima no tiene actividad como antioxidante.



Catalasa (CAT): Es una hemoproteína tetramérica de 240 kDa, con 4 ferriprotoporfinas por moléculas, tiene una vida media de aproximadamente 6-8 min [Thakur et al., 1998], se encuentra en los peroxisomas y presenta una doble función; a la descomposición de H₂O₂ a oxígeno y H₂O (reacción 4) se le conoce como su actividad catalítica y a la oxidación de donadores de protones como metanol, etanol, etc con el consumo de 1 mol de peróxido se le conoce como actividad de peroxidasa (reacción 5) [Aebi H., 1984]. En los mamíferos, se encuentra en altas concentraciones en hígado, riñón y en menor cantidad en tejido conectivo [Nakashima et al., 1989]. Esta enzima se ha encontrado principalmente en los peroxisomas y en menor cantidad en las mitocondrias, mientras que en los eritrocitos se ha reportado una forma soluble [Thakur et al., 1998]. En ciertas especies, la CAT presenta el dinucleótido de fosfato nicotinamida adenina reducida (NADPH), constituyendo un reservorio de NADPH, lo cual tiene un papel muy importante en el estrés oxidante [Kirkman et al. 1984].

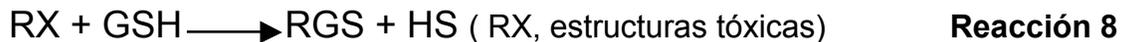


Glutatión Peroxidasa (GPx): Fue descubierta a finales de los 50' y tiene un peso molecular aproximadamente de 84 kDa, esta

enzima cataliza la descomposición del H₂O₂ y otros peróxidos orgánicos a H₂O, con la subsecuente oxidación del glutatión reducido, es decir de GSH a GSSG (reacción 6). El GSSG es reducido a GSH por la glutatión reductasa en presencia del NADPH, impidiendo que se agoten las reservas de GSH (reacción 7) [Harris ED., 1992; Ichikawa et al., 1994].



Glutatión S-transferasa (GST): Pertenece a una grupo de enzimas que tiene la célula para la destoxificación, eliminación de xenobióticos o sustancias nocivas. Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del GSH sobre un gran número de estructuras tóxicas u orgánicas, generando compuestos menos reactivos y más solubles para su eliminación celular por medio de transportadores específicos (reacción 8). Actualmente, se conocen dos isoformas de estas enzimas: la citosólica y las microsomales; en mamíferos, existen como homo y heterodímeros, con un peso de aproximadamente 25 kDa por subunidad y un sitio activo por monómero [Wilce et al., 1994].



Superóxido dismutasa (SOD): Esta enzima se descubrió a finales de los 60', y cataliza la dismutación del O₂^{·-} a H₂O₂ (**reacción 9**); en eucariontes existen tres isoformas diferentes que provienen de genes diferentes, dos de ellas contienen en su sitio activo cobre o zinc, y la tercera contiene manganeso [Ho et al., 1991]. La isoforma que tiene zinc se localiza principalmente en el citoplasma aunque también se encuentra en menor proporción en: lisosomas, núcleo [Weisinger et al., 1973]. Se encuentra como dímero, con un peso aproximado de 17 kDa por subunidad [Crapo et al., 1992].



Glutatión reductasa (GR): Es una flavoenzima dependiente de NADPH que cataliza la reducción del GSSG a GSH, es decir, la regeneración de GSH (reacción 10), el cual será utilizado por la GPx para la reducción de los elementos tóxicos H₂O₂ y L-OOH. Estas

enzimas son las responsables de la detoxificación de los compuestos electrofílicos generados por las proteínas de fase I, agregándoles grupos funcionales a xenobióticos [Henderson et al., 2005].



Hemo oxigenasa (HO) : es una enzima antioxidante que se encarga de catalizar el primer paso de la degradación del grupo hemo produciendo CO, Fe 2+ y biliverdina; esta última molécula por acción de la biliverdina reductasa se convierte en bilirrubina que a su vez es una molécula con capacidad de atrapar ROS [Maines, 2000]. Se han encontrado dos isoformas de HO (HO-1 y HO-2) y de forma muy notable son codificadas por genes diferentes y por consiguiente con propiedades bioquímicas diferentes, mientras que la HO-1 es inducible la HO-2 es constitutiva [Cruse et al., 1998]. Estas enzimas se han asociado principalmente al retículo endoplásmico, sin embargo, reportes muy recientes la han encontrado en núcleo, mitocondria y membrana plasmática [Ryter et al., 2006]. La HO-1 se induce por una variedad de estímulos como su propio sustrato el grupo hemo, el estrés oxidante, el interferon- γ y compuestos polifenólicos como curcumina o el NDGA [Salinas, et al., 2003; Guzman Beltrán et al., 2008] y en su región promotora posee secuencias para los factores de transcripción NF κ B, Nrf2 y AP-1 [Nguyen et al., 2012]. Existen reportes donde se asocia su inducción con protección celular en modelos de daño celular como la diabetes [Di Noia et al., 2006], insuficiencia renal [Barrera et al., 2003; Pedraza-Chaverri et al., 2004] y daño neuronal [González-Reyes et al., 2009]. Ratones *knockout* de esta enzima presentan problemas en el metabolismo del hierro, con el posterior daño oxidante en hígado y riñón y finalmente desencadenando el proceso de inflamación [Saikawa et al. 2000]. Como se mencionó, la HO-1 se induce por factores de crecimiento que inducen a las vías de proteínas activadas por mitógenos (MAPK, Erk 1/2 y JNK) y a la vía de sobrevivencia celular PI3K/AKT [Martin et al., 2004].

1. 4 Ácido nordihidroguayerético, NDGA

Larrea tridentata, es un arbusto cuyas hojas han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional, debido a que infusiones de esta

planta tiene efectos benéficos en una diversidad de enfermedades como son: reumatismo, infertilidad, artritis, diabetes tipo II, eliminación de “cálculos renales”, inflamación y más recientemente se le ha involucrado en la inhibición de la duplicación del virus del VIH [Arteaga *et al.*, 2005; Gnabre *et al.*, 1995; Goodman *et al.*, 1994]. Esta planta es endémica de las partes desérticas del noreste de México y suroeste de Estados Unidos, popularmente se le conoce como “chaparral”, “gobernadora” o “hediondilla”, entre otros nombres. Este arbusto mide de 1-3 metros de altura y pertenece a la familia Zygophyllaceae (Esquema 1). Se ha reportado que *L. tridentata* contiene al menos 20 productos con propiedades biológicas, entre ellas se encuentran compuestos polifenólicos, terpenos, etc [Arteaga *et al.*, 2005; Lambert *et al.*, 2002]. El principal compuesto extraído de las hojas de ésta planta es el antioxidante conocido como ácido nordihidroguayarático (NDGA); el análisis ha demostrado que entre el 5-10 % del peso seco de las hojas son de NDGA y su concentración es de 38.3 mg/g [Hyder *et al.*, 2002]. El nombre químico del NDGA es 4,4'-(2,3 dimetil-1, 4-butanediol)bis[1,2-bencenediol] y en su estructura posee dos grupos o-catecoles (Esquema 2). Este compuesto ha llamado mucho la atención debido a que se ha demostrado en modelos murinos que tiene efectos en la disminución de la presión arterial, siendo éste un gran problema de salud pública tanto en países industrializados como en los no-industrializados [Gowri *et al.*, 1999]; inhibe la división celular de diversos tipos de células cancerosas e inhibe la duplicación del virus del herpes y de HIV [Gnabre *et al.*, 1995; Birkenfeld *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1998; Hwu *et al.*, 2008]. El NDGA se encuentra en las flores, hojas, y en el tallo de la planta [Hyder *et al.*, 2002].

El NDGA es un compuesto con propiedades muy interesantes desde el punto de vista biológico, ya que se conoce que tiene efectos benéficos en problemas tan graves como reumatismo, infertilidad entre otras, sin embargo, también existen reportes donde el uso crónico tiene efectos colaterales como en daño renal y hepático lo que ha limitado en gran medida la utilización de este compuesto de forma regulada; por lo que es muy importante, tratar de discernir cada vez más los efectos que produce este compuesto en diversas líneas celulares y de esta forma, a través del tiempo, poder hacer uso de él de forma sistemática [Floriano-Sanchez *et al.*, 2006]. Finalmente, y no por eso menos importante, se ha reportado que el –

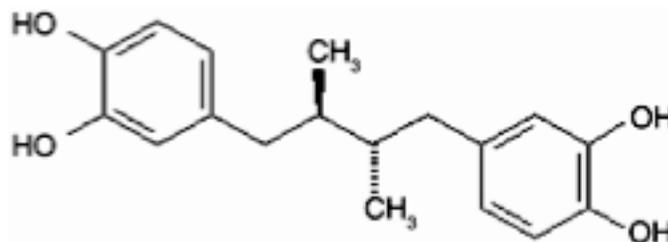


Esquema 1. Arbusto de *Larrea tridentata*.

NDGA tiene propiedades de atrapar radicales libres *in vitro* [Galano *et al.*, 2010].

1.5 Nrf2 y la vía de señalización para activar genes citoprotectores

La inducción de muchas enzimas citoprotectoras en respuesta a estrés químico es regulado principalmente a nivel transcripcional. Uno de los mecanismos principales con que cuenta la célula para defenderse contra el estrés oxidante y electrofílico, es la activación

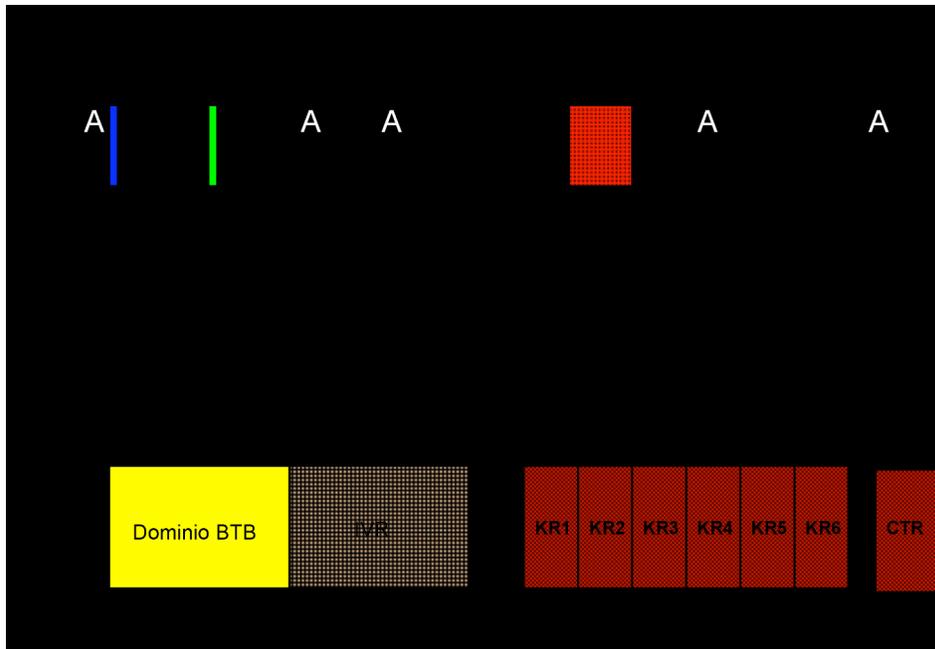


Esquema 2. Estructura del ácido nordihidroguayarético, NDGA.

de la vía de señalización de elementos que responden al estrés oxidante regulada por el factor transcripcional, Nrf2; el cual regula la expresión de genes cuyos productos proteicos están involucrados en la detoxificación o eliminación de oxidantes reactivos o agentes electrófilos a través de reacciones de conjugación y de esta forma incrementa la capacidad antioxidante de la célula [Jaiswal 2004; Kaspar *et al.*, 2004; Niture *et al.*, 2010]. Muchas de las enzimas involucradas en la protección celular contra el estrés oxidante son reguladas a nivel transcripcional. Se ha encontrado en los promotores de dos enzimas citoprotectoras [GSTA2 (glutathión S-transferasa A2) y NQO1 (NADPH:quinona oxidoreductasa 1)] un elemento de acción en *cis*, conocido como ARE (por sus siglas en inglés, *antioxidant response element*) que poseen características únicas de respuesta al estrés oxidante [Kensler *et al.*, 2007]. Este *enhancer*, responde a las alteraciones en el estado redox de la célula, debido a nivel altos de ERO y especies electrófilas que disminuyen la capacidad antioxidante de la célula [Nguyen *et al.*, 2005; 2009]. Es importante señalar que los genes de expresión inducible tienen un nivel basal de expresión bajo condiciones de no-estrés; debido a que las especies de oxígeno reactivas y otras moléculas reactivas endógenas son generadas de forma constante a partir del metabolismo aeróbico normal, estos elementos en *cis*, tienen una función crítica en el mantenimiento de la homeostasis redox celular bajo condiciones de estrés y de no-estrés [Kensler *et al.*, 2007].

En condiciones de no-estrés (basales) en la célula, el factor de transcripción Nrf2, interactúa con la proteína anclada a la actina Keap1, la cual se localiza ampliamente en el citoplasma; la unión de Nrf2-Keap1 en condiciones basales, permite que Nrf2 sea degradada por medio del proteosoma (Esquema 3) [Nguyen *et al.*, 2003; Cullinan *et al.*, 2004]. Esta interacción entre Nrf2-Keap1 mantiene los niveles de expresión basal bajos de la familia de genes regulados por Nrf2.

Sin embargo, cuando las células están expuestas a señales químicas que promueven estrés oxidante o debido a la exposición a -



Esquema 3. Dominios de las proteínas Nrf2 y Keap1. a) Dominios descritos del factor transcripcional Nrf2. b) Dominios estructurales del represor de Nrf2, la proteína Keap1. (Tomada de Hayes *et al.*, 2009)

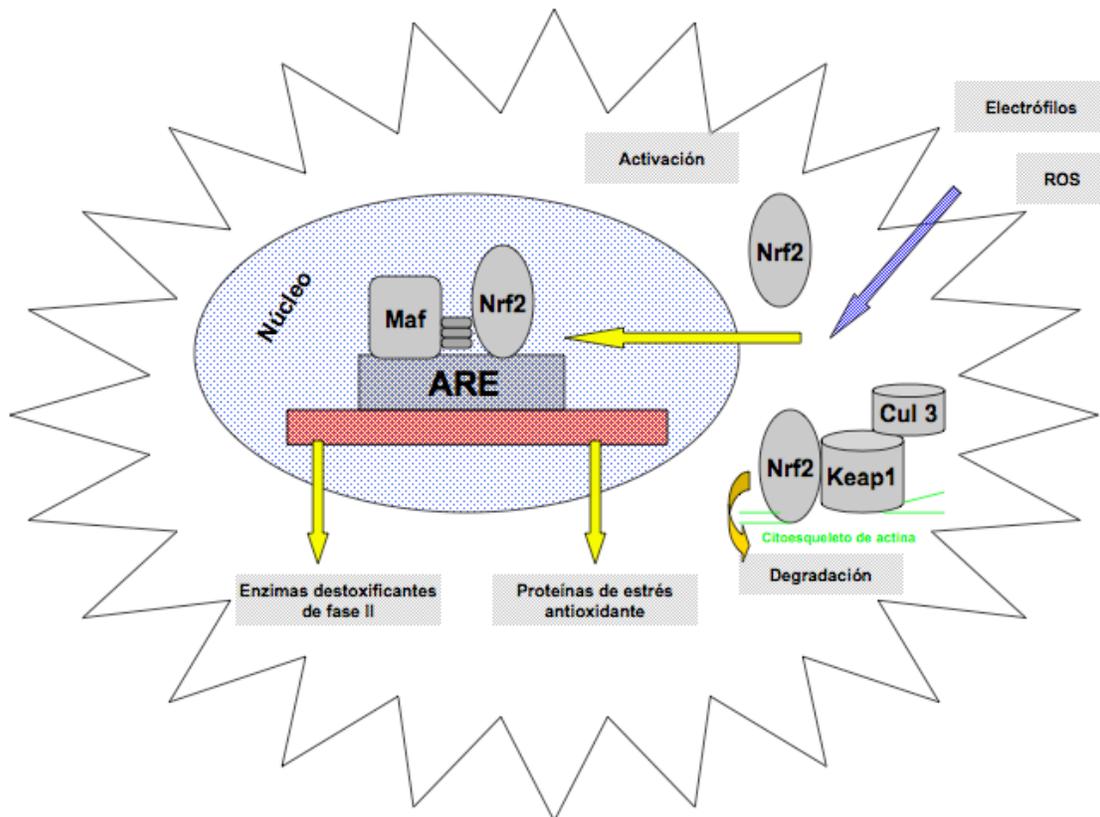
moléculas electrófilas, la proteína Nrf2 se libera de la proteína Keap1 localizadas en el citoplasma, migrando al núcleo y transactivando la expresión de genes citoprotectores (como por ejemplo el de **HO-1**) que permiten la sobrevivencia celular [Kobayashi *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004]; específicamente, se ha documentado que la PKC induce la fosforilación de Nrf2 y permite la disociación de su represor, Keap1 [Bloom *et al.*, 2003], por otro lado se ha encontrado que GSK-3 β fosforila a residuos de Ser/Thr en Nrf2 e induce su degradación [Salinas *et al.*, 2003; Salazar *et al.*, 2006] y en sistema nervioso se ha reportado su participación [Rojo *et al.*, 2008].

El estrés oxidante contribuye a enfermedades relacionadas con el envejecimiento celular tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamación crónica y/o enfermedades neurodegenerativas [Kensler *et al.*, 2007].

En la respuesta protectora participan tres componentes esenciales: a) elementos de respuesta antioxidante (ARE), que son

secuencias regulatorias presentes en regiones “*río arriba*” de los genes regulados en una o múltiples copias; b) Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor* 2), factor transcripcional que heterodimeriza con miembros de factores transcripcionales de la familia de “proteínas Maf”, los cuales se unen al ARE para reclutar la maquinaria de transcripción para los genes regulados de esta forma; y c) Keap1 (*Kelch ECH associated protein 1*), proteína citosólica que reprime a Nrf2, manteniéndola en el citoplasma y favoreciendo la degradación de este complejo por el sistema del proteosoma (Esquema 4). Es muy evidente, que el estrés celular y ambiental induce “**cascadas de señalizaciones**” que posteriormente regulan genes efectores dependientes de estas señales celulares como es el estrés oxidante [Kensler *et al.*, 2007]. Es notorio señalar que estas cascadas de señalización que responden a señales extracelulares son muy antiguas evolutivamente hablando, se encuentran desde los procariontes, *C. elegans*, *Drosophila* hasta los mamíferos. Principalmente, existe una familia de proteínas cinasas de Ser/Thr (MAPK) como lo son p38, Erk1/2 y JNK que son las encargadas de convertir las señales extracelulares en respuestas intracelulares [Owuor *et al.*, 2002], es decir que activan a Nrf2 para inducir la transcripción de genes citoprotectores; estas tres vías parecen estar involucradas en la inducción de este tipo de genes; también, se ha implicado la participación de la vía de PKC, PI3K/AKT y cinasas de tirosinas en la inducción de estos genes [Bloom *et al.*, 2003].

La proteína Nrf2 fue clonada a partir de la propiedad que tienen de unirse al sitio hipersensible a DNAasa I, conocido como “motivo de unión al DNA NF-E2/AP-1”, además, de ser parte del “*locus control region*” del gen β -globin (Orkin, 1990). Este gen codifica para una proteína de 589 residuos en humanos y pertenece a un subgrupo de genes conocido como “cierre de leucinas básico” (bZip) que comparten un dominio estructural conservado entre sus miembros llamado “dominio CNC” que inicialmente fue descrito en una mutante de *Drosophila* llamada cap ‘n’ collar, y que se requiere para el desarrollo mandibular y labial de este invertebrado [Mohler *et al.*, 1995]. En mamíferos, la **familia de genes CNC** está compuesta de 4 proteínas altamente relacionadas en su secuencias, a saber, p45-NFE2, Nrf1, Nrf2 y Nrf3 y dos proteínas relacionadas distantemente, conocidas como Bach1 y Bach2 [Kensler *et al.*, 2007].



Esquema 4. Vía de acción de Nrf2. Esquema que representa como Nrf2 puede unirse a los elementos de respuesta a estrés (ARE). ROS, especies de oxígeno reactivas. Keap1 y Cul3 son proteínas que favorecen la degradación de Nrf2; Maf, compañero de unión al ADN de Nrf2. (Tomado de Motohashi et al., 2004)

Estas proteínas funcionan como factores transcripcionales heterodiméricos con otras proteínas bZip, conocidas como Maf pequeñas [Igarashi *et al.*, 1994]. Estudios genéticos en ratones ha revelado funciones únicas e importantes de estas proteínas al menos durante el desarrollo embrionario de estos mamíferos. Los ratones *knockout* de Nrf1, presentan letalidad embrionaria durante la gestación media con un fenotipo de anemia severa debido a anomalías en el hígado fetal [Chan *et al.*, 1998]. Se han establecido diversas líneas de ratones *Nrf2*^{-/-}. Sin embargo, en todas ellas se observa que es dispensable para el crecimiento y desarrollo, aunque la expresión inducible de enzimas como GSTs y NQO1 esta atenuada en hígado e intestino [Itoh *et al.*, 1997] y estos ratones son extremadamente sensibles a retos exógenos que provienen del estrés oxidante ó electrofílico, lo que claramente indica

su papel durante la homeostasis celular [Rangasamy *et al.*, 2004; Rangasamy *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 2007].

1.6 Keap1, represor del factor transcripcional Nrf2

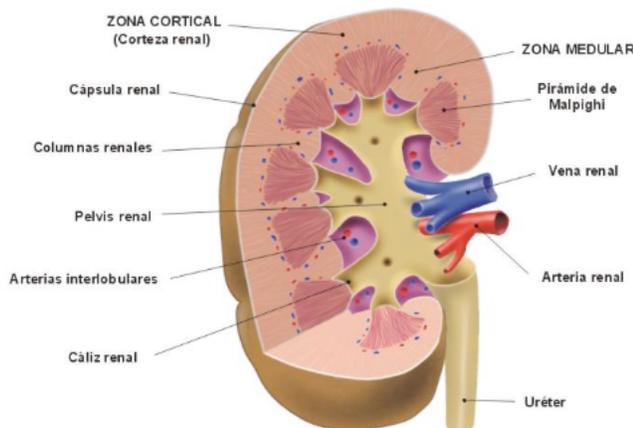
Como se mencionó anteriormente, la proteína Keap1 se une al factor transcripcional Nrf2 y lo ancla al citoplasma en condiciones basales; sin embargo, cuando la célula es expuesta a un estrés celular Keap1 se desensambla del complejo con Nrf2, permitiendo que este factor migre al núcleo celular para la activación de genes que respondan al estrés celular. El regulador negativo de Nrf2, la proteína Keap1 posee 5 dominios (esquema 3): El dominio COOH terminal, el dominio repetido Kelch (también conocido como “dominio de repetición de glicina doble”), el dominio de región de intervención (IVR), el dominio BTB (“Bric-à-Brac) y el dominio NH₂ terminal. Es muy notable mencionar que la proteína Keap1 posee en su secuencia primaria 27 Cys en humanos y 25 en ratón sugiriendo ampliamente que es una proteína sensor a electrofilos. Ciertas evidencias han indicado que el sulforafano induce la expresión de Nrf2 de forma dependiente de la Cys151 conservada [Itoh *et al.*, 1999]. Keap1 es anclada al citoplasma celular a través de su dominio Kelch que le permite unirse tanto a las fibras de actina del citoesqueleto como al factor transcripcional Nrf2. El dominio BTB es el que le permite formar homodímeros de esta proteína y muy importante señalar que este dominio es el que le permite interactuar con la proteína adaptadora, Culina. [Kansanen *et al.*, 2012]

1.7 Riñón

Los riñones constituyen un órgano par y se localizan en la pared abdominal posterior, a ambos lados de la columna vertebral. Las dimensiones medias del riñón humano son de 12 x 6 x 3 cm. El peso promedio del riñón es de aproximadamente 125-170 g en hombres y de 115-155 g en mujeres. Tiene forma irregular y ovoide aplanada en sentido anteroposterior. Este órgano es el encargado de remover del cuerpo los productos terminales del metabolismo de las células, tales como la urea, ácido úrico y creatinina y de forma muy determinante regula el equilibrio hídrico y electroquímico del cuerpo. Además regula la presión arterial e impide que moléculas que son esenciales para el cuerpo sean eliminadas, como el agua, azúcares,

aminoácidos, proteínas y electrolitos sodio, potasio, cloruro y bicarbonato.

En un corte sagital del riñón, podemos observar dos regiones principalmente: la corteza y la médula renal. La corteza rodea por completo a la médula, siendo la región más externa. La médula ocupa la región central del riñón y se divide en dos zonas, la externa y la interna. La médula externa está formada por estructuras en forma de embudo llamadas pirámides; los cálices renales son los lugares donde se drena el producto de desecho del riñón.



Esquema 5. Diagrama del riñón cortado de forma sagital.

La unidad funcional del riñón es la nefrona. El riñón humano tiene aproximadamente de 0.4×10^6 a 1.2×10^6 nefronas y cada riñón de la rata contiene aproximadamente 30×10^3 a 34×10^4 , las cuales no pueden regenerarse después de ser dañadas. La nefrona está compuesta por el corpúsculo renal y el sistema tubular [Heinz V., 1983]. El sistema tubular de la nefrona está compuesta por el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el sistema de los túbulos colectores. En la rata, el túbulo proximal mide aproximadamente 8 mm y por microscopía óptica podemos observar las células tubulares, y se pueden distinguir tres segmentos especializados (S1, S2 y S3) y diferenciados ultraestructuralmente [Kaissling et al., 1979]. Las células epiteliales que constituyen el túbulo contorneado proximal presenta una forma muy compleja y la superficie luminal presenta dos características: gran cantidad de microvellosidades y un sistema de túbulos ápicales. Esta modificación en forma de borde de cepillo, se estima que produce un

incremento de aproximadamente 40 veces de la superficie luminal y con esto la capacidad de reabsorción tubular. Esta es la sección de la nefrona donde se lleva a cabo principalmente la reabsorción de las moléculas del organismo [Heinz, 1983].

1.8 Insuficiencia renal aguda (IRA)

La IRA se caracteriza por una disminución rápida de la capacidad de filtración glomerular, lo que trae como consecuencia principal la acumulación de productos finales del metabolismo, como los compuestos nitrogenados como urea y creatinina. La IRA generalmente es asintomática y se detecta al realizar un perfil bioquímico en pacientes intrahospitalarios, debido a un incremento considerable de la creatinina y el nitrógeno de urea en sangre (BUN). La IRA está asociada con un aumento de la morbilidad y mortalidad intrahospitalaria en aproximadamente un 50 % [Huen et al., 2012].

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

1. IRA prerenal: Se caracteriza por una hipoperfusión renal en el cual la integridad del tejido renal es preservado y representa entre un 55 y 60 % de los casos de IRA.
2. IRA intrínseca: El tejido renal se encuentra comprometido. Desde el punto de vista clininopatológico se clasifica en : 1) enfermedad que involucra los vasos renales grandes; 2) enfermedades de la microvasculatura y el glomérulo; 3) necrosis tubular aguda isquémica y nefrotóxica (el 90 % de las IRA son de este tipo).
3. IRA postrenal: Enfermedad asociada con la obstrucción aguda del flujo urinario entre la uretra y el cuello de la vejiga o debido a una obstrucción bilateral de los ureteros.

La necrosis tubular aguda se caracteriza por la generación de una serie de alteraciones estructurales y moleculares de las células tubulares como la pérdida del borde en cepillo, disminución de los procesos de absorción, hipoxia, incremento del calcio citosólico, descenso de los niveles de ATP, acidosis intracelular, producción de ERO y, junto con los restos necróticos de las células tubulares, contribuyen a la obstrucción tubular [Brenner, 2000].

1.9 Isquemia –reperfusión renal:

Se describe como **daño renal agudo**, a una disminución de la función renal medida por el incremento en suero de creatinina que va desde el rango de horas hasta menos de 3 meses [Bonventre et al., 2011]. La eliminación del flujo sanguíneo (isquemia) seguida por el restablecimiento del mismo (reperfusión), tiene como consecuencia que se dañen tejidos y órganos [Chatterjee, 2007]. La causa principal de estos daños no se conoce con precisión, sin embargo, se ha descrito que la falta de sangre a los tejidos tiene como consecuencia la falta de oxígeno y nutrientes, además, que el regreso rápido de la sangre oxigenada por un lado previene de la muerte celular isquémica aunque también contribuye a un daño y muerte celular, llamado “daño de la reperfusión” [Bonventre, 1993].

En relación a la I/R renal, se desconoce el mecanismo intracelular y molecular que causa el daño a tejidos y órganos. Sin embargo, la falta de flujo sanguíneo a alguno de los riñones pueda causar un daño isquémico agudo y si el problema persiste se desencadenará un problema crónico renal. A nivel celular, las células del túbulo proximal dentro del riñón son muy especializadas tanto morfológica como funcionalmente, ya que permiten un transporte eficiente de agua e iones y ciertas macromoléculas a través de las membranas que son altamente selectivas. Cuando se presenta la isquemia, estas células al hacerles falta los nutrientes tienen como consecuencia que una determinada población celular muera [Lieberthal et al., 1996]. El problema de mortalidad ocasionada por daños renales agudos se ha estimado que se presenta una tasa de mortalidad de hasta el 50% en países industrializados [Star, 1998].

La I/R se ha clasificado para fines prácticos en tres fases de respuestas, a saber,

Fase I ó de respuesta temprana a la reperfusión: Inmediatamente después de la reperfusión (dentro de segundos hasta minutos), que incluye una serie de cascadas moleculares como la activación de fosfolipasas, cambios en el citoesqueleto y expresión de ciertas moléculas [Toledo-Pereyra et al., 2004].

Fase II ó de respuesta temprana a la reperfusión: En esta etapa se incluyen respuestas moleculares tempranas (dentro de minutos a horas) como el inicio de la síntesis de proteínas, especialmente las asociadas a la inflamación como TNF- α e IL-1. Señales moleculares iniciales que empiezan en este punto y continúan hacia el citoplasma

con la activación de ciertas proteínas cinasas (MAPK), para enviar las señales al núcleo y activar factores de transcripciones para el proceso inflamatorio [Toledo-Pereyra et al., 2004].

Fase III ó de respuesta tardía a la reperfusión: Está asociada con los eventos finales de la respuesta a la I/R, implicando mecanismos crónicos de protección (dentro de días a semanas) como ciertas vías de señalización implicadas en la cicatrización [Toledo-Pereyra et al., 2004].

1.10 Nefrotoxicidad inducida por gentamicina

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido policatiónico y altamente polar que se utiliza de forma sistemática en el tratamiento de infecciones por bacterias gram negativas debido a su estabilidad química y su rápida acción para eliminar a las bacterias; sin embargo, altas concentraciones de este antibiótico son nefrotóxicas. Este antibiótico se absorbe rápidamente después de inyecciones intramusculares o subcutáneas y sus niveles en los tejidos es baja, excepto en la corteza renal. Su vida media en plasma es de 2-3 horas y su eliminación es virtualmente de forma completa por filtración glomerular en el riñón [Bennet, 1989; López-Novoa et al., 2011]. La nefrotoxicidad por gentamicina se asocia a que éste se incorpora y se acumula en los lisosomas de los túbulos proximales lo que ocasiona que estas células pierdan su morfología de “borde en cepillo” [Ali, 1995]. Se ha documentado ampliamente que la gentamicina induce la expresión del TGF- β y la endotelina-1, y un incremento en la infiltración monocitos/macrófagos hacia la corteza renal y médula así como una inducción de apoptosis y necrosis [Ali, 1995].

1.11 Estrés oxidativo en la isquemia-reperfusión y en el daño ocasionado por gentamicina:

La generación de ERO y la disminución del sistema de defensa favorece el desarrollo de **estrés oxidativo**, el cual tiene un papel muy preponderante en el desarrollo del daño por I/R renal aguda [Nath et al., 2000]. Recordemos que las ERO en condiciones fisiológicas tienen una función muy importante para mantener el flujo sanguíneo y la función tubular, y gracias al sistema antioxidante enzimático y al no-enzimático se evita que éstas moléculas dañen a las células [Araujo et al., 2006]. Por lo que durante la I/R renal, se

presenta un aumento excesivo de ERO siendo ésta una de las principales causas de la Insuficiencia renal aguda (IRA) [Nose, 2000; Quiros et al., 2011], como se ha demostrado por estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos [Chatterjee et al., 2000]. En el riñón, la susceptibilidad de las células tubulares proximales a las ERO favorece el daño celular, lo que finalmente induce necrosis tubular aguda [Nath et al., 2000; Quiros et al., 2011].

Por otro lado, la óxido nítrico sintasa (NOS) que produce el óxido nítrico (NO^\cdot), también tiene una función importante tanto en el estado fisiológico como fisiopatológico [Araujo et al., 2006]. La NOS inducible (iNOS) se expresa después de una exposición a I/R o citocinas inflamatorias en las células tubulares proximales del riñón, contribuyendo al daño renal agudo. Más aún, en estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado que la inhibición de la actividad de iNOS reduce significativamente el daño ocasionado por la I/R. También, se ha demostrado que la interacción de los radicales libres NO^\cdot con $\text{O}_2^{\cdot-}$ genera la especie prooxidante peroxinitrilo (ONOO^\cdot) lo que tiene como consecuencia el daño celular afectando el ADN y favoreciendo la nitración de tirosinas en las proteínas con su consecuente inactivación [Chatterjee, 2007].

También se ha demostrado que durante la I/R, la inflamación tiene un papel muy importante en el desarrollo de la IRA. El proceso inflamatorio renal involucra una secuencias de eventos que conducen al daño celular y una eventual muerte de las células renales. La principal teoría implicada en el daño renal agudo ocasionado por la inflamación es la producción abundante de ERO. En un modelo en ratones, se observó que durante el periodo de reperfusión se activan células polimorfonucleares lo que permite que se adhieran e infiltren al tejido renal donde generan $\text{O}_2^{\cdot-}$ [Patel et al., 2002]. Debido a las evidencias de que el desarrollo del daño renal agudo está fuertemente asociado con inflamación intrarenal, este es un blanco para el desarrollo de nuevas drogas que contraresten este efecto [Chatterjee, 2007].

En conclusión, durante la I/R se generan grandes cantidades de ERO lo que trae como consecuencia el daño celular, y a pesar de los grandes esfuerzos que se hacen para tratar de contrarrestar el efecto del daño renal agudo, todavía no se ha logrado mejorar el tratamiento después de un daño ocasionado por la I/R [Chatterjee,

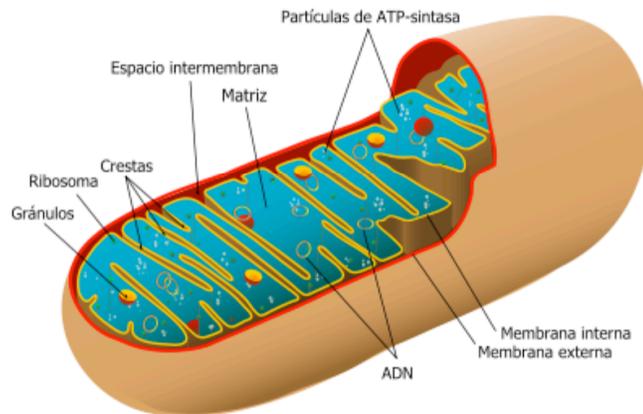
2007], por lo que se requiere una mayor cantidad de estudios que permitan discernir el mecanismo implicado en el daño renal agudo.

En lo referente a la nefrotoxicidad inducida por gentamicina se ha documentado que este fármaco se une a los fosfoinosítidos ácidos de las membranas en “borde en cepillo” de los túbulos proximales y actúan en el receptor de drogas catiónicas megalina (proteína membranal), localizadas en las bases del “borde en cepillo”. Así el complejo receptor-droga se internaliza por pinocitocis hasta los lisosomas donde ocurre fosfolipidosis alterando procesos intracelulares renales [Laurent et al., 1982]. Estructuralmente, la nefrotoxicidad inducida por gentamicina está asociada con descamación celular, atrofia glomerular, necrosis y fibrosis tubular, edema epitelial de los túbulos proximales, hipertrofia e inflamación glomerular [Bledsoe et al., 2006; Quiros et al., 2011]. Evidencias experimentales sugieren que la gentamicina incrementa la infiltración glomerular un aumento en los niveles de la citocina TGF- β con la subsecuente progreso de la nefritis tubulointersticial [Bledsoe et al., 2006]; la necrosis estimulada por este aminoglucósido estimula eventos inflamatorios al recutar moléculas de adhesión intercelular en el sitio del daño incrementando la migración de monocitos y macrófagos al tejido dañado [Balakumar et al., 2010]; también, se ha demostrado la generación de especies de oxígeno reactivas como O_2^- , OH^- , H_2O_2 y especies reactivas de nitrógeno en la corteza renal. Más aún, se ha demostrado que incrementa los niveles de peroxidación, formación de nitrotirosina y oxidación de proteínas en la corteza renal [Balakumar et al., 2010].

1.12 Mitocondria y cadena respiratoria:

La mitocondria es un organelo esencial para el mantenimiento de la homeostasis de las células que utilizan oxígeno. En este organelo es donde se produce la mayor cantidad de energía en forma de ATP, utilizando al O_2 como aceptor final de los electrones; también, es la encargada de mantener los niveles intracelulares de Ca^{2+} en el rango fisiológico. Las mitocondrias tienen una longitud aproximada de 1.5-10 μm y un diámetro de 0.5-1 μm ; están formadas por una doble membrana: a) la membrana externa: de forma lisa que recubre a toda la mitocondria; y, b) la membrana interna: que está formado por grandes pliegues irregulares llamados crestas. La región entre

ambas membranas, recibe el nombre de espacio intermembranal (Esquema 6).



Esquema 6. Estructura de la mitocondria. ADN, material genético de la mitocondria.

La membrana mitocondrial externa es relativamente permeable a moléculas de diverso peso molecular, sin embargo, la membrana mitocondrial interna es relativamente impermeable a las diversas moléculas. Por ello las moléculas que entran o salen de la matriz lo hacen a través de diversos transportadores, lo que permite que esta membrana genere una diferencia de concentración entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana [Voet et al., 2001].

La cadena respiratoria mitocondrial, es un conjunto de transportadores localizados en la membrana mitocondrial interna. Estas proteínas se encargan de bombear protones de la matriz al espacio intermembrana, además, de forma acoplada transporta electrones desde el NAD^+/NADH y el FAD/FADH_2 al O_2 produciendo H_2O , mecanismo llamado cadena de transporte de electrones. Este proceso se realiza gracias a la presencia de cinco complejos proteicos insertados en la membrana mitocondrial interna: Complejo I o NADH deshidrogenasa, complejo II o succinato deshidrogenasa, complejo III o citocromo *bc1*, complejo IV o citocromo *c* oxidasa y el complejo V o la ATP-sintasa; y dos complejos móviles: la ubiquinona (coenzima Q) y el citocromo *c*. (Esquema 7).

Complejo I (NADH deshidrogenasa): Este complejo cataliza la transferencia desde el NADH a la ubiquinona. Este complejo permite la salida de los protones desde la matriz al espacio intermembranal y se le considera en conjunto con el complejo III, uno de los principales sitios de formación de ERO en la célula [Raha et al., 2001].

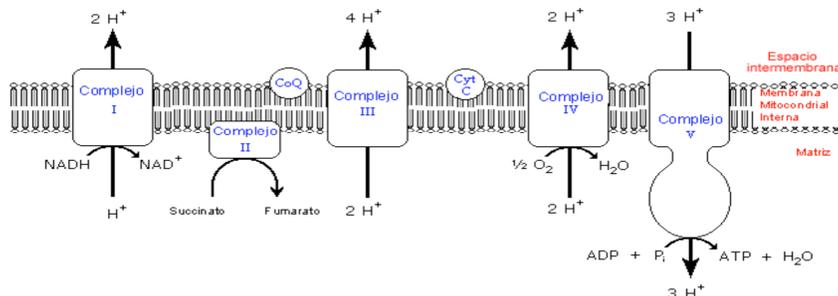
Complejo II (succinato deshidrogenasa): Este complejo cataliza la transferencia de electrones del succinato al fumarato en la matriz mitocondrial. La oxidación del succinato está acoplada a la reducción de la ubiquinona a ubiquinol. Este complejo no transfiere protones a través de la membrana mitocondrial, por lo que no participa en la formación del gradiente electroquímico para la síntesis de ATP [Huo et al., 2007].

Complejo III (citocromo *bc1*): Es el componente más pequeño de la cadena respiratoria, y tiene la función de bombear 2H^+ a la matriz mitocondrial y el de transportar 2e^- al citocromo c soluble.

El citocromo c, es una proteína monomérica que se encuentra en el lado externo de la membrana interna. La función de esta proteína es transferir 2e^- entre los complejos III y IV.

Complejo IV (citocromo c oxidasa): Es el complejo final de la cadena respiratoria cuya función es la reducción del O_2 hasta H_2O . Por cada electrón transferido al O_2 , se bombea un protón a través de la citocromo c oxidasa, por lo que se requieren 4H^+ de la matriz y 4e^- del citocromo c para reducir al O_2 a H_2O [Bränden et al., 2006].

ATP-sintasa (complejo V): este complejo utiliza el gradiente electroquímico para sintetizar ATP a través de sus subunidades: F_1 o subunidad catalítica y la subunidad F_0 o subunidad membranal [Voet et al., 2001].



Esquema 7. Componentes de la cadena de transporte mitocondrial.

2. JUSTIFICACIÓN

El NDGA es un antioxidante con efectos muy amplios presente en *L. tridentata*, y desde hace mucho tiempo es comúnmente utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades, sin embargo, el uso crónico de este compuesto también se le ha asociado a daño renal. Por lo que es de suma importancia, evaluar en un modelo *in vivo*, el efecto del NDGA ante la insuficiencia renal aguda inducida por la I/R (gentamicina) .

Por otra parte y para ampliar nuestro conocimiento sobre el efecto del NDGA en la citoprotección, sería muy importante evaluar el papel que tiene éste compuesto en la inducción de alguna vía señalización y la subsecuente inducción de algún gen citoprotector sobre la toxicidad inducida por H_2O_2 .

3. HIPÓTESIS

Si el antioxidante NDGA es capaz de atenuar las especies reactivas de oxígeno y/o activar enzimas citoprotectoras entonces será capaz de disminuir el daño renal agudo producida por la I/R ó la gentamicina activando alguna vía de sobrevivencia celular que participe en este efecto citoprotector.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto del NDGA en un modelo de insuficiencia renal aguda y determinar la participación de vías de señalización celular con la subsecuente expresión de un gen citoprotector *in vitro*.

Objetivos específicos:

- a) Evaluar si el NDGA previene la disfunción renal producida por la I/R.
- b) Evaluar si el NDGA tiene algún efecto sobre la actividad de ciertas enzimas citoprotectoras en la I/R.
- c) Evaluar el efecto del NDGA sobre el estrés oxidante y nitrante en la I/R.
- d) Evaluar el efecto del NDGA sobre la función mitocondrial en la I/R.
- e) Evaluar el efecto del NDGA sobre la migración de Nrf2 en la I/R.
- f) Evaluar el efecto protector del NDGA sobre la toxicidad generado por el H₂O₂ *in vitro*.
- g) Evaluar el efecto del NDGA sobre la expresión del gen citoprotector HO-1, así como la posible participación de alguna vía de señalización.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos.

Los siguientes reactivos se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): Ácido nordihidroguayerético, NDGA (No. de cat. N5023), SB203580 (No. de cat. S8307), SP600125 (No. de cat. S5567), LY-294002 (No. de cat. L9908) , PD98059 (No. de cat. P215), nitroazul de tetrazolio (NBT), tetrametoxipropano (TMPO), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato de forma reducida (NADPH), nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida (NADH), HEPES, y albúmina sérica bovina (BSA). SnMP se compró de (Frontier Scientific (No. de cat. LY09-1701). El JC1 se compró de Molecular Probes™ (No. de cat. T3168). El peróxido de hidrógeno (H₂O₂ al 30 %) se obtuvo de J. T Baker (No. de cat. 2186).

5.2 Estudios *in vivo*

5.2.1 Efecto del NDGA sobre el daño renal inducido por I/R

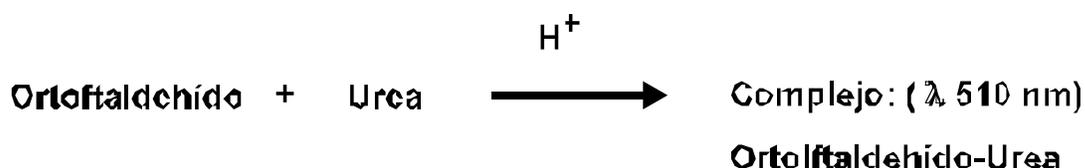
5.2.1.1 Diseño experimental

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de entre 250-300 g. Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h en condiciones de temperatura controlada, teniendo acceso *ad libitum* a agua y alimento. El trabajo experimental se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y protección de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y de disposición de residuos biológicos (NOM-087-ECOL-1995). Se estudiaron cuatro grupos de animales. (1) Grupo control (CT); a las ratas de este grupo se les administró la solución de DMSO/solución salina isotónica por vía intraperitoneal (i.p) como vehículo. (2) Grupo NDGA; a las ratas de este grupo se inyectaron por vía i.p tres dosis de 20 mg/kg (Yam-Canul et al., 2008), 48, 24 y 2 h antes de la cirugía simulada. (3) Grupo I/R; a las ratas de este grupo se les administró por vía i.p la solución de DMSO 48, 24 y 2 h antes de la isquemia. (4) Grupo I/R+NDGA; a las ratas de este grupo se les administró por vía i.p. tres dosis de 20 mg/kg 48, 24 y 2 h antes de la isquemia. A las ratas de los grupos I/R e IR+NDGA se les practicó la nefrectomía del riñón izquierdo y al riñón derecho se bloqueó la circulación por 30 min al ocluir por medio de pinzas la arteria renal, se siguió un período de reperfusión de 24 h, seguida del

sacrificio de las ratas para la obtención del riñón para realizar diversas determinaciones.

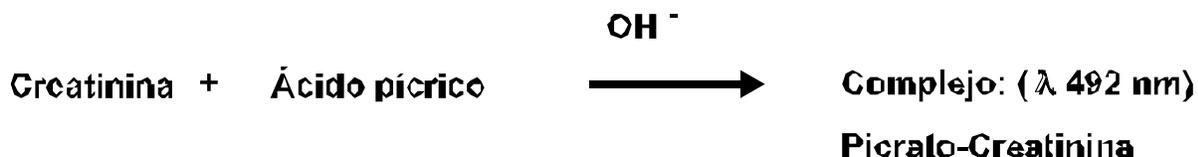
5.2.1.2 Evaluación de la función renal

Nitrógeno de urea en sangre (BUN). La determinación de la concentración de BUN se realizó mediante un ensayo colorimétrico en un autoanalizador (Esquema 9). Se mezclaron 10 μL de la muestra con 400 μL de amortiguador de boratos 87 mM, los tubos se incubaron a 37°C por 15 min y transcurrido el tiempo se leyeron las absorbancias a 510 nm (Jung et al., 1975).



Esquema 9. Reacción entre la urea y el ortoftaldehído.

Creatinina en plasma. La cantidad de creatinina presente en el plasma se determinó con un autoanalizador, utilizando un método colorimétrico basado en la reacción de Jaffé (Esquema 10), en el cual al reaccionar la creatinina con el ácido pícrico se forma un complejo anaranjado capaz de absorber a 492 nm. La cantidad de creatinina se expresó en mg/dL.



Esquema 10. Reacción de Jaffé.

5.2.1.3 Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos

Cortes histológicos. Al riñón se le hizo un corte transversal para fijarlo en amortiguador de fosfatos (PBS) a pH neutro con una solución de formalina al 10% y hasta que se hicieron las tinciones. Se deshidratan con 3 lavados de etanol absoluto por 1 h c/u. Se lavaron tres veces con xilol y luego con parafina fundida a 60°C. Las muestras se colocan por separado en moldes para su inclusión en

parafina. Después de que la parafina se enfría, el tejido se separa del molde y se hicieron cortes de 3-4 μm con un microtomo. Finalmente, se colocaron en portaobjetos silanizados y se incubó por 24 h a 60°C. Estos cortes se usaron para la cuantificación del daño y los estudios inmunohistoquímicos.

Tinción de hematoxilina y eosina (H&E) y cuantificación del daño.

Esta tinción permite observar las estructuras del tejido, en donde la hematoxilina tiñe de color morado a los núcleos celulares (estructuras ácidas) y la eosina tiñe de color rosa al citoplasma y a las membranas (estructuras básicas). Se lavan tres veces con xilol por 5 min; se rehidratan con tres lavados de 5 min con etanol a concentraciones decrecientes hasta llegar a agua. Se tiñe con hematoxilina durante 5 min, se lava con una solución de HCl al 1% en etanol al 70%. Se limpia el tejido con LiCO_3 al 0.1% para teñirlos con eosina por 15 seg. Se lava con etanol absoluto por tres veces. Finalmente, los cortes teñidos se deshidratan en solución de etanol y xilol para su observación. Los cortes teñidos se analizan con un microscopio de luz Leica con un lente de resolución 2.5X y la cuantificación del daño histológico se determina utilizando un analizador de imágenes Leica Qwin color (Cambridge, Inglaterra) que permite cuantificar el área dañada por célula y el área celular total en μm^2 . El daño celular se identificó por la presencia de signos de necrosis como inflamación, formación de vacuolas y fragmentos celulares.

Estudios inmunohistoquímicos. Esta técnica permite localizar a las proteínas presentes en los tejidos o células, basados en la reacción antígeno-anticuerpo. El antígeno es la proteína que se pretende detectar en el tejido o en las células y el anticuerpo específico para ese antígeno que se añade a la muestra está conjugado con moléculas fluorescentes como peroxidasa de rábano que hacen posible su detección. Las inmunotinciones: anti-Nrf2 (Santa cruz, C-20), anti 3-NT (Millipore, Cat.16-163), anti 4-HNE (Upstate, Cat # AB5605), anti MDA (Chemicon, Cat. AB5524), anti HO-1 (Assay designs, Cat.SPA895) y anti MPO (Santa Cruz, sc-16128) se hicieron de acuerdo a los manuales de cada compañía. Brevemente, los cortes histológicos se desparafinaron, se hidrataron y se incubaron en una solución de H_2O_2 al 4.5% en metanol durante 1.5 h para

inhibir la peroxidasa endógena, posteriormente se bloqueo el tejido con albúmina de suero bovino al 3 % por 30 min. Los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario en albúmina sérica bovina al 1% durante toda la noche. Los tejidos se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Se reveló con 3,3'-diaminobencidina y se contrastó con hematoxilina. Los cortes teñidos se deshidrataron en solución etanol y xilol; se montaron para su observación con una resina soluble en xilol y un cubreobjeto. La reacción positiva se hizo evidente por una tinción café en las muestras.

5.2.1.4 Preparación de los homogenados renales y de las células LLC-PK1.

Los riñones se homogenizaron en un politrón (modelo PT 2000, Brinkmann, Westbury, NY, USA) durante 10 s en amortiguador de fosfatos de potasio frío (50 mM, pH 7), adicionado con 0.1% de tritón X-100, 5 µg/mL de leupeptina, 7 µg/mL de pepstatina y 5 µg/mL de aprotinina. El homogenado se centrifugó a 19 000 x g a 4°C durante 30 min, el sobrenadante se utilizó para cuantificar la cantidad de proteínas totales por el método de Lowry y la actividad de las enzimas (GPx, CAT y GST). Para medir los marcadores de estrés oxidante (lipoperoxidación) se adicionó BHT (0.5 M) como antioxidante al amortiguador de fosfatos de potasio (50 mM, pH 7). Las células LLC-PK1 se expusieron a NDGA por 3, 6, 12 y 24 h, posteriormente se midió la actividad de las enzimas antioxidantes.

5.2.1.5 Actividad de enzimas antioxidantes.

Actividad de CAT. Para esta determinación se empleó el método de Aebi (1984), el cual se basa en el cambio en la densidad óptica a 240 nm, debido a la desaparición de H₂O₂ por su degradación por CAT (Esquema 11). De acuerdo a Aebi, se usa la constante de reacción de primer orden (*k*) como unidad de actividad de CAT. Los resultados se expresan en k/mg de proteína.



Esquema 11. Reacción de la catalasa (CAT).

Actividad de GPx . La actividad de esta enzima se determinó indirectamente por el método de Lawrence y Burk (1976) por medio de un par de reacciones acopladas. La enzima del homogenado utiliza GSH para reducir el H_2O_2 a agua. El GSSG producido en la reacción anterior es reducido por la glutatión reductasa utilizando NADPH como cofactor. Debido a que el NADPH absorbe a 340 nm, la reacción se basa en la disminución de la intensidad óptica por la desaparición del NADPH. Los resultados se expresan en U/mg de proteína, donde 1 U = 1 mmol de NADPH consumido por min.

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

Actividad de GR. La GR es una flavoproteína dependiente de NADPH que cataliza la reducción de GSSH a GSH, el cual será utilizado por la GPx para la reducción del H_2O_2 .

Actividad de SOD. Cataliza la dismutación del O_2 a H_2O_2 . Se han encontrado tres isoformas de esta enzima: (a) la SOD citosólica dependiente de cobre-zinc (Cu, Zn-SOD), (b) la SOD mitocondrial dependiente de manganeso (Mn-SOD) y, (c) la SOD extracelular dependiente de cobre-zinc (Cu, Zn-SOD) localizada en la matriz extracelular de los tejidos.

5.2.1.6 Estudios en mitocondrias aisladas.

Aislamiento de mitocondrias renales. Las mitocondrias del riñón se obtuvieron a partir de centrifugaciones diferenciales. Se extrae el riñón derecho de las ratas y se coloca en una solución de sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.3 (solución 1) a 4°C. Se elimina el tejido conjuntivo y el tejido graso y se coloca de nueva forma en la solución 1. El riñón se corta en fracciones y se homogeniza con la ayuda de un homogenizador tipo Potter. Se centrifuga a 750 g por 10 min a 4°C para sedimentar el tejido conjuntivo y los restos celulares. El sobrenadante se vuelve a someter a otra centrifugación de 12,000 g por 10 min a 4°C, con el fin de sedimentar a las mitocondrias. El “botón mitocondrial” se

resuspende en 10 mL de solución de aislamiento con 0.1% de albúmina sérica bovina y se incuba por 15 min. Se centrifuga otra vez a 12,000 g por 10 min a 4°C, y el “botón mitocondrial” se resuspende en 1 mL de solución de aislamiento sin albúmina sérica bovina. Finalmente, se cuantificó la concentración de proteínas [Chavez et al., 1985; Martínez-Abundis et al., 2010].

Consumo de oxígeno mitocondrial. En las mitocondrias normales existe un acoplamiento de dos procesos, a saber, la síntesis de ATP por la ATP-sintasa y la reducción del oxígeno a agua. Cuando la mitocondria esta dañada, el acoplamiento se pierde, dando como resultado el consumo de oxígeno sin la síntesis de ATP, produciendo el fenómeno de respiración desacoplada [Nicholls, 1987]. El control respiratorio (CR) nos permite valorar la integridad de la mitocondria, siendo éste un valor obtenido al dividir la velocidad de respiración dependiente de la síntesis de ATP (Estado 3, en presencia de ADP y sustrato), entre la velocidad máxima independiente de la síntesis de ATP (estado 4), es decir: $CR = \text{estado 3} / \text{estado 4}$.

El consumo de oxígeno mitocondrial se midió utilizando un electrodo para oxígeno de tipo Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Spring, OH, USA), el cual permite determinar de forma directa la velocidad de transferencia de electrones al oxígeno. El ensayo se realiza en la cámara de reacción con agitación magnética a temperatura ambiente (TA) en 1.5 mL de solución A (KCl 125 mM, HEPES 10 mM y Pi 3 mM, pH 7.3). Todos los ensayos se realizaron con 1 mg de proteína mitocondrial; el estado 4 se determinó en presencia de succinato de sodio 10 mM, 1 µg/mL de rotenona o con glutamato de sodio 10 mM y malato de sodio 10 mM. El estado 3 se estimuló al agregar de ADP 200 µM.

Actividad del complejo mitocondrial I. La actividad de este complejo se evalúa espectrofotométricamente a 25°C, midiendo la desaparición del NADH a 340 nm. Los ensayos se llevan a cabo a 25°C en 1.5 mL de medio de reacción (KCl 120 mM, MOPS 20 mM y EGTA 0.5 mM, pH 7.2) suplementado con 0.1 µg de antimicina A, KCN 1 mM, NADH 100 µM, Tween 20 0.01% y 0.5 mg de proteína mitocondrial congelada y descongelada 3 veces. Se incuba durante 10 min, se corre un trazo basal de 1 min y se inicia la reacción agregando decilubiquinona 60 µM por 3 min o hasta que se forme

una pendiente evidente. Para determinar la especificidad del ensayo, se incubó la misma muestra durante 10 min con rotenona 4 μ M. La actividad de la enzima se determina como la diferencia de NADH oxidado en la ausencia y presencia del inhibidor del complejo I [Estornell et al., 1993].

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

5.2.2 Efecto del NDGA sobre el daño renal inducido por gentamicina

5.2.2.1. Diseño experimental.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de entre 250-300 g. Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h en condiciones de temperatura controlada, teniendo acceso *ad libitum* a agua y alimento. Para el modelo de daño renal inducido por gentamicina se utilizaron 4 grupos. (1) Grupo control (CT); a las ratas de este grupo se le administró por vía orogástrica aceite de maíz (vehículo del NDGA). (2) Grupo NDGA; a las ratas de este grupo se le administraron dos dosis de 10 mg/kg de NDGA con una diferencia de 12 horas por vía orogástrica. (3) Grupo gentamicina; las ratas de este grupo se les administraron dos dosis de gentamicina (80 mg/kg) con una diferencia de 12 horas por 4 días de manera subcutánea. (4) Grupo de gentamicina+NDGA; a las ratas de este grupo se les administró NDGA (10 mg/kg) media hora antes de cada inyección de gentamicina (80 mg/kg) la cual se realizó de acuerdo al esquema del grupo 3. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas para la recolección de orina de 24 h y se sacrificaron al final de los estudios para obtener sangre y riñones para los diversos estudios.

5.2.2.2. Determinación de la función renal.

Creatinina y BUN. La medición de los marcadores de la función renal creatinina y nitrógeno de urea se realizaron de la manera descrita en la sección 5.2.1.2

Determinación de proteinuria. La orina recolectada durante 24 h se centrifugó a 3,000 x g por 10 min a TA. El sobrenadante sirvió para la determinación de proteínas. La proteinuria se determinó midiendo la turbidez generada por la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético (TCA) a 420 nm. Se incubó 1 mL de orina diluida con agua destilada 1:5 y 250 µL de TCA al 12.5% por 10 min a TA. Para cada muestra se preparó un blanco sin TCA. El espectrofotómetro se calibró con agua y TCA al 12.5%. La concentración se obtiene de las interpolaciones de las densidades ópticas en una curva patrón de albúmina sérica bovina al 0.1% con una concentración de entre 0.04 a 0.8 mg/mL. Los resultados se multiplicaron por el volumen urinario de 24 horas y se expresaron en mg /24 h.

5.2.2.3 Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos.

Cuantificación del daño histológico. Se realizó de la manera descrita en la sección 5.2.1.3.

Estudios de inmunohistoquímica. Se realizaron inmunotinciones contra mieloperoxidasa (MPO) y heme-oxigenasa 1 de la manera descrita en la sección 5.2.1.3.

5.3 Estudios *in vitro*

5.3.1 Cultivo de células

Las células LLC-PK1 (epitelio renal porcino) y los fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) se cultivaron en medio Eagle Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con SFB al 10%, bicarbonato de sodio 0.33%, más los antibióticos (penicilina/estreptomicina) al 1%, se mantuvieron en una incubadora NUAIRE modelo NU457 en una atmósfera de O₂ al 95% y CO₂ al 5%. El ambiente de trabajo fue estéril en una campana de seguridad biológica clase II Tipo A2 modelo NU425-400.

5.3.2 Tripsinización

Cuando las células alcanzan la confluencia del 90-100%, se elimina el medio y se lava con PBS estéril. Se agrega 1 ml de tripsina recombinante (Tryple Express) a las cajas de 100 mm y se incuba por aproximadamente 10 a 15 min a 37°C. Se agregan de 2 a 3 ml de medio a la placa y se centrifuga a 130 x g durante 3 min en una centrifuga clínica Heraeus (Megafuge). Se elimina el sobrenadante y el “botón celular” se resuspende con 1 ml de medio DMEM suplementado.

5.3.2.1 Siembra de células (crecimiento)

Después de contar el número de células con la ayuda de la cámara de Neubauer, a las células resuspendidas se les agregaron 9 ml de medio DMEM suplementado, para que finalmente se pusieran 5 ml a cada caja de petri de 100 mm, dejándolo en la incubadora hasta que alcanzara el 90% de confluencia. En condiciones de 100% de confluencia el número promedio de células en las cajas de 100 ml fue de 2 500 000.

5.3.2.2 Siembra de células (experimentos)

Las células se sembraron en cajas de 60 mm o 100 mm ó en placas de 24, 48 y 96 pozos hasta que alcanzaran la confluencia, para ser sometidas a los diferentes tratamientos.

El número de células sembradas en las cajas petri o placas de pozos fueron los siguientes:

Caja petri de 60 mm: 700 000 células.

Caja petri de 100 mm: 1 700 000 células.

Caja de 96 pozos: 25 000 células por pozo.

Caja de 48 pozos: 75 000 células por pozo.

Caja de 24 pozos: 150 000 células por pozo.

Cuando las células alcanzaron la confluencia, se eliminó el medio y se reemplazó por medio DMEM con antibiótico al 1% por 24 h antes de iniciar el tratamiento. Después de recibir el tratamiento correspondiente, las células se lavaron con PBS y se rasparon y se centrifugaron por 10 min a 13 000 g, el botón celular sirvió para hacer diferentes experimentos.

5.3.3 Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)2,5-difeniltetrazolio (MTT). En el fundamento de esta técnica se basa en que la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial reduce este compuesto formando un precipitado de color azul, la sal de formazan. Esta sal se resuspendió en isopropanol ácido y se obtuvo la densidad óptica a 570 nm en un espectrofotómetro Synergy HT (BioTek Instruments, Inc Winooski, VT, USA). Los resultados se presentan como porcentaje de reducción de MTT.

5.3.4 Visualización de ROS y $O_2^{\cdot-}$

La medición de las ROS se realizó utilizando 5-(6)-chloro-methyl-2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA). Las células se cultivaron en placas de 24 pozos y se incubaron con CM-H₂DCFDA 10 μ M por 30 min a 37°C. El cultivo se lavó 3 veces con PBS 1X, la fluorescencia se visualizó con un microscopio invertido de fluorescencia Nikon modelo TS-100F con un filtro de excitación 490 nm y un filtro de emisión de 520 nm. Para la cuantificación, el nivel de fluorescencia se midió con un espectrofotómetro HT BioTek. La presencia de $O_2^{\cdot-}$ fue evaluada con la sonda dihidroetidio.

5.3.5 Potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial se evaluó utilizando el colorante catiónico 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-ioduro carbocianine, conocido como JC1 (molecular probes, Eugene, Oregon, USA). Las células se cultivaron en placas de 24 pozos y se incubaron 30 min a 37°C en presencia de JC1 (1 μ g/mL) y protegidas de la luz. El colorante catiónico se introduce en las mitocondrias en forma de monómero y a 530 nm emite fluorescencia de color roja, cuando se despolariza la membrana el colorante sale de la mitocondria y se agrega en el citoplasma de las células y cuando se excita a 590 nm emite fluorescencia de color verde. La fluorescencia se midió con un equipo Sinergy HT BioTek y los valores de fluorescencia se expresaron como una proporción entre la fluorescencia de complejos agregados sobre los monómeros,

F590/F530. La fluorescencia se visualizó con un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon modelo TS-100F).

5.3.6 Estudio de las vías de señalización.

Se estudiaron las vías de señalización tanto en las células LLC-PK1 como en los MEFs con la ayuda de anticuerpos contra las vías p38, Erk 1/2, JNK y PI3K. La activación de las vías se evaluó con anticuerpos que detectan las formas fosforiladas de las vías de señalización. Los anticuerpos fueron de Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA).

Western blot. Las células se lisaron en amortiguador de fosfato de potasio (50 mM pH 7.4) que tiene un *cocktail* de inhibidores de proteasas y un cocktail de inhibidores de fosfatasas (Calbiochem, EMD Bioscience, San Diego, CA) para la obtención de las proteínas. Las proteínas se mezclaron con amortiguador Laemmli y se hirvieron por 5 min. Se cargaron 25 µg de proteína a geles desnaturalizantes SDS-PAGE 12.5 %. Posteriormente, se transfirieron en membranas de nitrocelulosa Hybond-C Extra (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ) con la ayuda de una cámara de transferencia (Bio-Rad, Hercules, CA). Las membranas se bloquearon por 1 h en leche en polvo descremada al 5% en PBS. Los anticuerpos primarios se diluyeron en un amortiguador PBS, Tween 20 al 0.1% y BSA al 5% en las concentraciones señaladas por las hojas de información de cada anticuerpo por toda la noche a 4°C. Se lavaron las membranas por tres veces con amortiguador PBS, Tween 20 al 0.1 % y se incubaron con por 2 h con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, Pierce Biotechnology, Inc Rockford, IL). Para visualizar los anticuerpos unidos a las membranas se utilizó un sistema de detección de sustrato quimioluminiscente (ImmobilonTM Western, Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) y se revelaron usando placas Kodak Biomax film (Perkin Elmer, Wellesley, MA)

Diseño experimental

5.3.7 Efecto de los inhibidores de las vías de señalización sobre la expresión de HO-1 y sobre la citoprotección inducida por NDGA ante el daño por H₂O₂

Se usaron los siguientes inhibidores de las proteínas cinasas LY204002 40 μM (PI3K/AKT), PD98059 50 μM (Erk 1/2), SB203580 5 μM (p38 MAPK Kinase), SP600125 10 μM (JNK). Brevemente, los inhibidores de las vías de señalización se pre-incubaron por 30 min, antes de la adición de NDGA 15 μM por los tiempos indicados. Posteriormente, se agregó en NDGA en presencia de los inhibidores de las vías de señalización por los tiempos requeridos. Finalmente, se obtuvieron los “pellets celulares” a los cuales se resuspendió en PBS para su análisis posterior por WB para HO-1. En los siguientes experimentos las células LLC-PK1 se expusieron a H_2O_2 30% y a los diferentes inhibidores de las cinasas para evaluar que vía estaba involucrada en la citoprotección por NDGA. Para estos estudios, se utilizaron 4 grupos experimentales: (1) células control (CT); (2) células expuestas a NDGA 15 μM (NDGA); (3) células expuestas a H_2O_2 1 mM por 2 h (H_2O_2); (4) células expuestas a NDGA 15 μM más H_2O_2 1 mM por 2 h (NDGA+ H_2O_2). La viabilidad se evaluó 24 h después de la adición del H_2O_2 como se indica en la sección 5.3.3.

5.3.8 Efecto del NDGA sobre la actividad de otras enzimas antioxidantes en las células LLC-PK1.

Las células LLC-PK1 se incubaron a diferentes tiempos con NDGA 15 μM al final de los cuales se midió la actividad de las siguientes enzimas antioxidantes: GPx, GR, GST, CAT y SOD. Este experimento se diseñó con el propósito de investigar si el NDGA es capaz de inducir otras enzimas antioxidantes, además de la HO-1.

5.3.9 Papel del Nrf2 en la inducción de HO-1 por NDGA en MEFs.

Se realizaron estudios en MEFs Nrf2 (-/-) y Nrf2 (+/+) con el propósito de evaluar el papel de Nrf2 en la inducción de HO-1 por NDGA. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de NDGA (1, 3 y 10 μM) por 6h. Al final de este tiempo se midió la expresión de HO-1 por Western blot.

5.3.10 Papel de Keap1 en la inducción de HO-1 y Nrf2 por NDGA en MEFs.

Para evaluar el papel de Keap1 en la inducción de HO-1 y Nrf2 por NDGA se realizaron experimentos en MEFs Keap (+/+) y Keap (-/-). Estas células se incubaron con 15 μ M de NDGA por diferentes tiempos (15 and 30 min y 1, 3 y 6 h) al final de los cuáles se midió por Western blot la expresión de Nrf2 y HO-1.

5.3.11 Papel de la vía GSK3 β en la citoprotección inducida por NDGA.

Para evaluar el papel de la vía GSK3 β en la inducción de HO-1 y Nrf2 por NDGA se realizaron experimentos en MEFs Keap (+/+) y Keap (-/-) usando el inhibidor de GSK3 β SB216763 10 μ M. Las células se incubaron con 15 μ M de NDGA por 6 h. Al final se midió por Western blot la expresión de HO-1 y de Nrf2.

5.3.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar de la media (Prom \pm EEM). Los datos se analizaron utilizando la prueba ANOVA seguida de la prueba de comparaciones múltiples Bonferroni o Dunnet, usando el programa Prism 2.01 (GraphPad, San Diego, CA). Las diferencias se consideraron significativas con valores de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Estudios *in vivo*

6.1.1 El NDGA protege del daño renal inducido por la isquemia-reperfusión (I/R) y por gentamicina

La función renal se evaluó en los cuatro grupos de ratas tanto en el modelo de I/R como en el de gentamicina. En el grupo de ratas que se les hizo la I/R, el daño renal fue evidente debido al incremento de 4.12 y 4.58 veces los niveles de BUN (Fig 1A) y creatinina (Fig 1B) en plasma cuando se compara con el grupo CT. Este aumento se previno de forma significativa por el tratamiento con NDGA; (ver el grupo I/R+NDGA, Fig 1), donde hubo una disminución de 2.15 y 2.8 veces los niveles de BUN y creatinina en plasma; sugiriendo que la administración del NDGA previene del daño renal ocasionado por la isquemia-reperfusión. En el modelo de IRA inducida por gentamicina, el NDGA protegió de la disfunción renal en cuanto a los marcadores de BUN (Fig 1C), creatinina en suero (Fig 1D) y de forma muy notable, previno la proteinuria (Fig 1E).

6.1.2 Estudios histopatológicos

Para evaluar cual podría ser la causa del inadecuado funcionamiento renal en las ratas que fueron sometidas a daño renal agudo (I/R); se evaluó histológicamente el grado de necrosis y después se hizo morfometría automatizada para cuantificar el área de la necrosis tubular que se presenta tanto en la I/R como en el modelo por gentamicina (GEN). Como podemos ver en la Fig 2, existe un mayor número de túbulos renales corticales necróticos el grupo con I/R (Fig 2C) como en el grupo tratado con GEN (Fig 2G), y se evitó por el tratamiento con NDGA tanto en el modelo de I/R (FIG 2D) como en el modelo de GEN (FIG 2H). En la Fig 2 (I y J) se representa el análisis morfométrico que permite evaluar el área de tejido necrótico. Como podemos ver claramente en la Fig 2I, se observa una disminución de aproximadamente 9 veces el área de tejido dañado en el grupo tratado con I/R+NDGA y una disminución de aproximadamente dos veces el área de tejido dañado en el grupo GEN+NDGA (FIG 2J). Esto sugiere que el NDGA previene la formación de tejido necrótico ocasionado tanto por la I/R como por GEN.

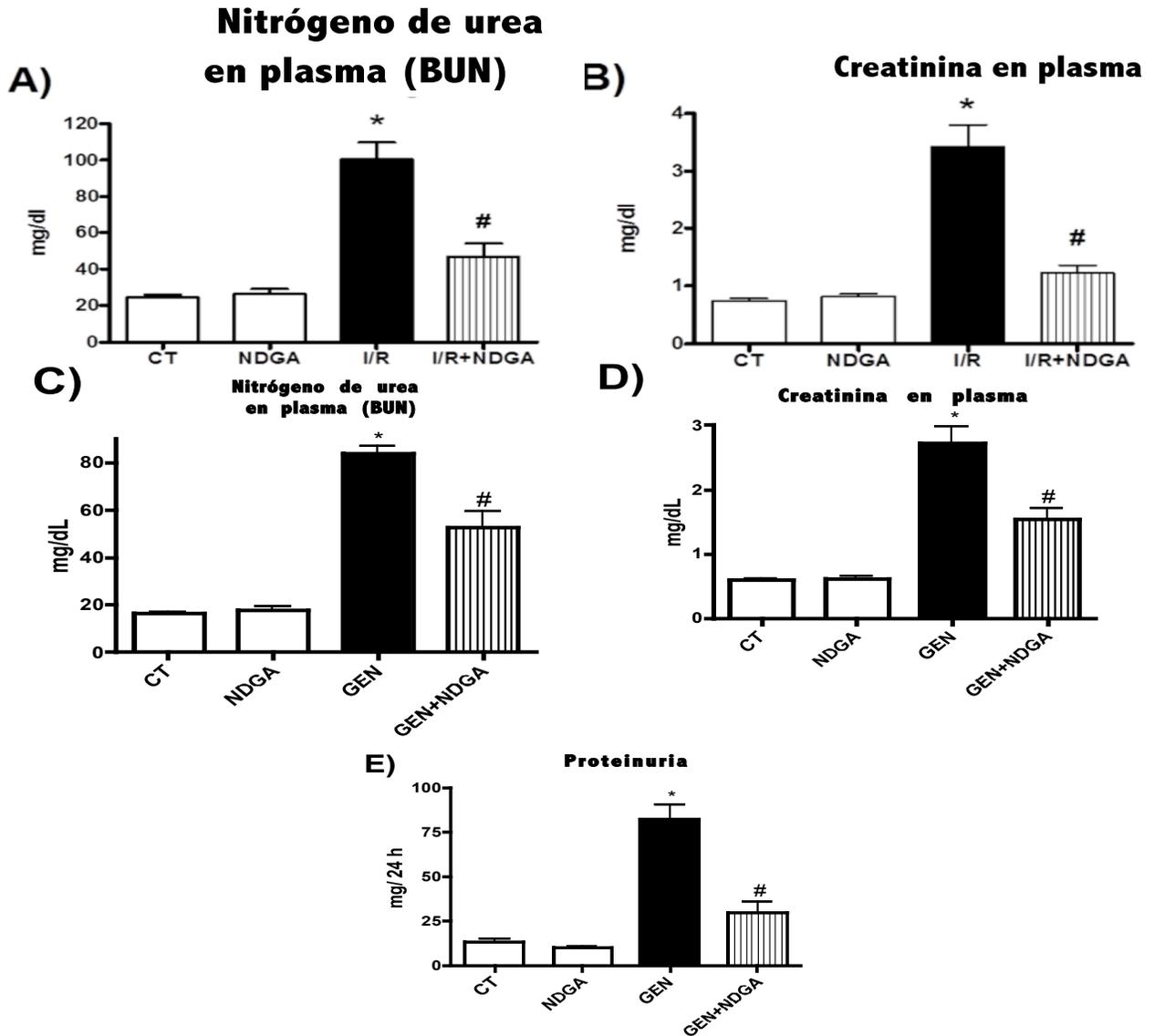


Figura 1. El NDGA disminuye los marcadores de insuficiencia renal aguda en el modelo de I/R (A y B) y por gentamicina (C,D y E). (A) Nitrógeno de urea en sangre (BUN), (B) Creatinina en plasma. Prom±EEM. n= 6-14. *p<0.001 vs CT; #p< 0.001 vs I/R. NOTA: a partir de esta figura y para las demás de esta tesis (a menos que se indique lo contrario), los cuatro grupos estudiados son: CT: grupo CT; NDGA: grupo NDGA; I/R: grupo con isquemia-reperfusión; y, I/R+NDGA: grupo pre-tratado con NDGA más la isquemia-reperfusión. (C) Nitrógeno de urea en sangre en el modelo de gentamicina, *p<0.001 vs CT, #p<0.01 vs GEN. (D) Creatinina en plasma en el modelo de gentamicina, *p<0.001 vs CT, #p<0.001 vs GEN. (E) Proteinuria en el modelo de gentamicina, *p<0.0001, #p<0.0001. GEN=Gentamicina.

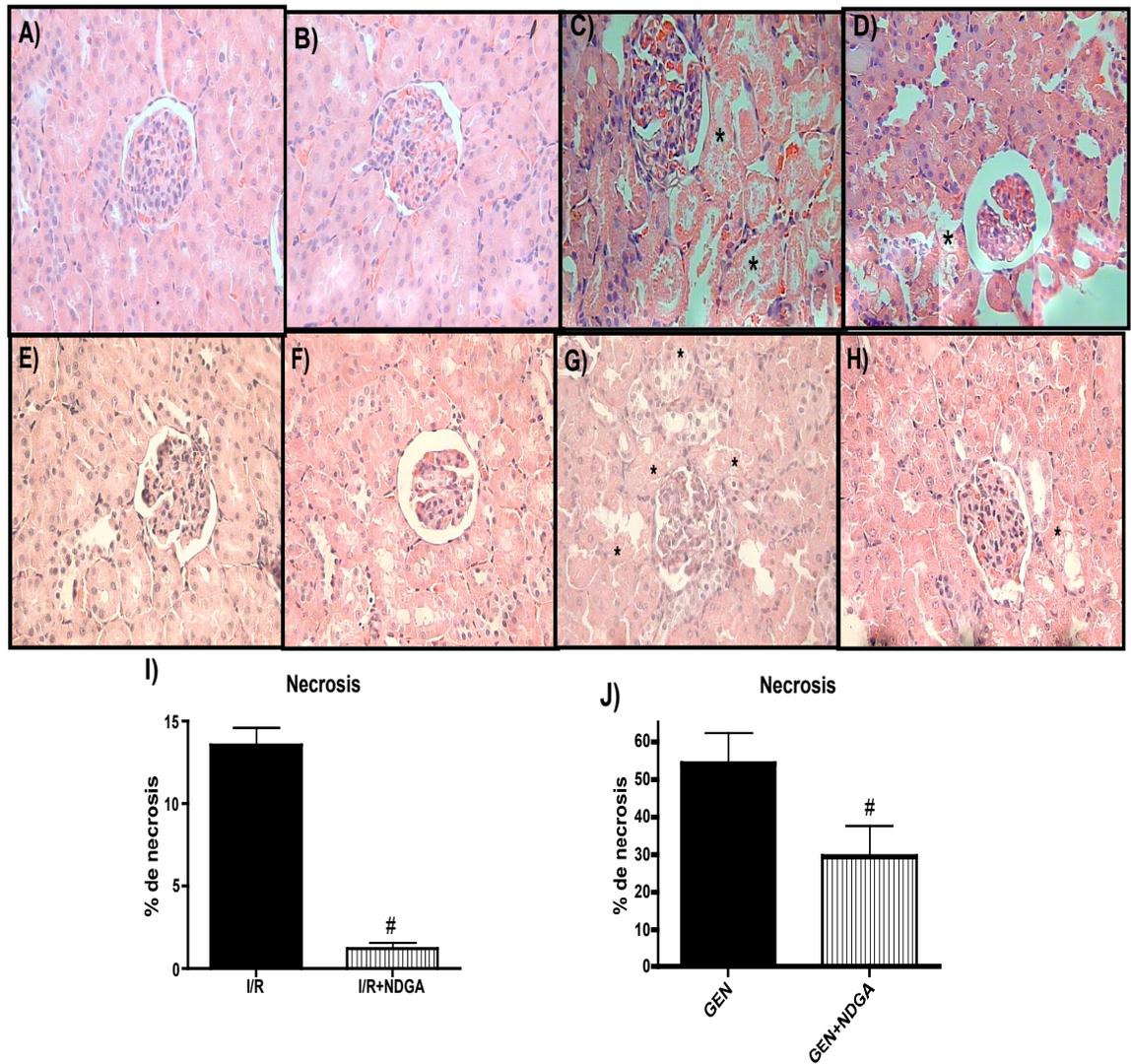


Figura 2. Histopatología y determinación de tejido necrótico renal por morfometría automatizada. El Tejido renal de ratas en el modelo de I/R (A, B, C, D e I) del grupo (A) CT del grupo (B) NDGA, del grupo con (C) I/R, del grupo (D) I/R+NDGA. El tejido renal de ratas en el modelo de gentamicina, **GEN** (E, F, G, H y J) del grupo (E) CT, del grupo (F) NDGA, del grupo (G) GEN, del grupo (H) GEN+NDGA. Análisis por morfometría automatizada en el modelo de (I) I/R y en el modelo (J) GEN. Para el modelo de I/R, n= 8-9; para el modelo de GEN, n=3-5. #p0.05 vs I/R vs GEN. el * indica la presencia de células necróticas tubulares.

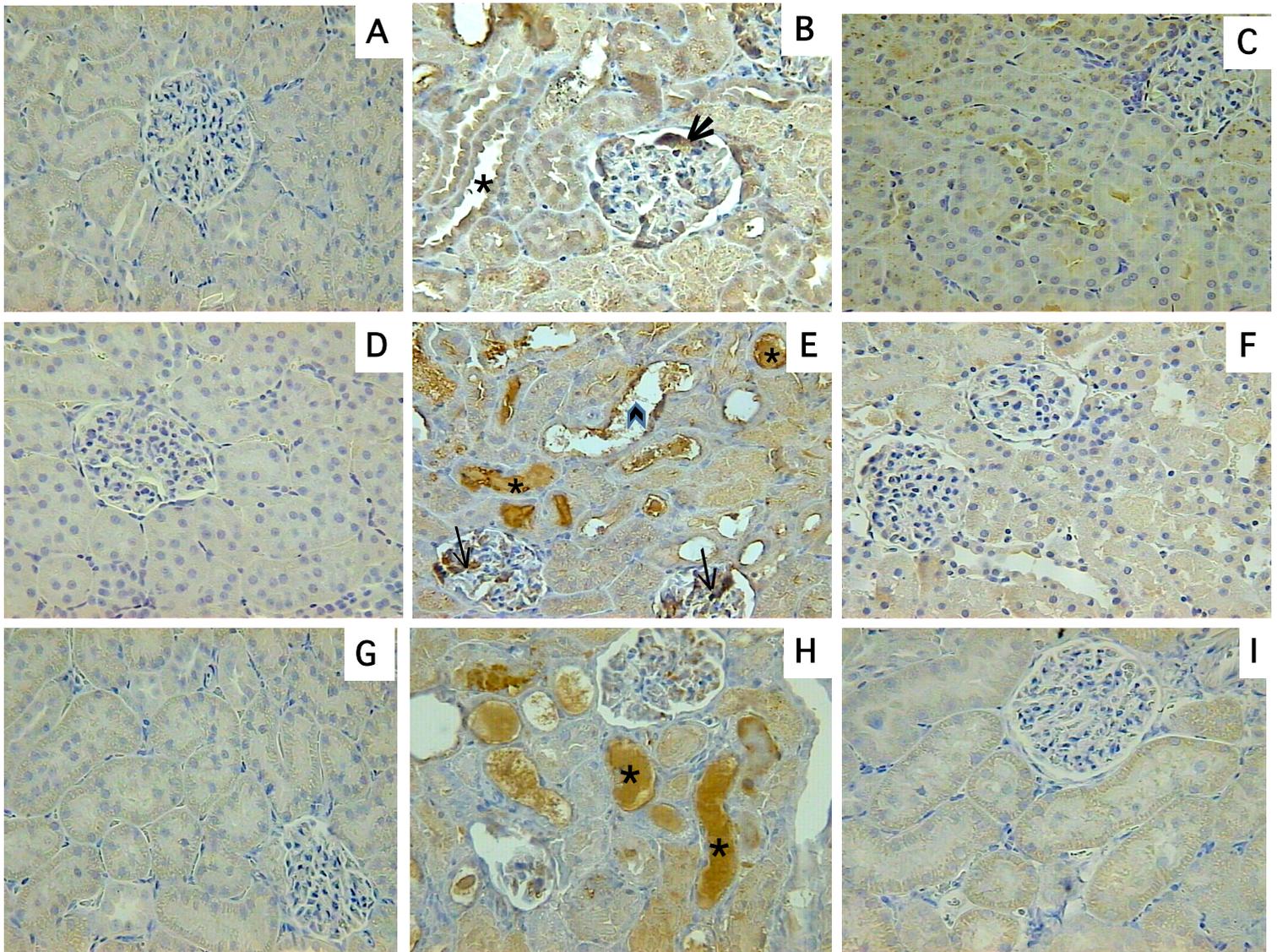


Figura 3. Inmunohistoquímica contra marcadores de estrés oxidativo. (A, B, C) inmunotinción contra el marcador 4-HNE en ratas tratadas con (A) NDGA, (B) I/R e (C) I/R+NDGA, → células mesangiales, * células proximales; (D, E, F) inmunotinción contra el marcador 3-NT en ratas tratadas con (D) NDGA, (E) I/R e (F) I/R+NDGA, → mesangio glomerular, *túbulo corticales, > endo-telio vascular; (G, H, I) inmunotinción contra el marcador MDA en ratas tratadas con (G) NDGA, (H) I/R e (I) I/R+NDGA, * células epiteliales tubulares.

6.1.3 Marcadores de estrés oxidante y nitrante

Por inmunohistoquímica (IHQ) se determinó la presencia de marcadores de estrés oxidante, para cubrir este objetivo, se utilizaron diversos anticuerpos que detectan proteínas con grupos carbonilos oxidados y residuos de tirosina que fueron sujetos a estrés nitrante.

La IHQ para 4-HNE, indica una mayor tinción en las células mesangiales y en el epitelio de las células proximales de las ratas sometidas a I/R (Fig 3B), situación que disminuye cuando las ratas fueron tratadas con el antioxidante en el grupo I/R+NDGA (Fig 3C). Posteriormente se evaluó la presencia de especies nitrantes, la IHQ para 3-NT indicó una fuerte tinción en el mesangio glomerular, túbulos corticales y el endotelio vascular de las ratas con I/R (Fig 3E), disminuyendo la tinción cuando las ratas fueron tratadas con el NDGA, I/R+NDGA (Fig 3F). Finalmente, se evaluó la presencia de proteínas oxidadas por la presencia de grupos carbonilos a través del anticuerpo anti-MDA, como podemos ver en la Fig. 3H se observa una tinción muy marcada en células epiteliales tubulares de las ratas expuestas a la I/R, disminuyendo considerablemente cuando las ratas fueron tratadas con el antioxidante en el grupo I/R+NDGA (Fig 3I). Las Figs. 3A, D y G son las IHQ para los riñones de ratas de los grupos controles contra 4-HNE, 3-NT y MDA, respectivamente; indicando una tinción basal mínima.

6.1.4 Efecto del NDGA sobre el gen de estrés celular MPO en la I/R

Durante la I/R se induce considerablemente la inflamación, lo que trae como consecuencia el aumento de citocinas inflamatorias y otros genes. En el caso de mieloperoxidasa (MPO) es un gen que se induce en procesos inflamatorios como es el causado por la I/R (Fig 4C), sin embargo el pretratamiento con NDGA antes de la I/R disminuye la expresión de este gen (Fig 4D). El NDGA por si solo no tiene efecto sobre la expresión de MPO, Fig 4B. Estos datos nos sugieren que el NDGA esta actuando como un antioxidante indirecto, ya que disminuye la expresión de MPO en un proceso inflamatorio como lo es la I/R.

6.1.5 Participación de Nrf2

La proteína Nrf2, es un factor transcripcional que regula una gran batería de genes citoprotectores. Así que se evaluó por IHQ la migración de este factor del citoplasma al núcleo. Como vemos en la Fig 5, las ratas que se les administró el NDGA (Fig 5B), tuvieron un aumento de aproximadamente el 40% con respecto al grupo CT, y las ratas del grupo I/R+NDGA tuvieron también un aumento de otro 40% con respecto al grupo que solo fue tratado con NDGA. Estos datos sugieren que Nrf2 migra al núcleo cuando es estimulado por el NDGA, induciendo ciertas enzimas citoprotectoras. Es de destacar, que en el grupo I/R+NDGA existió un aumento muy marcado de migración de Nrf2 lo que sugiere que cuando la células se sometie--

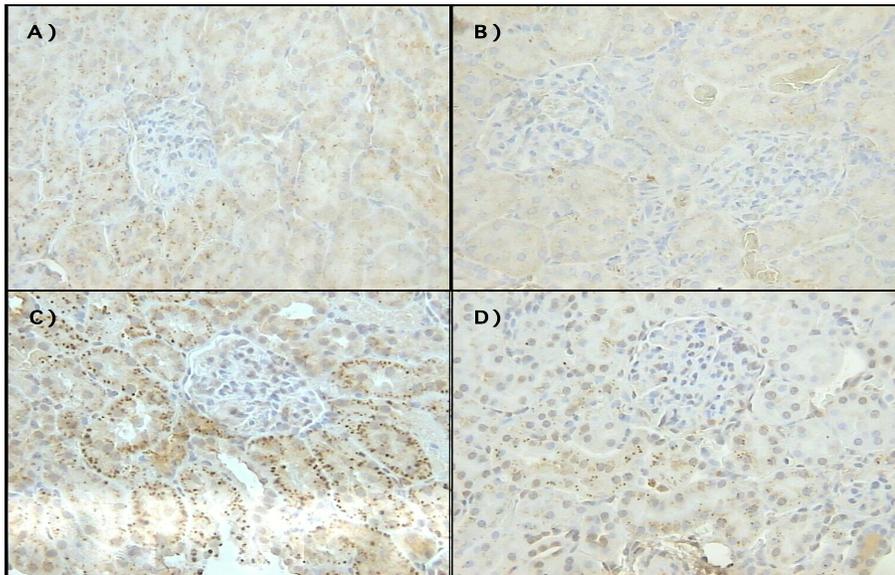


Figura 4. Efecto del NDGA sobre MPO en la I/R. Expresión de MPO de los grupos (A) CT, (B) NDGA, (C) I/R y (D) I/R+NDGA. n=3.

ron a la I/R, se induce una respuesta a través del factor transcripcional Nrf2 incrementando la migración de Nrf2 al núcleo. La Fig 5E nos muestra la cuantificación densitométrica de estos datos. La migración de Nrf2 del citoplasma al núcleo debe de tener un efecto fisiológico y tal vez sea la inducción de ciertas enzimas citoprotectoras actuando como un antioxidante indirecto.

6.1.6 Efecto del tratamiento del NDGA sobre HO-1 en la I/R

Después de haber observado que el NDGA induce la migración del citoplasma hacia el núcleo, nos preguntamos si tenía efecto sobre la expresión de algún gen citoprotector, por lo cual nos dimos a la tarea de evaluar el efecto sobre HO-1. Como podemos ver en la Fig 6B, en el NDGA por sí solo induce poca señal de HO-1, sin embargo cuando las ratas se sometieron a I/R (Fig 6C) más el tratamiento de NDGA (Fig 6D), claramente se presentó una tinción mucho mayor. A partir de estos datos podemos concluir que el NDGA está actuando como un antioxidante indirecto, ya que en procesos inflamatorios como en el caso de I/R induce la expresión de HO-1 y reduce la expresión de la proteína que se induce por estrés celular como es el caso de MPO.

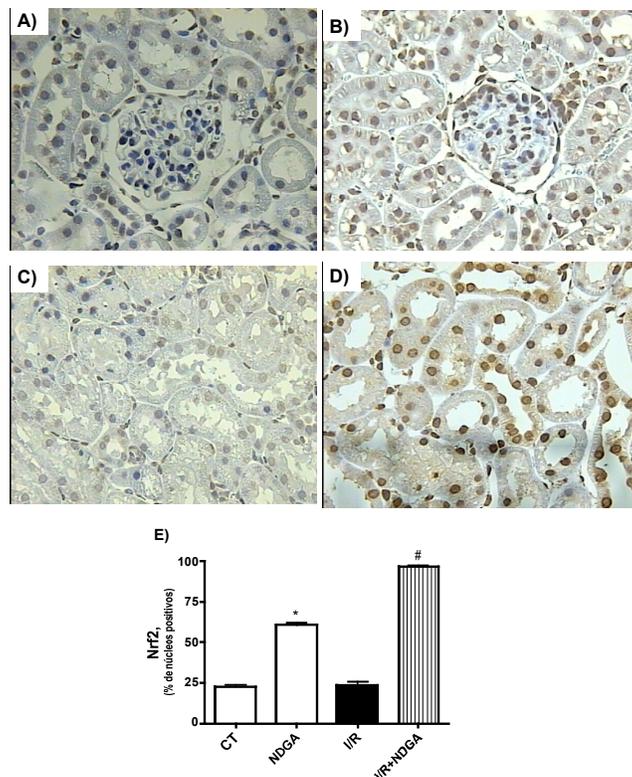


Figura 5. Migración de Nrf2 del citoplasma al núcleo de los grupos (A) CT, (B) NDGA, (C) I/R y (D) I/R+NDGA. Cuantificación densitométrica de la inmunotinción (E). Los valores son promedios±EEM, n=3. * $p < 0.001$ vs CT, # $p < 0.001$ vs NDGA; las imágenes tienen un aumento de 40X.

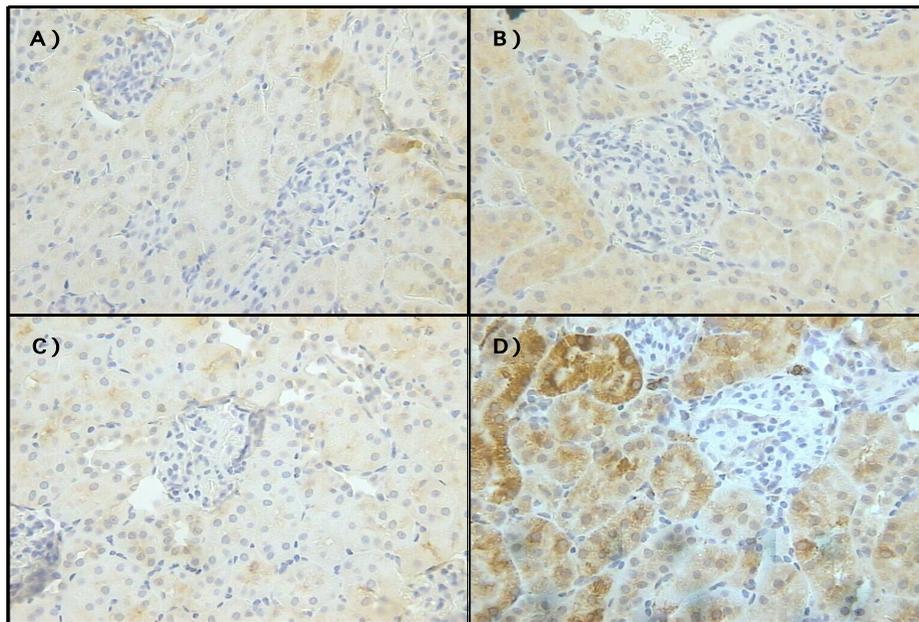


Figura 6. Efecto del NDGA sobre HO-1 en la I/R. Expresión de HO-1 de los grupos (A) CT, (B) NDGA, (C) I/R y (D) I/R+NDGA. Las imágenes tienen un aumento de 40X.

6.1.7 Efecto del tratamiento del NDGA sobre HO-1 y MPO en la nefrotoxicidad inducida por gentamicina

La gentamicina induce nefrotoxicidad en las ratas expuestas a dosis elevadas, por lo que en nuestro modelo se evaluó el efecto del NDGA sobre la nefrotoxicidad inducida por gentamicina. Tal como se esperaba, durante el estrés oxidante se induce la expresión del gen de MPO (Fig 7C), pero de forma muy notoria cuando las ratas se sometieron al NDGA se disminuyó la expresión de esta proteína proinflamatoria (Fig 7D), sugiriendo que la función protectora del NDGA es entre otras cosas debida a la disminución de algunos genes que se inducen durante el estrés oxidante. Posteriormente, se evaluó el efecto del NDGA sobre el gen citoprotector HO-1 en la I/R y como podemos ver en la Fig 7F, el NDGA *per se* induce niveles bajos de HO-1, sin embargo existe un incremento muy marcado en el

grupo I/R+NDGA (Fig 7H) cuando se compara con el grupo de I/R (Fig 7G).

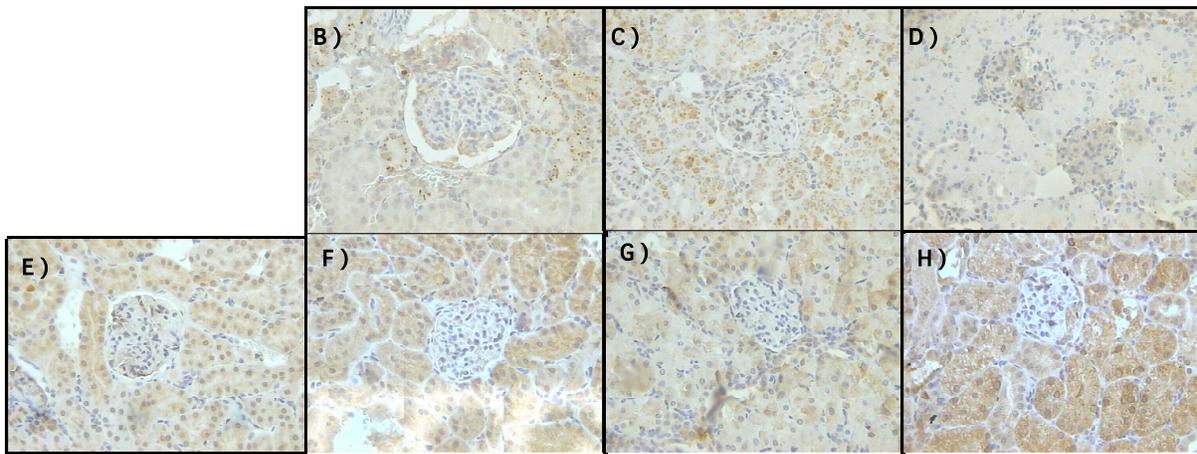


Figura 7. Efecto del NDGA sobre MPO y HO-1 en la nefrotoxicidad inducida por gentamicina (GEN). Expresión de MPO de los grupos (A) CT, (B) NDGA, (C) GEN y (D) GEN+NDGA. Expresión de HO-1 en los grupos (E) CT, (F) NDGA, (G) GEN y (H) GEN+NDGA.

6.1.8 Enzimas antioxidantes

Después de evaluar la presencia de marcadores de estrés oxidante y nitrante, y de observar que NDGA induce la expresión de HO-1 y reduce la expresión de MPO durante el estrés oxidante, emprendimos la tarea de investigar la actividad de las enzimas renales citoprotectoras, entre ellas: la glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S-transferasa (GST) y catalasa (CAT). Como observamos en la Fig 8A la actividad de la GPx disminuyó 40.2% en las ratas sometidas a I/R comparado con el CT, y esta actividad se aumentó a nivel similar al del grupo CT cuando las ratas fueron tratadas con NDGA, en el grupo I/R+NDGA. En Fig 8B se observa que la actividad de la enzima GST disminuyó 35.03% cuando las ratas se sometieron a la I/R, restableciéndose de forma parcial los niveles de la enzima cuando las ratas se trataron con NDGA (grupo I/R+NDGA). Finalmente, se evaluó la actividad de la CAT (Fig 8C). La actividad de la CAT disminuyó en 50.1% en ratas sometidas a I/R y esta actividad se restableció a casi un 90% respecto al CT cuando fueron tratadas con NDGA antes de la I/R (grupo I/R+NDGA). Es de notar,

que la actividad de la CAT se indujo en el grupo al que solo se le administró el NDGA (Fig 8C), sugiriendo una probable participación del antioxidante como un inductor de esta enzima. A partir de estos datos podemos sugerir que el NDGA favorece la actividad de estas enzimas evaluadas, por lo que el efecto renoprotector que tiene el NDGA sobre el daño producido por la I/R podría ser debido en parte a estos aumentos de las actividades enzimáticas.

6.1.9 Efecto del NDGA sobre la respiración mitocondrial

Con el objetivo de evaluar ampliamente el efecto renoprotector del NDGA, iniciamos la tarea de investigar la participación de este compuesto en la función mitocondrial en el modelo de daño renal agudo inducido por I/R, ya que este organelo es el principal productor de EROs en la célula. Por lo que al indagar la función de los complejos mitocondriales inducida por la I/R, teniendo como sustrato al succinato, no encontramos ninguna diferencia significativa en los parámetros evaluados, (Tabla 1). Por lo que como siguiente objetivo fue evaluar la función de los complejos mitocondriales utilizando como sustrato al malato/glutamato; en este caso se encontró que el estado 3 de la respiración (presencia de ADP) disminuye cuando a las ratas se sometieron a la I/R, situación que se revirtió cuando las ratas se les administró el NDGA antes de la I/R (grupo I/R+NDGA), Fig 9, indicando un mejor funcionamiento mitocondrial en presencia del NDGA; el coeficiente respiratorio (CR) se calculó como la relación estado 3/estado 4 y como se observa en la Fig 9, este coeficiente

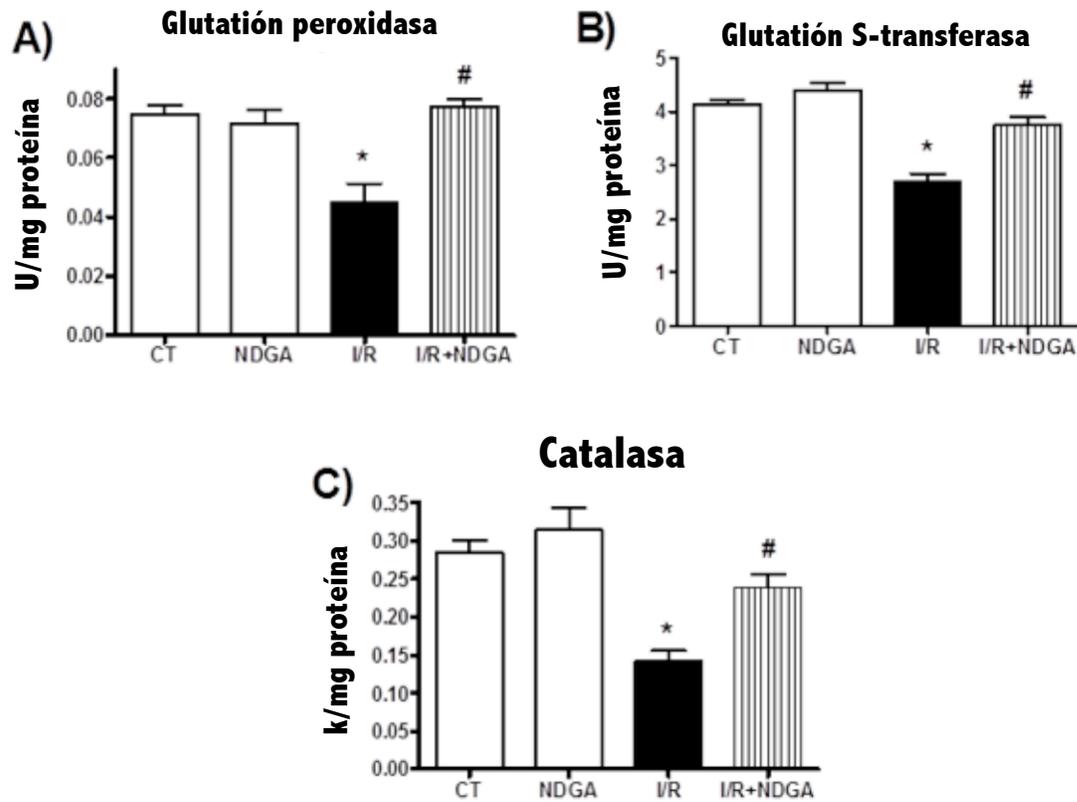


Figura 8. Enzimas antioxidantes. (A) Glutación peroxidasa (GPx); (B) Glutación S-transferasa (GST); (C) Catalasa (CAT). Los valores son promedios±EEM. n=6-14. *p<0.05 vs CT, #p<0.05 vs I/R.

disminuyó en las ratas del grupo I/R restableciéndose este estado cuando las ratas se trataron con el NDGA en el grupo I/R+NDGA. Sin embargo, no hubo cambios significativos cuando se evaluó el estado 4 entre los grupos estudiados. La síntesis de ATP (ADP/O), disminuyó significativamente cuando las ratas se sometieron a la I/R y esta se revirtió cuando las ratas se trataron con NDGA antes de la I/R (grupo I/R+NDGA). Estos datos nos permiten sugerir que el efecto renoprotector del NDGA se debe en parte a que favorece un mejor funcionamiento del complejo I.

Para discernir el papel que estuviera teniendo el complejo I mitocondrial, se evaluó directamente la actividad de éste complejo, al determinar la cantidad de NADH oxidado. Cuando las ratas se sometieron a I/R, hubo una disminución en la cantidad de NADH oxidado (7.86 ± 2.06 nmol/min/mg) con respecto al grupo CT (20.4 ± 0.72 nmol/min/mg) implicando una probable disminución de la función de -

Tabla 1. Evaluación de la función mitocondrial utilizando como sustrato al succinato. CR: índice del control respiratorio; ADP/O: producción de ATP; ngAO/min/mg= ng átomos de oxígeno/min/mg de proteína.

	CT	I/R	I/R+NDGA	NDGA
Estado 3 (ngAO/min/mg)	181.2±17	224 ±26	206 ±36	183 ±25
Estado 4 (ngAO/min/mg)	97±15	101 ±17	100 ±19	88 ±18
CR	2.4±0.46	2.7 ±0.36	2.1±0.22	2.5 ±0.29
ADP/O	1.57±0.21	0.69 ±0.05	1.5±0.19	1.5 ±0.25

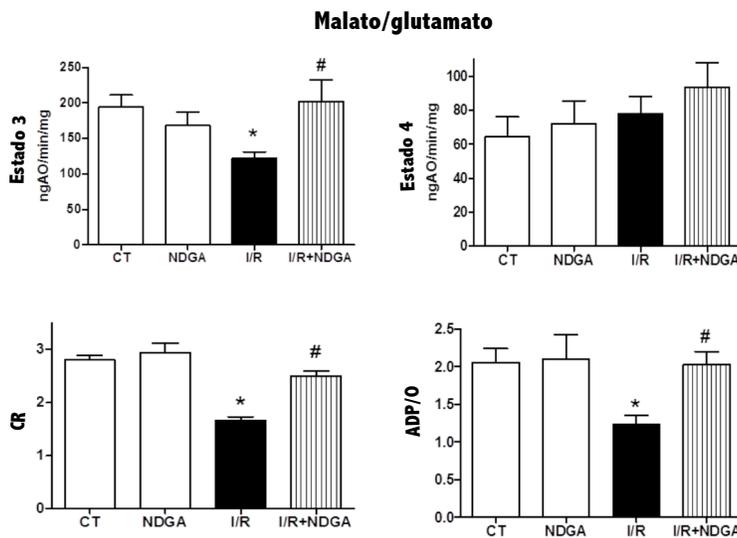


Figura 9. Consumo de oxígeno mitocondrial utilizando malato/glutamato como sustrato. Los valores son promedios±EEM. n=7-15. *p<0.05 vs CT, #p<0.05 vs I/R. CR: índice del control respiratorio; ADP/O: producción de ATP; ngAO/min/mg= ng átomos de oxígeno/min/mg de proteína.

este complejo, pero cuando se administra el NDGA en el grupo I/R+NDGA, el funcionamiento de este complejo se restableció parcialmente (16.3±0.45 nmol/min/mg), Fig 10. Indicando, además de los datos anteriores, que el funcionamiento inadecuado del complejo

I en la cadena de respiración mitocondrial, es el que participa en el estrés oxidante.

6.1.10 Determinación de 4-HNE y MDA en la mitocondria

Por otra parte, al evaluar los niveles de productos finales de lipo peroxidación (MDA y 4-HNE) en las mitocondrias, como podemos ver en la Fig 11A se observa un aumento del MDA en las ratas tratadas -

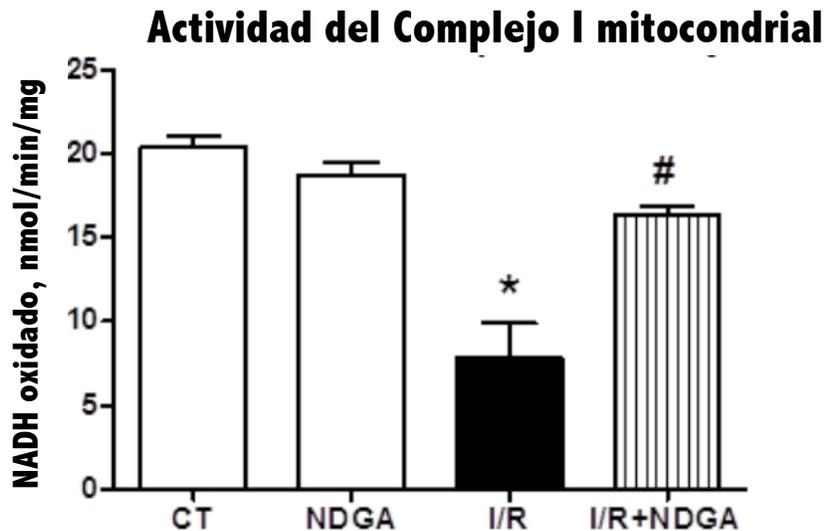


Figura 10. Actividad del complejo respiratorio mitocondrial I. Los valores son promedios±EEM. n=6. nmol/min/mg = nanomoles/min/miligramo. *p<0.05 vs CT, #p<0.05 vs I/R.

con I/R (12.8 ± 0.98 nmoles/ mg de proteína) comparado con el grupo CT (8.4 ± 0.88 nmoles/ mg de proteína), esta alteración se revirtió cuando las ratas se trataron con el NDGA, grupo I/R+NDGA (9.51 ± 0.51 nmoles/ mg de proteína). Y los niveles de 4-HNE (Fig 11B) aumentaron en las ratas sometida a I/R (3.81 ± 0.16 nmoles/ mg de proteína) comparado con el grupo CT (2.79 ± 0.14 nmoles/ mg de proteína), y estos niveles disminuyeron de forma similar al CT, cuando las ratas se trataron con NDGA, grupo I/R+NDGA (2.98 ± 0.11 nmoles/ mg de proteína). Estos datos, sugieren que el NDGA está participando, también como un antioxidante directo mitocondrial, al prevenir el aumento de productos de lipoperoxidación.

6.2 Estudios *in vitro*

6.2.1 Estudios en células LLC-PK1

6.2.1.1 El NDGA induce la expresión de HO-1

Se conoce que el NDGA induce la expresión del gen citoprotector

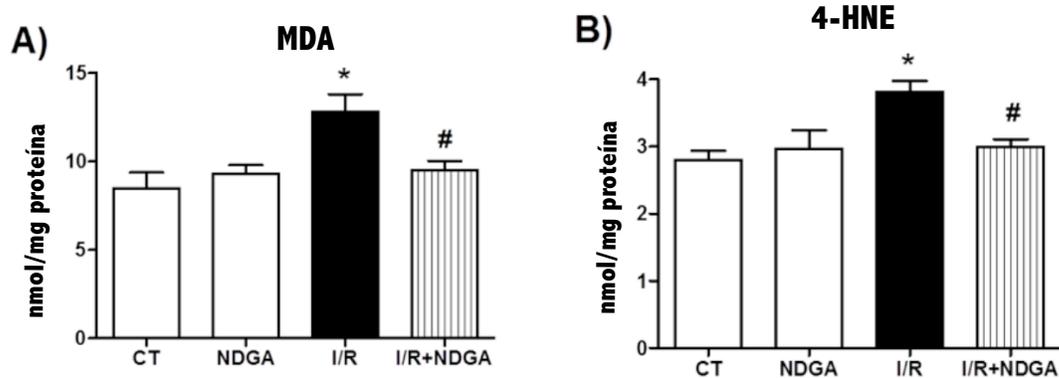


Figura 11. Contenido mitocondrial de (A) Malondialdehído, MDA y (B) 4-hidroxinonenal, 4-HNE. Los valores son promedios \pm EEM, n=4-5. *p<0.05 vs CT, #p<0.05 vs I/R.

en neuronas granulares de cerebelo, sin embargo, en nuestro modelo desconocemos si esto sucede de la misma forma. Por lo cual evaluamos si el NDGA puede inducir de manera dependiente del tiempo la expresión de HO-1. En la Fig 12 podemos ver que el NDGA induce la expresión de HO-1 a través del tiempo, en una forma clara desde los 60 min y presentando un pico de inducción a las 3 y 6 h, aunque la expresión fue evidente hasta las 24 h (1440 min). Estos datos son similares a los datos que se obtuvieron *in vivo*, sugiriendo al NDGA con un inductor de enzimas citoprotectoras.

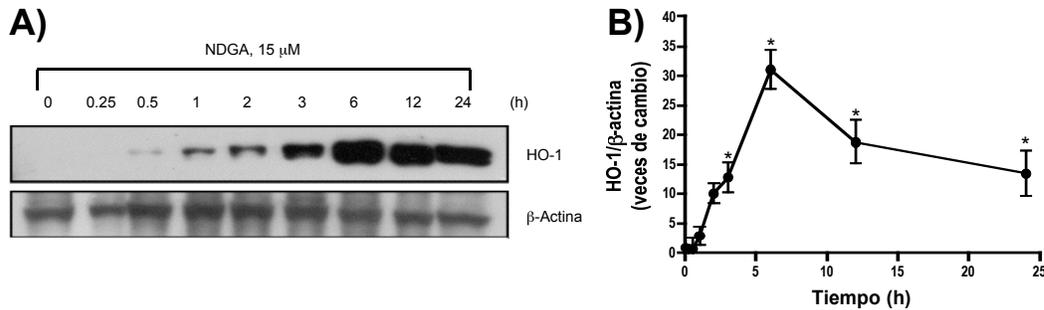


Figura 12. Curso temporal del NDGA sobre HO-1. (A) Western blot de HO-1 y (B) Cuantificación densitométrica. $n=3$. $*p < 0.01$ vs 0 h.

6.2.1.2 Producción de especies de oxígeno reactivas (ROS)

Las células LLC-PK1 se trataron con H_2O_2 como un agente inductor de daño tisular. Como siguiente objetivo, se evaluó la producción de anión superóxido por medio de fluorescencia, determinando la fluorescencia de color verde en las células tratadas con H_2O_2 y si este disminuye cuando las células se trataron previamente con NDGA. Cuando se inhibió la actividad enzimática de la hemo-oxigenasa (HO-1) con la mesoporfirina de estaño (SnMP), se observó un aumento en la producción de ERO y anión superóxido, sugiriendo una participación de esta enzima en la disminución de ROS y de anión superóxido. La cuantificación densitométrica de la fluorescencia del dihidroetidio y de la producción de ROS se presenta en la Fig 13B y 13C, respectivamente.

6.2.1.3 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial

Para seguir investigando la función citoprotectora del NDGA, se evaluó el funcionamiento de la mitocondria. Para esto utilizamos una sonda (JC1) que se introduce en la mitocondria formando monómeros y que emiten una fluorescencia de color roja a 590 nm, cuando la mitocondria se despolariza se liberan al citoplasma formando agregados y emitiendo una fluorescencia verde a 530 nm. Como podemos ver en la Fig 14, el H_2O_2 1 mM induce la despolarización de la membrana mitocondrial, permitiendo que salgan los monómeros de JC1 y formen agregados moleculares, que podemos detectar como una fluorescencia verde a 530 nm (Fig 14C).

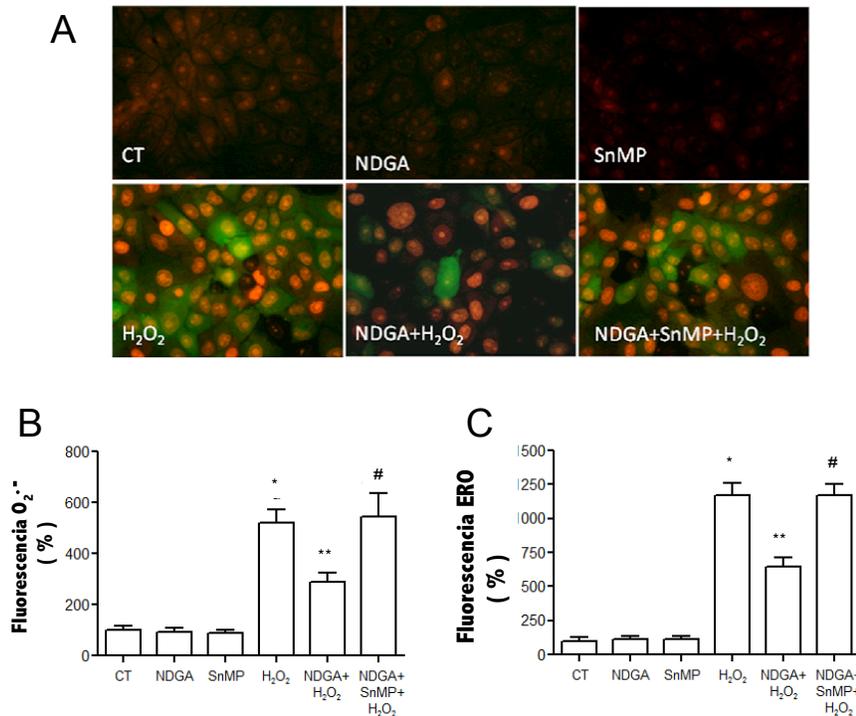


Figura 13. El NDGA previene de la generación de O₂^{•-} y especies de oxígeno reactivas (ROS) en las células LLC-PK1. (A) sonda contra dihidroetidio (rojo, O₂^{•-}) y carboxi-ABC (verde, ROS). Las células se incubaron con las sondas (CT), tratadas con NDGA 15 μM por 6 h (NDGA); H₂O₂ 1 mM por 2 h (H₂O₂); se preincubó con NDGA 15 μM + 2 h de H₂O₂ (NDGA+ H₂O₂), además se pre-incubó 30 min con SnMP (NDGA+SnMP+ H₂O₂). Cuantificación de dihidroetidio, DHE (B); y especies de oxígeno reactivas, ROS (C). *p<0.001 vs CT; **p< 0.001 vs H₂O₂; #p<0.001 vs NDGA+H₂O₂. SnMP:mesoporfirina de estaño.

En las células que se pretrataron con el NDGA, se observa que se evita la despolarización de la membrana mitocondrial (Fig 14D). El NDGA por si solo no tuvo efecto en el potencial de membrana mitocondrial (Fig 14B). Con la sonda JC1 se puede obtener un cociente de emisión 590/530, que indica la relación entre los agregados/monómeros. En la Fig 14E, se observa la pérdida del potencial de membrana de la mitocondria; claramente vemos como el H₂O₂ disminuye el potencial de membrana de la mitocondria, y las tratadas NDGA+H₂O₂ se evita parcialmente esta pérdida del potencial de membrana mitocondrial, sugiriendo que el NDGA evita la despolarización de la membrana mitocondrial.

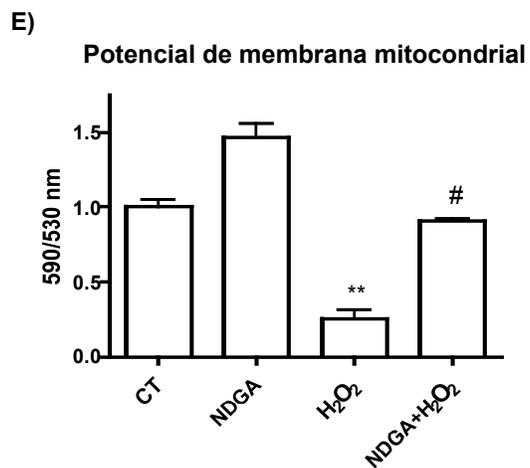
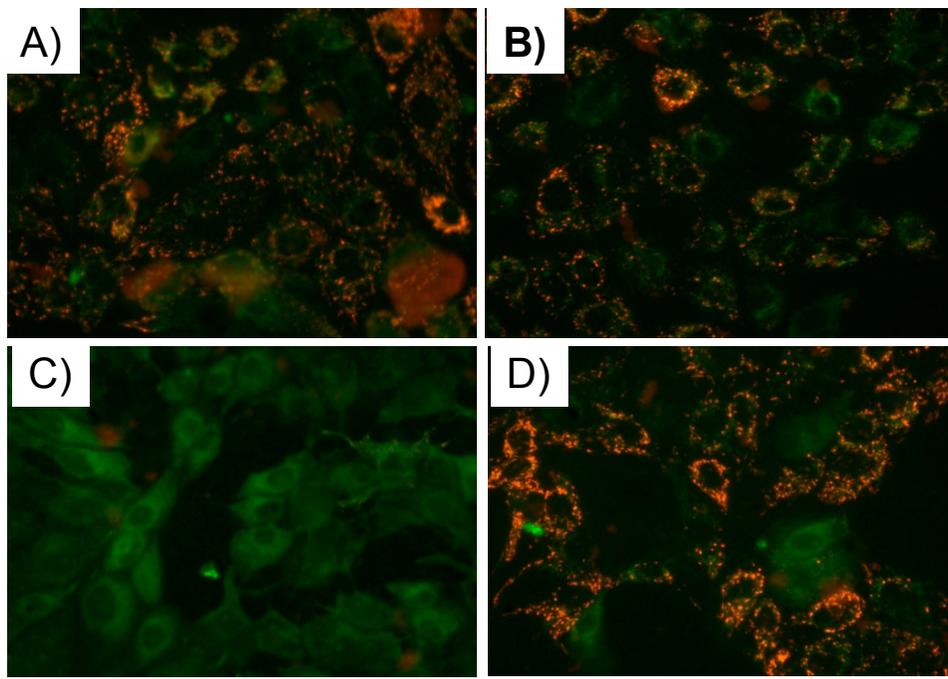


Figura 14. Potencial de membrana mitocondrial en las células LLC-PK1. (A) CT; (B) NDGA 15 μ M por 6 h; (C) H₂O₂ 1 mM por 2 h; (D) NDGA 15 μ M+H₂O₂ (E) Cuantificación del potencial de membrana mitocondrial (relación 590/530). Los valores son promedios \pm EEM, n=8. **p<0.001 vs CT, #p<0.001 vs H₂O₂.

6.2.1.4 El NDGA induce las vías de Erk1/2 y PI3K/AKT

Con el objetivo de determinar que vías de señalización son inducidas por el NDGA, utilizamos anticuerpos contra las formas activas de las vías de señalizaciones (PI3K, MAPK). Como vemos en la Fig 15A y C, el NDGA induce las vías de PI3K/AKT y Erk 1/2 a partir de los 15 min; las Figs 15B y D son las cuantificaciones de las gráficas anteriores. Las vías de p38 y JNK no se indujeron por el NDGA (Fig 15E y G, respectivamente).

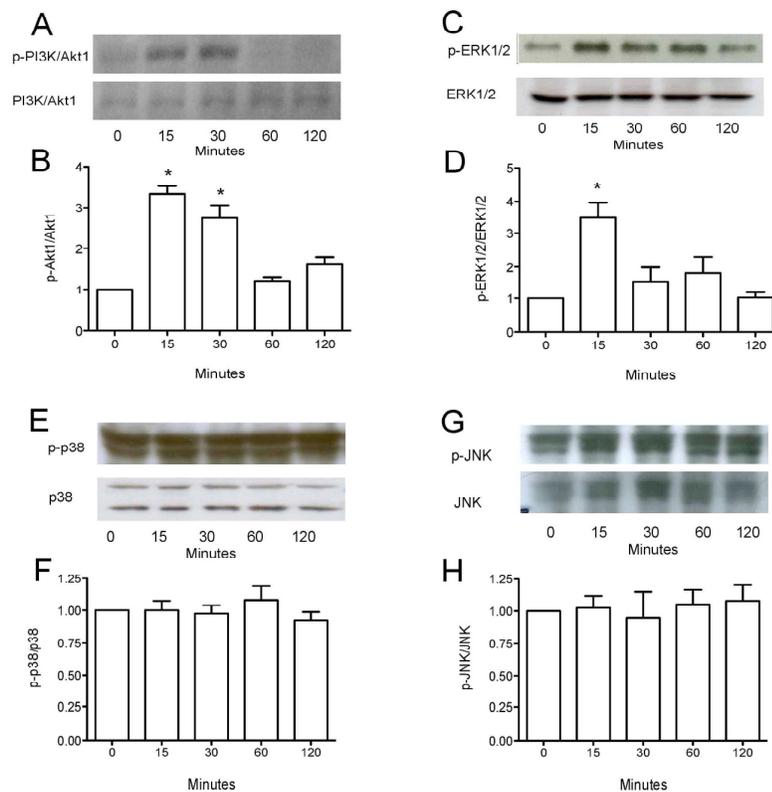


Figura 15. Curso temporal del efecto del NDGA sobre las vías de señalización de (A)PI3K/AKT, (C) Erk 1/2, (E) p38 y (G) JNK. Las cuantificaciones densitométricas de cada una de las vías están en el panel inferior de cada Western blot. Los valores son promedios±EEM, n=3, *p<0.01 vs 0 min.

6.2.1.5 La vía de supervivencia PI3K/AKT participa en la inducción de HO-1 por el NDGA

El siguiente objetivo fue evaluar la vía de señalización *upstream* de Nrf2, por lo que con la ayuda de los inhibidores de las cinasas se evaluó la vía implicada. Como vemos en la Fig 16A, el inhibidor de la vía PI3K/AKT es el único que bloquea la expresión de HO-1 estimulada por el NDGA. La cuantificación densitométrica está representada en la Fig 16B. Pero de forma muy notable, el efecto --

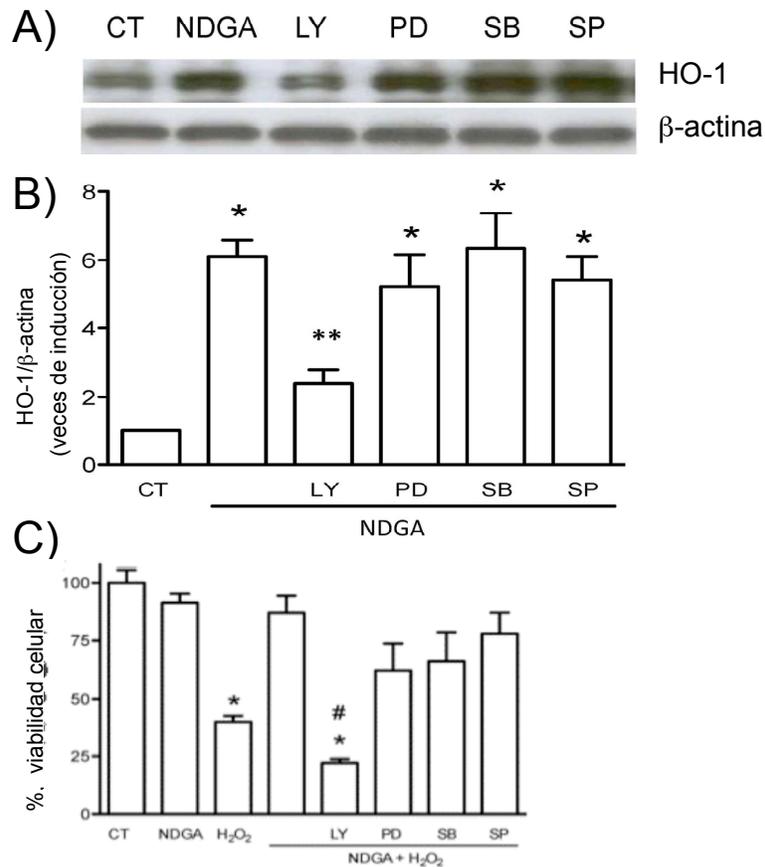


Figura 16. Efecto de los inhibidores de las vía de señalización sobre el aumento de la expresión de HO-1 y la citoprotección inducida por el NDGA. (A) Western blot de HO-1, y cuantificación densitométrica (B); * $p < 0.001$ vs CT y ** $p < 0.001$ vs NDGA. (C) Viabilidad celular; * $p < 0.001$ vs CT, # $p < 0.001$ vs NDGA+H₂O₂. Las concentraciones de los inhibidores fueron las siguientes: LY294002, 40 μ M; PD98059, 50 μ M; SB203580, 5 μ M y SP600125 10 μ M. $n = 4-6$.

citoprotector del NDGA sobre la viabilidad celular (Fig 16C) se disminuye al bloquear la vía de señalización PI3K/AKT. A partir de estos datos, podemos sugerir que el NDGA está activando la vía de PI3K/AKT y **posteriormente induce la expresión del gen citoprotector, HO-1.**

6.2.1.6 El NDGA induce la actividad de enzimas citoprotectoras

Para complementar estudios del efecto indirecto del NDGA, se evaluó la actividad de enzimas citoprotectoras. Como vemos en la Fig 17, el NDGA induce la actividad de GSH reductasa (Fig 17B), CAT (Fig 17D) y SOD (Fig 17E) y no tiene efectos sobre GPx y GST. Estos datos sugieren que el efecto citoprotector del NDGA es debido a la inducción de varias enzimas citoprotectoras.

6.2.2 Estudios en células embrionarias murinas (MEFs)

6.2.2.1 El NDGA induce la expresión de las vías de estrés celular y la vía de sobrevivencia celular

Una de las tareas es validar a los MEFs como modelo de estudio, por lo que como primer objetivo, emprendimos la tarea de evaluar las vías de señalización que responden al NDGA. Encontramos que el NDGA induce las tres principales vías de señalización que responden a estrés celular como son las vías p38, Erk 1/2 y JNK. Es de notar que las tres vías se inducen dependiendo del tiempo de exposición al NDGA. Además, la vía de sobrevivencia celular PI3K/AKT, también responde al NDGA (Experimentos realizados en el lab. Del Dr. Antonio Cuadrado; Rojo, et al., 2012).

6.2.2.2 El NDGA induce la expresión de HO-1 a través de Nrf2

Después de observar que el NDGA induce la expresión de HO-1, nuestro siguiente objetivo fue evaluar si el factor transcripcional Nrf2 participa en la inducción de este gen. Para abordar este objetivo contamos con fibroblastos embrionarios murinos (MEF) que carecen de este factor transcripcional. Encontramos que el NDGA induce la expresión de HO-1 de forma dependiente de la concentración y cuando los MEFs Nrf2^{-/-} se trataron con el NDGA, se observó que --

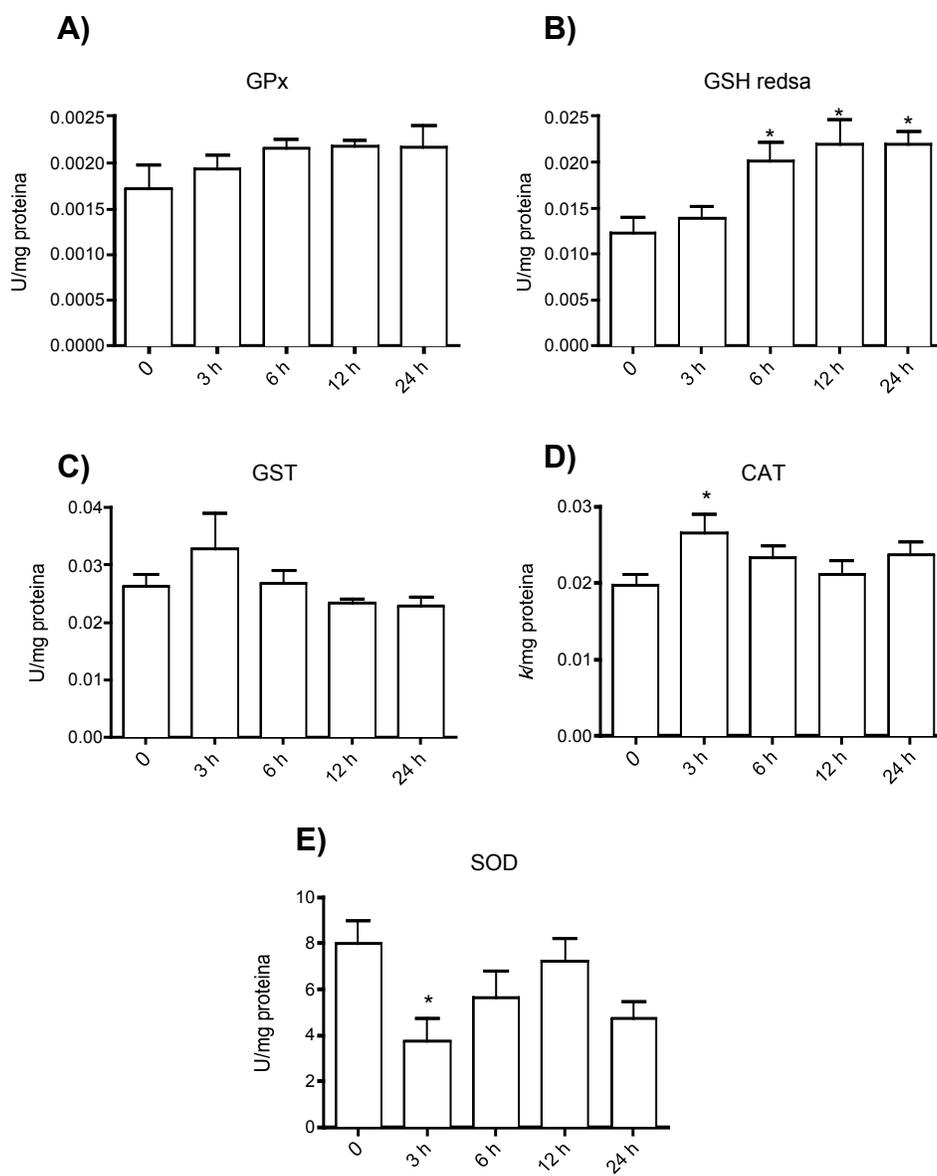


Figura 17. Efecto del NDGA sobre la actividad de enzimas antioxidantes. (A) Glutación peroxidasa (GPx), (B) Glutación reductasa (GSH reductasa), (C) Glutación S-transferasa (GST), (D) Catalasa (CAT), y (E) Superóxido dismutasa (SOD). * $p < 0.05$ vs 0 min. $n=2$.

la expresión es muy baja, por lo que concluimos que el NDGA induce la expresión de HO-1 de forma dependiente de Nrf2. Estos resultados se obtuvieron en el lab. del Dr. Antonio Cuadrado en la UAM (Madrid, España, Rojo et al., 2012).

6.2.2.3 La inducción de HO-1 es independiente de Keap1

En el modelo canónico, el factor transcripcional Nrf2 está regulado por la proteína Keap1. El siguiente objetivo fue evaluar la participación de Keap1 en la citoprotección inducida por el NDGA en la vía Nrf2/Keap1/HO-1. Encontramos que el NDGA induce la expresión de HO-1 a través de Nrf2, pero lo notable es que podemos ver que esta inducción es independiente de Keap1 (Rojo, et al., 2012).

6.2.2.4 La vía de GSK-3 β regula la citoprotección inducida por el NDGA

En la última parte de este proyecto, evaluamos si la vía de GSK3 β participa en mantener la estabilidad del factor transcripcional y el gen citoprotector HO-1. Encontramos que al bloquear la vía de GSK3 β aumenta la estabilidad del factor transcripcional Nrf2 y la proteína citoprotectora, indicando que esta vía es regulada por el NDGA. Estos experimentos se llevaron a cabo en el Lab. del Dr. Antonio Cuadrado en la UAM (Madrid España; Rojo et al., 2012).

7. DISCUSIÓN

El NDGA es un polifenol que tiene una larga historia en la medicina tradicional y su aplicación en enfermedades como la diabetes, cancer, esterilidad, catarro común y la eliminación de cálculos renales [Anjaneyulu et al., 2004; Arteaga et al., 2005; Lü et al. 2010]. De forma muy notable, el NDGA ha cobrado mucha relevancia médica debido a que se ha propuesto que tiene propiedades antineoplásicas, antivirales y anti-inflamatorias [Craig et al., 2000] aunque el mecanismo molecular de acción de este compuesto se sigue estudiando. Se ha demostrado que el NDGA es un antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que tiene la capacidad de atrapar especies de oxígeno reactivas e impedir la nitración de tirosinas de las proteínas en el pulmón [Floriano-Sánchez et al., 2006; Galano et al. 2010], lo que sugiere que el NDGA pudiera estar evitando el daño de moléculas biológicas como lípidos, proteínas o material genético.

Por otro lado, se sabe que durante períodos de la IRA existe un daño a tejidos y órganos involucrados, en parte debido a un incremento en el estrés oxidante [Huen et al., 2012]. En este trabajo se utilizó como modelo de estudio ratas sometidas a I/R renal donde está ampliamente documentado el aumento del estrés oxidante [Pedraza-Chaverri et al., 1992; Liu et al., 2009]. En nuestros estudios *in vivo* encontramos de forma muy notoria que el NDGA protege de la disfunción renal causada por la I/R [Dobashi et al., 2000; Segoviano-Murillo et al., 2008]; además de disminuir la necrosis celular y evitar el aumento de marcadores de estrés oxidativo (4-HNE, MDA, 3-NT) inducidas por la I/R [Liu et al., 2009; Guerrero-Beltrán et al., 2012]. Probablemente, el efecto protector sobre la necrosis tubular se deba en parte a la propiedad intrínseca de este compuesto de inhibir 5-LOX, y como consecuencia, disminuya la respuesta inflamatoria [Bhattacharjee et al., 1998]. Por otro lado, el efecto sobre la disminución de marcadores de estrés oxidativo se pudiera deber a sus propiedad de antioxidante directo [Floriano-Sánchez et al., 2006; Galano et al. 2010]. En este trabajo encontramos que el NDGA mantiene la actividad de ciertas enzimas antioxidantes (GPx, GST y CAT) en la I/R sugiriendo ampliamente su papel como antioxidante indirecto [Tenorio-Velázquez et al., 2005; Guerrero-Beltrán et al., 2012]. En este aspecto, un dato muy

importante que encontramos en este trabajo es que el NDGA induce la migración del factor transcripcional Nrf2 del citoplasma al núcleo en las células renales disminuyendo la abundancia de MPO y por otro lado aumentando la expresión de la enzima citoprotectora HO-1 en los modelos de IRA tanto en el de I/R como en el de gentamicina [Guzmán-Beltrán et al., 2008], sugiriendo un papel como antioxidante indirecto.

La mitocondria es el principal organelo productor de especies de oxígeno reactivas, por lo que al evaluar la función mitocondrial encontramos que el NDGA protege de la disfunción mitocondrial inducida por la I/R, evitando el mal funcionamiento del complejo mitocondrial I; además, de prevenir la formación de marcadores de estrés oxidante como lo fue el MDA y el 4-HNE [Guerrero-Beltrán et al., 2012].

Por todos los datos obtenidos de los estudios *in vivo* podemos afirmar que el NDGA induce la activación del factor transcripcional Nrf2, lo que favorece un aumento en la expresión de la enzima citoprotectora HO-1, que a su vez, esta enzima aumenta el CO y la bilirrubina (esta convertida en biliverdina, por la biliverdina reductasa) siendo estas moléculas fuertes atraparoras de las ROS producidas durante la IRA y que finalmente disminuye el daño oxidante previniendo la disfunción mitocondrial, con la consecuente citoprotección renal.

Para tratar de dilucidar el mecanismo de acción antioxidante del NDGA realizamos estudios *in vitro*, con la ayuda de las células de epitelio renal porcino LLC-PK1 y fibroblastos embrionarios murinos (MEFs). En lo referente a estos estudios, encontramos por una parte que el NDGA protege del daño ocasionado por H₂O₂, ya que es capaz de disminuir la producción de ERO (Por ejemplo: O₂⁻) y de impedir la despolarización de la mitocondria, actuando como antioxidante directo [Floriano-Sánchez et al., 2006; Galano et al., 2010]; por otro lado, al NDGA se le ha asociado efectos citoprotectores debido a su propiedad como antioxidante indirecto [Guzmán-Beltrán et al., 2008], por lo que evaluamos si era capaz de inducir vías de señalización que repondieran a estrés celular. Como pudimos observar el NDGA fue capaz de inducir las vías p38, Erk1/2, JNK y la vía de PI3K/AKT, además de inducir la proteína citoprotectora HO-1 dependiente del tiempo (también lo hizo *in vivo*) y con la ayuda de los MEF se demuestra con claridad que este efecto es dependiente del factor transcripcional Nrf2 [Guzmán-

Beltrán et al., 2008]. Con la ayuda de los inhibidores de cinasas se demostró que la vía de PI3K/AKT es la que está participando en la inducción de la expresión de HO-1, y de forma concluyente demostramos que el inhibidor de la enzima, el SnMP, aumenta la generación de ROS con la subsecuente disminución de la viabilidad celular. Estos datos *in vitro* nos estarían indicando que el NDGA activa la vía de PI3K/AKT, lo que favorece la activación de Nrf2 con la posterior inducción de la enzima citoprotectora HO-1 (que produce CO y biliverdina), que estos productos a su vez atrapan a las ROS, lo que trae como consecuencia la disminución de éstas, y se ve reflejado en una citoprotección celular.

Mediante el modelo de MEFs se encontró además que el NDGA induce la expresión de Nrf2 y HO-1 de forma independiente de su represor, Keap1. Más aún, se encontró que el NDGA disminuye la expresión de la vía de GSK-3 β que a su vez regula la estabilidad de Nrf2 y HO-1, lo que sugiere que NDGA es un xenobiótico con funciones amplias en la regulación de la citoprotección [Rada et al., 2011].

En este trabajo se demuestra que el NDGA tiene efectos tanto como antioxidante directo e indirecto *in vivo* e *in vitro*, y nos permite discernir uno de los posibles mecanismos de acción del NDGA en la citoprotección.

8. CONCLUSIONES

Períodos cortos de I/R renal, traen como consecuencia la pérdida gradual de la función del riñón, por lo que este trabajo es un claro indicativo que el NDGA tiene funciones renoprotectoras ya que evita la disfunción renal (creatinina, BUN), aumenta las actividades de enzimas antioxidantes, evita la lipoperoxidación mitocondrial (MDA y 4-HNE) y el mal funcionamiento de ésta.

El NDGA previene de la necrosis tubular en el riñón inducida por estrés oxidante y nitrante debida a la I/R, por una parte al inducir la enzima citoprotectora HO-1, y por otra parte al disminuir la abundancia de la MPO.

El NDGA mantiene los niveles altos de expresión de las enzimas citoprotectoras catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa, sugiriendo su participación en la protección celular.

El NDGA favorece el funcionamiento adecuado de las mitocondrias renales, ya que mantiene el adecuado funcionamiento del complejo mitocondrial I, además de evitar la formación de la oxidación de lípidos en la mitocondria.

También hemos demostrado que el NDGA tiene funciones protectoras *in vitro*. En las células epiteliales renales, LLC-PK1, el NDGA evitó la formación de radicales libres (ROS y $O_2^{\cdot-}$), y evitó la pérdida del potencial mitocondrial. Más aún, el NDGA induce la vía de sobrevivencia celular PI3K/AKT que a su vez induce la activación del factor transcripcional Nrf2 que finalmente induce la expresión de HO-1. Por otro lado, es importante señalar que en MEFs, vemos que el efecto citoprotector de HO-1 es independiente de Keap1 y que el NDGA regula la vía de señalización de GSK3 β , que a su vez regula la estabilidad de Nrf2 y en consecuencia de la proteína citoprotectora HO-1.

9. PERSPECTIVAS

Durante la isquemia renal y después del período de reperfusión se producen una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Por lo en este trabajo hemos encontrado que el antioxidante NDGA, previene del daño renal ocasionado por I/R actuando tanto como antioxidante directo como indirecto. Sin embargo, sería relevante evaluar si el NDGA puede inducir la expresión de toda una batería de genes citoprotectores *in vivo*, así como evaluar con que otros factores transcripcionales se une Nrf2 en la secuencia ARE en los promotores de estos genes citoprotectores. También sería importante determinar el efecto que tiene Nrf2 en la insuficiencia renal aguda *in vivo*, a través de ratones que carecen de este factor transcripcional. También, sería interesante estudiar con mayor detalle el mecanismo citoprotector del NDGA en el daño renal inducido por gentamicina.

10.BIBLIOGRAFÍA

- Aebi H** (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126.
- Ali BH** (1995). Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol.* 26(7):1477-1487.
- Anjaneyulu M, Chopra K** (2004). Nordihydroguaiaretic acid, a lignin, prevents oxidative stress and the development of diabetic nephropathy in rats. *Pharmacology.* 72(1):42-50.
- Arteaga S, Andrade-Cetto A, Cárdenas R** (2005). *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol.* 98(3):231-239.
- Araujo M, Welch WJ** (2006). Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 15(1):72-77.
- Balakumar P, Rohilla A, Thangathirupathi A** (2010). Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacol Res.* 62(3):179-186.
- Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverrí J** (2003). Protective effect of SnCl₂ on K₂Cr₂O₇-induced nephrotoxicity in rats: the indispensability of HO-1 preinduction and lack of association with some antioxidant enzymes. *Life Sci.* 73(23):3027-3041.
- Bhattacharjee P, Boughton-Smith NK, Follenfant RL, Garland LG, Higgs GA, Hodson HF, Islip PJ, Jackson WP, Moncada S, Payne AN, Randall RW, Reynolds CH, Salmon JA, Tateson JE, Whittle BJR** (1988). The effects of a novel series of selective inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase on anaphylactic and inflammatory responses. *Ann N Y Acad Sci.* 524:307-320.
- Beckman B, Ames BN** (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78(2):547-581.
- Bennett WM** (1989). Mechanisms of aminoglycoside nephrotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 16(1):1-6.
- Birkenfeld S, Zaltsman YA, Krispin M, Zakut H, Zor U, Kohen F** (1987). Antitumor effects of inhibitors of arachidonic acid cascade on experimentally induced intestinal tumors. *Dis Colon Rectum.* 30(1):43-46.
- Bledsoe G, Crickman S, Mao J, Xia CF, Murakami H, Chao L, Chao J** (2006). Kallikrein/kinin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity by inhibition of inflammation and apoptosis. *Nephrol Dial Transplant.* 21(3):624-633.

Bloom DA, Jaiswal AK (2003). Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I κ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem.* 78(45):44675-44682.

Bonventre JV (1993). Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 43:1160–1178.

Bonventre JV, Yang L (2011). Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 121(11):4210-4221.

Brändén G, Pawate AS, Gennis RB, Brzezinski P (2006). Controlled uncoupling and recoupling of proton pumping in cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(2):317-322

Brenner BM (2000). *The kidney.* Saunders Company. 6th edition.

Burton GW, Joyce A, Ingold KU (1982). First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet.* 2(8293):327.

Cochemé HM, Murphy MP (2010). Can antioxidants be effective therapeutics?. *Curr Opin Investig Drugs.* 11(4):426-431.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17:1195–1214.

Craigo J, Callahan M, Huang RC, DeLucia AL (2000). Inhibition of human papillomavirus type 16 gene expression by nordihydroguaiaretic acid plant lignan derivatives. *Antiviral Res.* 47(1):19-28.

Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY (1992). Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(21):10405-10409.

Cruse I, Maines MD (1998) Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J Biol Chem.* 263(7):3348-3353.

Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol.* 2004 19:8477-86.

Chan JY, Kwong M, Lu R, Chang J, Wang TSB, Yen, Kan YW (1998). Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *EMBO J.* 17:1779–87.

Chatterjee PK (2007). Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 376(1-2):1-43.

Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiernemann C (2000). Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int.* 58(2):658-673.

Chávez E, Briones R, Michel B, Bravo C, Jay D (1985). Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium transport: studies with cadmium. *Arch Biochem Biophys* 242:493-497.

Chen H, Teng L, Li JN, Park R, Mold DE, Gnabre J, Hwu JR, Tseng WN, Huang RC (1998). Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 2. Targeting herpes simplex virus replication by the mutation insensitive transcription inhibitor tetra-O-methyl-NDGA. *J Med Chem.* 41(16):3001-3007.

Di Noia MA, Van Driesche S, Palmieri F, Yang LM, Quan S, Goodman AI, Abraham NG (2006). Heme oxygenase-1 enhances renal mitochondrial transport carriers and cytochrome C oxidase activity in experimental diabetes. *J Biol Chem.* 281(23):15687-15693.

Dieter MZ, Freshwater SL, Solis WA, Nebert DW, Dalton TP (2001). Tyrphostin [correction of Tryphostin] AG879, a tyrosine kinase inhibitor: prevention of transcriptional activation of the electrophile and the aromatic hydrocarbon response elements. *Biochem. Pharmacol.* 61:215–225.

Dinkova-Kostova AT (2002). Protection against cancer by plant phenylpropenoids: induction of mammalian anticarcinogenic enzymes. *Mini Rev Med Chem.* 6:595-610.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res.* 52 Suppl 1:S128-S138.

Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Talalay P (2001). Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(6):3404-3409.

Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK (2000). Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem.* 205(1-2):1-11.

Estornell E, Fato R, Pallotti F, Lenaz G (1993). Assay conditions for the mitochondrial NADH:coenzyme Q oxidoreductase. *FEBS Lett.* 332(1-2):127-131.

Floriano-Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sánchez-González DJ, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J (2006). Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res.* 5:523-533.

Forman HJ, Dickinson DA (2003). Oxidative signaling and glutathione synthesis. *Biofactors* 17(1-4):1-12.

Galano A, Macías-Ruvalcaba NA, Medina Campos ON, Pedraza-Chaverri J (2010). Mechanism of the OH radical scavenging activity of nordihydroguaiaretic acid: a combined theoretical and experimental study. *J Phys Chem B.* 114(19):6625-6635.

Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J (1998). Reaction of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol.* 11(10):1176-1183.

Ghanta S, Chattopadhyay S (2011). Glutathione as a signaling molecule: another challenge to pathogens. *Plant Signal Behav.* 6(6):783-788.

Gnabre JN, Brady JN, Clanton DJ, Ito Y, Dittmer J, Bates RB, Huang RC (1995). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription and replication by DNA sequence-selective plant lignans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(24):11239-11243.

Goodman Y, Steiner MR, Steiner SM, Mattson MP (1994). Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid beta-peptide toxicity, and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Res.* 654(1):171-176.

González-Reyes S, Orozco-Ibarra M, Guzmán-Beltrán S, Molina-Jijón E, Massieu L, Pedraza-Chaverri J (2009). Neuroprotective role of heme-oxygenase 1 against iodoacetate-induced toxicity in rat cerebellar granule neurons: Role of bilirubin. *Free Radic Res.* 43(3):214-223.

Gowri MS, Reaven GM, Azhar S (1999). Masoprocol lowers blood pressure in rats with fructose-induced hypertension. *Am J Hypertens.* 12(7):744-746.

Guerrero-Beltrán CE, Tapia E, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cristobal-García M, Pedraza-Chaverri J (2012). tert-butylhydroquinone protects kidney from ischemia/reperfusion injury. *Journal of Nephrology* 25(1):84-89.

Gutteridge JM, Halliwell B (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 899:136-147.

Gutteridge JM, Halliwell B (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.* 393(4):561-564.

Guzmán-Beltrán S, Espada S, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J, Cuadrado A (2008). Nordihydroguaiaretic acid activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects cerebellar granule neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett.* 2008 447(2-3):167-171.

Haagenson KK, Wu GS (2010). Mitogen activated protein kinase phosphatases and cancer. *Cancer Biol Ther.* 17;9(5):337-340.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249(22):7130-7139

Han ES, Muller FL, Pérez VI, Qi W, Liang H, Xi L, Fu C, Doyle E, Hickey M, Cornell J, Epstein CJ, Roberts LJ, Van Remmen H, Richardson A (2008). The in vivo gene expression signature of oxidative stress. *Physiol Genomics.* 34(1):112-126.

Harris ED (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 6(9):2675-2683.

Hayes JD, McMahon M (2009). NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci.* 34(4):176-188.

Heinz VMD (1983). Renal function: mechanisms preserving fluid and solute balance in health. 2 nd edition. Little, Brown and Company, USA 1-10.

Henderson EM, Gaston B (2005). SNOR and wheeze: the asthma enzyme? *Trends Mol Med.* 11(11):481-484

Ho YS, Howard AJ, Crapo JD (1991). Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 4(3):278-286.

Huang HC, Nguyen T, and Pickett CB (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12475–12480.

- Huen** SC, Parikh CR (2012). Predicting acute kidney injury after cardiac surgery: a systematic review. *Ann Thorac Surg.* 93(1):337-347.
- Huo** X, Su D, Wang A, Zhai Y, Xu J, Li X, Bartlam M, Sun F, Rao Z (2007). Preliminary molecular characterization and crystallization of mitochondrial respiratory complex II from porcine heart. *FEBS J.* 274(6):1524-1529.
- Hwu** JR, Hsu MH, Huang RC (2008). New nordihydroguaiaretic acid derivatives as anti-HIV agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 18(6):1884-1888.
- Hyder** P, Fredrickson EL, Rick E, Estell R, Tellez M, Gibbens R (2002). Distribution and concentration of total phenolics, condensed tannins and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in creosote bush (*Larrea tridentata*). *Biochemical Systematics and Ecology* 30:905–912.
- Ichikawa** I, Kiyama S, Yoshioka T (1994). Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 45(1):1-9.
- Igarashi** K, Kataoka K, Itoh K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M (1994). Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature* 367:568–572.
- Iqbal** M, Sharma SD, Okazaki Y, Fujisawa M, Okada S (2003). Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol Toxicol.* 92(1):33-38.
- Itoh** K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:313–322.
- Itoh** K, Ishii T, Wakabayashi N, Yamamoto M (1999). Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free Radic Res.* 31(4):319-324.
- Itoh** K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13(1):76-86.
- Jaiswal** AK (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.* 36(10):1199-1207.
- Jung** D, Biggs H, Erikson J, Ledyard PU (1975). New Colorimetric

reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clin Chem.* 21(8):1136-1140.

Kaissling B, Kriz W (1979). Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 56:1-123.

Kansanen E, Jyrkkänen HK, Levonen AL (2012). Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic Biol Med.* 52(6):973-982.

Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK (2004). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 47(9):1304-1309.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:89-116

Keon WK, Ryu JH, Kim SG (2000). The essential role of phosphatidylinositol 3-kinase and of p38 mitogen-Activated Protein Kinase Activation in the Antioxidant Response Element-Mediated rGSTA2 Induction by Decreased Glutathione in H4IIE Hepatoma Cell. *Mol Pharmacol* 58:1017-1025

Kirkman HN, Gaetani GF (1984). Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81(14):4343-4347.

Klein JA, Ackerman SL (2003). Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest.* 111:785–793.

Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 24(16):7130-7139.

Lambert JD, Zhao D, Meyers RO, Kuester RK, Timmermann BN, Dorr RT (2002). Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol.* 40(12):1701-1708.

Laurent G, Carlier MB, Rollman B, Van Hoof F, Tulkens P (1982). Mechanism of aminoglycoside-induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *Biochem Pharmacol.* 31(23):3861-3870.

Lawrence RA, Burk RF (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 71(4):952-958.

Lieberthal W, Levine JS (1996). Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol.* 271:F477-F488.

Liu M, Grigoryev DN, Crow MT, Haas M, Yamamoto M, Reddy SP, Rabb H (2009). Transcription factor Nrf2 is protective during ischemic and nephrotoxic acute kidney injury in mice. *Kidney Int.* 76(3):277-285.

Long LH, Halliwell B (2000). Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers. *Free Radic Res.* 32(5):463-467.

Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ (2011). New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int.* 79(1):33-45.

Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 14(4):840-860.

Maher J, Yamamoto M (2010). The rise of antioxidant signaling the evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol.* 244(1):4-15.

Maines MD (2000). The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Mol Biol* 46(3):573-585.

Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM, Cuadrado A (2004). Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem.* 279(10):8919-8929.

Martínez-Abundis E, García N, Correa F, Hernández-Reséndiz S, Pedraza-Chaverri J, Zazueta C (2010) Effects of alpha-mangostin on mitochondrial energetic metabolism. *Mitochondrion* 10:151-157.

Mohler J, Mahaffey JW, Deutsch E, Vani K (1995). Control of *Drosophila* head segment identity by the bZIP homeotic gene *cnc*. *Development* 121:237–247.

Motohashi H, Yamamoto M (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med.* 10(11):549-557.

Myatt L (2010). Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta.* 31 Suppl:S66-S69.

Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H (1990). Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene.* 89(2):295.

Nath KA, Norby SM (2000). Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med.* 109(8):665-678.

Nguyen T, Nioi P, Pickett CB (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 284(20):13291-13295.

Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS, Pickett CB (2005). Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem.* 280(37):32485-32492.

Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, Pickett CB (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem.* 278(7):4536-4541.

Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43:233-260.

Nicholl DG (1987). Bionergética: Introducción a la teoría quimiosmótica. Editorial Reverté S.A. Barcelona. pp. 71-135.

Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK (2010). Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol.* 244(1):37-42.

Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, Brodsky S, Goligorsky MS (2001). Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281(5):F948-F957.

Nose K (2000). Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. *Biol Pharm Bull.* 23(8):897-903.

Orkin SH (1990). Globin gene regulation and switching: circa 1990. *Cell* 63:665–672.

Owuor ED, Kong AN (2002). Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol.* 64(5-6):765-770. Erratum in: *Biochem Pharmacol* 2002 64(10):1547.

Patel NS, Chatterjee PK, Chatterjee BE, Cuzzocrea S, Serraino I, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiernemann C (2002). Tempone reduces renal dysfunction and injury mediated by oxidative stress of the rat kidney. *Free Radic Biol Med* 33(11):1575-1589.

Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Hernández-Pando R, Medina-Campos ON, Cruz C, Murguía F, Juárez-Nicolás C, Correa-Rotter R, Torres N, Tovar AR (2004). Soy protein diet ameliorates renal nitrotyrosine formation and chronic nephropathy induced by puromycin aminonucleoside. *Life Sci.* 74(8):987-999.

Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Bobadilla N (1992). Ischemia-reperfusion induced acute renal failure in the rat is ameliorated by the

spin-trapping agent α -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN). *Renal Failure* 14(4):467-471.

Quiros Y, Vicente-Vicente L, Morales AI, López-Novoa JM, López-Hernández FJ (2011). An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin. *Toxicol Sci.* 119(2):245-256.

Rada P, Rojo AI, Chowdhry S, McMahon M, Hayes JD, Cuadrado A (2011). SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol Cell Biol.* 31(6):1121-1133.

Raha S, Robinson BH (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 25(10):502-508.

Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, Roman J, Singh A, Fryer AD, Yamamoto M, Kensler TW, Tuder RM, Georas SN, Biswal S (2005). Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J Exp Med.* 202(1):47-59.

Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tuder RM, Biswal S (2004). Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest.* 114(9):1248-1259.

Reddy NM, Kleeberger SR, Cho HY, Yamamoto M, Kensler TW, Biswal S, Reddy SP (2007). Deficiency in Nrf2-GSH signaling impairs type II cell growth and enhances sensitivity to oxidants. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 37(1):3-8.

Rojo AI, Sagarra MR, Cuadrado A (2008). GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem.* 105(1):192-202.

Rushmore TH, Kong AN (2002). Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab.* 3(5):481-490.

Ryter SW, Alam J, Choi AM (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev.* 86(2):583-650.

Saikawa Y, Kaneda H, Yue L, Shimura S, Toma T, Kasahara Y, Yachie A, Koizumi S (2000). Structural evidence of genomic exon-deletion mediated by Alu-Alu recombination in a human case with heme oxygenase-1 deficiency. *Hum Mutat.* 16(2):178-179.

Salazar M, Rojo AI, Velasco D, de Sagarra RM, Cuadrado A (2006). Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and

antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem.* 281(21):14841-14851.

Salinas M, Diaz R, Abraham NG, Ruiz de Galarreta CM, Cuadrado A (2003). Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J Biol Chem.* 278(16):13898-13904.

Segoviano-Murillo S, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Maldonado PD, Pedraza-Chaverri J (2008). S-allylcysteine ameliorates ischemia and reperfusion induced renal damage. *Pythotherapy Research* 22(6):836-840.

Spector A (1991). The lens and oxidative stress. *Oxidative stress* . Academic Press, Inglaterra, pp. 529-557.

Star RA (1998). Treatment of acute renal failure. *Kidney Int.* 54(6):1817-1831.

Stocker R, Frei B (1991). Endogenous antioxidant defence in human blood plasma. *Oxidative stress: oxidant and antioxidant.* Academic Press, Inglaterra, pp. 213-243.

Tenorio-Velázquez VM, Barrera D, Franco M, Tapia E, Hernández-Pando R, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J (2005). Hypothyroidism attenuates protein tyrosine nitration, oxidative stress and renal damage induced by ischemia and reperfusion: effect unrelated to antioxidant enzymes activities. *BMC Nephrology* 6:12.

Thakur V, Walker PD, Shah SV (1998). Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in puromycin aminonucleoside-induced proteinuria. *Kidney Int.* 34(4):494-499.

Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F (2004). Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp Clin Transplant.* 2(1):174-177.

Voet D, Voet GJ, Pratt CW (2001). Capítulo 17. pp. 492-528.

Weisiger RA, Fridovich I (1973). Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem.* 248(13):4793-4796.

Wilce MC, Parker MW (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys Acta.* 1205(1):1-18.

Yam-Canul P, Chirino YI, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Villanueva C, Pedraza-Chaverri J (2008). Nordihydroguaiaretic acid attenuates potassium dichromate-induced

oxidative stress and nephrotoxicity *Food Chem Toxicol.* 46(3):1089-1096.

Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol.* 24(24):10941-10953