



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**EFFECTO PROTECTOR DE LA S-ALILCISTEÍNA CONTRA EL DAÑO INDUCIDO  
POR CISPLATINO EN RATAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
Q.A TANIA GÓMEZ SIERRA

TUTOR PRINCIPAL:  
Dr. José Pedraza Chaverri  
Facultad de Química, UNAM

COMITÉ TUTOR:  
Dra. Mahara Valverde Ramírez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Amelia Farrés González-Saravia  
Facultad de Química, UNAM

MÉXICO, D. F. FEBRERO, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# EFFECTO PROTECTOR DE LA S-ALILCISTEÍNA CONTRA EL DAÑO INDUCIDO POR CISPLATINO EN RATAS

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri en el laboratorio 209, edificio F, Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dra. Mahara Valverde Ramírez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración y asesoría técnica de la Dra. Edilia Tapia Rodríguez y del M. en C. Wyly Ramsés García Niño, del Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", en los procedimientos realizados a los animales.

Se reconoce la colaboración de la Dra. Perla Maldonado Jiménez, del Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", por la síntesis de la S-alilcisteína.

Se reconoce la colaboración e interpretación del Dr. Rogelio Hernández Pando, del Departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán", en los estudios histológicos.

Se reconoce la colaboración del M. en C. Eduardo Molina Jijón, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV por los análisis de Western Blot.

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

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 IN210713. Durante los estudios de maestría recibí una beca otorgada por CONACYT.

El jurado de examen de grado estuvo conformado por:

PRESIDENTE	Dr. Arturo Navarro Ocaña
VOCAL	Dra. Nimbe Torres y Torres
VOCAL	Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo
VOCAL	Dra. María Elena Ibarra Rubio
SECRETARIO	Dr. Manuel Jiménez Estrada

# ÍNDICE

Abreviaturas .....	- 1 -
Resumen .....	- 2 -
1. Antecedentes .....	- 3 -
1.1 Ajo.....	- 3 -
1.2 Extracto de ajo envejecido .....	- 4 -
1.3 S-alilcisteína.....	- 5 -
1.4 Estrés oxidante y antioxidantes.....	- 8 -
1.5 Riñón.....	- 10 -
1.6 Insuficiencia renal aguda .....	- 12 -
1.7 Cisplatino .....	- 13 -
2. Justificación.....	- 16 -
3. Hipótesis.....	- 16 -
4. Objetivos .....	- 16 -
4.1 Objetivo general.....	- 16 -
4.2 Objetivos particulares.....	- 16 -
5. Diseño experimental.....	- 17 -
6. Materiales y Métodos .....	- 19 -
6.1 Materiales .....	- 19 -
6.2 Preparación de los homogenados de riñón.....	- 20 -
6.3 Aislamiento de fracciones renales.....	- 20 -
6.4 Extracción de proteínas totales para Western Blot .....	- 21 -
6.5 Análisis proteico por Western Blot .....	- 21 -
6.6 Evaluación de la función renal .....	- 22 -
6.7 Daño histológico.....	- 23 -
6.8 Estrés oxidante .....	- 23 -
6.9 Actividad de enzimas antioxidantes .....	- 24 -
6.10 Análisis estadístico.....	- 24 -
7. Resultados .....	- 25 -
7.1 Determinación de la dosis protectora de SAC .....	- 25 -
7.2 Efecto del CIS y la SAC en el peso corporal y la proporción del riñón.....	- 26 -
7.3 Efecto de la SAC en los marcadores de daño tubular.....	- 27 -

7.4 Efecto de la SAC en el estrés oxidante inducido por CIS .....	- 28 -
7.5 Efecto del CIS y la SAC en la actividad de las enzimas antioxidantes.....	- 29 -
7.6 La SAC atenúa el daño histológico inducido por CIS.....	- 29 -
7.7 Efecto de la SAC en la función renal.....	- 31 -
7.8 Efecto de la SAC en la expresión de Nrf2, PKC $\beta$ 2, p47 <sup>phox</sup> , gp91 <sup>phox</sup> .....	- 32 -
7.9 Efecto de la SAC en el estrés oxidante y la actividad de enzimas antioxidantes en túbulo proximal.....	- 34 -
7.10 Efecto de la SAC en el estrés oxidante y la actividad de enzimas antioxidantes en túbulo distal.....	- 36 -
8. Discusión.....	- 39 -
9. Conclusiones.....	- 42 -
10. Referencias .....	- 44 -
Anexo 1 .....	- 53 -
Anexo 2 .....	- 54 -

---

---

## ***Abreviaturas***

<b>ARE</b>	Antioxidant response element
<b>BUN</b>	Blood Urea Nitrogen
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CIS</b>	Cisplatino
<b>Ctr1</b>	Transportador de cobre 1
<b>EAE</b>	Extracto de ajo envejecido
<b>ERN</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GST</b>	Glutación S-transferasa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HOCl</b>	Ácido hipocloroso
<b>IRA</b>	Insuficiencia renal aguda
<b>Keap 1</b>	Kelch ECH associating protein 1
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>NAG</b>	N-acetil-β-D-glucosaminidasa
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kappa B
<b>Nrf2</b>	Nuclear factor erythroid-derived-2 like 2; NF-E2
<b>NO<sup>•</sup></b>	Radical óxido nítrico
<b>Oct2</b>	Transportador de cationes orgánicos 2
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno singulete
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Anión superóxido
<b><sup>•</sup>OH</b>	Radical hidroxilo
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Anión peroxinitrito
<b>SAC</b>	S-alilcisteína

---

---

## **Resumen**

La S-alilcisteína (SAC) es un compuesto derivado del ajo con propiedades antioxidantes. En diferentes modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que la SAC protege contra el daño oxidante al atrapar diversas especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), aumentar los niveles de glutatión (GSH) y la actividad de enzimas antioxidantes en cerebro, hígado, corazón, pulmón y riñón. El cisplatino (CIS) es un antineoplásico que induce nefrotoxicidad como efecto secundario, asociado a la producción de ERO y ERN e inhibición de enzimas antioxidantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto protector de la SAC en la disfunción renal y el daño oxidante inducido por CIS en ratas. El estudio se dividió en dos etapas, en las cuales se utilizaron ratas macho Wistar con un peso inicial de 200-220 g. En la primera etapa se trataron con CIS (7.5 mg/kg p.c, i.p.) + 6.25, 12, 15, 20, 25, 50, 100, 150 ó 200 mg/kg p.c, i.p. de SAC. Los grupos CIS+SAC 20, 25 y 50 mg/kg p.c, disminuyeron los niveles de creatinina y BUN (Blood Urea Nitrogen) en al menos un 40 y 25%, respectivamente. Además se evaluó en esos grupos el daño histológico, los marcadores de estrés y las actividades de enzimas antioxidantes. Se encontró que la dosis de 25 mg/kg de SAC provee protección mediante la atenuación del estrés oxidante. En la segunda etapa se utilizaron los grupos control, SAC 25 mg/kg, CIS y CIS+SAC 25 mg/kg. Se determinó la expresión de Nrf2, PKC $\beta$ 2 y de las subunidades de la NADPH oxidasa (p47<sup>phox</sup> y gp91<sup>phox</sup>) en la corteza renal. El grupo CIS disminuyó la expresión de Nrf2 y aumentó las de PKC $\beta$ 2, p47<sup>phox</sup> y gp91<sup>phox</sup>. El tratamiento con SAC atenuó dichos cambios así como el daño oxidante en los túbulos proximales y distales. Estos datos sugieren que SAC provee renoprotección contra el daño inducido por CIS al atenuar el estrés oxidante e incrementar la actividad de enzimas antioxidantes.

---

---

## 1. Antecedentes

### 1.1 Ajo

El ajo (*Allium sativum*) ha sido utilizado por diversas culturas para el tratamiento y prevención de algunas enfermedades. En diversos estudios epidemiológicos, clínicos y preclínicos se ha demostrado una relación directa entre su ingestión y la disminución de enfermedades (Amagase, 2006), debido a que actúa como hipolipemiante, hipoglucemiante, antiaterosclerótico, antitrombótico, antibiótico, antiinflamatorio y antioxidante (Banerjee *et al.*, 2003; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2000-b; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2006; Iciek *et al.*, 2009; Capasso, 2013; Srinivasan, 2014).

La actividad antioxidante del ajo en estudios *in vivo* e *in vitro* se ha asociado a la capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno (ERO) como anión superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $^{\bullet}OH$ ), anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2006; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2007; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2007-b; Sadiq Butt *et al.*, 2009) y además al aumento en la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S-transferasa (GST) y catalasa (CAT) (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2000; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2001; Sadiq Butt *et al.*, 2009; Capasso, 2013).

Los efectos benéficos del ajo se asocian a los numerosos compuestos de azufre que contiene como sulfóxido de S-alilcisteína (aliína),  $\gamma$ -glutamyl-S-alilcisteína, sulfóxido de S-metilcisteína, sulfóxido *trans*-1-propenilcisteína, S-2-carboxipropilglutatión y S-alilcisteína (SAC) (Amagase, 2006; Iciek *et al.*, 2009; Queiroz *et al.*, 2009; Capasso, 2013). El desarrollo de suplementos de ajo permite obtener efectos benéficos en diferentes presentaciones farmacéuticas: aceites (cápsulas), ajo en polvo (tabletas) y extractos de ajo envejecido (EAE) (tabletas y cápsulas).

## 1.2 Extracto de ajo envejecido

Los productos derivados del ajo como el EAE tienen una mayor actividad antioxidante en comparación con el ajo fresco y otros suplementos que lo contienen (Borek, 2001; Santhosha *et al.*, 2013). Se obtiene a partir de la extracción del ajo fresco en etanol al 20% en un periodo de 10-24 meses a temperatura ambiente; éste es altamente biodisponible y biológicamente activo para animales y humanos (Borek, 2001; Herrera-Mundo *et al.*, 2009, Matsutomo *et al.*, 2013). Durante su proceso de envejecimiento se modifican sus componentes (Tabla 1) a través de reacciones químicas y enzimáticas, dando como resultado la formación de compuestos con actividad antioxidante como la SAC y S-alilmercaptocisteína (Borek, 2001; Banerje *et al.*, 2003, Herrera-Mundo *et al.*, 2009). Además de estos compuestos el EAE contiene  $\gamma$ -glutamilcisteína y  $\gamma$ -glutamil S-alilcisteína.

**Tabla 1.** Cambios en la composición del extracto de ajo envejecido (mg/g)

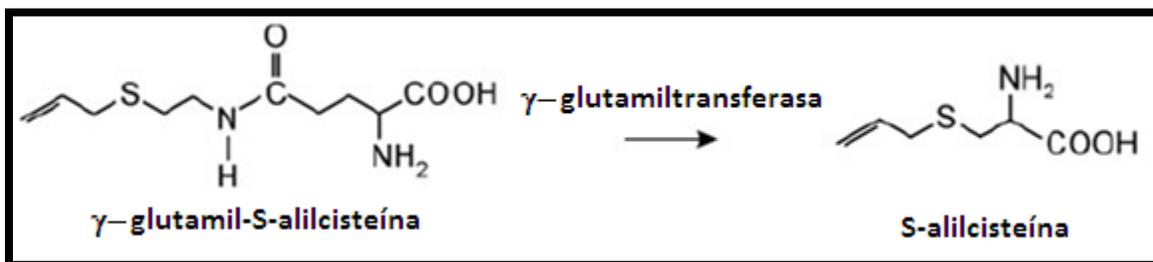
Compuesto	Tiempo de incubación <sup>1</sup> (meses)				
	0	1	3	12	24
$\gamma$ -glutamil-S-alilcisteína	12.7	5.8	1.1	0	0
<b>S-alilcisteína</b>	<b>0.2</b>	<b>5.9</b>	<b>7.2</b>	<b>7.1</b>	<b>7.2</b>
$\gamma$ -glutamil-S-1propenilcisteína	15.9	3.4	0.5	0	0
S-1-propenilcisteína	0.5	6.7	8.1	6.5	4.4
S-alilmercaptocisteína	0.01	0.6	1.2	1.7	1.9

<sup>1</sup>Se cortaron dientes de ajo en trozos y se colocaron en un recipiente cerrado con etanol al 20% a temperatura ambiente. Fuente: Herrera-Mundo *et al.*, 2009.

El EAE protege contra el daño oxidante al atrapar ERO, aumentando los niveles de glutatión (GSH), la actividad de SOD, CAT y GPx, inhibiendo la lipoperoxidación y la activación del factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ -B) (Borek, 2001; Banerje *et al.*, 2003).

### 1.3 S-alilcisteína

La SAC es el compuesto organosulfurado más abundante en el EAE, se produce a través de la transformación de la  $\gamma$ -glutamyl-S-alilcisteína por la acción de la  $\gamma$ -glutamyltransferasa (Figura 1). Es un compuesto hidrosoluble, biodisponible, estable y 30 veces menos tóxico que otros compuestos del ajo como la alicina y el dialildisulfuro (Tabla 2) (Herrera-Mundo *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Síntesis de la S-alilcisteína. Fuente: Herrera-Mundo *et al.*, 2009.

**Tabla 2.** Dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de los compuestos de ajo (ratón, vía oral)

	DL <sub>50</sub> (mg/kg p.c)	
	Macho	Hembra
<b>S-alilcisteína</b>	<b>8890</b>	<b>9390</b>
Dialildisulfuro	145	1303
Alicina	309	363

Fuente: Herrera-Mundo *et al.*, 2009.

La SAC se absorbe en el tracto gastrointestinal y se distribuye en el hígado, bazo, corazón, pulmón, cerebro y riñón, sin embargo, en éste último es en donde se observa la mayor distribución de la SAC, independientemente de la vía de administración (Yan y Zeng, 2005). En el riñón, se metaboliza a N-acetil-S-alilcisteína por la N-acetiltransferasa, para ser eliminada por orina. La vida media de eliminación de la SAC varía dependiendo del tipo de especie, por ejemplo en humanos y perros después de la administración por vía oral es de 10 h, mientras que en ratas es de 3 h (Yan y Zeng, 2005; Amagase, 2006; Herrera-Mundo *et al.*, 2009; Iciek *et al.*, 2009).

En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que la SAC protege contra el daño oxidante inducido en varios modelos experimentales, de tal forma que se le ha asociado con efectos neuroprotectores, hepatoprotectores, cardioprotectores y renoprotectores (Segoviano-Murillo *et al.*, 2008; Herrera-Mundo *et al.*, 2009).

La protección contra el daño oxidante se debe a que la SAC atrapa diversas especies reactivas (Tabla 3) previniendo la oxidación de lípidos y proteínas. Además, aumenta los niveles de GSH y la actividad GPx y CAT en hígado y riñón (Medina-Campos *et al.*, 2007; Herrera-Mundo *et al.*, 2009; Colín-González *et al.*, 2012). La SAC al atrapar al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede inhibir la activación de NF-κB implicado en la regulación de la transcripción de genes involucrados en la apoptosis (Borek, 2001; Banerjee *et al.*, 2003; Amagase, 2006; Cruz *et al.*, 2007).

**Tabla 3.** Especies reactivas que atrapa la SAC

Especie reactiva	IC <sub>50</sub> (mM)
Anión superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )	14.5 ± 1.67
Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	68.0 ± 1.92
Radical hidroxilo (•OH)	0.68 ± 0.06
Ácido hipocloroso (HOCl)	2.86 ± 0.15
Oxígeno singulete ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )	1.93 ± 0.27
Peroxinitrito (ONOO <sup>-</sup> )	0.80 ± 0.05

Valores promedio ± EEM, n=4-10.

Fuente: Herrera-Mundo *et al.*, 2009.

En la tabla 4 se muestra la actividad antioxidante de la SAC en diferentes modelos experimentales.

**Tabla 4.** Actividad antioxidante de la SAC en diferentes modelos experimentales

Dosis de SAC	Modelo experimental	Efecto protector
100, 300 y 600 mg/kg, i.p	Isquemia cerebral focal en ratas	Disminuye lipoperoxidación (Numagami y Ohnishi, 2001).
250 mg/kg, i.p durante 4 d	Daño renal por gentamicina en ratas	Atrapa $O_2^{\bullet-}$ , $H_2O_2$ y mantiene las actividades de Mn-SOD, GPx y GR en la corteza renal (Maldonado <i>et al.</i> , 2003-b).
200 mg/kg, i.p durante 30 d	Nefrectomía 5/6	Atrapa $O_2^{\bullet-}$ , $ONOO^-$ ; inhibe expresión de iNOS y previene la activación de NF- $\kappa$ B (Cruz <i>et al.</i> , 2007).
100 mg/kg, i.p	Isquemia-reperfusión	Disminuye el daño histológico y la peroxidación de lípidos (Segoviano-Murillo <i>et al.</i> , 2008).
100 mg/kg i.p durante 3 d	Daño hepático por $K_2Cr_2O_7$ en ratas	Disminuye lipoperoxidación y daño histológico, aumenta actividad SOD, GPx, GST y CAT e induce expresión de Nrf2 (Kalayasaran <i>et al.</i> , 2008).
30 mg/kg, i.p durante 15 d	Neurodegeneración con estreptozotocina en ratones	Disminuye lipoperoxidación y aumenta los niveles de GSH y la actividad de GPx y GR (Javed <i>et al.</i> , 2011).
150 mg/kg, v.o durante 45 d	Diabetes inducida con estreptozotocina en ratas	Disminuye lipoperoxidación, aumenta niveles de GSH y la actividad de SOD, CAT y GPx (Saravanan y Ponmurugan, 2011).
0.5 y 1 g/L durante 70 d	Nefropatía diabética en ratones	Previene activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de iNOS. (Mong y Yin, 2012).

Mn-SOD (Manganeso-Superóxido dismutasa), GPx (Glutación peroxidasa), GR (Glutación reductasa), iNOS (Sintasa de óxido nítrico inducible).

---

---

## 1.4 Estrés oxidante y antioxidantes

El estrés oxidante se define como el desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los antioxidantes celulares a favor de los oxidantes. Las ERO se producen de manera natural en la mitocondria, retículo endoplásmico, peroxisomas y lisosomas por la reducción parcial del oxígeno (Small *et al.*, 2012).

La reducción del oxígeno en la cadena de transporte de electrones es esencial para la función celular, sin embargo, los complejos que la conforman son sitios de generación de ERO, las cuales en conjunto con las especies reactivas de nitrógeno (ERN), pueden conducir un estado de estrés (Konigsberg, 2008; Small *et al.*, 2012).

Para correlacionar la intensidad y el grado de afectación en la salud, el proceso de estrés oxidante puede dividirse en tres etapas de evolución: adaptación, agudo y crónico (Morales *et al.*, 2009; Small *et al.*, 2012).

- 1) Adaptación: Es la respuesta de la célula para equilibrar daño oxidante mediante procesos de sobreexpresión génica y la activación enzimática.
- 2) Agudo: El daño oxidante está mediado por ERO menos reactivas como  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ , moléculas que en concentraciones y actividades controladas tienen una importante participación fisiológica, pero que al generarse en alta proporción pueden afectar las características de procesos intracelulares vitales como el control del tono vascular, apoptosis, crecimiento y diferenciación celular.
- 3) Crónico: El daño oxidante está mediado en su totalidad por  $\bullet OH$ . Se manifiesta por la modificación de biomoléculas con la consecuente liberación de moléculas altamente reactivas, amplificando y propagando el daño que se manifiesta en células y tejidos.

La protección celular contra la toxicidad oxidante está dada por los antioxidantes, los cuales son sustancias capaces de prevenir, retardar o remover el daño oxidante a una molécula blanco.

De acuerdo a su mecanismo de acción, los antioxidantes se pueden clasificar en directos e indirectos. Los antioxidantes directos, son compuestos de bajo peso molecular como el glutatión, tocoferoles y ácido lipoico, que participan directamente en las reacciones de óxido-reducción eliminando las ERO y ERN. Los antioxidantes indirectos son compuestos que inducen la expresión de enzimas citoprotectoras de fase II, éstas protegen a las células contra el daño generado por el estrés oxidante (Dinkova-Kostova y Talalay, 2008; Jung y Kwak, 2010). En la tabla 5 se describen las reacciones de algunas de estas proteínas.

**Tabla 5.** Proteínas citoprotectoras de fase II

Proteína	Función protectora
Glutatión S-transferasa	Conjuga electrófilos, reduce oxidantes y peróxidos.
$\gamma$ -Glutamylcistein ligasa	Cataliza la reacción limitante de la síntesis de GSH
Glutatión reductasa	Regenera GSH a partir de GSSG
Tiorredoxina reductasa	Regenera tiorredoxina reducida.
NADPH quinona oxidoreductasa	Previene el ciclo redox de las quinonas, disminuye el nivel de las quinonas electrofílicas y mantiene a la coenzima Q en su forma reducida.
Hemo oxigenasa-1	Genera bilirrubina
Glutatión peroxidasa	Descompone peróxidos
Catalasa	Descompone H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Peroxirredoxina	Descompone H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Superóxido dismutasa	Convierte O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Tiorredoxina	Reduce diversos compuestos
Ferritina	Almacena hierro

La expresión de enzimas citoprotectoras de fase II está regulada por el sistema Keap1/Nrf2/ARE. El Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived-2) like 2; NF-E2) se expresa de manera constitutiva en todas las células, su actividad está altamente regulada y se encuentra en el citoplasma como un complejo inactivo a través de la interacción con

---

---

Keap1 (Kelch ECH associating protein 1). Bajo condiciones de estrés dicho complejo se disocia y permite la traslocación nuclear de Nrf2, en donde se dimeriza con Maf (muscle aponeurotic fibrosarcoma) y se asocia con ARE (antioxidant response element) situada dentro de las regiones promotoras del conjunto de genes de defensa celular (Nguyen *et al.*, 2004; Konisgberg, 2007; Coople, 2012).

## **1.5 Riñón**

Es un órgano par situado sobre la parte posterior de la cavidad abdominal, uno a cada lado de la columna vertebral entre la duodécima vértebra dorsal y la tercera lumbar. Cada riñón está irrigado por una arteria renal; su sistema venoso se une progresivamente para formar las venas radiales que confluyen en la vena renal. La superficie externa del riñón se encuentra recubierta por una cápsula; al corte se identifican dos componentes, la corteza de apariencia granular por la presencia de los glomérulos y los túbulos contorneados y la médula de apariencia estriada debido al curso paralelo de la porción ascendente de las asas de Henle y de los túbulos colectores (Kaplan y Pesce, 1990; Sherwood, 2011; Vélez *et al.*, 2012) (Figura 2).

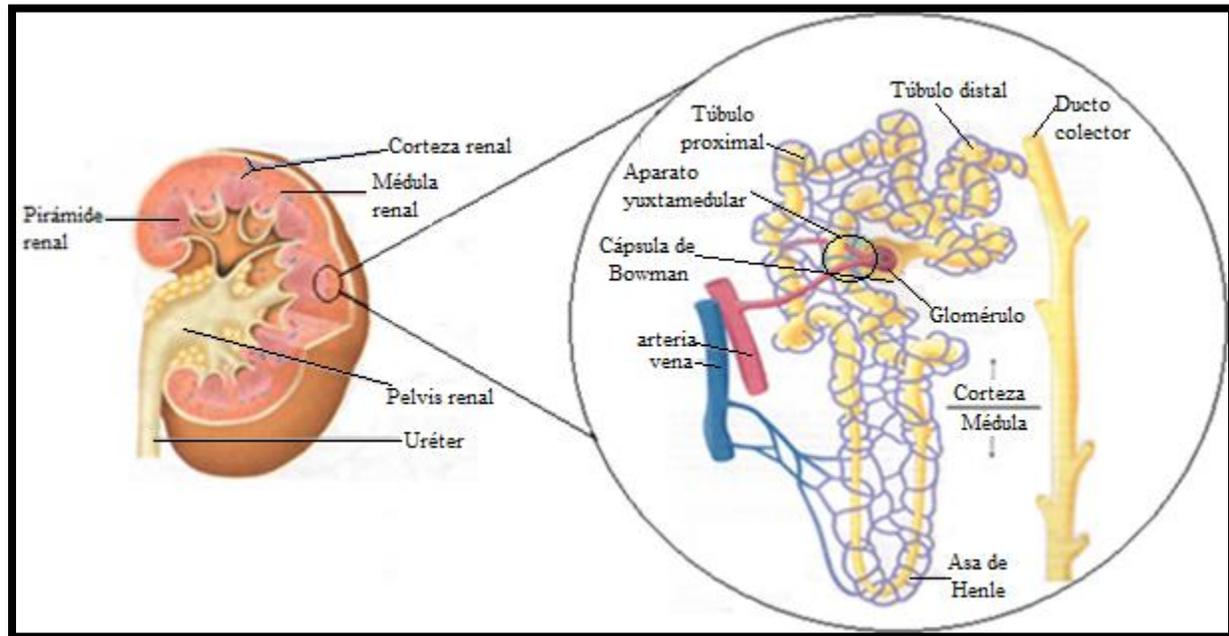
La unidad anatómica y funcional del riñón es la nefrona, cada uno tiene entre 600,000 y 1,200 000 nefronas. Se clasifican en superficiales, mesocorticales y yuxtamedulares dependiendo de su localización y de la longitud de las asas de Henle. La nefrona está constituida por dos componentes: el corpúsculo renal y el túbulo renal. El corpúsculo renal contiene las unidades estructurales vasculares y epiteliales del glomérulo renal, la arteriola aferente y la cápsula de Bowman, respectivamente. Los túbulos renales son un sistema que comprende: el túbulo proximal, el asa de Henle y el túbulo distal. Cada porción tiene características morfológicas diferentes para realizar funciones específicas (Sherwood, 2011; Vélez *et al.*, 2012).

El túbulo proximal está conformado por dos porciones, el túbulo contorneado proximal localizado en la corteza y el túbulo recto proximal que desciende a la médula conformando el primer segmento del asa de Henle, con el microscopio electrónico se

---

---

pueden identificar los túbulos proximales y distales, éstos últimos tienen escasas microvellosidades en su superficie (Vélez *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Corte longitudinal del riñón mostrando las principales estructuras anatómicas y los componentes de la nefrona. Adaptación Sherwood, 2011.

El riñón regula el medio interno del organismo para mantenerlo en un estado constante de equilibrio. Dentro de sus funciones están:

1. Formación de orina.
2. Regulación del equilibrio hidroelectrolítico.
3. Regulación del equilibrio ácido-base.
4. Excreción de los productos de desecho.
5. Función hormonal.

Al interrumpirse las funciones regulatorias y excretoras de los riñones para mantener la homeostasis, se presenta una insuficiencia renal; las principales causas de esta

---

---

patología son los agentes tóxicos, respuesta inmune inapropiada, obstrucción del flujo urinario y abastecimiento insuficiente de sangre renal.

### **1.6 Insuficiencia renal aguda**

El riñón es susceptible a desarrollar diversas formas de lesiones por ser el órgano encargado de eliminar los fármacos y toxinas exógenas. En general son reversibles si se detectan en las primeras etapas, sino pueden ser permanentes lo cual conduce a una enfermedad renal (Bhadauria, 2012).

La toxicidad renal se debe a que éste metaboliza algunos agentes xenobióticos, generando compuestos que pueden dañar a la nefrona. Se considera nefrotóxico a toda sustancia que produzca una lesión demostrable sobre cualquier estructura del riñón, en este grupo se encuentran algunos antibióticos, medicamentos de contraste, antineoplásicos, anestésicos, inmunosupresores, diuréticos, metales pesados y disolventes (Bhadauria, 2012; Vélez *et al.*, 2012).

La insuficiencia renal es la pérdida total o parcial de la capacidad renal para mantener la homeostasis, puede ser aguda o crónica. La insuficiencia renal aguda (IRA) es un síndrome clínico secundario a múltiples etiologías, se caracteriza por un deterioro rápido de la función renal con una reducción de por lo menos el 50% de la tasa de filtración glomerular, que ocurre en un lapso de días a semanas y la afectación sistémica altera la capacidad de los riñones para excretar la carga de solutos que debe ser eliminada del organismo (Molitoris, 2001; Sherwood, 2011; Vélez *et al.*, 2012).

La IRA se clasifica de acuerdo al factor funcional alterado en: pre-renal (reducción en la tasa de filtración glomerular debida a la disminución del flujo sanguíneo del riñón), renal (fallo en las estructuras renales) y post-renal (obstrucción de las vías urinarias) (Molitoris, 2001). Su distribución porcentual es de 55-60% para la pre-renal, 35-40% renal y <5% para post-renal; dentro de la pre-renal el 90% es causado por isquemia o nefrotoxicidad (Vélez *et al.*, 2012).

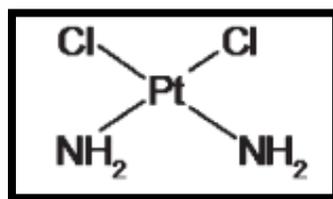
---

---

La incidencia de la IRA es frecuente, del 2-5% de todos los pacientes ingresados en los hospitales la presentan y el índice de mortalidad es del 40-50%. La IRA es un trastorno usualmente asintomático, por lo cual el diagnóstico se hace con base en los exámenes de laboratorio. Las pruebas de mayor utilidad para evaluarla son: creatinina sérica, nitrógeno ureico en sangre (BUN, Blood Urea Nitrogen), uroanálisis, tasa de filtración glomerular, microalbuminuria, depuración de creatinina y proteinuria (Vélez *et al.*, 2012). La condición de IRA se diagnostica con elevaciones de creatinina de 0.5 mg/dL a 1mg/dL y BUN >20mg/dL (Molitoris, 2001; Sherwood, 2011; Vélez *et al.*, 2012).

### 1.7 Cisplatino

El CIS (*cis*-diaminodicloroplatino II) (Figura 3), es un fármaco antineoplásico utilizado para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer: vejiga, pulmón, estómago, útero y testículos. Su uso clínico se aprobó por la FDA desde 1978, sin embargo, se ha limitado su aplicación debido a que del 25-35% de los pacientes tratados con CIS desarrollan daño renal. La terapia antitumoral con CIS además de inducir la nefrotoxicidad puede causar ototoxicidad, gastrotoxicidad, neurotoxicidad y hepatotoxicidad (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009; Miller *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2012; Sancho-Martínez *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Estructura del cisplatino

---

---

De acuerdo al tipo de tumor y la utilización de otros antineoplásicos se establece la dosis de CIS a administrar, generalmente comprende de 50-100 mg/m<sup>2</sup> en una sola administración o dividida entre 2-5 días, repitiéndose los ciclos cada tres semanas. Si se administra con otros antineoplásicos, la dosis puede reducirse a 20-30 mg/m<sup>2</sup> (Ramón-López *et al.*, 2012).

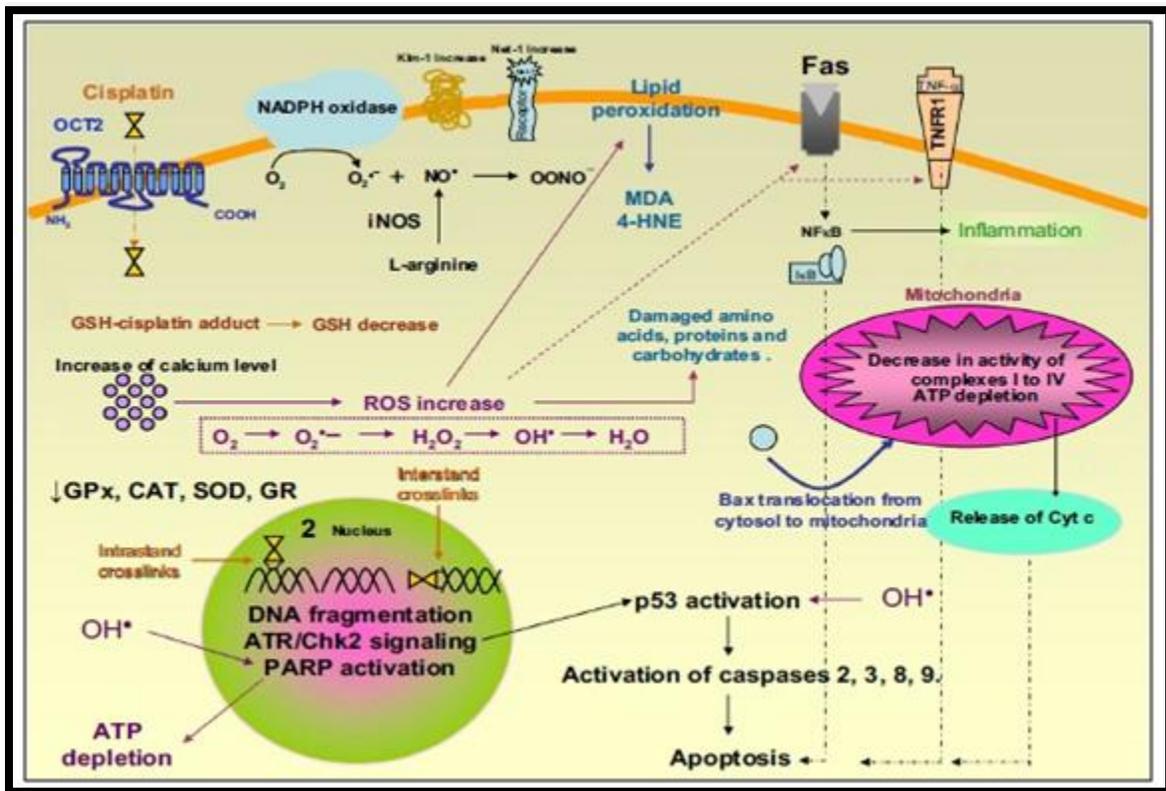
Con las dosis habitualmente empleadas en la clínica, el CIS se administra por vía intravenosa con solución salina y se distribuye rápidamente en hígado, riñón, músculo, testículos, páncreas, bazo, corazón, pulmón y cerebro. El CIS se elimina principalmente por los riñones en las primeras horas (15-60%) por filtración glomerular y secreción tubular, seguida de una excreción lenta durante los siguientes días (Arany y Safirstein *et al.*, 2003; Ramón-López *et al.*, 2012).

El mecanismo por el cual el CIS produce la nefropatía es complejo e involucra daño al ADN, muerte celular por apoptosis y necrosis, disfunción mitocondrial e inflamación (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010). La nefrotoxicidad inducida por CIS se ha asociado a la producción de ERO y ERN (Dos Santos *et al.*, 2012), inhibición de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GR, GPx y GST (glutación S-transferasa) (Yao *et al.*, 2007; Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009), la alta expresión de los transportadores de cobre 1 (Ctr1) y de cationes orgánicos 2 (OCT2) en riñón (Miller *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2012) y la vía que involucra a la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa y el conjugado de S-cisteína  $\beta$ -liasa (Townsend *et al.*, 2003; Barabas *et al.*, 2008, Launay-Vacher *et al.*, 2008; Pabla y Dong, 2008; Wainford *et al.*, 2008; Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010).

En la figura 4 se presenta el mecanismo de nefrotoxicidad del CIS, el cual ingresa en el riñón a través de los transportadores Ctr1 y Oct2, localizados principalmente en las células del túbulo proximal (Arany y Safirstein, 2003; Yao *et al.*, 2007; Pabla y Dong, 2008; Miller *et al.*, 2010). En el interior de las células se bioactiva al hidrolizarse uno o dos Cl<sup>-</sup>, dando lugar a la especie con carga positiva, la cual reacciona con ADN formando enlaces covalentes con las purinas (principalmente en la posición N<sup>7</sup>) produciendo un entrecruzamiento intracatenario y subsecuentemente provoca una falla

en la replicación y transcripción, resultando eventualmente en apoptosis. Además del daño al ADN, el CIS también puede interactuar con ARN, proteínas y fosfolípidos (Barabas *et al.*, 2008; Dos Santos *et al.*, 2012).

Asimismo el CIS forma aductos con GSH, aumenta los niveles de calcio intracelular que genera la producción de ROS, las cuales a su vez inducen la actividad de la NADPH oxidasa (NOX). El CIS forma de manera espontánea aductos con GSH, éstos a través de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa y aminopeptidasas producen conjugados que se transportan a las células del túbulo proximal en donde se metabolizan a tioles altamente reactivos (Townsend *et al.*, 2003; Wainford *et al.*, 2008; Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009; Miller *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Mecanismo de acción del cisplatino

Fuente: Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009.

---

---

## **2. Justificación**

La terapia antitumoral con CIS induce la nefrotoxicidad, asociada a las ERO producidas, inhibición de las enzimas antioxidantes, disfunción mitocondrial y muerte celular. En diversos modelos experimentales se ha demostrado la actividad antioxidante de la SAC de tal forma que se le asocia como un agente nefroprotector. En el presente estudio se pretende evaluar si este antioxidante atenúa la nefrotoxicidad inducida por CIS en ratas.

## **3. Hipótesis**

La SAC a través de su efecto antioxidante directo e indirecto atenuará el estrés oxidante y la insuficiencia renal inducida por CIS en ratas.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

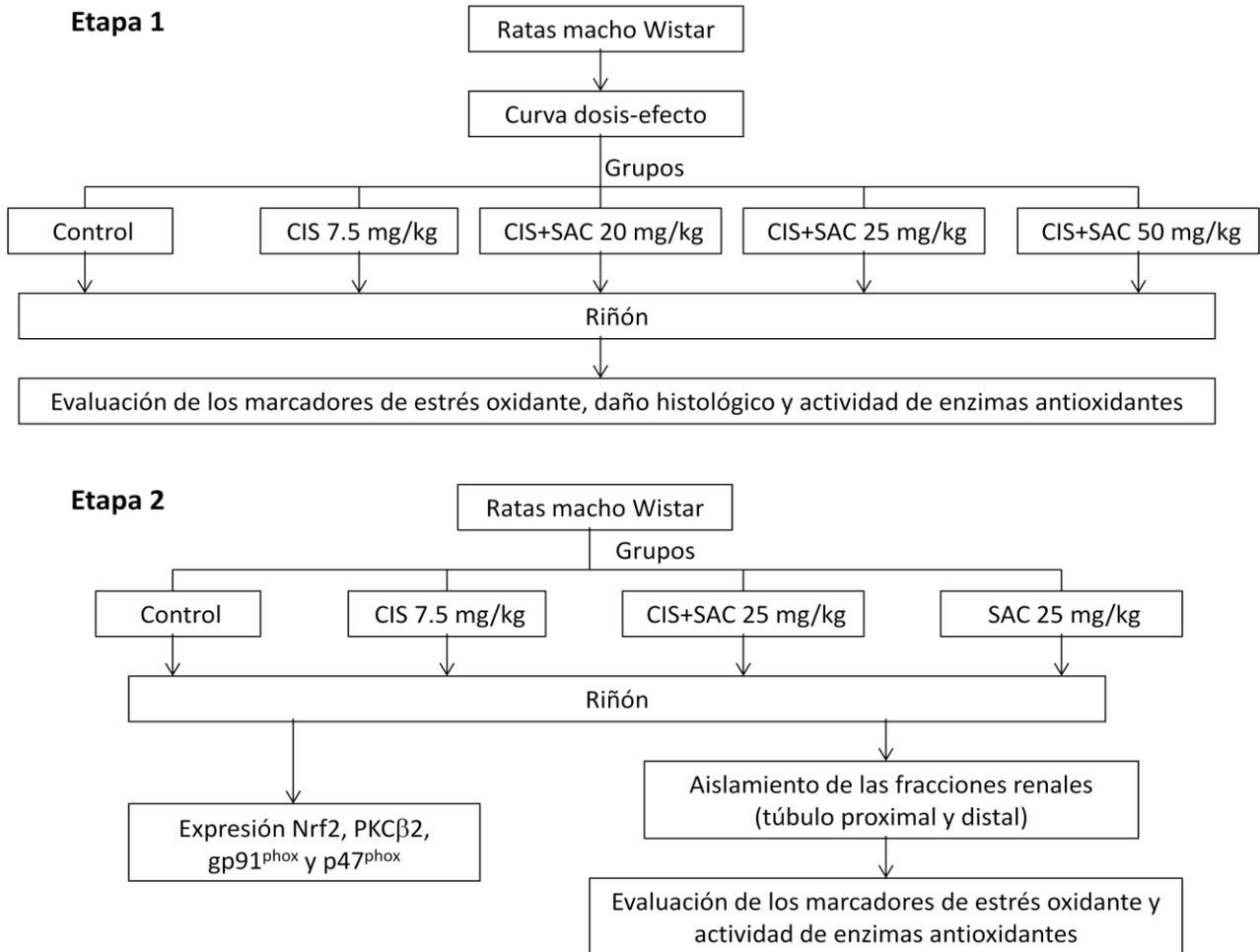
Evaluar el efecto nefroprotector de la SAC en la disfunción renal y el daño oxidante inducido por CIS en ratas.

### **4.2 Objetivos particulares:**

- Determinar las dosis de SAC que disminuyan los marcadores de daño renal en plasma en las ratas tratadas con CIS.
- Evaluar el efecto del CIS y la SAC en los marcadores de daño tubular, estrés oxidante, actividad de enzimas antioxidantes y daño histológico.
- Estimar la expresión de Nrf2, PKC $\beta$ 2, gp91<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> en la corteza renal de las ratas tratadas con CIS y SAC.
- Evaluar en las fracciones renales (túbulo proximal y túbulo distal) el efecto protector de la SAC en los marcadores de estrés oxidante y la actividad de enzimas antioxidantes.

## 5. Diseño experimental

El diseño experimental se dividió en dos etapas (Figura 5), en ambas se utilizaron ratas macho Wistar con un peso inicial de 200-220 g. Durante el estudio los animales se mantuvieron en condiciones controladas de luz/oscuridad (12 h x 12 h), con alimento y agua *ad libitum*. El diseño experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Química, UNAM (FQ/CICUAL/062/13) y se llevaron a cabo las disposiciones que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 en el cuidado y uso de los animales de laboratorio.



**Figura 5.** Diagrama general del diseño experimental

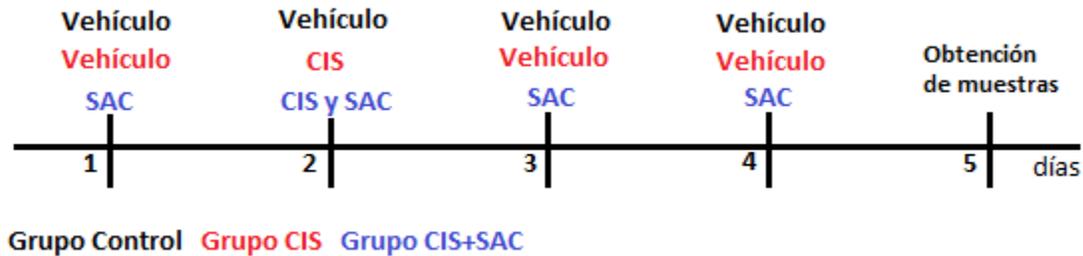
---

---

## Etapa 1

En la primera etapa del estudio se realizó una curva dosis-efecto para determinar la dosis de SAC que ejerce un efecto protector contra el daño inducido por una dosis única de CIS (7.5 mg/kg). Los animales se dividieron en 11 grupos, el esquema de tratamiento se describe a continuación y se presenta en la Figura 6.

- Grupo Control: solución salina isotónica al 0.9% (vehículo, i.p) durante 4 días.
- Grupo CIS: dosis única de CIS (7.5 mg/kg, i.p) en el día 2 del estudio y administración de vehículo durante los días 1, 3 y 4 del estudio.
- Grupo CIS+SAC: En el día 1, dos dosis de SAC fueron administradas en un intervalo de 2 h. En el segundo día, 1 h antes y después de la dosis de CIS, SAC fue administrada. El tercer y cuarto día se realizó una dosificación de SAC. Las dosis de SAC ensayadas fueron: 6.25, 12.5, 15, 20, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/kg p.c, i.p.



**Figura 6.** Esquema de administración de la etapa 1

En el día 5 del estudio (72 h después de la administración de CIS), los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p) para obtener la sangre a través de la aorta utilizando una jeringa y una aguja #18 con heparina. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 min a 3,000 g para obtener el plasma y se almacenaron a -40°C hasta su análisis. Ambos riñones se removieron para realizar los estudios histológicos, determinar el estrés oxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes.

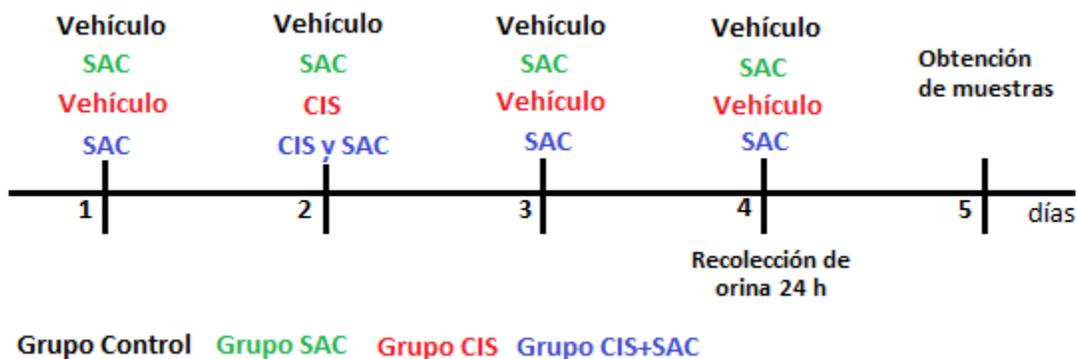
---

---

## Etapa 2

La dosis de 25 mg/kg de SAC se utilizó para determinar la expresión de Nrf2, PKC $\beta$ 2, gp91<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> en la corteza renal por Western Blot y aislar las fracciones renales para determinar en ellas los marcadores de estrés oxidante y la actividad de enzimas antioxidantes. El esquema de tratamiento es el utilizado en la primera etapa y se incluyó el grupo SAC 25 mg/kg.

En el día 4 del estudio se recolectó la orina durante 24 h, como se muestra en el esquema de la Figura 7, para determinar la depuración de creatinina y la proteinuria. En el día 5 se obtuvieron las muestras de sangre como se describe anteriormente y se removieron ambos riñones para los análisis por Western Blot y el aislamiento de las fracciones renales.



**Figura 7.** Esquema de administración de la etapa 2

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1 Materiales

Para la determinación de urea, creatinina plasmática y proteína se utilizaron estuches comerciales. La SAC fue sintetizada por la reacción de L-cisteína con bromuro de alilo y purificada por recristalización con etanol-agua (Maldonado *et al.*, 2003-b). El CIS [Cis-Diaminodicloroplatino (II)] Lote MKBG8465V, albúmina sérica bovina, p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminido, p-nitrofenol (PNP), 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB), glutatión oxidado (GSSG), glutatión reducido (GSH), dimetilsulfóxido (DMSO),

---

---

nicotidamina adenina dinucleótido fosfato (NADPH), sulfato de estreptomicina, guanidina-HCl, 1-metil-2-fenilindol, dinitrofenilhidrazina (DNPH), tetrametoxipropano (TMPO) glucosa, alanina, Percoll®, glutatión S-transferasa de hígado de caballo, colagenasa tipo 1 de *Clostridium histolyticum*, glutatión reductasa de levadura, anticuerpos anti-Nrf2, anti-PKC $\beta$ 2, anti-gp91<sup>phox</sup> y anti-p47<sup>phox</sup> de conejo se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se adquirieron de JT Baker (Xalostoc, Edo. México, México). Los demás reactivos utilizados son de grado analítico y se encuentran comercialmente disponibles.

## **6.2 Preparación de los homogenados de riñón**

Las muestras de tejido se homogeneizaron con un politrón (modelo PT 2000, Brikmann) en un amortiguador de fosfatos frío 50 mM, pH 7.0. Los homogenados se centrifugaron a 19,000 g a 4 °C durante 30 min para separar el sobrenadante. Posteriormente, se procedió a la determinación de las proteínas totales por el método de Lowry (Lowry, 1951), los marcadores de estrés oxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes.

## **6.3 Aislamiento de fracciones renales**

Las muestras de tejido se descapsularon para separar la corteza y la médula. Se realizaron cortes de 2 mm a la corteza obtenida y se lavaron con solución Ringer Krebs bicarbonato (RKB). Posteriormente se resuspendieron con una solución de colagenasa I, se centrifugaron a 1,300 g y se realizaron cuatro lavados con la solución RKB. Al final del último lavado se resuspendieron con solución de Percoll y se centrifugaron a 20,000 g a 4 °C durante 40 min. En el gradiente obtenido se separaron los túbulos distales y túbulos proximales (Vinay *et al.*, 1981), en donde se determinó la proteína total por el método de Lowry, los marcadores de estrés oxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes.

En los anexos 1 y 2 se presentan las imágenes de las fracciones aisladas y las actividades enzimáticas de fosfatasa alcalina (ALP), NAG, (localizadas principalmente

---

---

en túbulo proximal), lactato deshidrogenasa (LDH) y aspartato aminotransferasa (AST) representativas del túbulo distal.

Las enzimas ALP, LDH y AST se determinaron por espectrofotometría empleando estuches comerciales. Los ensayos se basan en la liberación de PNP y Pi, el incremento de NADH y la disminución de NADH por la formación de malato, respectivamente. La actividad de NAG se determinó por la liberación de PNP.

#### **6.4 Extracción de proteínas totales para Western Blot**

Las proteínas totales se extrajeron de los homogenados de la corteza renal y se colocaron en una solución Krebs-bicarbonato pH 7.4 (KB: 110 mM NaCl, 25 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM KCl, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.7 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM CH<sub>3</sub>COONa, 5.5 mM glucosa, 5 mM alanina, y 0.5 g/L de albúmina). Se realizaron tres lavados en la solución KB fría y se resuspendieron en 10 mL de KB con 0.2 g/100 mL de colagenasa. Las muestras fueron gasificadas con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> al 95 y 5 %, respectivamente, en un baño de agua a 37 °C durante 30 min con agitación. Posteriormente, se añadieron aproximadamente 10 mL de KB frío con un inhibidor de proteasas y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (20 g/mL). Las fibras de colágeno se eliminaron por filtración, y la suspensión del tejido se centrifugó a 18 g por 30 s. Este procedimiento de lavado se repitió tres veces. A continuación el sedimento se resuspendió en solución RIPA pH 7.6 (40 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% de glicerol, 1% Triton X-100, 0.5% de desoxicolato de sodio y 0.2% de SDS). Las muestras se incubaron durante 30 min a 4 °C y posteriormente se agitaron las muestras con un sonicador. Finalmente las muestras se centrifugaron a 14,000 g a 4 °C durante 40 min y en el sobrenadante obtenido se determinó el contenido de proteínas totales utilizando un estuche comercial (Arreola-Mendoza *et al.*, 2009).

#### **6.5 Análisis proteico por Western Blot**

El análisis por Western Blot se realizó de acuerdo a lo descrito por Arreola-Mendoza en 2009. Las membranas de PVDF se dejaron incubando toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios diluidos contra Nrf2 (1:1,000), PKCβ2 (1:1,000), p47<sup>phox</sup> (1:500) y

---

---

gp91<sup>phox</sup> (1:500) y el anticuerpo anti-peroxidasa de conejo (1:5,000). Las inmunotransferencias se desarrollaron utilizando el primer de detección ECL™ (Amersham™, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). La quimioluminiscencia se detectó en un sistema de imagen EC3 (UVP Bioluminescence Systems, Cambridge, Reino Unido). La densidad de la banda de proteína se cuantificó por densitometría de transmitancia (software Image J).

## 6.6 Evaluación de la función renal

- a) **Creatinina.** Su determinación en plasma y en orina se realizó mediante un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Jaffé (Slot, 1965), empleando un estuche comercial. La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo que absorbe a 492 nm. Los resultados se expresaron como mg de creatinina/dL.
- b) **Depuración de creatinina.** Se calculó con los resultados obtenidos en plasma y en orina y el volumen urinario recolectado por 24 h. Los resultados se expresaron en mL/min.
- c) **Nitrógeno ureico en sangre (BUN, Blood Urea Nitrogen).** Se determinó empleando un estuche comercial. La urea presente en la muestra reacciona con *o*-ftalaldehído en medio ácido originando un complejo colorido que absorbe a 510 nm. Los resultados se expresaron en mg/dL.
- d) **Proteinuria.** La excreción de proteínas totales se determinó por el método de Bradford. Los resultados se expresaron como mg proteína/24 h.
- e) **Actividad de glutatión peroxidasa (GPx) en plasma.** Se midió indirectamente a través de una reacción acoplada con GR y NADPH. Los resultados se expresaron en U/mL, donde una unidad (U) se define como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu$ mol de NADPH por minuto (Lawrence y Burk, 1976).
- f) **Actividad de N-acetil- $\beta$ ,D-glucosaminidasa (NAG).** El PNP liberado por la NAG a partir del sustrato *p*-nitrofenil-N-acetil- $\beta$  D-glucosaminido se midió por espectrofotometría a 405 nm. Los resultados se expresaron como U/mg proteína,

---

---

donde U es la cantidad de enzima que libera 1 nmol de PNP por minuto (Jung *et al.*, 1991).

### 6.7 Daño histológico

Para evaluar las alteraciones estructurales tisulares las muestras de tejido renal se fijaron en 10% de formalina disuelta en PBS pH 7.4, gradualmente se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes de 4  $\mu\text{m}$  para teñirlos con hematoxilina y eosina (H&E). Se tomaron fotografías de los cortes y se utilizó el software Leica QWin (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, RU) para analizar las imágenes y cuantificar el daño estructural. Para el perfil histológico se seleccionaron 20 túbulos proximales al azar por rata (4 ratas por grupo) y se determinó la superficie del área de las células dañadas en micrones cuadrados ( $\mu^2$ ) y finalmente se calculó el porcentaje de células dañadas por cada túbulo. El aumento que se utilizó para morfometría automatizado fue de 200x (Molina-Jijón *et al.*, 2011).

### 6.8 Estrés oxidante

Se midieron los siguientes marcadores de estrés oxidante:

- a) **Peroxidación lipídica.** El contenido de malondialdehído (MDA) se determinó por método colorimétrico, utilizando una curva estándar de TMPO. El MDA reacciona con el 1-metil-2-fenilindol en acetonitrilo-metanol a 45 °C para formar un cromóforo que absorbe a 586 nm. Los resultados se expresaron como nmol de MDA/proteína (Gérard-Monnier *et al.*, 1997).
- b) **Proteínas oxidadas.** El complejo proteína-hidrazona, que se forma por la reacción de los grupos carbonilo con DNPH, se determinó por espectrofotometría a 370 nm. Los resultados se expresaron como nmol de carbonilo/proteína (Levine *et al.*, 1990).
- c) **Contenido de GSH.** El monoclorobimano se hace reaccionar con GSH por medio de la GST. Los aductos de GSH con monoclorobimano se midieron por espectrofluorometría a una  $\lambda_{\text{excitación}}$  390 nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$  478 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol/proteína}$  (Fernández-Checa y Kaplowitz, 1990).

---

---

## 6.9 Actividad de enzimas antioxidantes

- a) **Catalasa.** Se determinó mediante la cuantificación a 240 nm de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  cada 15 s durante 30 s. Se utilizó la constante de reacción de primer orden ( $k$ ) como la unidad de actividad enzimática de la CAT. Los resultados se expresaron como  $k/\text{proteína}$  (Aebi, 1984).
- b) **Glutación peroxidasa.** Se empleó el mismo método descrito anteriormente para la determinación de esta enzima en plasma, la diferencia es que los resultados se expresaron en U/proteína.
- c) **Glutación reductasa.** Se midió la desaparición de NADPH a 340 nm por la conversión de GSSG a GSH. Los resultados se expresaron como U/proteína, en donde U es igual a un  $\mu\text{mol}$  de NADPH oxidado por minuto (Carlberg y Mannervik, 1975).
- d) **Glutación S-transferasa.** Esta enzima conjuga al GSH con CDNB y dicho conjugado absorbe a 340 nm. La actividad se expresó como U/proteína, en donde U son los nmol de CDNB conjugado por minuto (Habig *et al.*, 1974).

## 6.10 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó para cada determinación utilizando el software Prism 5.0 (GraphPad) comparando las medias a través de un ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

---

---

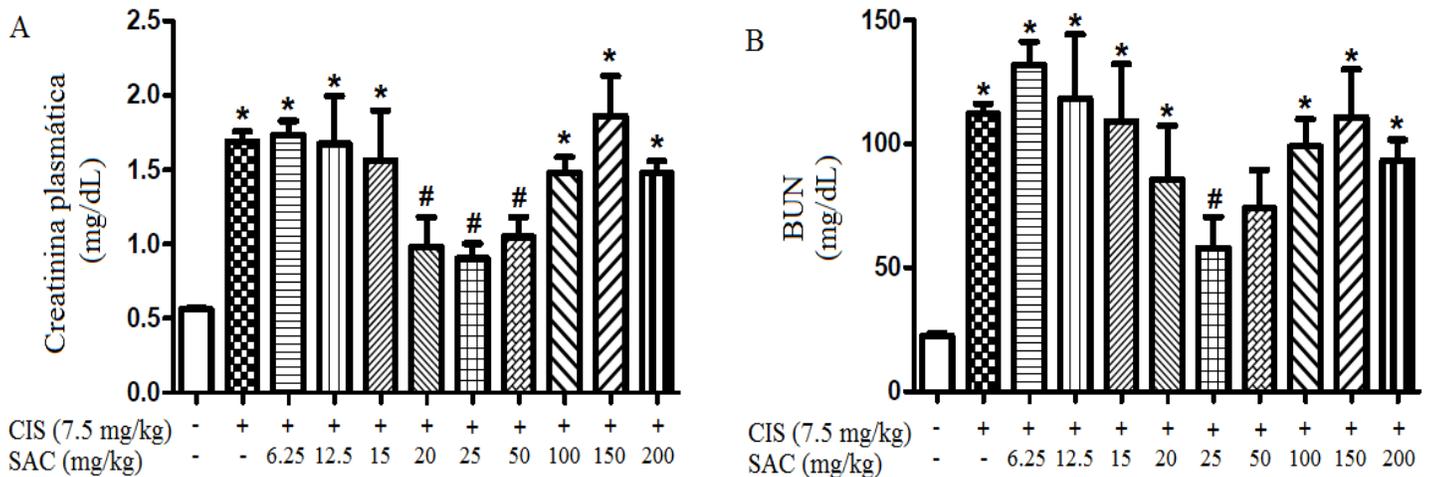
## 7. Resultados

### Primera etapa

#### 7.1 Determinación de la dosis protectora de SAC

Se realizó una curva dosis-efecto con los marcadores de creatinina en plasma y BUN, para determinar la dosis de SAC a la cual se atenúa la insuficiencia renal inducida por una dosis de CIS de 7.5 mg/kg (Figura 8).

Los valores de creatinina en plasma para el tratamiento con las dosis de 20, 25 y 50 mg/kg de SAC fueron menores significativamente con respecto al grupo CIS (Figura 8A), mientras que los valores de BUN disminuyeron sólo de manera significativa con la dosis de 25 mg/kg de SAC (Figura 8B).



**Figura 8.** Marcadores de daño renal en plasma. (A) Creatinina, (B) BUN. Valores promedio  $\pm$  EEM, n=5-11 animales por grupo. \* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  vs. CIS.

Con base en los resultados obtenidos en la curva dosis-efecto, las muestras obtenidas del tratamiento con CIS (7.5 mg/kg) y SAC a las dosis de 20, 25 y 50 mg/kg se utilizaron para evaluar los marcadores de estrés y la actividad de enzimas antioxidantes y así establecer la dosis de SAC que proporciona mayor protección contra el daño inducido por este antineoplásico.

---

---

## 7.2 Efecto del CIS y la SAC en el peso corporal y la proporción del riñón

En la tabla 6 se presenta el peso corporal y la proporción del riñón para los grupos estudiados, siendo significativamente menor el peso corporal de las ratas tratadas con CIS, el cual no se restableció con los tratamientos con SAC. El peso del riñón y la proporción de éste con respecto al peso corporal (% riñón) no presentan diferencias significativas entre grupos.

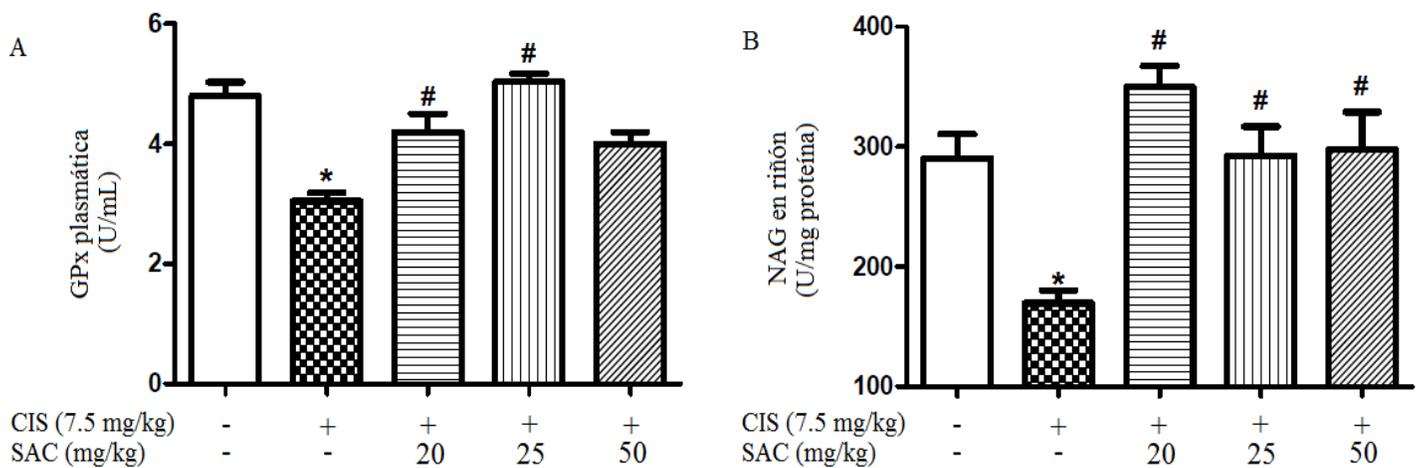
**Tabla 6.** Peso corporal y peso del riñón.

	Control	CIS 7.5 mg/kg	CIS 7.5 mg/kg + SAC		
			20 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
<b>Peso corporal (g)</b>	218.8±5.4	*183.6±5.9	196.6±5.9	*190.3±4.4	*189.3±4.8
<b>Peso riñón derecho (g)</b>	0.83±0.02	0.68±0.04	0.77±0.02	0.75±0.01	0.77±0.03
<b>% Riñón</b>	0.38±0.01	0.37±0.02	0.39±0.02	0.40±0.01	0.41±0.01

Valores promedio ± EEM, n=5-12 animales por grupo. \* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  vs. CIS.

### 7.3 Efecto de la SAC en los marcadores de daño tubular

El tratamiento con una dosis de 7.5 mg/kg de CIS indujo la insuficiencia renal, manifestada con el aumento en los marcadores evaluados (creatinina y BUN) y se corrobora con las actividades de las enzimas GPx plasmática y NAG en riñón (Figura 9). La dosis de 25 mg/kg de SAC aumentó significativamente la actividad de GPx (Figura 9A), mientras la actividad enzimática de NAG fue restaurada por las tres dosis evaluadas (Figura 9B).

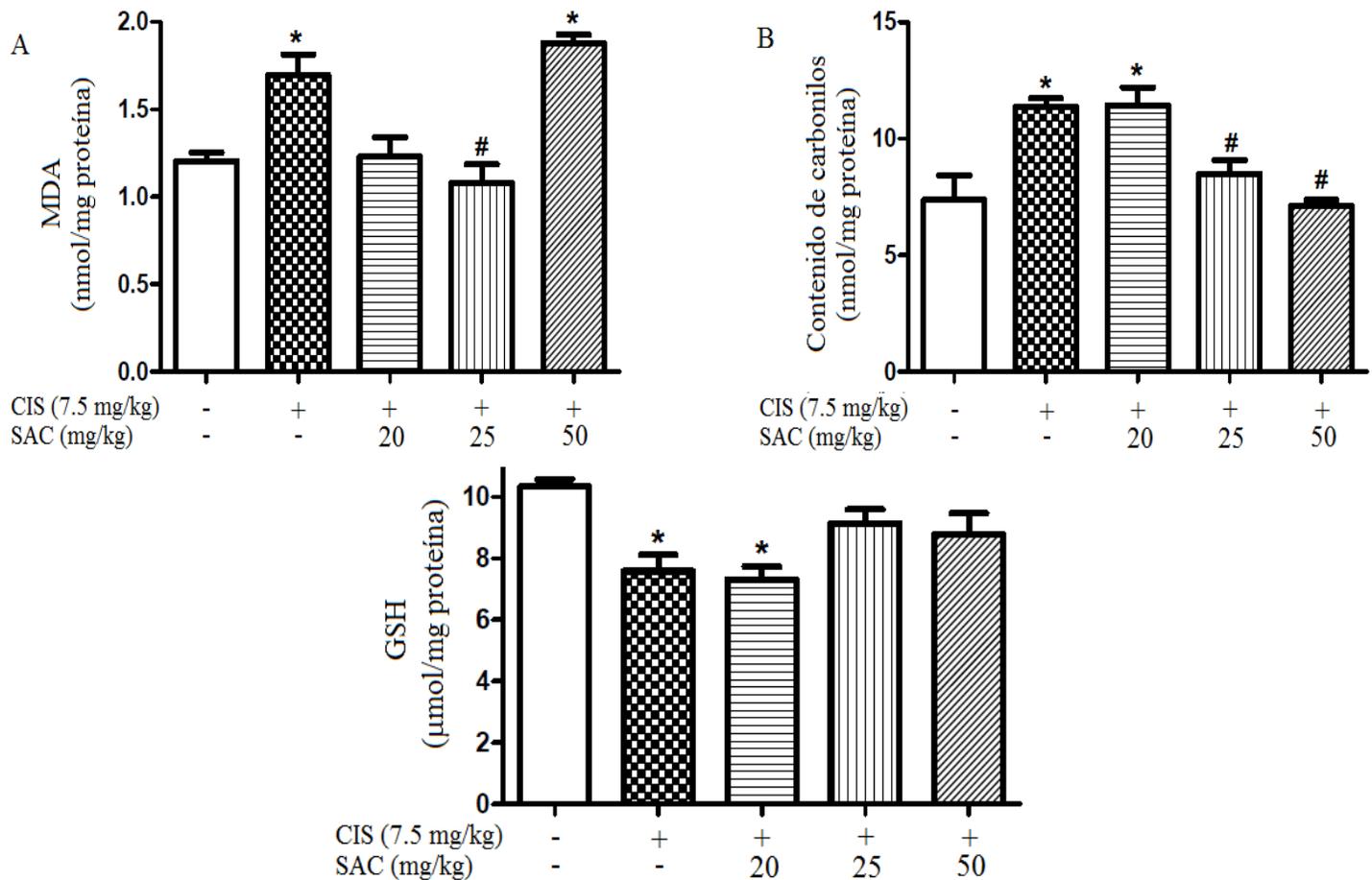


**Figura 9.** Marcadores de daño renal. (A) Actividad de GPx en plasma, (B) Actividad de NAG en riñón. Valores promedio  $\pm$  EEM, n=5-8 animales por grupo.

\* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  vs. CIS

#### 7.4 Efecto de la SAC en el estrés oxidante inducido por CIS

El tratamiento con CIS produce estrés oxidante, el cual se hizo evidente por la oxidación de lípidos, proteínas y la disminución del contenido de GSH (Figura 10). El tratamiento con 25 mg/kg de SAC disminuyó significativamente el contenido de MDA y carbonilos (Figura 10A y 10B) y aumentó el contenido de GSH (Figura 10C), aunque no de manera significativa. Sólo la dosis de 50 mg/kg de SAC disminuyó significativamente el contenido de carbonilos y la dosis de 25 mg/kg aumentó el contenido de GSH sin ser significativo.

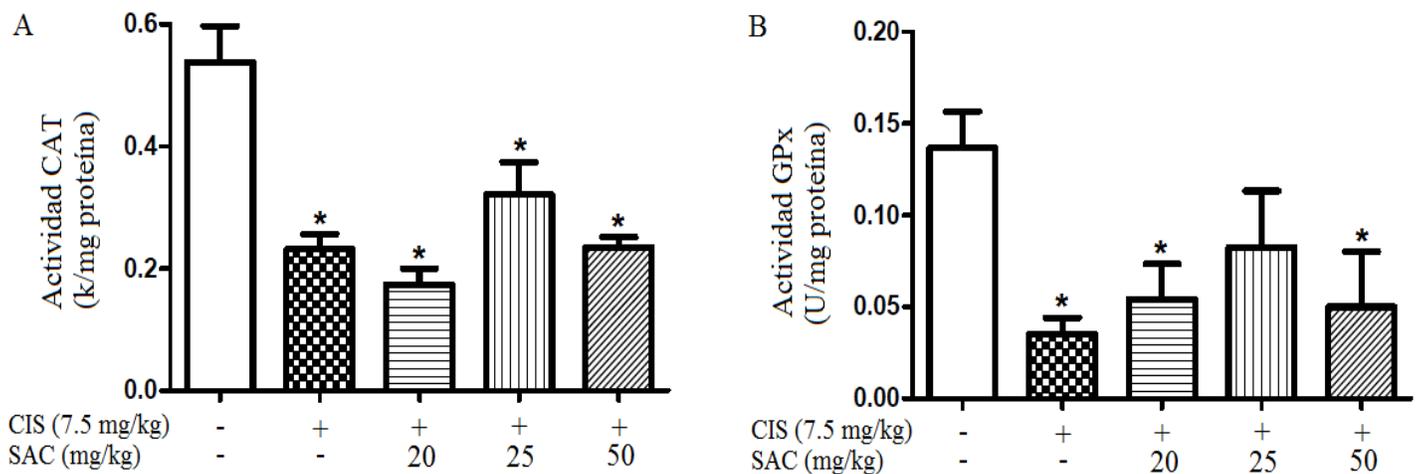


**Figura 10.** Marcadores de estrés oxidante en riñón. (A) MDA, (B) Contenido de carbonilos, (C) GSH. Valores promedio  $\pm$  EEM, n=5-10 animales por grupo.

\* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  vs. CIS.

## 7.5 Efecto del CIS y la SAC en la actividad de las enzimas antioxidantes

La nefrotoxicidad inducida por CIS disminuyó la actividad de las enzimas antioxidantes CAT en 56% (Figura 11A) y GPx en 77% (Figura 11B) con respecto al grupo control. La dosis de 25 mg/kg de SAC aumentó aunque no de manera significativa la actividad de estas dos enzimas (Figura 11).



**Figura 11.** Actividad de enzimas antioxidantes en riñón. (A) CAT, (B) GPx, (C) GST.

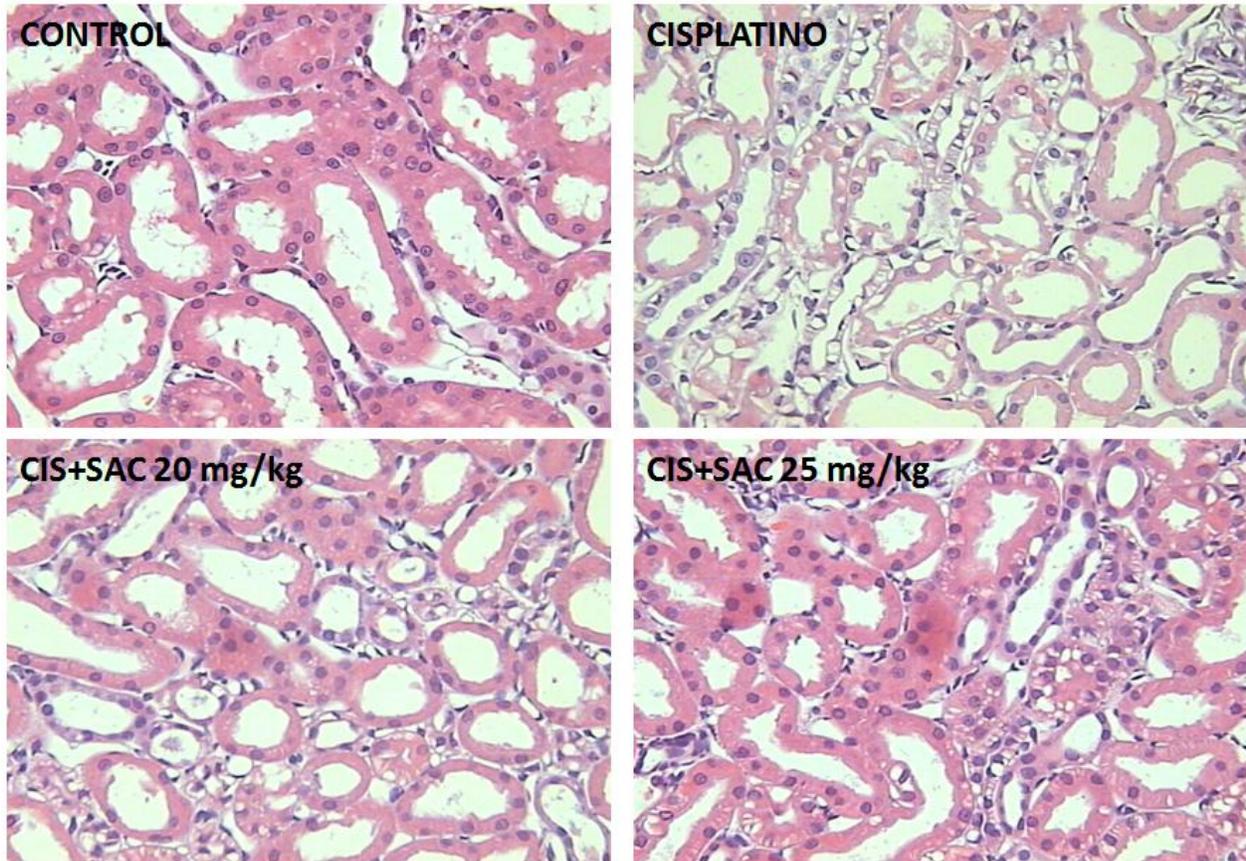
Valores promedio  $\pm$  EEM,  $n=5-8$  animales por grupo.

\* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  vs. CIS.

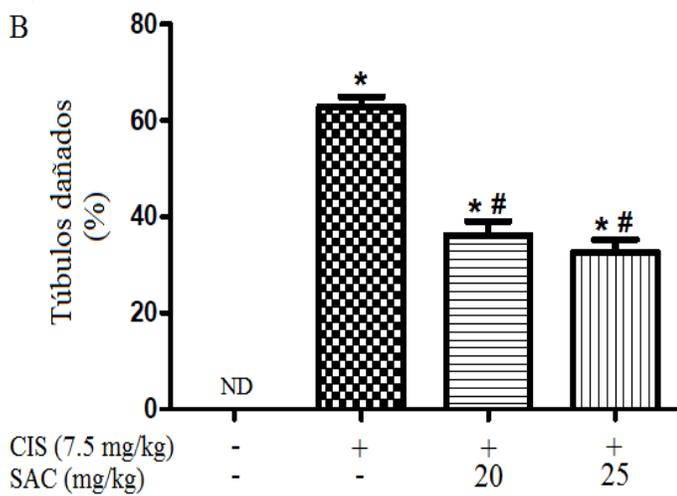
## 7.6 La SAC atenúa el daño histológico inducido por CIS

Imágenes representativas (Figura 12A) y su cuantificación morfométrica se presentan en las Figuras 12B y 12C. El grupo CIS presentó vacuolización citoplasmática extensa, núcleos celulares condensados y desprendimiento de las células epiteliales de los túbulos proximales contorneados, que afecta al  $62.8 \pm 1.8\%$  de la zona tubular (Figura 12B) y  $79.6 \pm 3.9\%$  del área tubular (Figura 12C). En contraste, los animales tratados con CIS+SAC mostraron menor daño, en particular el grupo tratado con CIS+SAC 25 mg/kg. El grupo control no mostró daño tisular.

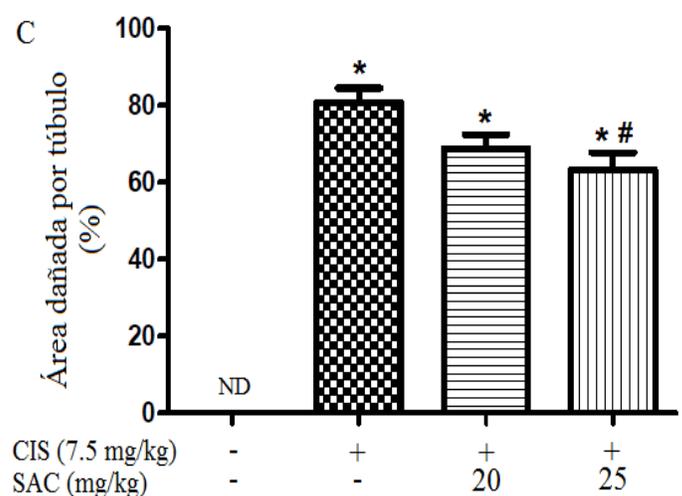
A



B



C



**Figura 12.** Daño histológico. A) Tinción con H&E, B) túbulos dañados, C) área dañada por túbulo. ND (no detectado). Valores promedio  $\pm$  EEM, n=4 animales por grupo.

\* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  vs. CIS.

---

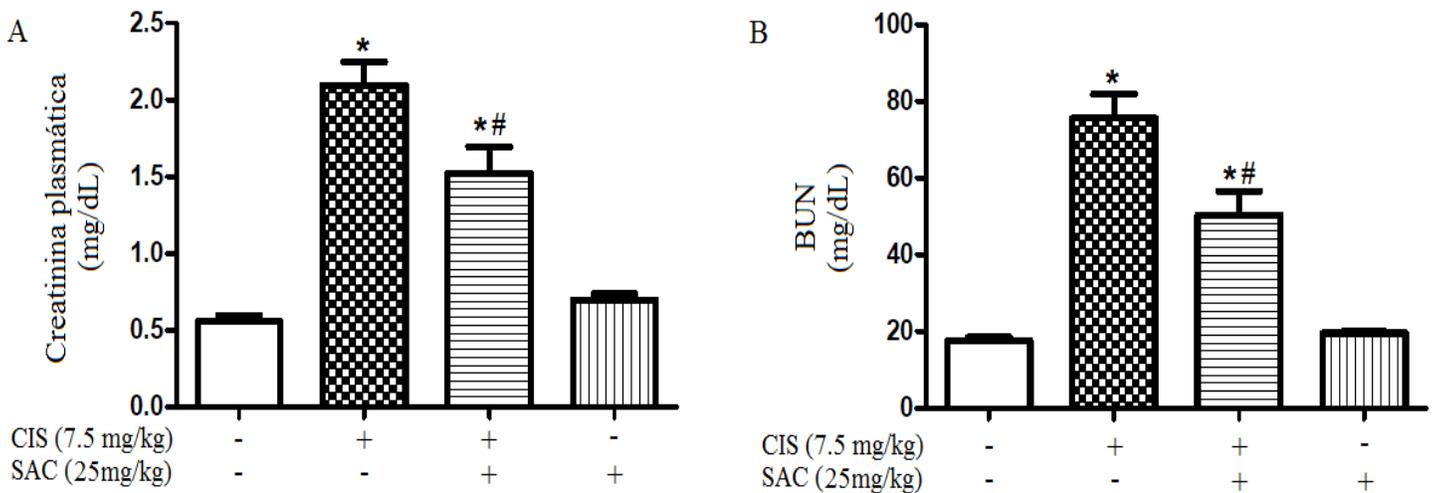
---

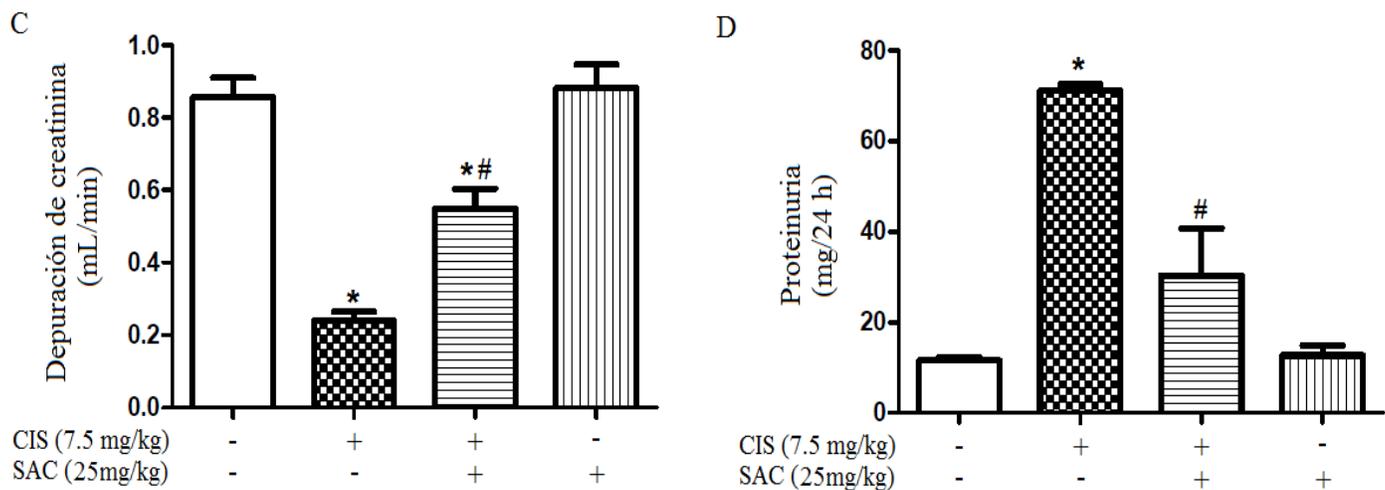
## Segunda etapa

Con base en los resultados obtenidos en la primera etapa, la dosis 25 mg/kg de SAC es la que se utilizó en la segunda etapa del diseño experimental para evaluar la expresión de Nrf2, PKC $\beta$ 2, p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> en la corteza renal y realizar el aislamiento de las fracciones renales (túbulos proximal y distal) para determinar el daño inducido por CIS.

### 7.7 Efecto de la SAC en la función renal

Se evaluaron los marcadores de función renal creatinina en plasma, BUN y depuración de creatinina (Figura 13). El CIS indujo un aumento en los niveles de dichos marcadores en plasma así como la disminución en la depuración de creatinina. El tratamiento con CIS y 25 mg/kg de SAC atenuó dichos cambios (Figura 13A, 13B y 13C). Además se determinó el marcador de función tubular proteinuria, el cual aumenta 7.5 veces en el grupo CIS con respecto al control; el tratamiento con SAC atenuó este aumento (Figura 13D).

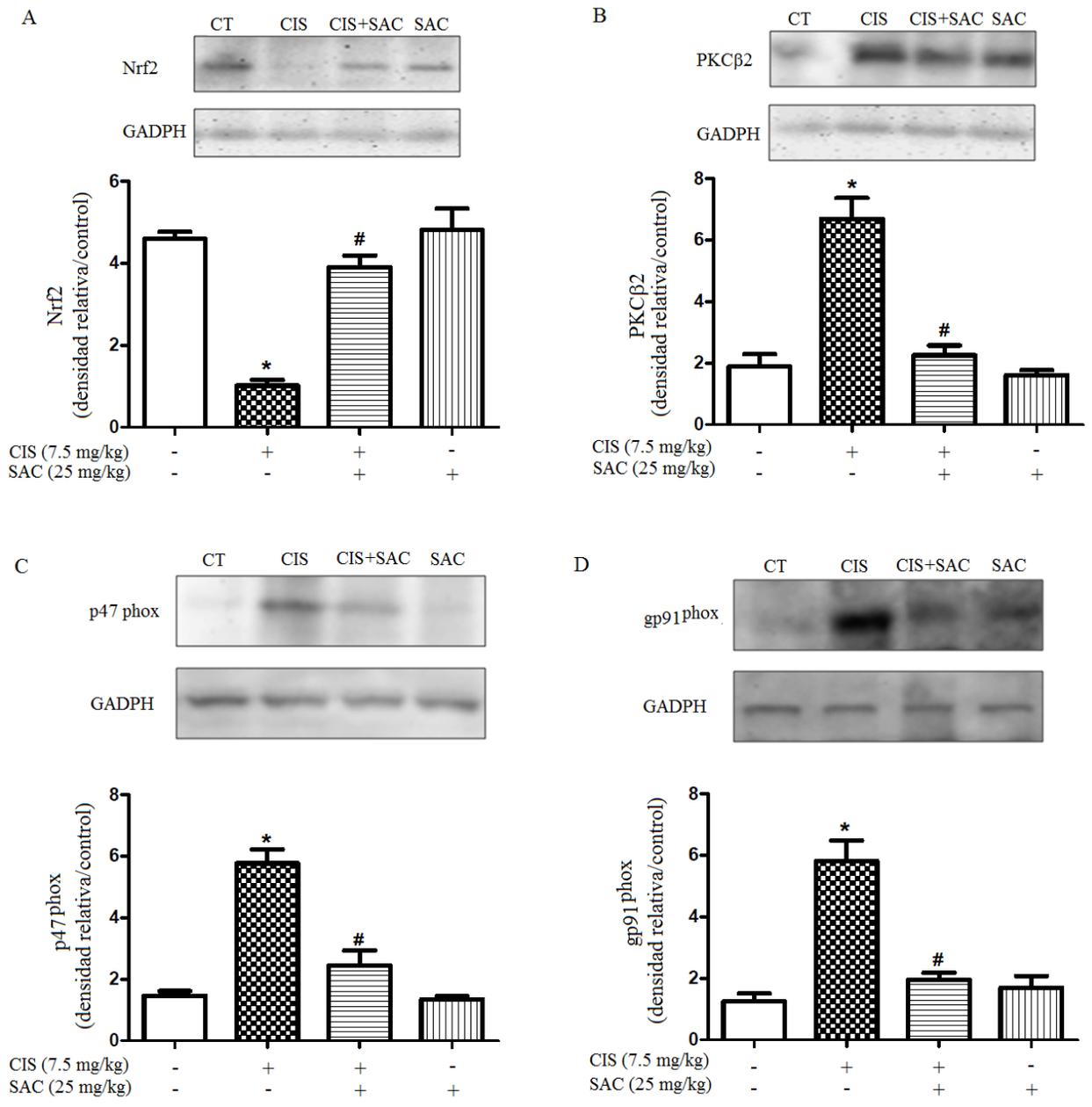




**Figura 13.** Evaluación de la función renal. A) Creatinina en plasma, B) BUN, C) Depuración de creatinina, D) Proteinuria. Valores promedio  $\pm$  EEM, n=8-12 animales por grupo. \* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  vs. CIS

### 7.8 Efecto de la SAC en la expresión de Nrf2, PKC $\beta$ 2, p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup>

Se evaluó la expresión de diferentes proteínas en la corteza renal. El CIS disminuye la expresión de Nrf2 y aumenta la de PKC $\beta$ 2, p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> (Figura 14). El grupo con CIS y SAC aumenta la expresión de Nrf2 (Figura 14A) y disminuye la expresión de PKC $\beta$ 2 (Figura 14B), p47<sup>phox</sup> en (Figura 14C) y gp91<sup>phox</sup> en (14D). La administración de SAC no presenta diferencias con respecto al grupo control (Figura 14).



**Figura 14.** Western Blot en corteza renal. A) Nrf2, B) PKCβ2, C) p47<sup>phox</sup>, D) gp91<sup>phox</sup>.  
 Valores promedio ± EEM, n=4. \**p* <0.05 vs. Control, #*p* <0.05 vs. CIS

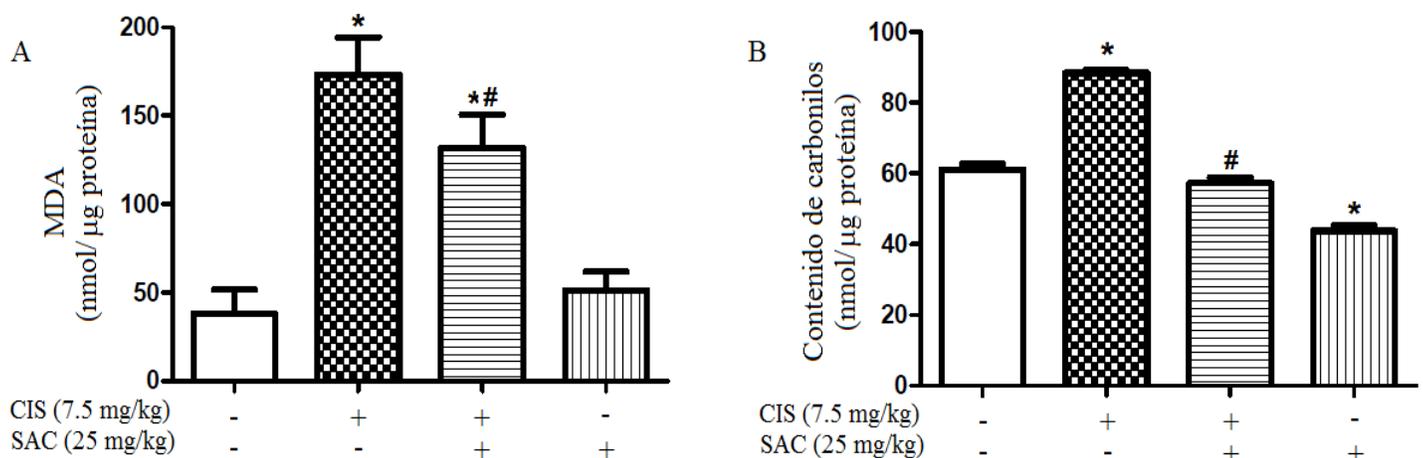
---

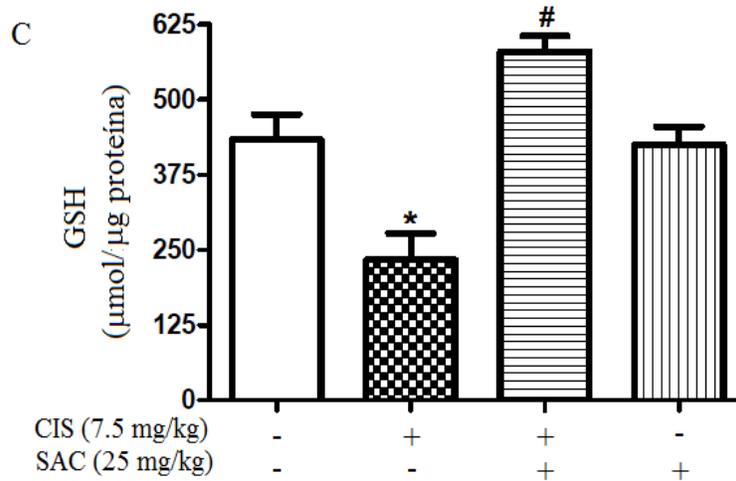
---

### 7.9 Efecto de la SAC en el estrés oxidante y la actividad de enzimas antioxidantes en túbulo proximal

En la fracción del túbulo proximal el CIS aumentó 5 y 1.5 veces el contenido de MDA y de carbonilos, respectivamente (Figura 15A y 15B), mientras que el contenido de GSH disminuyó en un 46% (Figura 15C). El tratamiento con CIS+SAC previno la oxidación de proteínas y restauró el contenido de GSH y atenuó de manera no significativa el aumento en la lipoperoxidación (Figura 15).

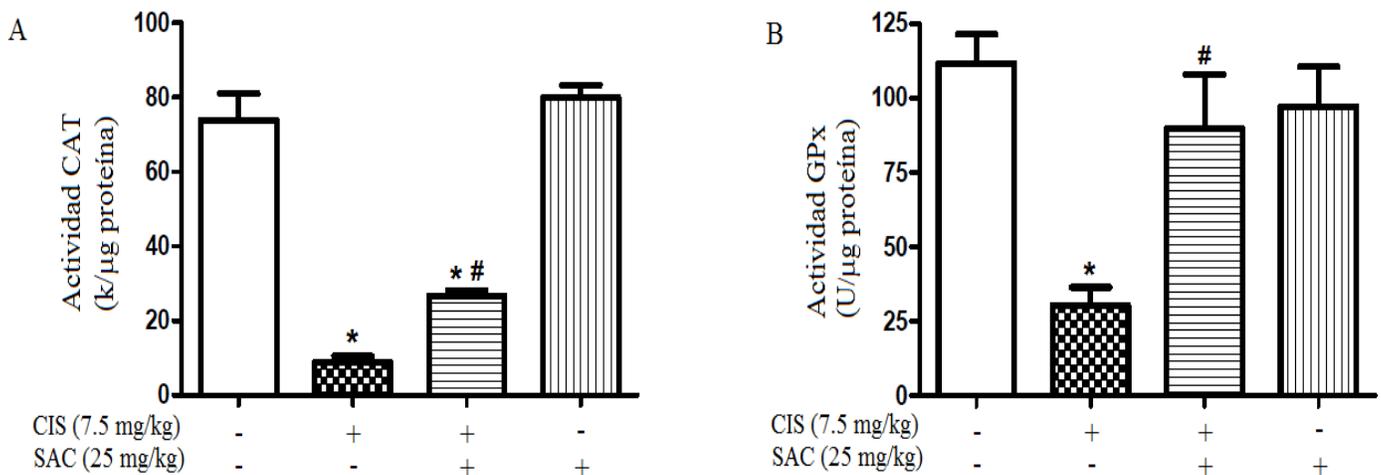
En el grupo tratado únicamente con 25 mg/kg de SAC, los marcadores de estrés oxidante MDA y GSH no presentaron diferencias significativas con el control, sin embargo, el contenido de carbonilos es significativamente menor para este grupo (Figura 15B).

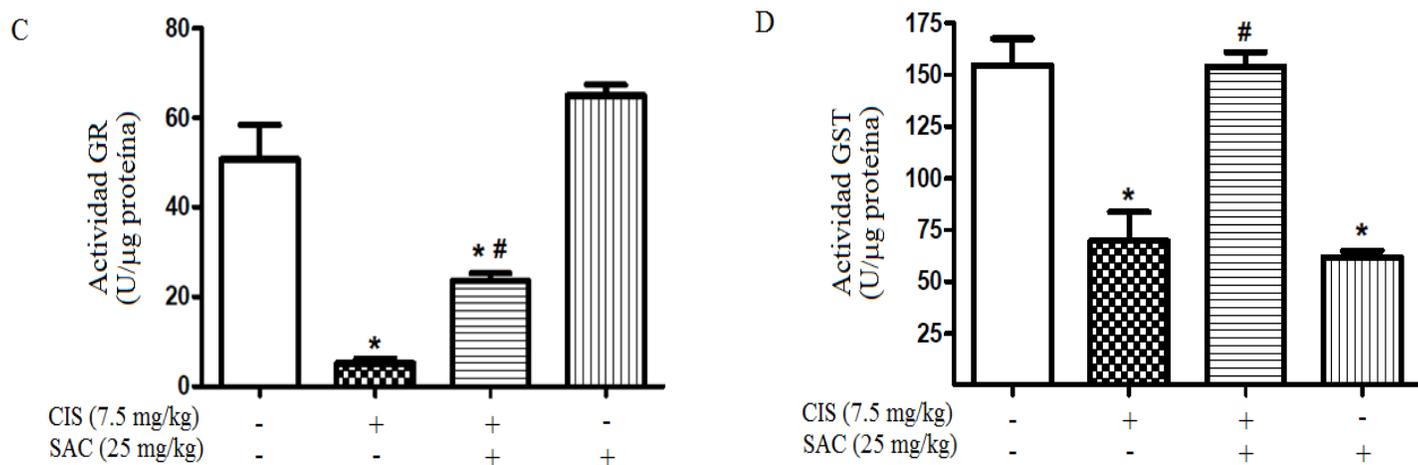




**Figura 15.** Marcadores de estrés oxidante en túbulo proximal. A) Malondialdehído, B) Contenido de carbonilos, C) Glutación reducido. Valores promedio  $\pm$  EEM, n=8-12 animales por grupo. \* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  vs. CIS

Con respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes, el tratamiento con CIS disminuyó la actividad de CAT, GPx, GR y GST en 89%, 73%, 90% y 55% respectivamente (Figura 16). En el grupo CIS+SAC se atenuó la disminución de la actividad de CAT en 24% (Figura 16A), GPx en 62% (Figura 16B), GR en 36% (Figura 16C) y de GST en 100% (Figura 16D). La administración de SAC no indujo cambios con respecto al grupo control a excepción de la disminución de la actividad de GST (Figura 16).

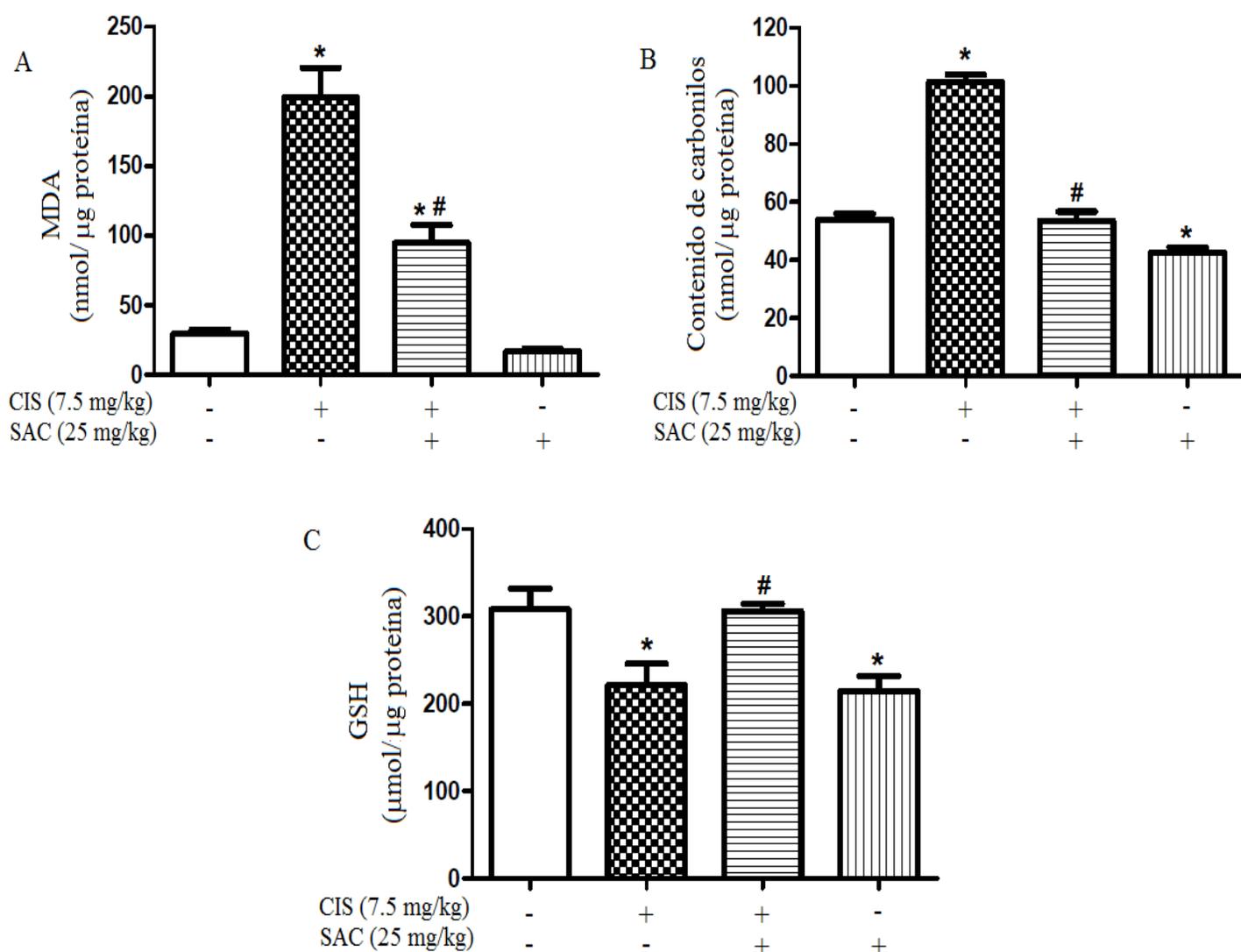




**Figura 16.** Actividad de enzimas antioxidantes en túbulo proximal. A) Catalasa, B) Glutación peroxidasa, C) Glutación reductasa, D) Glutación-S-transferasa. Valores promedio  $\pm$  EEM, n=8-12 animales por grupo. \* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  vs. CIS

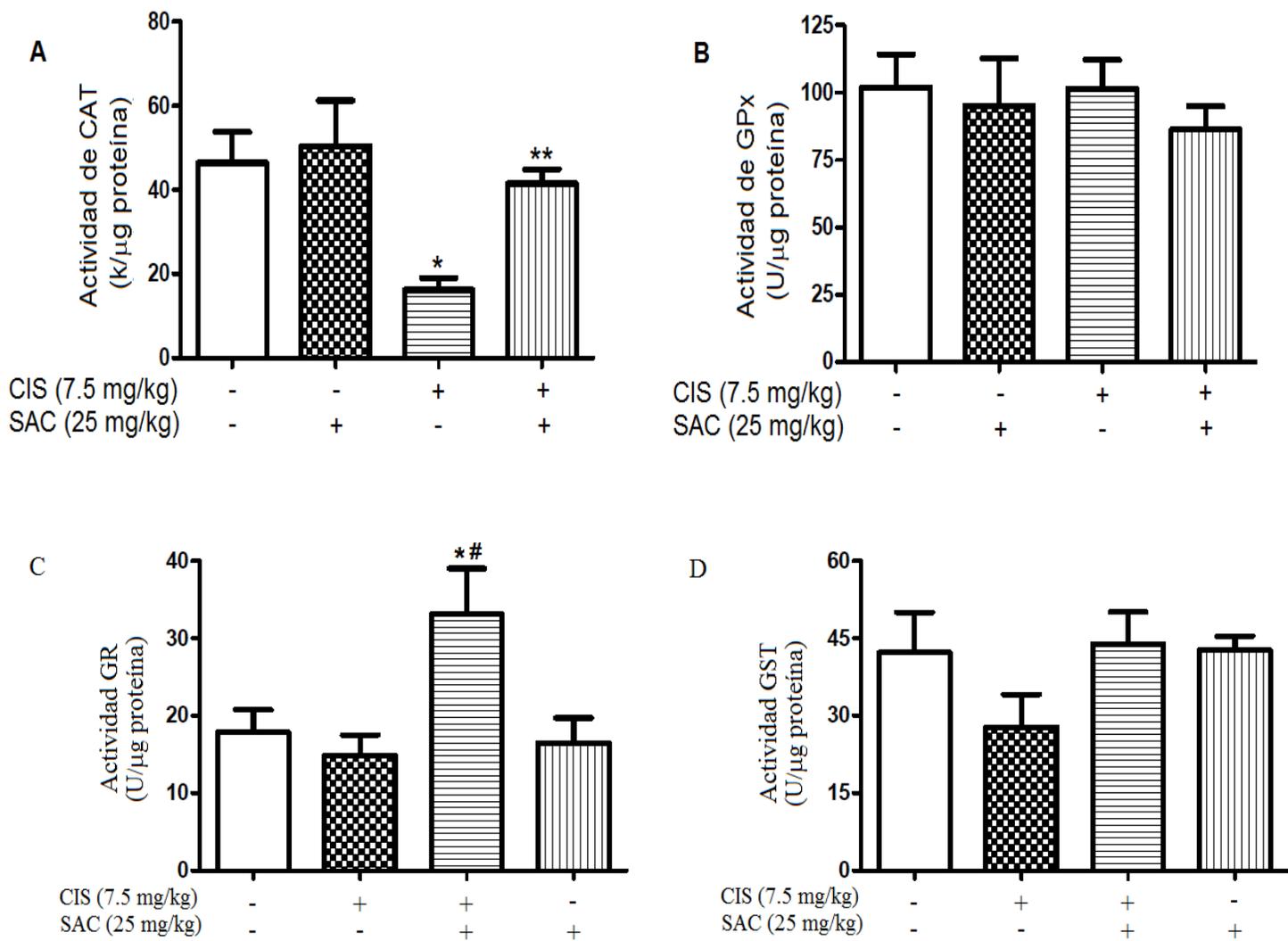
### 7.10 Efecto de la SAC en el estrés oxidante y la actividad de enzimas antioxidantes en túbulo distal

En la fracción del túbulo distal el CIS indujo un aumento en el contenido de MDA y de carbonilos de 6.6 y 1.8 veces, respectivamente (Figura 17A y Figura 17B) y del contenido de GSH en un 28% (Figura 17C). El tratamiento con CIS+SAC previno la oxidación de proteínas y la disminución del contenido de GSH y atenuó la lipoperoxidación (Figura 17). El tratamiento con 25 mg/kg de SAC disminuye el contenido de carbonilos, GSH y MDA con respecto al control (Figura 17B y Figura 17C).



**Figura 17.** Marcadores de estrés oxidante en túbulo distal. A) Malondialdehído, B) Contenido de carbonilos, C) Glutatión reducido. Valores promedio  $\pm$  EEM,  $n=8-12$  animales por grupo. \* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  vs. CIS

El CIS indujo un decremento en la actividad de CAT y de GST en un 70% y 30% respectivamente (Figura 18) y el tratamiento con CIS+SAC previno la disminución de GST (Figuras 18D) y atenuó en 46% CAT (Figura 18A). La actividad de las enzimas GPx y GR no se modifican en esta fracción (Figura 18B y 18C).



**Figura 18.** Actividad de enzimas antioxidantes en túbulo distal.

A) Catalasa, B) Glutación peroxidasa, C) Glutación reductasa, D) Glutación-S-transferasa.

Valores promedio  $\pm$  EEM, n=8-12 animales por grupo.

\* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  vs. CIS

---

---

## 8. Discusión

En diferentes estudios se ha demostrado que una dosis de CIS de 7.5 mg/kg induce insuficiencia renal aguda en ratas (Chirino *et al.*, 2008; Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009; Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 2013; El-Naga, 2013), la cual se caracteriza por los niveles de creatinina en plasma y BUN de >1 mg/dL y >20 mg/dL, respectivamente. Los marcadores de función renal mencionados anteriormente se evaluaron para realizar la curva dosis-efecto y determinar la dosis de SAC que disminuyera dichos niveles en las ratas tratadas con CIS. En los extremos de la curva dosis-efecto se observaron los valores más altos de los marcadores de función renal, sugiriendo que las dosis  $\leq 15$  mg/kg y  $\geq 100$  mg/kg de SAC no ejercen protección. Mientras que las dosis de SAC a 20, 25 y 50 mg/kg disminuyen estos niveles, por lo que esas dosis podrían desempeñar un papel protector en este modelo experimental. Se esperaba que el efecto de la SAC en las ratas tratadas con CIS fuera dependiente de la dosis, sin embargo, estos resultados indican que la SAC a dosis  $\geq 100$  mg/kg, es un agente pro-oxidante, debido a que aumentó los niveles de los marcadores con respecto a lo observado en las dosis de SAC 50 mg/kg. De acuerdo a la estructura de la SAC, el grupo sulfuro y alilo desempeñan un papel fundamental en su actividad antioxidante (Maldonado *et al.*, 2011); no obstante se ha descrito que los compuestos que contienen alguno de estos grupos pueden generar radicales libres (Filomeni *et al.*, 2008) y consecuentemente desencadenar los efectos que producen.

En la primera etapa del estudio se evaluó la atenuación del daño oxidante en el riñón con las dosis de 20, 25 y 50 mg/kg de SAC. El efecto observado en la disminución de los marcadores de estrés en lípidos y proteínas con las dosis de 25 y 50 mg/kg de SAC se debe a que ésta atrapa ERO como  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $^1\text{O}_2$  (Herrera-Mundo *et al.*, 2009; Colín-González *et al.*, 2012), de manera que atenúa el daño en el tejido y evita la propagación de los radicales libres. El principal iniciador de la oxidación de lípidos y proteínas es el  $\bullet\text{OH}$  (Konigsberg *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2008) y de acuerdo al  $\text{IC}_{50}$  de la SAC descrito (Medina-Campos *et al.*, 2007; Herrera-Mundo *et al.*, 2009) este antioxidante tiene el valor más bajo para dicha especie reactiva con respecto a las otras

---

---

especies que atrapa, lo cual indica que la SAC posee mayor eficacia para  $\bullet\text{OH}$ , sin embargo, ha mostrado ser altamente eficiente para otras ERO.

Además del aumento en los marcadores de función renal y de estrés oxidante, la disminución del sistema antioxidante es característica en la nefrotoxicidad por CIS. La formación de conjugados con GSH y la consecuente disminución de éste en el riñón inducen el decremento de la actividad de las enzimas GPx y GST, debido a que es sustrato de las enzimas mencionadas anteriormente (Konigsberg *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2010; Guinam dos Santos *et al.*, 2012). En los homogenados renales el aumento del sistema antioxidante con el tratamiento con SAC no es tan evidente, probablemente el efecto diferencial del CIS en la nefrona (Kröning *et al.*, 2000; Van Angelen *et al.*, 2013) y de la SAC interfiera en la medición de los parámetros evaluados y la restauración en el sistema antioxidante no se manifieste; sin embargo, con los resultados obtenidos se demuestra que la dosis de 25 mg/kg de SAC es la que proporciona mayor protección con respecto a las dosis ensayadas.

El túbulo proximal es el segmento de la nefrona con mayor daño en diferentes modelos de nefrotoxicidad, debido a que en él se llevan a cabo las reacciones de biotransformación que permiten excretar los agentes xenobióticos del organismo. En la nefrotoxicidad inducida por CIS éste es el principal segmento que se encuentra dañado, aunque también se ha observado daño en el túbulo distal. El daño producido en el túbulo proximal se debe a la alta expresión de los transportadores OCT2 y Ctr1 y de la enzima  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (Pabla y Dong, 2008). El CIS ingresa a las células renales a través de dichos transportadores, en el interior de la célula se bioactiva y genera la producción de ERO, la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes y del contenido de GSH (Townsend *et al.*, 2003; Wainford *et al.*, 2008; Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009; Miller *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2012). El daño oxidante producido en los lípidos y proteínas en el túbulo distal se previene con el tratamiento con SAC, mientras que en los túbulos proximales la oxidación de proteínas y lípidos disminuye, pero ésta última no es significativa. La SAC no evita el daño en los túbulos proximales,

---

---

debido a que son más sensibles a la toxicidad del CIS, por el proceso de reabsorción y biotransformación llevados a cabo en este segmento de la nefrona. Además se ha descrito que para causar el 50% de la muerte en las células del túbulo proximal se requieren de 9-12  $\mu\text{M}$  de CIS y para el distal de 17  $\mu\text{M}$  (Kröning *et al.*, 2000; Van Angelen *et al.*, 2013), confirmando estos datos la alta sensibilidad de los túbulos proximales. La SAC atrapa diversas ERO, sin embargo, no es tan eficiente para  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , éste último puede inducir la activación de NF- $\kappa\text{B}$  implicado en la regulación de genes involucrados en la apoptosis e inflamación (Herrera-Mundo *et al.*, 2009).

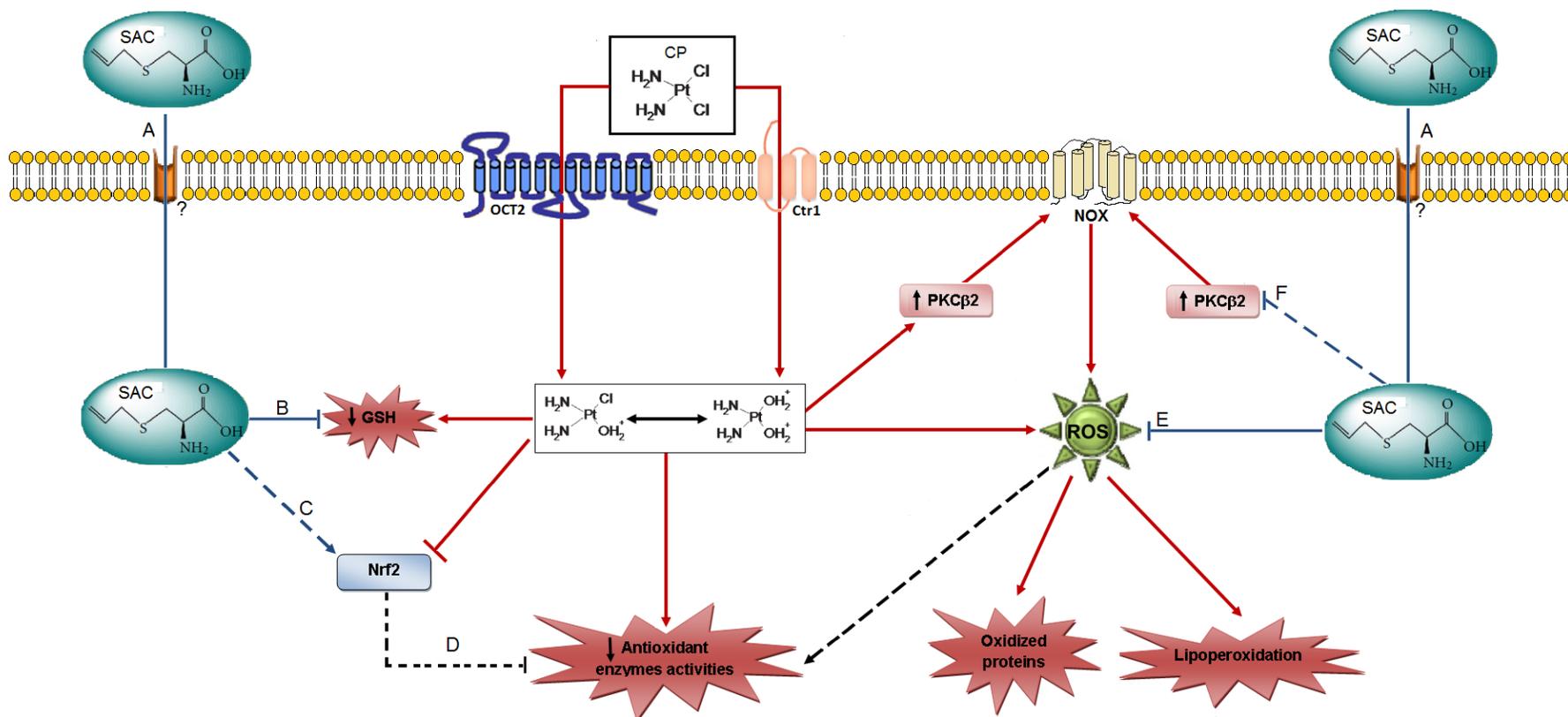
Es posible que la SAC aumente la actividad de las enzimas antioxidantes al atrapar ERO que pueden modificar o saturar estas enzimas (Konigsberg, 2008) y además si SAC atrapa ERO, podría disminuirse la actividad de la NOX; que es altamente expresada en los animales tratados con CIS y una de las principales fuentes de ERO (El-Naga, 2013, Gang *et al.*, 2013). La activación de esta enzima es a través de PKC $\beta$ 2, la cual a su vez es activada por el estrés oxidante. SAC al atenuar este estrés, previene la activación de PKC $\beta$ 2, consecuentemente p47<sup>phox</sup> no se fosforila, las subunidades de NOX no interaccionan y no se forma el complejo activado responsable de la producción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Konigsberg, 2008; Deng *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que SAC induce la traslocación nuclear de Nrf2 en cerebro e hígado (Kalayarasan *et al.*, 2008; Colín-González *et al.*, 2012). Aunque en riñón no ha sido descrito, es posible que SAC esté interaccionando con los grupos tiol de los residuos de cisteína de Keap1, disociando el complejo y permitiendo su traslocación nuclear, donde se dimeriza con Maf y ARE, localizadas en las regiones promotoras de una serie de genes de defensa de la células como las enzimas antioxidantes (Konigsberg, 2007; Colín-González *et al.*; 2012; Bryan *et al.*, 2013).

---

---

## **9. Conclusiones**

La dosis de 25 mg/kg de SAC proporciona mayor protección contra el daño inducido por una dosis de 7.5 mg/kg de CIS con respecto a las dosis ensayadas. El efecto protector de la SAC se establece en el túbulo proximal y distal, asociado a su capacidad de atrapar ERO y al aumento de la actividad de enzimas antioxidantes. La cual está mediada por Nrf2. Con base en los resultados obtenidos en este estudio y lo establecido en la literatura se propone en la Figura 19 el mecanismo de protección de la SAC contra la nefrotoxicidad por CIS en ratas.



**Figura 19.** Esquema propuesto para describir la protección de SAC en la nefrotoxicidad inducida por CIS en ratas. A) SAC ingresa en las células renales, B) previniendo la disminución de GSH; C) aumentando la expresión de Nrf2 y consecuentemente D) la actividad de CAT, GPx, GR y GST. La otra vía de protección es que SAC E) atrapa las ERO producidas por CIS, F) disminuyendo la expresión de PKCβ<sub>2</sub> y la activación de NOX así como la producción de otras fuentes de ERO. Así SAC podría ejercer un efecto protector como un antioxidante directo e indirecto en ratas tratadas con una dosis única de CIS 7.5 mg/kg

---

---

## 10. Referencias

**Aebi H**, 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in enzymology* 105, 121-126.

**Amagase H**, 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *Journal of Nutrition* 136, 716S-725S.

**Arany I, Safirstein R**, 2003. Cisplatin nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology* 5, 460-464.

**Arreola-Mendoza L**, Del Razo L, Mendoza-Garrido M, Martín D, Namorado M, Calderon-Salinas J, Reyes J, 2009. The protective effect of alpha-tocopherol against dichromate-induced renal tight junction damage is mediated via ERK1/2. *Toxicology Letters* 191, 278-288.

**Banerjee K**, Mukherjee P, Maulik S, 2003. Review article. Garlic as an antioxidant: the good, the bad, and the ugly. *Phytotherapy Research* 17, 97-106.

**Barabas K**, Milner R, Laurie D, Adin C, 2008. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Veterinary and Comparative Oncology* 6, 1–18.

**Bhadoria D**, Agrawal N, 2012. Toxic acute kidney injury. *Clinical Queries:Nephrology* 0101, 29-33.

**Borek C**, 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Journal of Nutrition* 131, 1010S-1015S.

**Bradford M**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

**Bryan H**, Olanyanju A, Goldring C, Park K, 2013. The Nrf2 cell defense pathway: Keap1-dependent and –independent mechanisms of regulation. *Biochemical Pharmacology* 85, 705-717.

---

---

**Burtis C**, Ashwood E, Bruns D, 2008. Tietz. Fundamentals of clinical chemistry. Saunders Elsevier, USA, pp 631-654.

**Calberg I, Mannervik B**, 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 250, 5475-5480.

**Capasso A**, 2013. Antioxidant action and therapeutic efficacy of *Allium sativum* L. *Molecules* 18, 690-700.

**Chirino Y, Pedraza-Chaverri J**, 2009. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicology Pathology* 61, 223-242.

**Chirino Y, Sánchez-González D, Martínez-Martínez C, Cruz C, Pedraza-Chaverri**, 2008. Protective effects of apocynin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology* 245, 18-23.

**Colín-González A, Santana R, Silva-Islas C, Chánez-Cárdenas M, Santamaría A, Maldonado P**, 2012. Review article. The antioxidant mechanism underlying the aged extract garlic-and S-allylcysteine-induced protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 907, 162-178.

**Coople I**, 2012. Review article. The Keap1-Nrf2 cell defense pathway-A promising therapeutic target. *Advances in Pharmacology* 63. 43-77.

**Cruz C, Correa-Rotter R, Sánchez-González D, Hernández-Pando R, Maldonado P, Martínez-Martínez C, Medina-Campos O, Tapia E, Aguilar D, Chirino Y, Pedraza-Chaverri J**, 2007. Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 293, F1691-F1698.

**Deng B, Xie S, Wang J, Xia Z, Nie R**, 2011. Inhibition of protein kinase C  $\beta$ 2 prevents Tumor Necrosis Factor  $-\alpha$ - induced apoptosis and oxidative stress in endothelial cells: The role of NADPH oxidase subunits. *Journal of Vascular Research*, 49, 144-159.

---

---

**Dinkova-Kostova A, Talalay P**, 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Molecular Nutrition and Food Research* 52, S128-S138.

**Dos Santos GN**, Carvalho Rodrigues M, Martins N, Dos Santos AC, 2012. Review article. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Archives of Toxicology* 86, 1233-1250.

**El-Naga R**, 2013. Pre-Treatment with cardamonin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: Impact on NOX-1, inflammation and apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 274, 87-95.

**Fernández-Checa J, Kaplowitz N**, 1990. The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Analytical Biochemistry* 190, 212-219.

**Filomeni G**, Rotilio G, Ciriolo M, 2008. Molecular transduction mechanism of the redox network underlying the antiproliferative effects of allyl compounds from garlic. *The Journal of Nutrition* 138, 2053-2057.

**Gang G**, Kim Y, Noh J, Kim K, Jung J, Shong M, Hwang J, Lee C, 2013. Protective role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in cisplatin induced nephrotoxicity. *Toxicology Letters*. Article in Press.

**Gérard-Monnier D**, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Herry N, Yadan J, Chaudiere, 1998. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology* 11, 1176-1183.

**Gesek F**, Wolf D, Stradhoy J, 1987. Improved separation method for rat proximal and distal renal tubules. *American Journal Physiology and Renal Physiology* 253, F358-365.

**Guder W, Ross B**, 1984. Enzyme distribution along the nephron. *Kidney International* 26, 101-111.

---

---

**Guerrero-Beltrán C**, Calderón-Oliver M, Tapia E, Medina-Campos O, Sánchez-González D, Martínez-Martínez C, Ortiz-Vega K, Franco M, Pedraza-Chaverri J, 2010. Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology Letters* 192, 278-285.

**Habig W**, Pabst M, Jakoby W, 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130-7139.

**Herrera-Mundo N**, Pedraza-Chaverri J, Santamaría A, León-Aparicio D, Maldonado PD, 2009. Antioxidant effect of S-allylcysteine, a garlic compound, in several experimental disease models. En: *Pro-oxidant reactions: Physiological and pathological implications*, editado por Díaz-Muñoz M y Santamaría A. Research Signpost, Kerala, India, pp 67-84.

**Iciek M**, Kwiecien I, Wlodek L, 2009. Review article. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50, 247-265.

**Javed H**, Khan M, Khan A, Vaibhav K, Ahmad A, Khuwaja G, Ahmed M, Raza S, Ashafaq M, Tabassum R, Siddiqui M, El-Agnaf O, Safhi M, Islam F. 2011. S-allyl cysteine attenuates oxidative stress associated cognitive impairment and neurodegeneration in mouse model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Brain Research* 1389, 133-142.

**Jung K**, Priem F, Klotzek S, Becker S, Henke W, 1991. Methods compared for determining activity of activity of *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in urine with pretreatment of sample: different sensitivity and species effect. *Enzyme* 45, 215-221.

**Kaplan L, Pesce J**, 1990. Química Clínica: Métodos. Editorial Panamericana, Buenos Aires, pp 468-480.

**Konigsberg M**, 2007. Nrf2: la historia detrás de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica UNAM* 26, 18-25.

---

---

**Konigsberg M**, 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual moderno, México, D.F, pp 395-412.

**Kröning R**, Katz D, Lichtenstein A, Nagami G, 2000. Differential effects of cisplatin in proximal and distal renal tubule epithelial cell lines. *British Journal of Cancer*, 79, 293-299.

**Launay-Vacher V**, Rey JB, Isnard-Bagnis C, Deray G, Daouphars M, 2008. Review. Prevention of cisplatin nephrotoxicity: state of the art and recommendations from the European Society of Clinical Pharmacy Special Interest Group on Cancer Care. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 61, 903-909.

**Lawrence R, Burk R**, 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71, 952-958.

**Lee H**, Kim B, Nam Y, Sohn U, Park E, Hong S, Lee J, Chung Y, Jeong J, 2013. Protective role of phosphatidylcholine against cisplatin-induced renal toxicity and oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 388-393.

**Levine R**, Garland D, Oliver C, Amici A, Climent I, Lenz A, Ahn B, Shaltiel S, Stadtman E, 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology* 186, 464-478.

**Lowry O**, Rosebrugh N, Farr L, Randall R, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

**Maldonado P**, Alvarez-Idaboy R, Aguilar-González A, Lira-Rocha A, Jung-Cook H, Medina-Campos O, Pedraza-Chaverri J, Galano A, 2011. Role of allyl group in the hydroxyl and peroxy radical scavenging activity of S-allylcysteine. *The Journal of Physical Chemistry* 115, 13408-13417.

**Maldonado P**, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos O, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J, 2003-b. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radical Biology and Medicine* 35, 317-324.

---

---

**Matsutomo T**, Stark T, Hofmann T, 2013. In Vitro activity-guided identification of antioxidants in aged garlic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 3059-3067.

**Medina-Campos O**, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado P, Mendoza-Patiño N, Pedraza-Chaverri J, 2007. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK1 cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology* 45, 2030-2039.

**Miller R**, Tadagavadi R, Ramesh G, Reeves W, 2010. Review article. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins* 2, 2490-2518.

**Molitoris B**, Finn W, 2001. Acute renal failure: a companion to Brenner & Rector's the kidney. WB Saunders. Philadelphia, pp 157-166.

**Mong MC, Yin MC**, 2012. Nuclear factor  $\kappa$ B-dependent anti-inflammatory effects of S-allylcysteine and S-propyl cysteine in kidney of diabetic mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 3158-3165.

**Morales J**, Fernández A, Bautista M, Vargas N, Madrigal E, 2009. Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas. Tomo II. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, D.F., pp 432-434.

**Nguyen T**, Yang C, Pickett C, 2004. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radical Biology and Medicine* 4,443-441.

**Numagami Y, Ohnishi ST**, 2001. S-Allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *Journal of Nutrition* 131, 1100S-1105S.

**Pabla N, Dong Z**, 2008. Review. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International* 73, 994-1007.

---

---

**Pedraza-Chaverri J**, Maldonado P, Medina-Campos O, Olivares-Corichi I, Granados-Silvestre M, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio M, 2000. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity; relation to antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine* 29, 602-6011.

**Pedraza-Chaverri J**, Medina-Campos O, Granados-Silvestre A, Maldonado P, Olivares-Corichi I, Hernández-Pando R. 2000-b. Garlic ameliorates hyperlipidemia in chronic aminonucleoside nephrosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 211, 69-77.

**Pedraza-Chaverri J**, Granados-Silvestre M, Medina-Campos O, Maldonado P, Olivares-Corichi I, Ibarra-Rubio M, 2001. Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 216, 9-19.

**Pedraza-Chaverri J**, Medina-Campos O, Ávila-Lombardo R, Zúñiga-Bustos A, Orozco-Ibarra M. 2006. Reactive oxygen species scavenging capacity of different cooked garlic preparations. *Life Sciences* 78, 761-770.

**Pedraza-Chaverri J**, Arriaga-Noblecía G, Medina-Campos N, 2007. Hypochlorous acid scavenging capacity of garlic. *Phytotherapy Research* 21, 884-888.

**Pedraza-Chaverri J**, Medina-Campos O, Segoviano-Murillo S, 2007-b. Effect of heating on peroxynitrite scavenging capacity of garlic. *Food and Chemical Toxicology* 45, 622-627.

**Queiroz Y**, Ishimoto E, Bastos D, Sampaio G, Torres E, 2009. Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: In vitro antioxidant activity. *Food Chemistry*, 115, 371-374.

**Ramón-López A**, Escudero-Ortiz V, Carbonell V, Pérez-Ruixo J, Valenzuela B, 2012. Farmacocinética poblacional de cisplatino aplicada a la personalización de su dosificación en pacientes oncológicos. *Farmacia Hospitalaria* 36, 194-206.

**Sadiq Butt M**, Sultan M, Sadiq Butt M, Iqbal J. 2009. Garlic: Nature's protection against physiological threats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 538–551.

---

---

**Sancho-Martínez S**, Prieto-García L, Prieto M, López-Nava J, López-Hernández F, 2012. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: An integrated view. *Pharmacology and Therapeutics* 136, 35-55.

**Santos N**, Catao-Bezerra C, Martins N, Curti C, Bianchi M, Santos A, 2008. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 61, 145-155.

**Santhosha S**, Jamuna P, Prabhavathi s, 2013. Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. *Food Bioscience* 3, 59–74.

**Saravanan G, Ponmurugan P**, 2011. Ameliorative potential of S-allyl cysteine on oxidative stress in STZ induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions* 189, 100-106.

**Schafer J**, Watkins M, Herter L, Haxelmans S, Schalatter E, 1997. A simplified method for isolation of large number of defined nephron segments. *American Journal Physiology and Renal Physiology* 273, F650-657.

**Scholer W, Edelman S**, 1980. Isolation of rat kidney cortical tubules enriched in proximal and distal segments. *American Journal Physiology and Renal Physiology* 237, F350-359.

**Segoviano-Murillo S**, Sánchez-González D, Martínez-Martínez C, Cruz C, Maldonado P, Pedraza-Chaverri J, 2008. S-allylcysteine ameliorates ischemia and reperfusion induced renal damage. *Phytotherapy Research* 22, 836-840.

**Sherwood L**, 2011. Fisiología humana. De las células a los sistemas, CENGAGE Learning, 7° Edición, México, D.F., pp 515-517.

---

---

**Slot C. 1965.** Plasma creatinine determination. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 17, 381-387.

**Small D,** Coombes J, Bennet N, Jonhson D, Gobe G, 2012. Review Article. Oxidative stress, antioxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology* 17, 311-321.

**Srinivasan K,** 2014. Antioxidant potential of spices and their active constituents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 352-372.

**Townsend D,** Deng M, Zhang L, Lapus M, Hanigan M, 2003. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 14, 1-10.

**Van Angelen A,** Glaudemans B, Van der Kemp A, Hoenderop J, Bindels R, 2013. Cisplatin-induced injury of the renal distal convoluted tubule is associated with hypomagnesaemia in mice. *Nephrology Dialysis Transplant*, 28, 879-889.

**Vélez H,** Rojas W, Borrero J, Restrepo J, Borrero F, Ruiz M, 2012. Fundamentos de Medicina: Nefrología. Corporación para Investigaciones Biológicas, 5ª Edición, Colombia, Medellín, pp 215-248.

**Vinay P,** Gougoux A, Lemieux G, 1981. Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *American Journal Physiology and Renal Physiology* 241:F403-411.

**Wainford R,** Weaver R, Stewart K, Brown P, Hawksworth G, 2008. Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway. *Toxicology* 249, 184-193.

**Yan C, Zeng F,** 2005. Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine in rats. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 5, 61-69.

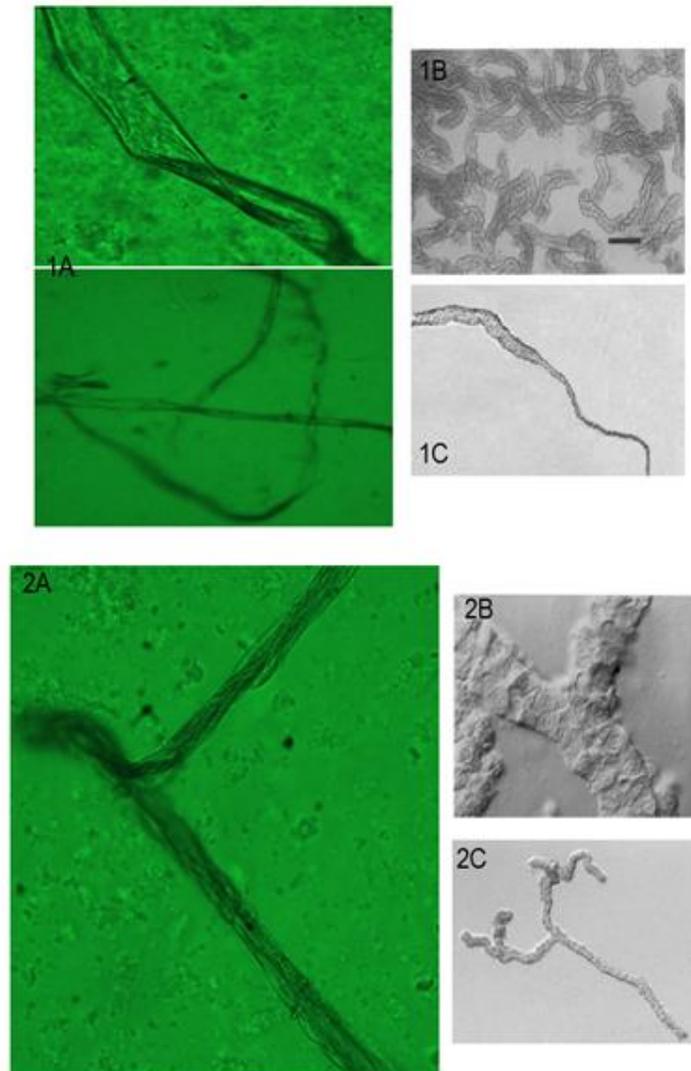
**Yao X,** Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K, 2007. Cisplatin nephrotoxicity: A review. *The American Journal of the Medical Sciences* 334, 115-124.

---

---

## Anexo 1

En la figura 19 se presentan las fotomicrografías de las fracciones renales aisladas en diferentes trabajos experimentales, así como las imágenes obtenidas en este estudio del grupo control (1A y 2A). El túbulo proximal se distingue por ser más ancho mientras que el túbulo distal por tener una ramificación.



**Figura 20.** Fotomicrografías.

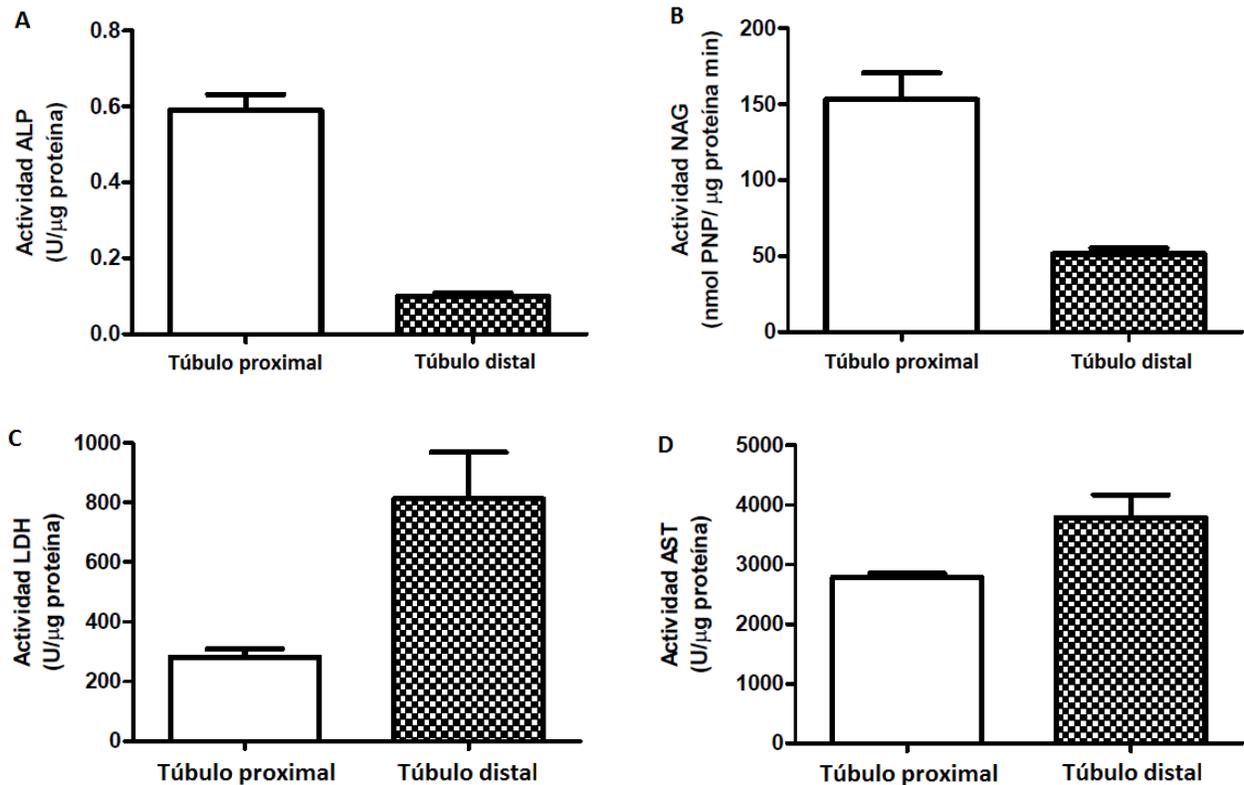
- 1) Túbulo proximal: A) Estudio CIS+SAC, B) Gesek *et al.*, 1987, C) Schafer *et al.*, 1997.
- 2) Túbulo distal: A) Estudio CIS+SAC, B) Scholer and Edelman, 1980, C) Schafer *et al.*, 1997.

---

---

## Anexo 2

Además en el grupo control se determinaron las actividades de las enzimas fosfatasa alcalina (ALP), N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAG), lactato deshidrogenasa (LDH) y aspartato aminotransferasa (AST) como indicadores de las fracciones renales. Las enzimas ALP y NAG se localizan principalmente en túbulo proximal (Figura 20A y 20B), mientras que LDH y AST se localizan en túbulo distal (Scholer and Edelman, 1980; Guder and Ross, 1984; Gesek *et al.*, 1987).



**Figura 21.** Actividad enzimas A) Fosfatasa alcalina (ALP), B) N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAG), C) Lactato deshidrogenasa (LDH), D) Aspartato aminotransferasa (AST). n=4