



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DE LA CURCUMINA SOBRE EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR
DICROMATO DE POTASIO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. WYLLY RAMSÉS GARCÍA NIÑO

**Dr. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Dr. SALVADOR URIBE CARVAJAL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**Dr. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA**

MÉXICO, D. F., MARZO, 2014



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 209 del edificio F de la Facultad de Química, así como en los Departamentos de Nefrología y Biomedicina Cardiovascular del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", S.S.A., además del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", S.S.A. La dirección del proyecto estuvo a cargo del Dr. José Pedraza Chaverrí y durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de Doctorado No. 227801. Esta tesis fue apoyada en parte por los proyectos CONACYT 129838 y PAPIIT IN210713.

*“Failure is the foundation of success;
if one plan doesn't work,
change the plan but never the goal.”*

Chinese proverb

*“El fracaso es la base del éxito;
si un plan no funciona,
cambia el plan, pero nunca la meta.”*

Proverbio Chino

DEDICATORIA

A mi amado hijo:

Ramsés García Vega

A mi adorada esposa:

Claudia Cecilia Vega García

A mis amados padres:

Guadalupe Niño Ojeda

Wilfrido García García

A mí querido sobrino

Jarot Gael Jiménez García

A mis hermanos:

Unsui Shuriken y

Agni Ra Sui

AGRADECIMIENTOS

Facultad de Química, UNAM

Dr. José Pedraza Chaverri

Dra. María Elena Ibarra Rubio

Dr. José de Jesús García Trejo

Dra. Amelia Farrés González Saravia

M. en C. Omar Medina Campos

M. en C. Tania Gómez Sierra

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Salvador Uribe Carvajal

Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas

Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Abraham Landa Piedra

Instituto Nacional de Cardiología

"Ignacio Chávez"

Dra. Cecilia Zazueta

Dra. Edilia Tapia Rodríguez

Dr. Francisco Correa

AGRADECIMIENTOS

Instituto Nacional de Nutrición

"Salvador Zubirán"

Dr. Rogelio Hernández Pando

Dr. Armando Tovar Palacio

M. en C. Zyanya Lucía Zatarain Barrón

M. en C. Claudia Cecilia Vega García

Instituto de Investigaciones Biomédicas,

UNAM

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dr. Emilio Rojas del Castillo

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

(CONACYT)

RESUMEN

Los compuestos con cromo hexavalente [Cr(VI)], como el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), han sido ampliamente reconocidos como carcinógenos, mutágenos y teratógenos en humanos y animales. El mecanismo de toxicidad inducida por Cr(VI) involucra reacciones redox que generan estrés oxidante. En hígado, se ha descrito que el $K_2Cr_2O_7$, incrementa los niveles de especies de oxígeno reactivas (ERO), dañando lípidos, proteínas y generando daño tisular. Particularmente, las mitocondrias son susceptibles al daño inducido por $K_2Cr_2O_7$, ya que la reducción del Cr(VI) a Cr(III) ocurre principalmente dentro de este organelo. Estos efectos tóxicos pueden mitigarse con antioxidantes, como la curcumina que actúa atrapando radicales libres y/o induciendo la activación de genes citoprotectores, tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que se plantea que puede ser un buen candidato de protección contra el daño hepático generado por $K_2Cr_2O_7$. Además, debido al potencial terapéutico de la curcumina es de interés conocer si este compuesto presenta actividad hepatoprotectora contra la toxicidad inducida por Cr(VI).

Objetivo general: Evaluar el efecto hepatoprotector de la curcumina sobre el daño generado por $K_2Cr_2O_7$. **Objetivos particulares:** En tejido hepático de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$: 1) evaluar el efecto anti-hepatotóxico de la curcumina, 2) reconocer la protección histológica de la curcumina, 3) analizar el efecto de la curcumina contra el daño inducido por el estrés oxidante, 4) determinar la actividad de enzimas antioxidantes. En mitocondrias aisladas de tejido hepático de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$: 5) identificar el efecto de la curcumina contra el daño inducido por el estrés oxidante, 6) analizar la actividad de enzimas antioxidantes, 7) determinar el efecto de la curcumina sobre la función mitocondrial.

Métodos: En la estandarización del modelo de hepatotoxicidad generada por $K_2Cr_2O_7$ se utilizaron ratas macho Wistar (150-200 g) y se siguieron tres esquemas de tratamiento para identificar la dosis y la vía de administración mediante la cual el $K_2Cr_2O_7$ genera daño hepático, además de identificar la dosis a la cual la curcumina atenúa o evita este daño. También se evaluaron marcadores de daño renal para comparar los resultados con datos previamente descritos de nefrotoxicidad inducida por este contaminante como un control interno. 1) Dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía subcutánea (s.c): las ratas recibieron 200 ó 400 mg/Kg de curcumina por 10 días vía intragástrica (i.g.) y/o dosis única de 15 ó 20 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ por vía s.c. al décimo día. Los animales se sacrificaron a las 48 horas. 2) Dosis repetidas de $K_2Cr_2O_7$, vía intraperitoneal (i.p.): las ratas se trataron con curcumina a la dosis de 400 mg/Kg por vía i.g. durante 10 días y/o 10, 12.5, 15 ó 17.5 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ por vía i.p. en los últimos cinco días. Los animales se sacrificaron a las 24 horas. 3) Dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.: las ratas recibieron 400 mg/Kg de curcumina por vía i.g. durante 10 días y/o con 10, 12.5, 15 ó 17.5 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ al décimo día por vía i.p. Los animales se sacrificaron a las 24 horas.

Modelo experimental: Las ratas se trataron con 400 mg/Kg de curcumina por vía i.g. durante 10 días y/o dosis única de 15 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ por vía i.p. en el día nueve (grupo 48 h) o diez (grupo 24 h). En el día once se sacrificaron las ratas y se removió el hígado. También se removieron el cerebro, corazón, pulmón, riñón, estómago, intestino, bazo y páncreas debido a que son órganos blanco de la toxicidad inducida por Cr(VI). En plasma se evaluaron las actividades de las enzimas alanino aminotransferasa (ALT),

aspartato aminotransferasa (ASP), lactato deshidrogenasa (LDH) y fosfatasa alcalina (ALP) como indicadores de hepatotoxicidad. Además, se prepararon homogenados hepáticos para evaluar marcadores de estrés oxidante y la actividad de enzimas antioxidantes. Las muestras de los tejidos se fijaron en paraformaldehído para su análisis histopatológico e inmunohistoquímico. En el líquido ascítico se determinaron proteínas totales y albúmina. Por otra parte, se aislaron las mitocondrias hepáticas por centrifugación diferencial y se evaluó la oxidación de proteínas, lipoperoxidación y actividad de enzimas antioxidantes, el consumo de oxígeno, contenido de ATP, actividad de los complejos mitocondriales I-V, potencial de membrana, retención de Ca^{2+} , transición de la permeabilidad (MPT) y liberación de citocromo c. En los demás órganos se realizó el análisis histopatológico, la evaluación de marcadores de estrés oxidante y la actividad de enzimas antioxidantes únicamente en los grupos expuestos al $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ por 24 h.

Resultados: Estandarización del modelo de hepatotoxicidad: 1) Dosis s.c. única de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: El $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ no generó daño hepático sino que ocasionó nefrotoxicidad, la cual fue atenuada por la coadministración con curcumina. 2) Dosis i.p. repetidas de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: El $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ocasionó una elevada toxicidad. Además, el daño hepático fue evidente, sin embargo, el tratamiento con curcumina no lo disminuyó. También ocasionó nefrotoxicidad que fue prevenida por la coadministración de curcumina. 3) Dosis i.p. única de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: El $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ causó daño hepático que fue prevenido por la coadministración con curcumina. No indujo toxicidad renal.

Modelo de hepatotoxicidad: La administración i.p. de 15 mg/Kg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ causó daño hepático que se hizo evidente por el aumento en la actividad plasmática de ALT, AST, LDH y ALP, las alteraciones estructurales, la ascitis, el daño causado por el estrés oxidante, la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, la disminución de la respiración mitocondrial y la actividad de enzimas mitocondriales y la inducción de la MPT. El pretratamiento con 400 mg/Kg de curcumina protegió exitosamente contra la hepatotoxicidad inducida por $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, previniendo los daños asociados con el estrés oxidante, evitando la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes en homogenados de tejido y en mitocondrias aisladas inducidos por el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Asimismo, la curcumina restauró la función mitocondrial, manteniendo la respiración mitocondrial, el contenido de ATP y la actividad de las enzimas mitocondriales, atenuando la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, modulando la retención de Ca^{2+} , disminuyendo el hinchamiento de la matriz evitando la ruptura de la membrana mitocondrial externa y de esta manera la liberación de citocromo c. La administración de una sola dosis de 15 mg/kg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ por vía i.p a las 24 h no causó daño estructural, estrés oxidante o algún efecto sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en cerebro, corazón, pulmón, riñón, estómago, intestino, bazo y páncreas. El efecto protector de la curcumina sobre el daño hepático inducido por $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ sugiere que la complementación de la dieta con este antioxidante puede ser útil para prevenir, disminuir o evitar el riesgo de daño hepático en las poblaciones ocupacional o ambientalmente expuestas a este agente contaminante.

Conclusión: El efecto protector de la curcumina contra la hepatotoxicidad inducida por $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se asoció con la prevención del estrés oxidante y la preservación de la función mitocondrial.

ABSTRACT

Compounds with hexavalent chromium [Cr(VI)], as potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$), have been widely recognized as carcinogenic, mutagenic and teratogenic in humans and animals. The mechanism of toxicity of Cr(VI) involves redox reactions that induce oxidative stress. In liver, it has been described that the $K_2Cr_2O_7$ increases levels of reactive oxygen species (ROS) and induces damage to lipids and proteins generating tissue damage. Particularly, mitochondria are susceptible to $K_2Cr_2O_7$ -induced damage, since the reduction of Cr(VI) to Cr(III) occurs mainly within these organelles. These toxic effects may be mitigated with antioxidants, as curcumin that acts by scavenging free radicals and/or by inducing the activation of cytoprotective genes both *in vitro* and *in vivo*, therefore it is proposed that it may be a good candidate for protection against liver damage generated by $K_2Cr_2O_7$. Moreover, owing to the therapeutic potential of curcumin, it is interesting to know whether this compound shows hepatoprotective activity against Cr(VI)-induced toxicity.

Objective: To evaluate the hepatoprotective effect of curcumin on the damage generated by $K_2Cr_2O_7$. **Specific objectives:** In liver tissue of rats treated with $K_2Cr_2O_7$: 1) to evaluate the anti-hepatotoxic effect of curcumin, 2) to recognize the histological protection of curcumin, 3) to analyze the effect of curcumin against damage induced by oxidative stress, 4) to determine the activity of antioxidant enzymes. In isolated mitochondria from liver tissue of rats treated with $K_2Cr_2O_7$: 5) to identify the effect of curcumin against damage induced by oxidative stress, 6) to analyze the activity of antioxidant enzymes, 7) to determine the effect of curcumin on mitochondrial function.

Methods: In the standarization of the hepatotoxicity model generated by $K_2Cr_2O_7$, Wistar male rats (150-200 g) were used and three treatment regimes were followed to identify the dose and route of administration by which the $K_2Cr_2O_7$ generates liver damage plus identify the dose at which curcumin attenuates or prevents this damage. Markers of kidney damage were also evaluated to compare the results with previously reported data of nephrotoxicity-induced for this pollutant as an internal control. 1) Single dose of $K_2Cr_2O_7$, subcutaneously (sc): rats received curcumin 200 or 400 mg/Kg for 10 days by gavage (ig) and/or single dose of $K_2Cr_2O_7$ 15 or 20 mg/kg (sc) the tenth day. The animals were sacrificed at 48 hours. 2) Repeated doses of $K_2Cr_2O_7$, intraperitoneally (ip): rats were treated with curcumin at a dose of 400 mg/Kg (ig) for 10 days and/or $K_2Cr_2O_7$ 10, 12.5, 15 or 17.5 mg/kg (ip) in the last five days. Animals were sacrificed at 24 hours. 3) Single dose of $K_2Cr_2O_7$, ip: rats received curcumin 400 mg/kg (ig) for 10 days and/or $K_2Cr_2O_7$ 10, 12.5, 15 or 17.5 mg/Kg (ip) at the tenth day. Animals were sacrificed at 24 hours.

Experimental Model: Rats were treated with 400 mg/kg of curcumin (ig) for 10 days and/or single dose of $K_2Cr_2O_7$ 15 mg/Kg (ip) on day nine (group 48 h) or ten (24 h group). On the eleventh day the rats were sacrificed and the liver was removed. The brain, heart, lung, kidney, stomach, intestine, spleen and pancreas were also removed because they are target organ of Cr(VI)-induced toxicity. In plasma, the activity of the enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (ASP), lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (ALP) were evaluated as hepatotoxicity indicators. Furthermore, liver homogenates were prepared to evaluate oxidative stress markers and the activity of antioxidant enzymes. The tissue samples were fixed in paraformaldehyde for histopathological and immunohistochemical analyses. In ascitic fluid, total protein and

albumin were determined. Moreover, the liver mitochondria were isolated by differential centrifugation and protein oxidation, lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes, oxygen consumption, ATP content, activities of mitochondrial complexes I-V, membrane potential, retention of Ca^{2+} , mitochondrial permeability transition (MPT) and cytochrome c release. In other organs histopathological analysis was performed, the evaluation of markers of oxidative stress and antioxidant enzyme activity was determined in groups exposed only at $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ for 24 h.

Results: Standardization of hepatotoxicity model: 1) Single sc dose of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ was unable to induce liver damage but it caused nephrotoxicity, which was attenuated by coadministration with curcumin. 2) Repeated ip doses of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ induced high toxicity, including liver damage, which was not decreased by treatment with curcumin. In contrast, nephrotoxicity was prevented by co-administration of curcumin. 3) Single ip dose of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ caused liver damage and coadministration with curcumin induced a protective effect. Renal toxicity was not observed.

Hepatotoxicity model: Administration of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (15 mg/kg, ip) induced liver damage that was evident by ascites, liver structural alterations, and by the increased plasma activity of ALT, AST, LDH and ALP which was associated to oxidative stress, decrease in the activity of antioxidant enzymes, impaired mitochondrial respiration, decreased activity of mitochondrial enzymes, and induction of MPT. Pretreatment with 400 mg/kg of curcumin successfully protected against $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -induced hepatotoxicity, preventing the damage associated with oxidative stress, preventing the $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ induced decrease in the activity of antioxidant enzymes in tissue homogenates and in isolated mitochondria. In addition, curcumin restored mitochondrial function, maintaining mitochondrial respiration and the activity of mitochondrial enzymes and attenuating depolarization of mitochondrial membrane potential by modulating the retention Ca^{2+} , decreasing the swelling of the matrix while avoiding the rupture of the outer mitochondrial membrane and thereby the release of cytochrome c. Administration of a single dose of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (15 mg/kg, ip) to 24 h did not cause structural damage, oxidative stress or an effect on the activity of antioxidant enzymes in the brain, heart, lung, kidney, stomach, intestine, spleen and pancreas. The protective effect of curcumin against $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ induced hepatotoxicity suggest that the supplementation of the diet with this antioxidant may be useful to reduce or avoid the risk of liver damage in occupational or environmentally populations exposed to this pollutant.

Conclusion: The protective effect of curcumin against $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -induced liver toxicity was associated to the prevention of oxidative stress and to the preservation of mitochondrial function.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
CONTENIDO	xi
LISTA DE ABREVIATURAS Y MOLÉCULAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS	xix
LISTA DE TABLAS	xxi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antioxidantes	1
1.2. <i>Curcuma longa</i>	2
1.3. Curcumina	4
1.3.1. Propiedades farmacocinéticas	4
1.3.2. Actividad biológica	5
1.3.3. Actividad antioxidante	6
1.3.4. Actividad hepatoprotectora	8
1.4. Estrés oxidante	8
1.5. Metales pesados	10
1.6. Cromo	11
1.6.1. Normatividad y límites de exposición a cromo	12
1.6.2. Contaminación en México por cromo	12
1.6.3. Cromo trivalente Cr(III)	14
1.6.4. Cromo hexavalente Cr(VI)	15
1.6.5. Toxicidad del cromo	16
1.6.6. Hepatotoxicidad inducida por Cr(VI)	17
1.7. Justificación	18
1.8. Hipótesis	18
1.9. Objetivos	18
1.9.1. Objetivo General	18
1.9.2. Objetivos Particulares	19
2. MÉTODOS	20
2.1. Diseño experimental	20
2.2. Modelo biológico	21
2.3. Estandarización del modelo de hepatotoxicidad inducida por $K_2Cr_2O_7$	21
2.3.1. Dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía subcutánea (s.c.)	21
2.3.2. Dosis repetidas de $K_2Cr_2O_7$, vía intraperitoneal (i.p.)	21
2.3.3. Dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.	22
2.4. Modelo experimental: dosis única de $K_2Cr_2O_7$ (15 mg/Kg), vía i.p.	22
2.5. Marcadores bioquímicos de daño hepático	23
2.6. Marcadores bioquímicos de daño renal	23
2.7. Estudio histopatológico	23
2.8. Preparación de los homogenados tisulares	24
2.9. Aislamiento de mitocondrias hepáticas	24

	Página
2.10. Biomarcadores de estrés oxidante en homogenados y mitocondrias aisladas	24
2.10.1. Contenido de malondialdehído (MDA)	24
2.10.2. Contenido de proteínas carboniladas	24
2.10.3. Contenido de glutatión reducido (GSH)	25
2.11. Actividad de enzimas antioxidantes tisulares y mitocondriales	25
2.11.1. Superóxido dismutasa (SOD)	25
2.11.2. Catalasa (CAT)	25
2.11.3. Glutatión peroxidasa (GPx)	25
2.11.4. Glutatión reductasa (GR)	26
2.11.5. Glutatión-S-transferasa (GST)	26
2.12. Consumo de oxígeno mitocondrial	26
2.13. Contenido de ATP	26
2.14. Actividad de enzimas mitocondriales	27
2.14.1. Aconitasa	27
2.14.2. NADH:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I)	27
2.14.3. Succinato:ubiquinol oxidoreductasa (Complejo II)	27
2.14.4. Ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa (Complejo III)	27
2.14.5. Succinato:citocromo c oxidoreductasa (Complejo II+III)	28
2.14.6. Citocromo c oxidasa (Complejo IV)	28
2.14.7. ATP sintasa (Complejo V)	28
2.15. Transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT)	28
2.15.1. Hinchamiento mitocondrial	28
2.15.2. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	29
2.15.3. Retención de Ca^{2+} mitocondrial	29
2.16. Liberación de citocromo c (cit c)	29
2.17. Análisis estadístico	29
3. RESULTADOS	30
3.1. Estandarización del modelo de hepatotoxicidad inducida por $K_2Cr_2O_7$	30
3.1.1. Dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía s.c.	30
3.1.2. Dosis repetidas de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.	32
3.1.3. Dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.	35
3.2. Efecto de la curcumina sobre la hepatotoxicidad inducida por $K_2Cr_2O_7$ a la dosis de 15 mg/Kg, vía i.p.	38
3.3. Protección histológica de la curcumina en hígado de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$	41
3.4. Efecto de la curcumina contra el daño inducido por el estrés oxidante en tejido hepático de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$	43
3.5. Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes en el hígado de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$	45
3.6. Efecto de la curcumina contra el daño inducido por el estrés oxidante en mitocondrias hepáticas aisladas de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$	46
3.7. Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes en mitocondrias hepáticas de ratas expuestas a $K_2Cr_2O_7$	47
3.8. Efecto de la curcumina sobre la función de mitocondrias hepáticas aisladas de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$	49

	Página
4. DISCUSIÓN	60
5. CONCLUSIONES	71
6. PERSPECTIVAS	72
7. REFERENCIAS	73
8. ANEXOS	100
8.1. Efecto del tratamiento con curcumina y/o $K_2Cr_2O_7$ a la dosis de 15 mg/Kg (24 h) sobre diversos órganos	100
8.1.1. Cerebro	100
8.1.2. Corazón	102
8.1.3. Pulmón	104
8.1.4. Riñón	106
8.1.5. Estómago	108
8.1.6. Intestino	110
8.1.7. Bazo	112
8.1.8. Páncreas	114
8.2. Artículos derivados del proyecto de tesis de Doctorado	116
8.3. Artículos derivados de colaboraciones durante el proyecto de Doctorado	117

LISTA DE ABREVIATURAS Y MOLÉCULAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
$^1\Delta O_2$	Oxígeno singulete delta
$^1\Sigma O_2$	Oxígeno singulete sigma
ABTS ⁺⁺	Radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolina-6-ácido sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Difosfato de adenosina
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina aminotransferasa
ANT	Translocador de nucleótidos de adenina-1
ARE	Elemento de respuesta a antioxidantes
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Trifosfato de adenosina
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
CAT	Catalasa
CCCP	Carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
cit c	Citocromo c
CMC	Carboximetilcelulosa
Cr(0)	Cromo metálico
Cr(III)	Cromo trivalente
Cr(VI)	Cromo hexavalente
CrO ₄ ²⁻	Anión cromato
Cr ₂ O ₇ ²⁻	Anión dicromato
CsA	Ciclosporina A
DMPD ⁺⁺	Radical <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -fenilenediamina dihidrocloruro
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
DPPH [·]	Radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
EEM	Error estándar de la media
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GAS-A	Gradiente de albúmina en plasma - albúmina en ascitis
GCLC	Glutamato cisteína ligasa subunidades catalíticas
GCLM	Glutamato cisteína ligasa subunidades moduladoras
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación-S-transferasa
H&E	Hematoxilina y eosina
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno

HCrO_4^-	Anión hidrocromato
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HO-1	Hemo oxigenasa 1
HOB _r	Ácido hipobromoso
HOCl	Ácido hipocloroso
i.p.	Intraperitoneal
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Dicromato de potasio
Keap 1	Proteína asociada a ECH 1 tipo Kelch
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MCB	Monoclorobimano
MDA	Malondialdehído
MPT	Transición de la permeabilidad mitocondrial
NBT	Nitro azul de tetrazolio
$\cdot\text{NO}$	Óxido nítrico
$\text{NO}_2\cdot$	Radical del dióxido de nitrógeno
NQO1	NADPH:ubiquinona oxidoreductasa 1
Nrf2	Factor nuclear eritroide-2 relacionado con el factor 2
O_2	Oxígeno molecular
$\text{O}_2\cdot^-$	Radical superóxido
O_3	Ozono
$\text{OH}\cdot$	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO^-	Peroxinitrito
ppm	Partes por millón
PPT	Concentración promedio ponderada en tiempo
PTPm	Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial
$\text{ROO}\cdot$	Radical peroxilo
s.c.	Subcutánea
SOD	Superóxido dismutasa
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Turmerica (<i>Curcuma longa</i>).	3
Figura 2. Tautomerismo ceto-enol de la curcumina.	5
Figura 3. Producción de radicales libres.	9
Figura 4. Participación del Cr(III) en la acción de la insulina.	15
Figura 5. Generación de estrés oxidante por Cr(VI).	17
Figura 6. Diseño experimental	20
Figura 7. Peso corporal en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía s.c.	30
Figura 8. Marcadores de daño hepático en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía s.c.	31
Figura 9. Marcadores de daño renal en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía s.c.	31
Figura 10. Peso corporal en los grupos de ratas estudiados bajo el esquema de dosis repetidas de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.	32
Figura 11. Marcadores de daño hepático en los grupos de ratas estudiados bajo el esquema de dosis repetidas de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.	33
Figura 12. Ascitis en los grupos de ratas estudiados bajo el esquema de dosis repetidas de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.	34
Figura 13. Marcadores de daño renal en los grupos de ratas estudiados bajo el esquema de dosis repetidas de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.	34
Figura 14. Peso corporal en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.	35
Figura 15. Marcadores de daño hepático en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.	36
Figura 16. Ascitis en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.	36
Figura 17. Marcadores de daño renal en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.	37

	Página
Figura 18. Efecto de la curcumina sobre el peso corporal y del hígado en ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$.	38
Figura 19. Efecto de la curcumina sobre la actividad enzimática de ALT, AST, LDH y ALP en el plasma de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$.	39
Figura 20. Efecto de la curcumina sobre la generación de ascitis en ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$.	40
Figura 21. Histologías representativas de hígado de ratas tratadas con curcumina, $K_2Cr_2O_7$ o ambos.	42-43
Figura 22. Efecto de la curcumina sobre el contenido hepático de marcadores de estrés oxidante de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$.	44
Figura 23. Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes en hígado de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$.	45
Figura 24. Efecto de la curcumina sobre el daño inducido por el estrés oxidante en mitocondrias aisladas de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$.	47
Figura 25. Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes en mitocondrias hepáticas aisladas de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$.	48
Figura 26. Trazos representativos de al menos cuatro experimentos de consumo de oxígeno, en los seis grupos estudiados usando glutamato/malato como sustratos.	50
Figura 27. Efecto de la curcumina sobre las alteraciones inducidas por el $K_2Cr_2O_7$ relativas al consumo de oxígeno mitocondrial usando glutamato/malato como sustratos.	51
Figura 28. Trazos representativos de al menos cuatro experimentos de consumo de oxígeno, en los seis grupos estudiados usando succinato como sustrato	52
Figura 29. Efecto de la curcumina sobre las alteraciones inducidas por el $K_2Cr_2O_7$ relativas al consumo de oxígeno mitocondrial usando succinato como sustrato.	53
Figura 30. Efecto del pretratamiento con curcumina sobre el contenido de ATP en mitocondrias hepáticas aisladas de ratas expuestas a $K_2Cr_2O_7$.	54
Figura 31. Efecto del pretratamiento con curcumina sobre la actividad de enzimas mitocondriales hepáticas de ratas expuestas a $K_2Cr_2O_7$.	55-56

	Página
Figura 32. Efecto de la curcumina sobre las alteraciones mitocondriales inducidas por el $K_2Cr_2O_7$ en hinchamiento, potencial de membrana y la retención de Ca^{2+} .	57
Figura 33. Efecto de la curcumina sobre la liberación de citocromo c (cit c) inducida por el tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ en mitocondrias hepáticas aisladas de ratas tratadas con estos agentes.	58
Figura 34. Efecto protector de la curcumina sobre el daño hepático inducido por el $K_2Cr_2O_7$.	69

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

	Página
Figura 1S. Micrografías representativas de la corteza cerebral, de los grupos estudiados.	100
Figura 2S. Marcadores de estrés oxidante en cerebro de los grupos estudiados.	100
Figura 3S. Actividad de enzimas antioxidantes en cerebro de los grupos estudiados.	101
Figura 4S. Micrografías representativas del miocardio de los grupos estudiados.	102
Figura 5S. Marcadores de estrés oxidante en corazón de los grupos estudiados.	102
Figura 6S. Actividad de enzimas antioxidantes en corazón de los grupos estudiados.	103
Figura 7S. Micrografías representativas del tejido pulmonar de los grupos estudiados.	104
Figura 8S. Marcadores de estrés oxidante en pulmón de los grupos estudiados.	104
Figura 9S. Actividad de enzimas antioxidantes en pulmón de los grupos estudiados.	105
Figura 10S. Micrografías representativas de la corteza renal de los grupos estudiados.	106
Figura 11S. Marcadores de estrés oxidante en riñón de los grupos estudiados.	106
Figura 12S. Actividad de enzimas antioxidantes en riñón de los grupos estudiados.	107
Figura 13S. Micrografías representativas de la túnica mucosa del estómago de los grupos estudiados.	108
Figura 14S. Marcadores de estrés oxidante en estómago de los grupos estudiados.	108
Figura 15S. Actividad de enzimas antioxidantes en estómago de los grupos estudiados.	109
Figura 16S. Micrografías representativas de la mucosa intestinal de los grupos estudiados.	110

	Página
Figura 17S. Marcadores de estrés oxidante en intestino de los grupos estudiados.	110
Figura 18S. Actividad de enzimas antioxidantes en intestino de los grupos estudiados.	111
Figura 19S. Micrografías representativas del bazo de los grupos estudiados.	112
Figura 20S. Marcadores de estrés oxidante en bazo de los grupos estudiados.	112
Figura 21S. Actividad de enzimas antioxidantes en bazo de los grupos estudiados.	113
Figura 22S. Micrografías representativas de los acinos pancreáticos de los grupos estudiados.	114
Figura 23S. Marcadores de estrés oxidante en páncreas de los grupos estudiados.	114
Figura 24S. Actividad de enzimas antioxidantes en páncreas de los grupos estudiados.	115

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Actividad hepatoprotectora de la curcumina.	7
Tabla 2. Límites de exposición a cromo ambientales y ocupacionales.	13

1. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes ambientales tienen un impacto negativo sobre los ecosistemas, causan inestabilidad, desorden, daño y/o malestar a los seres humanos y otros organismos (Gulati *et al.*, 2010). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció que cada año ocurren más de 13 millones de muertes alrededor del mundo debido a contaminantes ambientales y que aproximadamente el 24% de las enfermedades son causadas por exposiciones ambientales que podrían evitarse a través de medidas preventivas (Prüss-Üstün y Corvalán, 2006).

Una estrategia que ha sido benéfica en la prevención y atenuación de alteraciones bioquímicas inducidas por tóxicos ambientales es el consumo de antioxidantes obtenidos de la dieta (Hennig *et al.*, 2004; Flora, 2009; Lobo *et al.*, 2010). Entre estos, la curcumina (una especia que se aísla de la planta *Curcuma longa*), es uno de los antioxidantes más estudiados y posee efectos protectores contra el daño causado por el estrés oxidante inducido por contaminantes ambientales como los metales pesados (Aggarwal *et al.*, 2007).

Los metales pesados son los tóxicos conocidos más antiguamente por el hombre siendo las fuentes de exposición ubicuas tanto en el campo laboral, el agua, los alimentos o el ambiente contaminados (Ferrer, 2003). La exposición a estos agentes a corto o largo plazo puede generar estrés oxidante, lo cual causa efectos adversos en los humanos y lleva a desórdenes sistémicos (Hennig *et al.*, 2012), por lo que las estrategias que modulen el efecto de los tóxicos sobre procesos fisiológicos involucrados en la etiología y progresión de las enfermedades serán de gran importancia para la salud pública (Hennig *et al.*, 2007).

1.1. Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que previene, retarda, inhibe o remueve significativamente la oxidación de una molécula blanco (Gutteridge y Halliwell, 1999; Halliwell y Gutteridge, 2007). Particularmente, un antioxidante puede proteger contra la toxicidad por metales atrapando a las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por estos agentes, quelando a los iones metálicos previniendo la reacción con las ERO, quelando al metal manteniéndolo en un estado reducido, o favoreciendo la activación de enzimas antioxidantes (Flora, 2009).

Los sistemas antioxidantes del organismo pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. Los primeros contribuyen directa y/o indirectamente a la defensa contra el daño asociado a estrés oxidante, estos incluyen a la superóxido dismutasa (SOD) que dismuta al radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la glutatión peroxidasa (GPx) que reduce al H_2O_2 y a los hidroperóxidos, la catalasa (CAT) que convierte el H_2O_2 en oxígeno molecular (O_2) y agua (H_2O) y la glutatión-S-transferasa (GST) que cataliza la adición del glutatión reducido (GSH) a compuestos electrofílicos (Matés et al., 1999). Los sistemas no enzimáticos comprenden 2 subgrupos: antioxidantes hidrofílicos, entre ellos el GSH, la vitamina C (ascorbato), el ácido úrico y la albúmina y los antioxidantes lipofílicos, como el α -tocoferol, la bilirrubina, los carotenoides y las ubiquinonas, muchos de estos provenientes de la dieta (Halliwell, 1999).

Los antioxidantes endógenos juegan un papel crucial en el mantenimiento óptimo de las funciones celulares y por lo tanto en la salud. Sin embargo, bajo condiciones que promueven la producción de ERO, los antioxidantes endógenos pueden no ser suficientes. En consecuencia, los antioxidantes exógenos, obtenidos en la dieta o como suplementos dietéticos pueden ser necesarios para conservar la funcionalidad de las células (Rahman, 2007). Al respecto, en los últimos años se ha realizado una extensa investigación para evaluar diversos antioxidantes naturales encontrados en plantas y utilizados en la dieta para combatir las enfermedades humanas (Pérez-De La Cruz *et al.*, 2006; Tapia *et al.*, 2012; Negrette-Guzmán *et al.*, 2013). Entre estos, el turmérico, una especia aislada del rizoma de la planta *Curcuma longa*, la cual ha sido consumida como alimento y medicina ha llegado a ser una de las moléculas más citadas debido a la multitud de efectos benéficos para la salud que han sido estudiados y establecidos por la comunidad científica moderna (Kumar y Maliakel, 2007).

1.2. *Curcuma longa*

La planta perenne *Curcuma longa* (comúnmente conocida como Turmerica) es miembro de la familia Zingiberaceae (Figura 1), crece alrededor de 1 m de altura, tiene tallos cortos con hojas curvadas y oblongas, flores amarillas en forma de embudo de entre 10 y 15 cm de longitud y agrupadas en espigas densas, las cuales aparecen desde el final de la primavera hasta la mitad del verano. Además, presenta rizomas ovalados o cilíndricos, los cuales están frecuentemente ramificados y son de color amarillo-café pardo (Rivera-Espinoza y Muriel, 2009). *Curcuma longa* crece en suelos ricos, húmedos y arcillosos, es originaria de la India y el Sureste Asiático, después fue introducida en

América y en regiones templadas de Europa. Es cultivada en la mayoría de las ciudades tropicales como la India, China, Pakistán, Sri Lanka, Indonesia y Sudamérica (Kandiannan *et al.*, 2008; Bengmark *et al.*, 2009).

El uso medicinal de esta planta ha sido descrito en la India y China desde hace miles de años. En la India, se ha usado tradicionalmente para el tratamiento de desórdenes biliares, hepáticos y musculares, artritis, reumatismo, anorexia, coriza, tos, heridas diabéticas y sinusitis. Mientras que en China, se ha usado como un analgésico tópico y en enfermedades asociadas con dolores abdominales como flatulencias, cólicos y hepatitis (Ammon y Wahl, 1991; Chainani-Wu, 2003). Actualmente, el turmérico (extracto seco del rizoma de *Curcuma longa*) es utilizado por la industria de alimentos como aditivo alimenticio (especia), saborizante, conservador y agente colorante, en bebidas gaseosas, mostazas y margarinas (FAO, 2004; Aggarwal *et al.*, 2007; Basnet y Skalko-Basnet, 2011).

El turmérico contiene proteína (6.3%), grasa (5.1%), minerales (3.5%), carbohidratos (69.4%), humedad (13.1%), aceites esenciales (5.8%) y curcuminoides (3-4%) (Chattopadhyay *et al.*, 2004). La curcumina (diferuloilmetano) (70-76%), demetoxicurcumina (16%), bisdemetoxicurcumina (8%) y ciclocurcumina son los cuatro principales curcuminoides presentes en el turmérico, los cuales se reconocieron como compuestos biológicamente activos (Kohli *et al.*, 2005). Entre estos, la curcumina es la fracción más importante, ya que se demostró en la mayoría de los sistemas que es la más potente (Sreejayan y Rao, 1997; Ahsan *et al.*, 1999).

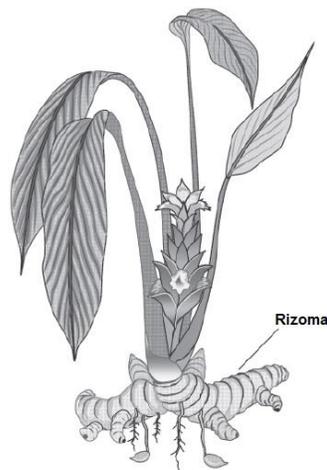


Fig. 1 Turmeric (*Curcuma longa*).

1.3. Curcumina

La curcumina o diferuloilmetano (1,7-bis[4-hidroxi-3-metoxifenil]-1,6-heptadieno-3,5-diona) es un polifenol hidrofóbico, fue aislado por primera vez en 1815 y su estructura química fue determinada por Roughley y Whiting (1973). Es un pigmento de color amarillo, tiene un peso molecular de 368.37 y un punto de fusión de 183°C, es relativamente insoluble en agua, pero se disuelve en acetona, ácido acético, cloroformo, dimetilsulfóxido y etanol (Sharma *et al.*, 2005; Anand *et al.*, 2007).

La curcumina químicamente es una β -dicetona bi- α,β -insaturada, la cual presenta tautomerismo ceto-enol. La forma bi-ceto predomina en soluciones acuosas ácidas o neutras y en la membrana celular (Wang *et al.*, 1997). Jovanovic *et al.* (1999) demostraron que la curcumina a pH 3-7, actúa como un donador de átomos de H. Esto se debe a que en la forma ceto, el enlace heptadienona entre los dos anillos metoxifenólicos contienen un átomo de carbono altamente activado y las uniones C-H son muy débiles debido a la deslocalización de los electrones desapareados de los oxígenos adyacentes. Mientras que a pH 8, la forma enólica de la cadena heptadienona es la que predomina y en esta forma actúa principalmente como un donador de electrones, lo cual es un mecanismo típico para la actividad atrapadora de los antioxidantes fenólicos (Figura 2).

1.3.1. Propiedades farmacocinéticas

La curcumina administrada oralmente a ratas a una dosis de 500 mg/kg es absorbida desde el tracto digestivo y pasa al torrente sanguíneo, distribuyéndose a diferentes tejidos como la sangre, el hígado, riñón e intestino en donde las concentraciones máximas se observaron a las 6 h y se detectó del 3.88 al 48.3% de la curcumina administrada. En el tejido hepático, la curcumina fue detectable hasta los 4 días. (Suresh y Srinivasan, 2010). La curcumina es estable en el estómago y en el intestino delgado ya que su degradación es extremadamente lenta a pH 1-7 y su elevada lipofilia le permite una rápida absorción gastrointestinal por difusión pasiva (Sharma *et al.*, 2007). Ravindranath y Chandrasekhara (1981) reconocieron que después de la administración oral de 400 mg/Kg de curcumina, se absorbe del 60 al 66% de la dosis dada y que este compuesto podía encontrarse en cantidades detectables en el hígado y el riñón hasta por 12 días.

Por otro lado, cuando la curcumina se administra por vía intraperitoneal (i.p.) a modelos murinos la absorción es del 20 al 33% a las 4 h. En corazón, pulmón, los riñones, el cerebro y los tejidos musculares los niveles disminuyeron a niveles residuales antes de

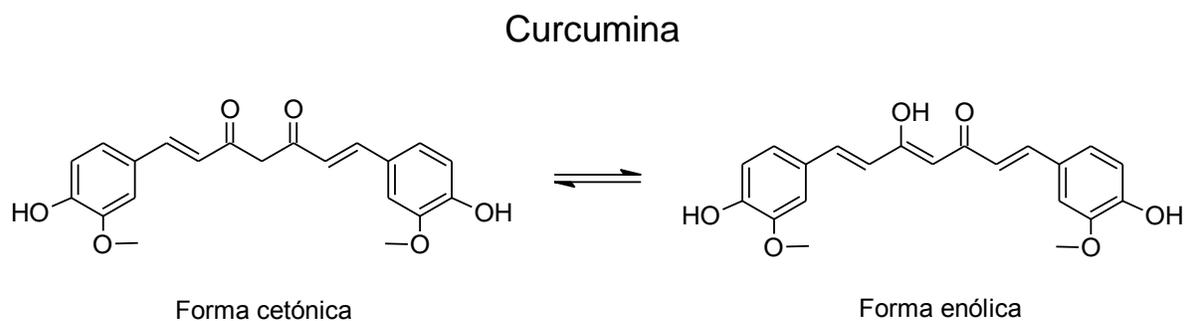


Fig. 2 Tautomerismo ceto-enol de la curcumina.

las 24 h (Perkins *et al.*, 2002). Cuando la curcumina se administra a una dosis de 100 mg/Kg, vía i.p. las concentraciones máximas en plasma o suero en el transcurso de 1 h son menores a 2.25 µg/mL (Pan *et al.*, 1999).

La curcumina administrada por vía oral es sujeta a conjugaciones tipo sulfatación y glucuronidación en el plasma, la mucosa intestinal, el hígado y el riñón de la rata (Asai y Miyazawa, 2000; Ireson *et al.*, 2001), siendo el hígado, el principal órgano responsable del metabolismo de la curcumina (Garcea *et al.*, 2004). La curcumina se excreta principalmente por las heces y muy poco por orina. Mientras que, cuando la administración es intraperitoneal o intravenosa este compuesto es excretado a través de la bilis (Sharma *et al.*, 2007).

En estudios clínicos, realizados con voluntarios y pacientes con cáncer, se ha observado que la curcumina presenta baja biodisponibilidad sistémica siguiendo la administración oral (Cheng *et al.*, 2001; Lao *et al.*, 2006; Hsu y Cheng, 2007). Garcea *et al.* (2005), identificaron que una dosis oral diaria de 3.6 g de curcumina es compatible con niveles detectables del compuesto en tejido colorectal de pacientes con cáncer y que estos niveles podrían ser suficientes para ejercer su actividad farmacológica.

1.3.2. Actividad biológica

En numerosos estudios preclínicos, se ha demostrado que la curcumina presenta actividades antioxidantes (Iqbal *et al.*, 2003; Surh, 2003; Dairam *et al.*, 2008; Al-Jassabi *et al.*, 2012), anti-inflamatorias (Jurenka, 2009; Bereswill *et al.*, 2010), antimicrobiales (Çıkrıkçı *et al.*, 2008; Tajbakhsh *et al.*, 2008), antivirales (Barthelemy *et al.*, 1998; Kutluay

et al., 2008) y anticarcinogénicas (Aggarwal *et al.*, 2003; 2006; Wang *et al.*, 2009; Das y Vinayak, 2012).

Además, se ha sugerido que este compuesto tiene efectos benéficos en diversas enfermedades humanas como el cáncer (Garcea *et al.*, 2004; 2005), diabetes (Balasubramanyam *et al.*, 2003), enfermedad de Alzheimer (Ringman *et al.*, 2012), poliposis adenomatosa familiar (Cruz-Correa *et al.*, 2006), enfermedad inflamatoria intestinal (Holt *et al.*, 2005), artritis reumatoide (Deodhar *et al.*, 1980; Chandran y Goel, 2012), hipercolesterolemia (Soni y Kuttan, 1992), daño hepático (Kim *et al.*, 2013), asma atópica (Kim *et al.*, 2011), psoriasis (Kurd *et al.*, 2008), osteoartritis (Belcaro *et al.*, 2010), enfermedades neurológicas (Sanmukhani *et al.*, 2013), uveitis anterior crónica (Lal *et al.*, 1999; Allegri *et al.*, 2010), infección con el virus de inmunodeficiencia humana (James, 1994), y fibrosis quística (Henke, 2008). Además, la curcumina ha entrado en evaluaciones clínicas de fase I, II y III por su eficacia terapéutica incluso a dosis tan altas como 12 g/día durante 3 meses (Cheng *et al.*, 2001; Hsu y Cheng, 2007; NIH, 2007; Dhillon *et al.*, 2008).

1.3.3. Actividad antioxidante

La curcumina es un antioxidante bifuncional debido a que ejerce efectos antioxidantes directos e indirectos. La presencia de los grupos fenólicos en la estructura de la curcumina explican su capacidad de reaccionar con ERO y ERN de manera directa, además, los grupos metoxilo aumentan esta actividad (Esatbeyoglu *et al.*, 2012). La curcumina ha demostrado la capacidad de atrapar una variedad de ERO, incluyendo $O_2^{\cdot-}$, radical hidroxilo (OH^{\cdot}), radical peroxilo (ROO^{\cdot}), radical del dióxido de nitrógeno ($\cdot NO_2$), radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH $^{\cdot}$), radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS $^{\cdot+}$) y el radical *N,N*-dimetil-*p*-fenilenediamina dihidrocloruro (DMPD $^{\cdot+}$) (Reddy y Lokesh, 1994; Fujisawa *et al.*, 2004; Ak y Gülcin, 2008; Trujillo *et al.*, 2013). La forma enólica puede funcionar como un quelante de metales cargados positivamente, los cuales son frecuentemente encontrados en los sitios activos de proteínas blanco (Baum y Ng, 2004). El potencial quelante de la curcumina del tipo 1:1 y 1:2 ha sido reportado para los iones de cobre (Cu^{2+}), hierro (Fe^{2+}), manganeso (Mn^{2+}), plomo (Pb^{3+}), y zinc (Zn^{2+}) (Gupta *et al.*, 2011).

Por otro lado, la curcumina puede actuar como antioxidante indirecto induciendo la translocación del factor nuclear eritroide-2 relacionado con el factor 2 (Nrf2) al núcleo (Tapia *et al.*, 2012; 2013; Correa *et al.*, 2013; González-Reyes *et al.*, 2013). Nrf2 es un

Tabla 1. Actividad hepatoprotectora de la curcumina.

Compuesto	Modelo	Tratamiento con curcumina	Actividad protectora de la curcumina	Referencia
Alcohol	Rata Wistar	75 mg/Kg por 30 días, i.g.	↓ hígado graso ↓ inflamación ↓ necrosis	Nanji <i>et al.</i> , 2003
Etinilestradiol	Rata Sprague Dawley	50 mg/Kg por 15 días, i.g.	↓ daño hepático ↓ estrés oxidante ↓ colestasis	Ahmed y Mannaa, 2004
Cadmio	Rata Wistar	50 mg/Kg por 3 días, i.g.	↓ estrés oxidante ↑ GSH	Eybl <i>et al.</i> , 2004
Dimetilnitrosamina	Rata Wistar	200 mg/Kg por 4 días, i.g.	↓ necrosis ↓ estrés oxidante ↑ activación de Nrf2 ↑ enzimas antioxidantes ↑ GSH	Farombi <i>et al.</i> , 2008
Metotrexato	Rata Swiss	100 mg/Kg por 5 días, i.p.	↓ daño hepático ↓ inflamación ↓ necrosis ↓ estrés oxidante ↑ enzimas antioxidantes ↑ GSH	Hemeida y Mohafez, 2008
Tetracloruro de carbono	Rata Sprague Dawley	200 y 400 mg/Kg por 8 semanas, i.g.	↓ daño hepático ↓ fibrogénesis hepática ↓ citocinas proinflamatorias ↑ enzimas antioxidantes ↑ GSH	Fu <i>et al.</i> , 2008
Hierro	Rata Wistar	100 mg/Kg por 11 días, i.g.	↓ daño hepático ↓ deposición de hierro ↓ estrés oxidante ↑ GSH	El-Maraghy <i>et al.</i> , 2009
Paracetamol	Rata Wistar	50 mg/Kg por 15 días, i.g.	↓ daño hepático ↓ estrés oxidante ↓ inflamación ↑ enzimas antioxidantes ↑ GSH	Farghaly y Hussein, 2010

factor de transcripción sensible a redox el cual, bajo condiciones basales, está unido a su represor en el citoplasma, la proteína asociada a ECH 1 tipo Kelch (Keap1) el cual causa su degradación proteosomal (Copples *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010; Uruno y Motohashi, 2011; Buelna-Chontal y Zazueta, 2013).

La curcumina contiene dos grupos funcionales aceptores de Michael en su molécula, los cuales pueden modificar los residuos de cisteína de Keap1 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2001; Balogun *et al.*, 2003), liberando a Nrf2 permitiéndole translocarse al núcleo y unirse como un heterodímero al elemento de respuesta a antioxidantes (ARE) en el ácido desoxirribonucleico (ADN), iniciando la expresión de genes blancos e incrementando la expresión de enzimas de fase II (Dinkova-Kostova y Talalay, 1999; 2008; Hong *et al.*, 2005). De esta manera, la curcumina induce la transcripción de varios genes citoprotectores que incluyen SOD, CAT (Shukla *et al.*, 2003), GPx, glutatión reductasa (GR) (Piper *et al.*, 1998), GST (Oetari *et al.*, 1996), hemo oxigenasa 1 (HO-1) (Balogun *et al.*, 2003), NADPH:ubiquinona oxidoreductasa 1 (NQO1), glutamato cisteína ligasa subunidades catalíticas (GCLC) y moduladoras (GCLM) (Zhao *et al.*, 2013), así como aldosa reductasa (Kang *et al.*, 2008).

1.3.4. Actividad hepatoprotectora

Los efectos anti-hepatotóxicos de la curcumina contra fármacos, tóxicos ambientales y ocupacionales están bien documentadas (Tabla 1), atribuyéndose a sus propiedades antioxidantes intrínsecas, anti-inflamatorias, anticoléstatas, antifibrogénicas y anticarcinogénicas, mediando la inactivación de diferentes procesos involucrados en el daño hepático y manteniendo la función mitocondrial. Estas propiedades hacen de la curcumina un potencial agente protector contra el daño hepático inducido por metales pesados como el cromo.

1.4. Estrés oxidante

El estrés oxidante se define como un desbalance entre la generación de especies pro-oxidantes y la eliminación de las mismas mediante sistemas antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 2007). Este estado se caracteriza por un aumento en los niveles de ERO que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes y que daña al ADN, lípidos y proteínas causando disfunciones metabólicas severas, incluyendo la pérdida de la integridad celular, de funciones enzimáticas, estabilidad genómica, entre

otras, lo cual guía a la patogénesis de muchas enfermedades humanas (Finkel y Holbrook, 2000; Elejalde, 2001).

En los sistemas vivos, incluso en el estado basal, el metabolismo aeróbico está implicado en la producción de ERO, las cuales se forman durante los pasos intermedios de la reducción del oxígeno (Guérin et al., 2001). Las ERO pueden ser radicales libres o no radicales derivados del oxígeno. Un radical libre es aquella especie química que tiene uno o más electrones desapareados en su último orbital y que puede existir de manera independiente, lo que les proporciona gran reactividad y la cual depende de la localización del electrón (Rybczynska, 1994). Una vez que el radical libre ha conseguido obtener el electrón que necesita para aparear el suyo, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre, iniciándose así una reacción en cadena que daña a las células (Figura 3). Así, la vida media del radical es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a las moléculas y a las membranas celulares (Acworth et al., 1997).

Entre las especies radicales se incluyen al OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, O_2 , ROO^\bullet ; mientras que los no radicales comprenden al H_2O_2 , oxígeno singulete delta ($^1\Delta\text{O}_2$), oxígeno singulete sigma ($^1\Sigma\text{O}_2$), ácido hipocloroso (HOCl), ácido hipobromoso (HOBr) y ozono (O_3). El óxido nítrico ($^\bullet\text{NO}$), $^\bullet\text{NO}_2$ y peroxinitrito (ONOO^\bullet) pertenecen al grupo de ERN (Fang et al., 2002).

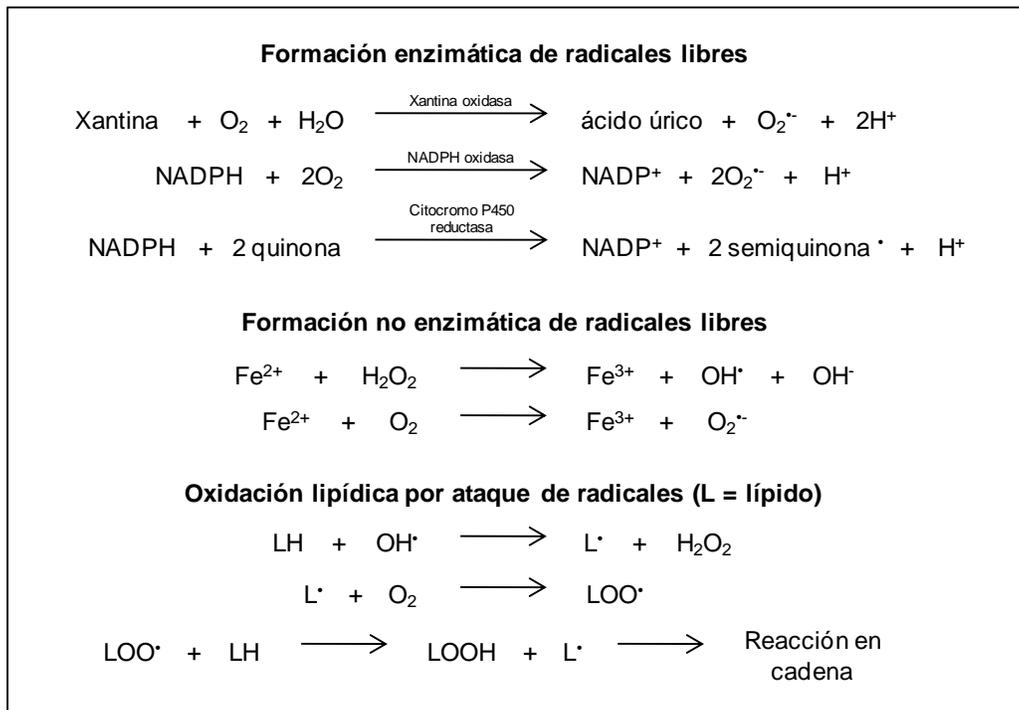


Fig. 3 Producción de radicales libres (Langseth, 1995).

Las fuentes más importantes de generación de ERO son la cadena de transporte de electrones mitocondrial, los peroxisomas y el sistema de citocromos P450. Además, la producción de ERO puede ser acelerada por la acción de varias enzimas tal como las ciclooxigenasas, xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa desacoplada y NADPH oxidasas (Rashid *et al.*, 2013). Entre las fuentes exógenas destacan los metales pesados, fármacos, disolventes, plaguicidas, radiaciones ionizantes (rayos γ , X, UV), hiperoxia e isquemia-perfusión, etc. (Kumar, 2011).

1.5. Metales pesados

Los metales están definidos químicamente como elementos con la capacidad para conducir el calor, poseen resistencia eléctrica que es directamente proporcional a la temperatura, maleabilidad, ductilidad e incluso brillo, forman cationes y tienen óxidos básicos (Appenroth, 2010). El término metales pesados se utiliza comúnmente para agrupar metales y semimetales (metaloides) con alto peso atómico que se han asociado con contaminación y toxicidad potencial o ecotoxicidad (IUPAC, 2002).

Se encuentran ampliamente distribuidos en la corteza terrestre y pueden estar presentes en el cuerpo humano; sin embargo, su presencia en la atmósfera, suelo y agua, puede causar problemas serios a todos los organismos (Jarup, 2003; Alissa y Ferns, 2011). Las fuentes de exposición a estos metales incluyen la exposición ocupacional y la contaminación ambiental (Ahalya *et al.*, 2003; CDC, 2009; Martinez-Zamudio y Ha, 2011). Las principales industrias emisoras de metales pesados al ambiente son la petroquímica, extractiva, metalúrgica (fundición y metalurgia), mecánica (procesos galvánicos, pintura), química (materiales plásticos, pinturas) y de cerámica (Ziemacki *et al.*, 1989).

El cromo (Cr) y el cobre (Cu) desarrollan reacciones cíclicas de óxido-reducción, mientras que la ruta primaria para la toxicidad del arsénico (As), cadmio (Cd) y mercurio (Hg) es la depleción del GSH y la unión a los grupos sulfhidrilos de las proteínas. Sin embargo, el factor que agrupa la toxicidad y carcinogenicidad de todos estos metales es la generación de ERO y ERN (Valko *et al.*, 2005; Flora *et al.*, 2008). En consecuencia, los metales pesados pueden causar alteraciones en los sistemas circulatorio, cardiovascular, endocrino, inmunológico, nervioso (central y periférico), reproductivo, urinario, de las vías de eliminación (colon, hígado, riñón, piel), de producción de energía y enzimáticas (Hughes, 1996).

El hígado es un órgano importante de considerar cuando se investigan los efectos de agentes contaminantes, debido a que juega un papel central en el metabolismo y

desintoxicación de sustancias biológicas. Además, la mayoría de las sustancias absorbidas por el intestino pasan primero a través del hígado donde las toxinas y los metales pesados pueden acumularse (Saïdi *et al.*, 2013). De esta manera, la exposición a metales pesados puede ocasionar enfermedades hepáticas relacionadas con daño crónico en el hígado, inflamación, fibrosis y finalmente carcinoma hepatocelular (Tanikawa y Torimura, 2006; Vera-Ramirez *et al.*, 2013), por lo que el uso de antioxidantes, la quelación y las terapias herbales son tres estrategias generalmente usadas en el tratamiento de intoxicaciones por metales pesados (Flora, 2009; Flora y Pachauri, 2010; Nwokocha *et al.*, 2012).

1.6. Cromo

El cromo es un elemento metálico encontrado en la naturaleza principalmente en rocas, animales, plantas, en polvos y gases volcánicos (Liu y Shi, 2001; Bagchi *et al.*, 2001). Es el décimo tercer elemento más abundante sobre la corteza terrestre, con una concentración promedio del orden de 400 partes por millón (ppm). Aproximadamente el 80% de la producción mundial viene de la India, Irán, Pakistán, Turquía y Sudáfrica. La Asociación Internacional sobre el Desarrollo del Cromo (ICDA), reportó que la producción mundial del mineral cromita en 2004 fue de alrededor de 17.2 millones de toneladas, de las cuales 92% fue producida para la industria metalúrgica, 4.4% para la industria química, 2.9% para la industria de la fundición y 0.5% para la industria refractaria (ICDA, 2004).

Este elemento pertenece al grupo VIB de la tabla periódica y tiene estados de oxidación desde -2 a +6, de las cuales las formas divalentes (+2, II), trivalentes (+3, III) y hexavalentes (+6, VI), son las más importantes. Sin embargo, las formas divalentes son rápidamente oxidadas al estado trivalente que es más estable (ATSDR, 2008; NTP, 2011). El cromo metálico [Cr(0)], es un sólido de color acero-grisáceo que se derrite a temperatura muy alta. Se usa principalmente para producir acero y otras aleaciones (ATSDR, 2000a). Las principales vías de exposición humana a estos compuestos son por inhalación, ingestión o contacto dérmico (U.S. EPA, 1998) y en la literatura científica, han sido ampliamente reconocidos como carcinógenos, mutágenos y teratógenos en humanos y animales (Armienta *et al.*, 2001; Pawlikowski *et al.*, 2006; Morton-Bermea *et al.*, 2010).

1.6.1. Normatividad y límites de exposición a cromo

El gobierno federal ha desarrollado reglamentos y recomendaciones para proteger la salud pública de los potenciales efectos adversos inducidos por el cromo, estableciendo límites o niveles de este metal, que no deben excederse en el aire, agua, suelo o alimentos (Galvao y Corey, 1987; ATSDR, 2008). La tabla 2 resume la normatividad nacional e internacional en que se regulan los límites máximos permisibles de cromo.

1.6.2. Contaminación en México por cromo

Gran parte del crecimiento industrial de México se desarrolló en los años previos a la década de los noventa cuando el manejo y disposición adecuada del cromo no estaba sujeta a regulación. Todo ello ocasionó que gran número de empresas generadoras de estos residuos contaminaran los suelos adyacentes y mantos acuíferos, cercanos a sus instalaciones con este tipo de compuestos (Díaz-Barriga, 1996; Cortinas de Nava, 2007; Reyes-Gutiérrez *et al.*, 2009).

En la ciudad de León (Guanajuato), uno de los principales centros industriales y urbanos del país, se detectó la presencia de cromo en pozos de agua potable, proveniente de tres fuentes: 1) desgaste de piroxenitas (rocas ultramórficas con un alto contenido de cromo total, alrededor de 1,500 ppm), 2) uso de cenizas residuales producidas en la fabricación de ladrillos como abono (conteniendo más de 1,000 ppm de Cr(VI)), y 3) la inadecuada disposición de desechos sólidos de la fábrica de cromado Química Central. De esta manera se han generado concentraciones de cromo mayores a los 50 mg/L en los pozos de agua (Armienta-Hernández y Rodríguez-Castillo, 1995).

Otro caso de contaminación por cromo, es el reportado en Tultitlán (Estado de México). En este lugar y a finales de los años 50, se instaló la empresa Cromatos de México, S.A., productora de compuestos de cromo que comenzaron a contaminar el aire y el suelo, generando gran incidencia de enfermedades respiratorias. A la clausura de esta planta se decidió la construcción de un cementerio industrial que albergara las 75 mil toneladas de material residual producido durante 20 años (González-Morán y Rodríguez-Castillo, 1989). Dadas las características de esta construcción, el agua de lluvia se infiltra y disuelve el cromo, distribuyéndolo lentamente en el subsuelo y contaminando los pozos de agua. Además, durante la primera década, el desecho fue utilizado como material de relleno en los alrededores de la empresa y en la nivelación de calles (Gutiérrez-Ruíz *et al.*, 1990). En 1986, Gutiérrez-Ruíz *et al.* recolectaron muestras de suelo en diversos puntos alrededor del cementerio industrial, de las cuales el 16.7% resultaron contaminadas con

chromo, obteniendo valores desde 10 hasta 6480 ppm. Recientemente, (Morton-Bermea *et al.*, 2010) identificaron cantidades entre 15 y 1837 mg/Kg de cromo total en muestras de suelo, siendo la cantidad de Cr(VI) detectado de 0.5 mg/Kg.

Tabla 2. Límites de exposición a cromo ambientales y ocupacionales recomendados.

Recurso	Forma química del cromo	Límite máximo permisible	Regulación
Agua de bebida	Total	0.05 mg/L	NOM-127-SSA1-1994
	Total	0.05 mg/L	WHO, 2003
	Total	0.1 mg/L	U.S. EPA, 2010
Aguas residuales: vertidas a aguas y bienes nacionales.	Total	0.5 – 1.5 mg/L	NOM-001-SEMARNAT-1996
	Cr(VI)	0.5 – 1 mg/L	NOM-002-SEMARNAT-1996
	Cr(VI)	1 – 1.5 mg/L	NOM-003-SEMARNAT-1997
vertidas al alcantarillado urbano y municipal.	Cr(VI)	0.5 – 1 mg/L	NOM-002-SEMARNAT-1996
tratadas que se reutilizan en servicios al público	Cr(VI)	1 – 1.5 mg/L	NOM-003-SEMARNAT-1997
Residuos peligrosos	Cr(VI)	5 mg/L	NOM-052-SEMARNAT-2005
Suelo uso agrícola, residencial o comercial	Cr(VI)	280 mg/Kg	NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004
Suelo uso industrial	Cr(VI)	510 mg/Kg	NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004
	Cr(VI)	10-50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	NOM-010-STPS-1999
	Cr(III) y Cr(0)	500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	Cr(VI)	5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	OSHA, 2006
	Cr(II), (III) y Cr(0)	500-1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
Aire: lugar de trabajo; PPT*	Cr VI	10-50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	ACGIH, 1999
	Cr III y metálico	500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	Cr VI	1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	NIOSH, 2007
Aire: lugar de trabajo; PPT (10 h)	Cr II, III y metálico	500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	

*PPT, concentración promedio ponderada en tiempo, para una jornada laboral normal de trabajo de 8 horas y una semana laboral de 40 horas, a la que pueden estar expuestos los trabajadores, sin presentar efectos adversos.

1.6.3. Cromo trivalente Cr(III)

El Cr(III) es la forma más común que se encuentra de manera natural y es un nutrimento presente en cantidades traza en algunos alimentos como carne, granos, plantas oleaginosas y legumbres (Rezende *et al.*, 2005). La participación del Cr(III) en el metabolismo favorece el incremento en la sensibilidad a la insulina, ya que al unirse cuatro átomos de cromo con la proteína intracelular denominada apocromodulina se induce un cambio conformacional y se genera la cromodulina activa, que concomitantemente con la insulina, amplifica la cascada de señales intracelulares responsables de estimular la translocación del transportador de glucosa GLUT4, e incrementar la entrada de glucosa a las células (Figura 4) (Mertz, 1993; Davis y Vincent, 1997; Vincent, 2000).

Además, debido a su acción sensibilizadora a la insulina, el Cr(III) también puede "influenciar" el metabolismo de proteínas, estimulando la incorporación de aminoácidos a la célula y favoreciendo de esta manera, la síntesis de proteínas (Clarkson, 1997). Sin embargo, la acción del cromo parece no estar limitada a la participación coadyuvante con la insulina y aunque ninguna enzima dependiente de cromo ha sido identificada, parece ser que este elemento puede inhibir a la enzima hepática hidroximetil glutaril-CoA reductasa, reduciendo así la concentración de colesterol en plasma (Zima *et al.*, 1998). Hay también, algunas evidencias de la función del cromo sobre el metabolismo de lípidos, la cual parece estar relacionada con el incremento en la actividad de la enzima lipasa, aumentando con ello, la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y disminuyendo el colesterol total, así como la concentración de lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL, VLDL) (Grant *et al.*, 1997; Lukaski, 2000).

Las sales de cromo como el picolinato y polinicotinato de cromo, son usados como micronutrientes y suplementos alimenticios para mejorar el perfil lipídico y los síntomas de individuos afectados con diabetes tipo II, dislipidemias u otros desórdenes metabólicos relacionados (Anderson, 1997; 1998; 2003; Hummel *et al.*, 2007). Algunos deportistas los utilizan para promover una mayor ganancia de masa muscular y la pérdida de grasa corporal (Pittler *et al.*, 2003). La Academia Nacional de Ciencia de Estados Unidos estableció que la ingesta diaria adecuada y segura de Cr(III) en adultos es de 50-200 µg/día (ATSDR, 2000a). Sin embargo, su efectividad ha sido un área de intenso debate en la última década, ya que en algunos estudios no se han observado efectos benéficos sobre la composición corporal de individuos saludables, incluso cuando se toman con un programa de entrenamiento (Vincent, 2003). Adicionalmente, se ha reportado que estos

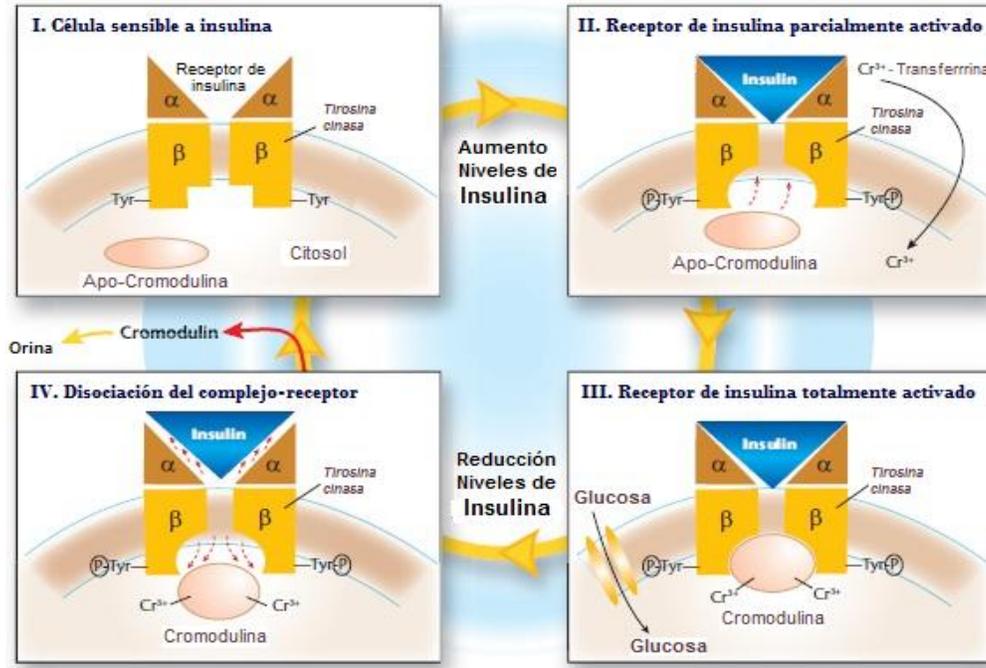


Fig. 4 Participación del Cr(III) en la acción de la insulina (Rezende *et al.*, 2005).

suplementos podrían ocasionar efectos deletéreos (Bailey *et al.*, 2006; Jana *et al.*, 2009), produciendo daño al ADN, proteínas y a organelos celulares (Raja y Nair, 2008; Stearns *et al.*, 2002).

1.6.4. Cromo hexavalente Cr(VI)

Los compuestos de Cr(VI) son agentes fuertemente oxidantes, altamente corrosivos y en el ambiente, son generalmente reducidos a Cr(III). En solución, el Cr(VI) existe en especies iónicas como hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}) y dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). La proporción de cada especie iónica en solución es dependiente del pH. A pH básico y neutro, predomina la forma de cromato. A pH de 6.0 a 6.2, se incrementa la concentración de hidrocromato. Mientras que a pH muy bajo, predomina la especie dicromato (ATSDR, 2000a; Volke *et al.*, 2005).

El Cr(VI) es un contaminante ambiental y su amplia distribución es el resultado de su extensa explotación industrial para producir acero inoxidable, pinturas y pigmentos, en el curtido de cueros, como catalizador y productos para el tratamiento de la madera (ATSDR, 2000b; Bagchi *et al.*, 2002b; OSHA, 2009). Los compuestos con Cr(VI) más comúnmente encontrados en la industria son el cromato de calcio, trióxido de cromo,

cromato y dicromato de sodio, cromato y dicromato de potasio, cromato de estroncio, cromato de plomo y cromato de zinc (IARC, 1990; Costa, 1997; NTP, 2011).

1.6.5 Toxicidad del cromo

La toxicidad de la mayor parte de los metales está relacionada con el bloqueo de un grupo funcional, desplazamiento de un ión metálico esencial o modificación de la conformación activa de una biomolécula. Sin embargo, uno de los principales mecanismos que está involucrado en su toxicidad, es la generación de estrés oxidante (Ercal *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2005). En relación al cromo, los minerales y el Cr(0) no son tóxicos, las sales de Cr(III) son medianamente tóxicas, mientras que las sales de Cr(VI) son altamente tóxicas (Shrivastava *et al.*, 2002).

O'Flaherty (1996), desarrolló un modelo fisiológico para el cromo, el cual incorpora distintos esquemas de absorción y disposición para el Cr(III) y Cr(VI) a través del cuerpo. El modelo sugiere que una vez absorbido, el Cr(III) viaja en el torrente sanguíneo principalmente unido a aminoácidos, otros ácidos orgánicos y proteínas plasmáticas, tal como globulinas y considera que cuando el Cr(III) está unido a ligandos de peso molecular más bajos es más probable que sea capaz de atravesar las membranas celulares (Mertz, 1969).

También, el modelo asume que la reducción del Cr(VI) no ocurre en el plasma, sino que en las formas aniónicas CrO_4^{2-} , HCrO_4^- o $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ tiene la capacidad de ingresar a la célula por canales proteínicos transportadores de aniones (Alexander y Aaseth, 1995), en el espacio intracelular es reducido a la forma pentavalente Cr(V) y luego a los estados Cr(IV) y Cr(III) por agentes reductores celulares como el GSH, cisteína, ácido ascórbico, riboflavina, flavoenzimas dependientes de NADPH, citocromo P450 reductasas y la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Jannetto *et al.*, 2001; Pourahmad y O'Brien, 2001; Ueno *et al.*, 2001). Langard (1979), estableció que la reducción del Cr(VI) a Cr(III) ocurre principalmente dentro de la mitocondria y que puede efectuarse en cualquiera de los diferentes organelos celulares donde haya donadores de electrones disponibles.

A través del establecimiento de pares óxido-reductores entre Cr(VI)/Cr(V), Cr(V)/Cr(IV), Cr(IV)/Cr(III) y Cr(III)/Cr(II), los cuales sirven como donadores de electrones cíclicos en una reacción tipo Fenton, se produce $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , radicales tiol y radicales basados en carbono (Figura 5) (Stohs y Bagchi, 1995; Liu y Shi, 2001). De esta manera, el Cr(VI) ocasiona daño en el ADN genómico (Henkler *et al.*, 2010), oxidación de

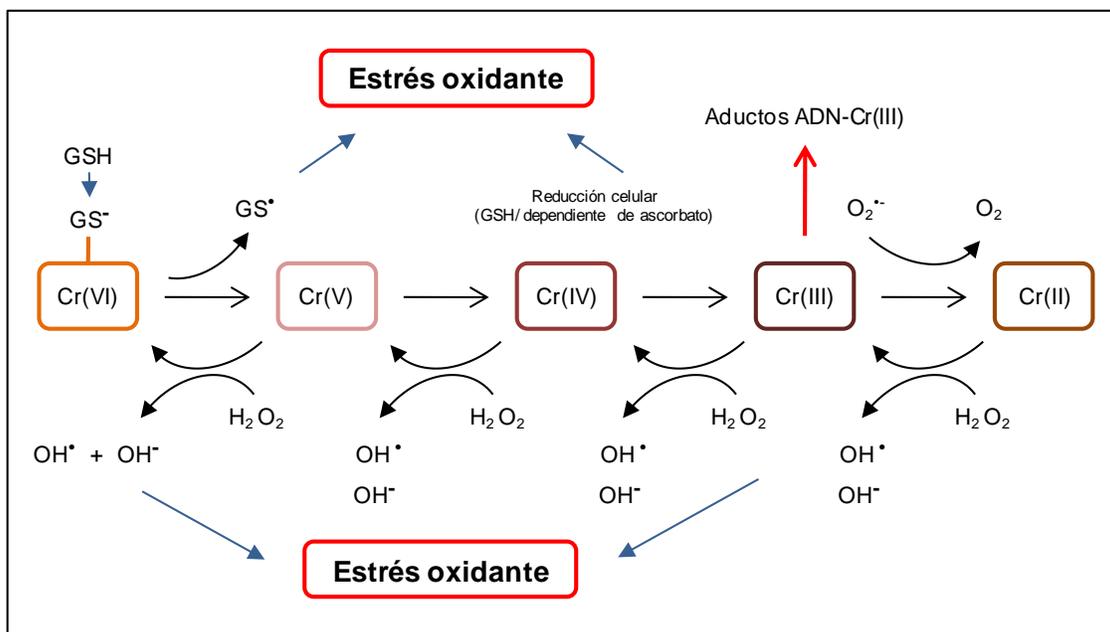


Fig. 5 Generación de estrés oxidante por Cr(VI) (Henkler *et al.*, 2010).

lípidos y proteínas (Kalahasthi *et al.*, 2006; Myers *et al.*, 2008; 2011), activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B y de la proteína supresora de tumores p53 (Ye *et al.*, 1999; Son *et al.*, 2010), arresto del ciclo celular, fosforilación de tirosinas (Bagchi *et al.*, 2001; Ding y Shi, 2002); daño mitocondrial (Ryberg y Alexander, 1990; Rudolf *et al.*, 2005; Myers *et al.*, 2010) y apoptosis (Pritchard *et al.*, 2000; 2001; Quinteros *et al.*, 2008).

La exposición ocupacional o ambiental a Cr(VI) provoca daño severo a los riñones (Wedeen y Qian, 1991; Barrera *et al.*, 2003; Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2005; Linos *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2013), hígado (Stift *et al.*, 2000; Rafael *et al.*, 2007), pulmones (Witmer *et al.*, 1994; Aw, 1997; Beaver *et al.*, 2009), piel (Ermolli *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2009; Rui *et al.*, 2010), cerebro (Travacio *et al.*, 2000; Nudler *et al.*, 2009), así como a otros órganos vitales (Shrivastava *et al.*, 2002; Aruldas *et al.*, 2005; Gatto *et al.*, 2010). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó a los compuestos con Cr(VI) como cancerígenos para los seres humanos (Grupo 1) (IARC, 1990).

1.6.6. Hepatotoxicidad inducida por Cr(VI)

Debido a su importante papel en la transformación de xenobióticos ambientales, el hígado es un órgano susceptible de ser atacado por Cr(VI) (Wood *et al.*, 1990) y cambios histopatológicos como la degeneración parenquimatosa, esteatosis y necrosis han sido

observados (Woźniak *et al.*, 1991; Kurosaki *et al.*, 1995; Acharya *et al.*, 2001). La hepatotoxicidad del Cr(VI) está asociada a niveles aumentados de ERO (Patlolla *et al.*, 2009b; Wang *et al.*, 2006), aumentar la lipoperoxidación (Bagchi *et al.*, 1995a; 1995b), daño al ADN (Yuann *et al.*, 1999), inhibición de la síntesis de ADN, ácido ribonucleico (ARN) y proteínas (Gunaratnam y Grant, 2008), disminuir la actividad de enzimas antioxidantes (Ueno *et al.*, 1989; Anand, 2005; Soudani *et al.*, 2013), daño mitocondrial (Pourahmad *et al.*, 2001; 2005), interferir con la bioenergética mitocondrial (Fernandes *et al.*, 2002; Ryberg y Alexander, 1984), arresto del ciclo celular (Xiao *et al.*, 2012) y apoptosis (Kalayarasan *et al.*, 2008).

En respuesta a la generación de ERO implicada en la patogénesis de toxicidad del cromo, la suplementación con antioxidantes puede ser considerada como un método alternativo para la protección hepática (Qi *et al.*, 2000; Anand, 2005b; Medina-Campos *et al.*, 2007).

1.7. Justificación

Debido al potencial terapéutico de la curcumina es de interés conocer si este compuesto presenta actividad hepatoprotectora contra la toxicidad inducida por Cr(VI), para que mediante la complementación de la dieta con este antioxidante, se busque prevenir, disminuir o evitar el riesgo de daño hepático en las poblaciones ocupacional o ambientalmente expuestas a este agente contaminante.

1.8. Hipótesis

Si el antioxidante bifuncional curcumina es capaz de reducir el estrés oxidante generado por el Cr(VI), entonces prevendrá o disminuirá el daño hepático inducido por el $K_2Cr_2O_7$.

1.9. Objetivos

1.9.1. Objetivo general

Evaluar el efecto hepatoprotector de la curcumina sobre el daño generado por $K_2Cr_2O_7$.

1.9.2. Objetivos particulares

En tejido hepático de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$:

- 1) Evaluar el efecto anti-hepatotóxico de la curcumina.
- 2) Reconocer la protección histológica de la curcumina.
- 3) Analizar el efecto de la curcumina contra el daño inducido por el estrés oxidante.
- 4) Determinar la actividad de enzimas antioxidantes.

En mitocondrias aisladas de tejido hepático de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$:

- 5) Identificar el efecto de la curcumina contra el daño inducido por el estrés oxidante.
- 6) Analizar la actividad de enzimas antioxidantes.
- 7) Determinar el efecto de la curcumina sobre la función mitocondrial.

2. MÉTODOS

2.1. Diseño experimental

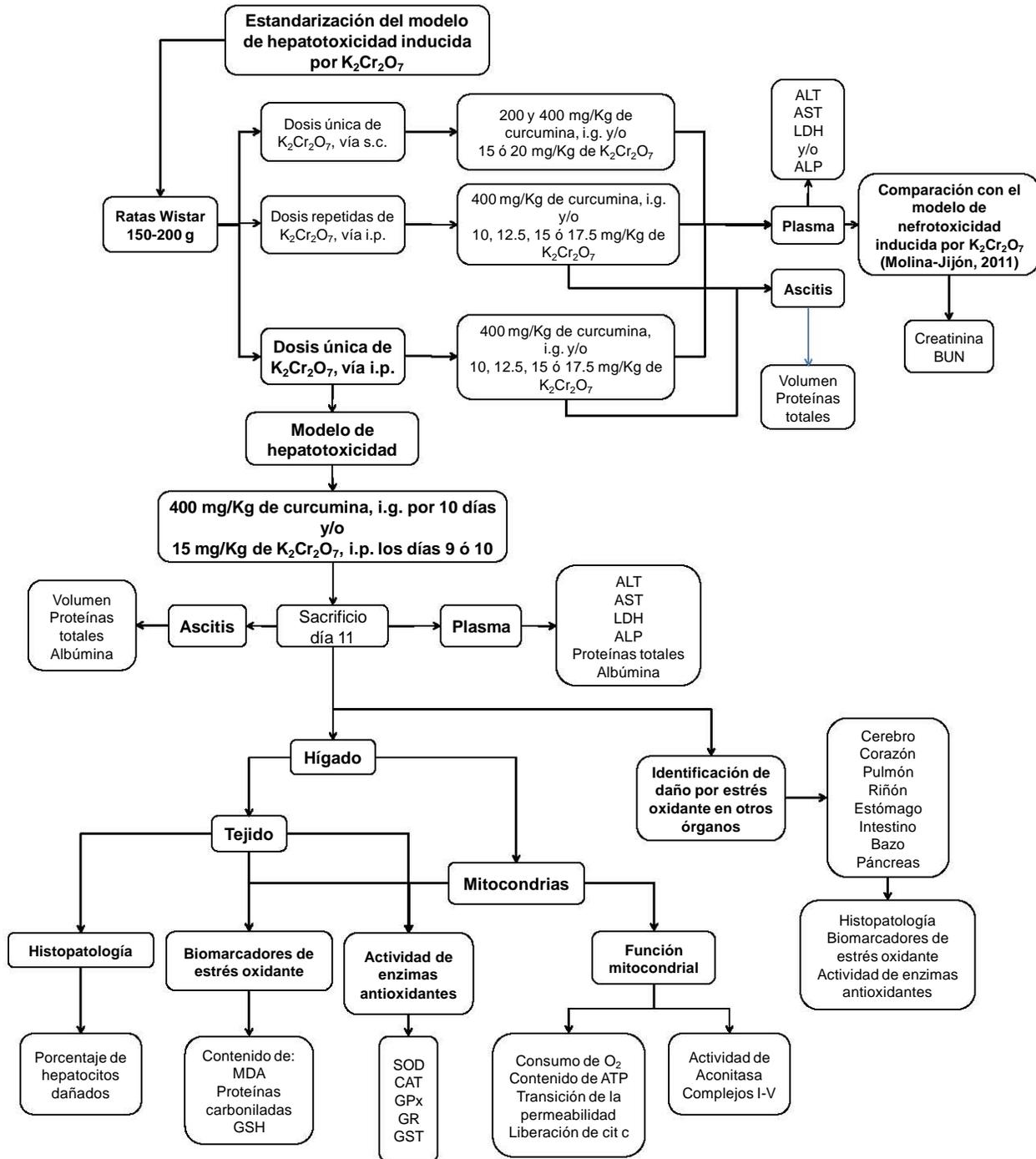


Fig. 6 Diseño experimental.

2.2. Modelo biológico

Las ratas macho Wistar (*Rattus norvegicus*) de 150 a 200 g se mantuvieron en cajas de acrílico con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, con acceso a agua y alimento *ad libitum*.

Todos los procedimientos se realizaron minimizando el sufrimiento animal y fueron aprobados por el Comité de Ética (FQ/CICUAL/036/12). Los protocolos experimentales siguieron los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y para la disposición de los residuos biológicos (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002).

2.3. Estandarización del modelo de hepatotoxicidad inducida por $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

2.3.1. Dosis única de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, vía subcutánea (s.c.)

Las ratas se dividieron en grupos de 4 a 6 ratas cada uno. Grupo 1: se inyectaron por vía s.c. con una sola dosis de solución salina al décimo día (vehículo del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Grupos 2 y 3: se trataron vía s.c. con dosis única de 15 ó 20 mg/Kg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ al décimo día (Molina-Jijón *et al.*, 2012). Grupo 4: se administró por vía intragástrica (i.g.) carboximetilcelulosa al 0.5% por 10 días (CMC, vehículo de la curcumina). Grupos 5 y 6: se trataron vía i.g. con 200 ó 400 mg/Kg de curcumina por 10 días, respectivamente (Molina-Jijón *et al.*, 2011). Grupo 7 y 8: se trataron con 200 ó 400 mg/Kg de curcumina por 10 días (i.g.) y la coadministración de 15 mg/Kg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (s.c.), se realizó 1 h después de la última administración de curcumina. Grupos 9 y 10: se trataron con 200 ó 400 mg/Kg de curcumina por 10 días (i.g.) y la coadministración de 20 mg/Kg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (s.c.), se realizó 1 h después de la última administración de curcumina. Los animales se sacrificaron a las 48 horas.

2.3.2. Dosis repetidas de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, vía intraperitoneal (i.p.)

Las ratas se dividieron en grupos de 4 a 5 ratas cada uno. Grupo 1: se inyectaron i.p. con solución salina por cinco días consecutivos. Grupos 2-5: se trataron vía i.p. con 10, 12.5, 15 ó 17.5 mg/Kg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ durante cinco días (Patlolla *et al.*, 2009b). Grupo 6: se administró CMC al 0.5% por 10 días (i.g.). Grupo 7: se trataron vía i.g. con 400 mg/Kg de curcumina por 10 días. Grupos 8-11: se trataron con 400 mg/Kg de curcumina por 10 días (i.g.) y la coadministración de 10, 12.5, 15 ó 17.5 mg/Kg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (i.p.), se realizó los últimos cinco días 1 hora después de la administración de curcumina. Los animales se sacrificaron a las 24 horas.

2.3.3. Dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.

Las ratas se dividieron en grupos de 4 a 10 ratas cada uno. Grupo 1: se administró vía i.p. solución salina al décimo día. Grupos 2 y 3: se trataron vía i.p. con dosis única de 10, 12.5, 15 ó 17.5 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ (Kim y Na, 1991). Grupo 6: se administró CMC al 0.5% por 10 días (i.g.). Grupo 7: se trataron vía i.g. con 400 mg/Kg de curcumina por 10 días. Grupos 8-11: se trataron con 400 mg/Kg de curcumina por 10 días (i.g.) y la coadministración de $K_2Cr_2O_7$ 10, 12.5, 15 ó 17.5 mg/Kg (i.p.), se realizó 1 hora después de la última administración de curcumina. Los animales se sacrificaron a las 24 horas.

Al término de estos esquemas de exposición las ratas se anestesiaron y se recolectaron muestras de sangre de la aorta abdominal. La sangre se centrifugó a 300 x g para separar el plasma, el cual se almacenó a $-4^{\circ}C$ hasta la determinación de las actividades de la aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP) o lactato deshidrogenasa (LDH), como indicadores de hepatotoxicidad. También se midió la creatinina en plasma u orina, el nitrógeno ureico en sangre o la urea en orina y proteinuria, como indicadores de nefrotoxicidad.

2.4. Modelo experimental: dosis única de $K_2Cr_2O_7$ (15 mg/Kg), vía i.p.

Las ratas se dividieron en grupos de 8 ratas cada uno. Grupo 1: se administró vía i.p. solución salina al décimo día. Grupos 2 y 3: se trataron vía i.p. con dosis única de 15 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ al noveno (48 h de tratamiento) y décimo día (24 h de tratamiento), respectivamente (Kim y Na, 1991). Grupo 4: se administró CMC al 0.5% por 10 días (i.g.). Grupo 5: se trataron vía i.g. con 400 mg/Kg de curcumina por 10 días. Grupos 6 y 7: se trataron con 400 mg/Kg de curcumina por 10 días (i.g.) y la coadministración de 15 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ (i.p.), se realizó 1 h después de la administración de la curcumina al noveno y décimo día, respectivamente. Los animales se sacrificaron en el día once.

Las ratas se anestesiaron y se recolectaron muestras de sangre para obtener el plasma en el cual se determinaron las actividades de ALT, AST, ALP y LDH. También se recuperó líquido ascítico donde se determinó la concentración de proteínas y albúmina. El hígado se removió para realizar los estudios histológicos y los análisis bioquímicos que incluyeron marcadores de estrés oxidante y actividad de enzimas antioxidantes. Por otra parte, se aislaron las mitocondrias hepáticas por centrifugación diferencial y se midieron los marcadores de daño asociado a estrés oxidante, la actividad de enzimas antioxidantes, el consumo de oxígeno, el contenido de ATP, así como las actividades de la aconitasa y la actividad de los complejos mitocondriales I-V. También se midió la

transición de la permeabilidad mitocondrial, evaluando el hinchamiento de las mitocondrias, el potencial de membrana, la retención de Ca^{2+} y la liberación de citocromo c.

También se obtuvieron el cerebro, corazón, pulmón, riñones, estómago, intestino, páncreas y bazo. Un segmento se utilizó para análisis bioquímicos y otro fue examinado por histopatología. En los grupos tratados con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (48 h) y el coadministrado con curcumina no se llevaron a cabo estos análisis.

2.5. Marcadores bioquímicos de daño hepático

Las actividades en plasma de ALT, AST, ALP y LDH se evaluaron espectrofotométricamente de acuerdo a procedimientos estándar usando estuches de diagnóstico comercialmente disponibles (ELITechGroup, Sées, France). La concentración de albúmina en plasma y líquido ascítico se determinó espectrofotométricamente por el método de verde bromocresol, utilizando una curva estándar de albúmina libre de ácidos grasos y la densidad óptica se midió a 628 nm después de 5 min de incubación a 25°C (Doumas *et al.*, 1971).

2.6. Marcadores bioquímicos de daño renal

Las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 h y se midió la excreción urinaria de proteínas totales por turbidimetría a 420 nm (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1999). Además, en el plasma y orina se determinó la concentración de creatinina y urea, utilizando estuches comerciales (Spinreact, Girona, Spain).

2.7. Estudio histopatológico

El hígado y demás tejidos se cortaron en segmentos de 0.5 cm de ancho, fijadas por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4%, deshidratadas, y embebidas en parafina. Se tiñeron secciones delgadas de 3 μm con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron con un microscopio de luz Leica (Cambridge, UK) (Coballase-Urrutia *et al.*, 2011). En los cortes de hígado, se analizaron los perfiles histológicos de siete campos 100X seleccionados al azar por rata (n=3-4 ratas por grupo), se registró el número de hepatocitos necróticos (células encogidas con citoplasma acidofílico condensado y núcleos picnóticos o fragmentados) y se calculó el porcentaje de células dañadas (n=500-800 hepatocitos).

2.8. Preparación de los homogenados tisulares

Las muestras de tejido se homogenizaron en amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM, pH 7.3 suplementado con hidroxitolueno butilado 0.5 M, empleando un politrón Brinkmann Modelo PT 2000 (Westbury, NY, USA). Los homogenados se centrifugaron a 3,000 g y se separó el sobrenadante. En estos sobrenadantes se midieron los marcadores de daño oxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GR, GPx y GST). La concentración de proteínas de los homogenados y mitocondrias aisladas se determinó de acuerdo al método descrito por Lowry *et al.* (1951).

2.9. Aislamiento de mitocondrias hepáticas

El hígado se lavó y se colocó en amortiguador de aislamiento frío conteniendo sacarosa 220 mM, HEPES 10 mM y EGTA 1 mM, pH 7.3. El hígado se cortó en trozos pequeños antes de ser homogenado. Las mitocondrias se obtuvieron por medio de centrifugaciones diferenciales y se midió el contenido de proteínas (Tapia *et al.*, 2012).

2.10. Marcadores de estrés oxidante en homogenados y mitocondrias aisladas

2.10.1. Contenido de malondialdehído (MDA)

El MDA es un importante subproducto tóxico de la peroxidación lipídica, el cual se midió por la formación de un complejo con 1-metil-2-fenilindol (Chirino *et al.*, 2008). Los homogenados y mitocondrias se incubaron con 1-metil-2-fenilindol 15.4 mM disuelto en una mezcla de acetonitrilo metanol (3:1); la reacción se inició al adicionar HCl al 37%. La densidad óptica se midió a 586 nm después de 1 h de incubación a 45°C. Para conocer la concentración de MDA se utilizó una curva estándar de trimetoxipropano. Los resultados se expresan como nmol MDA/mg proteína.

2.10.2. Contenido de proteínas carboniladas

El contenido de proteínas carboniladas, un marcador relativamente estable de la oxidación de proteínas por ERO, se midió por su reactividad con dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas (Maldonado *et al.*, 2003). Los homogenados y mitocondrias se incubaron por 1 h con sulfato de estreptomina para remover los ácidos nucleicos. Después, se trataron con DNPH 10 mM y HCl 2.5 M, las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético al 10% y se resuspendieron en cloruro de guanidina

6 M. La absorbancia se midió a 370 nm y los datos se expresaron como nmol carbonilos/mg proteína.

2.10.3. Contenido de glutatión reducido (GSH)

El contenido de GSH se evaluó siguiendo la formación de un aducto fluorescente entre el GSH y monoclorobimano (MCB) en una reacción catalizada por GST (Chirino *et al.*, 2010). Los homogenados y las mitocondrias se mezclaron en una solución Krebs-Henseleit conteniendo MCB 1 mM y GST 1 U/mL. Se utilizó una curva estándar de GSH y se midió la fluorescencia usando un lector de microplacas multimodal Synergy HT a las longitudes de onda de excitación y emisión de 385 y 478 nm, respectivamente. Los resultados se expresan como nmol GSH/ mg proteína.

2.11. Actividad de enzimas antioxidantes tisulares y mitocondriales

2.11.1. Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se evaluó espectrofotométricamente a 560 nm, midiendo la inhibición de la reducción del nitro azul de tetrazolio (NBT) a formazán (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2000). Una unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de proteína que inhibe la reducción del NBT en un 50%. Los datos se expresan como U/mg proteína.

2.11.2. Catalasa (CAT)

La actividad de CAT se midió por un método basado en la descomposición del H₂O₂ por la CAT contenida en las muestras a 240 nm (Barrera *et al.*, 2003). Los resultados se expresaron como *k*/mg proteína. *k* es la constante de reacción de primer orden de la catalasa, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula: $k = (1/\Delta t)(2.3 \times \log(A_1/A_2))$. Donde *t*=intervalo de tiempo medido, A₁ y A₂ son las absorbancias del H₂O₂ en los tiempos t₁ y t₂.

2.11.3. Glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de GPx se determinó indirectamente por medio de un par de reacciones acopladas, en las cuales la GPx reduce el H₂O₂, oxidando al GSH a glutatión oxidado (GSSG), el cual a su vez es reducido nuevamente a GSH por la GR que usa a NADPH como agente reductor (Orozco-Ibarra *et al.*, 2007). El consumo de NADPH se midió a 340 nm y los resultados se expresaron como U/mg proteína. 1 U de GPx se define como la cantidad de enzima que oxida 1 nmol de NADPH por minuto.

2.11.4. Glutación reductasa (GR)

La actividad de GR se midió usando GSSG como sustrato en una reacción cinética en la cual la enzima lo reduce a GSH en presencia de NADPH. Se midió la desaparición del NADPH a 340 nm y los datos se expresan como U/mg proteína. 1 U de GR es la cantidad de enzima que oxida 1 nmol de NADPH por minuto.

2.11.5. Glutación-S-transferasa (GST)

La actividad de la GST se determinó midiendo la conjugación del GSH con 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB) a 340 nm (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008). Los resultados se expresan como U/mg proteína. 1U de GST se definió como la cantidad de enzima que conjuga 1 μ mol de CDNB con GSH por minuto.

2.12. Consumo de oxígeno mitocondrial

La actividad de la cadena respiratoria se midió utilizando un electrodo para oxígeno tipo Clark, el cual determina directamente la velocidad de consumo de oxígeno. La respiración basal (estado 4) se evaluó en presencia de glutamato de sodio y malato de sodio, o con succinato de sodio y rotenona. La respiración asociada a la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) (estado 3) se determinó agregando difosfato de adenosina (ADP). El control respiratorio se calculó como la relación estado 3/estado 4. La respiración desacoplada se midió en presencia de carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP). La eficiencia de fosforilación (relación ADP/O) se calculó como el número de nmoles de ADP transformados a ATP entre el número de nmoles de oxígeno consumido durante el estado 3 (Correa *et al.*, 2008).

2.13. Contenido de ATP

El contenido de ATP se midió indirectamente a través de un par de reacciones acopladas, en las que la hexocinasa transfiere un fosfato del ATP a la glucosa formando glucosa-6-fosfato, la cual a su vez es transformada a 6-fosfogluconato por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, reduciendo el NADP⁺ a NADPH. La formación del NADPH se siguió fluorométricamente a las longitudes de onda de excitación y emisión de 345 y 460 nm. Se utilizó una curva estándar de NADH 4 mM y los datos se expresan como nmol ATP/mg proteína (Buelna-Chontal *et al.*, 2011).

2.14. Actividad de enzimas mitocondriales

2.14.1. Aconitasa

La actividad de la aconitasa se evaluó espectrofotométricamente a 240 nm siguiendo la formación del cis-aconitato (Martínez-Abundis *et al.*, 2010). Se utilizó amortiguador de fosfatos (KH_2PO_4 25 mM, Tween 20 al 0.05%, pH 7.3), suplementado con citrato de sodio 1 mM y 50 μg de proteína mitocondrial. La reacción se inició al adicionar cloruro de manganeso 0.6 mM. Los datos se expresan como nmol/min/mg proteína.

2.14.2. NADH:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I)

La actividad se evaluó en un espectrofotómetro de doble haz siguiendo la oxidación de NADH mediante la disminución en la absorbancia a 340 nm (Zúñiga-Toalá *et al.*, 2012). Los ensayos se llevaron a cabo en medio estándar suplementado con 0.1 μg de antimicina A, KCN 1 mM, NADH 100 μM , Tween 20 al 0.01% y 0.5 mg de proteína mitocondrial. La reacción se inició al adicionar decilubiquinona 60 μM , en presencia o ausencia de rotenona 4 μM . La actividad de la enzima se determina como la diferencia de NADH oxidado con o sin rotenona, utilizando una curva estándar de NADH. Los resultados se expresan como nmol NADH/min/mg proteína.

2.14.3. Succinato:ubiquinol oxidoreductasa (Complejo II)

La actividad de la enzima se evaluó polarográficamente en medio estándar suplementado con succinato 5 mM, rotenona 2 μM , 0.1 μg de antimicina, KCN 1 mM, CCCP 1 μM y 0.5 mg de proteína mitocondrial (Gaona-Gaona *et al.*, 2011). La reacción se inició adicionando metasulfato de fenazina 1 mM. Los resultados se expresan como ngAtO/min/mg proteína.

2.14.4. Ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa (Complejo III)

La actividad del complejo se determinó en un espectrofotómetro de doble haz siguiendo la reducción del citocromo c (cit c) al oxidar al ubiquinol a 550 nm (Barrientos, 2002). Se utilizó amortiguador de fosfatos (K_2HPO_4 25 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6), suplementado con rotenona 2 μM , KCN 1 mM, cit c 20 μM y 10 μg de proteína mitocondrial. La reacción se inició al adicionar ubiquinol 25 μM . Los datos se expresan como nmol cit c red/min/mg proteína.

2.14.5. Succinato:citocromo c oxidoreductasa (Complejo II+III)

La actividad se determinó en un espectrofotómetro de doble haz siguiendo la reducción del cit c mediante el aumento en la absorbancia a 550 nm (Barrientos et al., 2009). La reacción se llevó a cabo en medio KME (KCl 120 mM, MOPS 20 mM y EGTA 0.5 mM, pH 7.2), suplementado con rotenona 2 μ M, KCN 1 mM, cit c 60 μ M y 0.3 mg de proteína mitocondrial. La reacción se inició al adicionar succinato 5 mM. Los resultados se expresan como nmol cit c red/min/mg proteína.

2.14.6. Citocromo c oxidasa (Complejo IV)

La actividad de la enzima se evaluó polarográficamente en medio KME suplementado con ácido ascórbico 5 mM, cit c 25 μ M, tetrametilparfenilendiamina 2.5 mM, rotenona 2 μ M, antimicina 0.5 μ M y CCCP 1 μ M (Correa et al., 2007). La reacción se inició al agregar 50 μ g de proteína mitocondrial. Los resultados se expresan como ngAtO/min/mg proteína.

2.14.7. ATP sintasa (Complejo V)

La actividad de la F_1F_0 ATPasa se determinó a través de un método fluorescente, siguiendo la cantidad de protones (H^+) que se liberan por la hidrólisis de ATP utilizando piranina como indicador, a las longitudes de onda de excitación y emisión de 491 y 517 nm, respectivamente (Molina-Jijón et al., 2011). El medio de reacción (sacarosa 130 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Hepes 0.5 mM, pH 7.2) se suplementó con piranina 0.5 mM y 1 mg de proteína mitocondrial. La reacción se inició al adicionar ATP 2 mM, en presencia o ausencia de oligomicina 3.16 μ M. La actividad de la enzima se determina como la diferencia de H^+ liberados con o sin oligomicina, utilizando una curva estándar de HCl 1N. Los resultados se expresan como nmol H^+ /min/mg proteína.

2.15. Transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT)

2.15.1. Hinchamiento mitocondrial

La transición de la permeabilidad se midió registrando la disipación de la luz como resultado del hinchamiento de las mitocondrias. La cantidad de luz disipada es inversamente proporcional al volumen mitocondrial. El hinchamiento se evaluó después de la adición de $CaCl_2$ 50 μ M por los cambios en la absorbancia a 540 nm en ausencia o presencia de ciclosporina A (CsA, 1 μ M) durante 10 min (Correa et al., 2007).

2.15.2. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

El potencial de membrana mitocondrial se evaluó espectrofotométricamente en un espectrofotómetro de doble haz (UV-3600 Shimadzu) a 525-575 nm usando el colorante catiónico permeable safranina O (10 mM), en ausencia o presencia de CsA. La reacción se inició con la adición de CaCl_2 50 μM (García *et al.*, 2000).

2.15.3. Retención de Ca^{2+} mitocondrial

El movimiento de Ca^{2+} mitocondrial se evaluó en ausencia o presencia de CsA utilizando un espectrofotómetro de doble haz a 675-685 nm y el colorante metalocrómico arsenazo III (50 μM). La reacción se inició con la adición de CaCl_2 50 μM (Zazueta *et al.*, 2010).

2.16. Liberación de citocromo c (cit c)

Las mitocondrias hepáticas aisladas se incubaron en medio de reacción estándar con CaCl_2 50 μM , en ausencia o presencia de CsA por 10 min. Posteriormente, la suspensión mitocondrial se centrifugó obteniéndose el botón mitocondrial y el sobrenadante por separado. Se realizó Western blot para determinar la liberación de cit c y se utilizó el translocador de nucleótidos de adenina-1 (ANT) como control de carga (Zazueta *et al.*, 2007).

2.17. Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando la prueba de ANOVA seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los resultados están expresados como media \pm error estándar de la media (EEM). Las comparaciones con una $p < 0.05$ se consideraron significativos. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 5.0.

3. RESULTADOS

3.1. Estandarización del modelo de hepatotoxicidad inducida por $K_2Cr_2O_7$

3.1.1. Dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía s.c.

El grupo control presentado corresponde al tratado con solución salina. Los grupos tratados con 15 y 20 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$, presentaron una disminución significativa en la ganancia de peso corporal con respecto al control. En cambio, la coadministración de 400 mg/Kg de curcumina evitó significativamente la pérdida de peso ocasionada por el $K_2Cr_2O_7$ a ambas dosis (Figura 7A). La proporción hepática; es decir, la relación entre el peso del hígado con respecto al peso corporal no se modificó de manera significativa en ninguno de los grupos (Figura 7B).

El $K_2Cr_2O_7$ a las dosis de 15 y 20 mg/Kg administrado por vía s.c., no generó un incremento significativo en la actividad del marcador de daño hepático ALT (Figura 8A). La actividad de AST aumentó significativamente en los grupos tratados con 15 y 20 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$, así como en el grupo coadministrado con 200 mg/Kg de curcumina y 20 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$. Además, la coadministración con 400 mg/Kg de curcumina no evitó este incremento (Figura 8B).

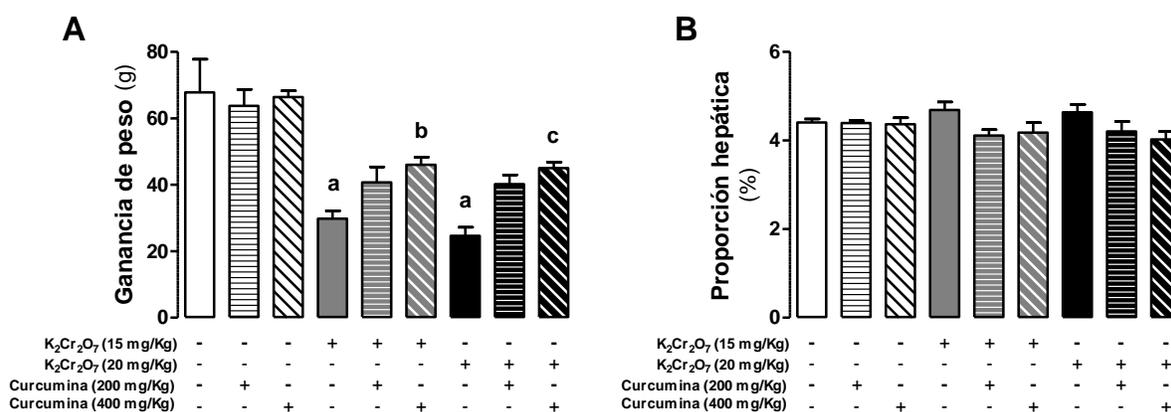


Fig. 7. Peso corporal en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía s.c. (A) ganancia de peso corporal después de los 10 días de seguimiento y (B) proporción hepática de ratas tratadas con curcumina y/o $K_2Cr_2O_7$. Promedio \pm EEM. $n=4-6$. ^a $p<0.05$ vs. control; ^b $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ 15 mg/Kg; ^c $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ 20 mg/Kg.

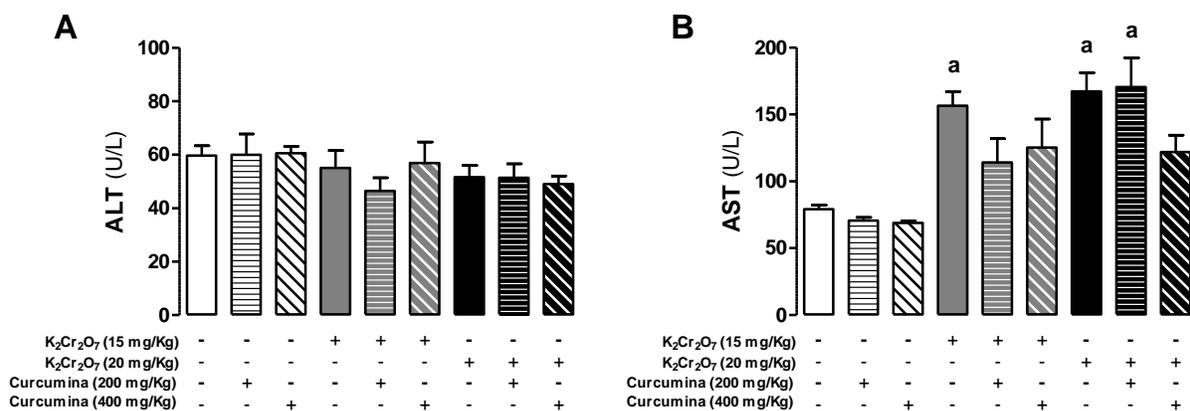


Fig. 8 Marcadores de daño hepático en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de K₂Cr₂O₇, vía s.c. (A) ALT, alanina aminotransferasa y (B) AST, aspartato aminotransferasa. Promedio ± EEM. n=4-5. ^ap<0.05 vs. control.

El daño renal sólo se determinó mediante marcadores bioquímicos en el plasma de las ratas de los grupos control y en las administradas con 400 mg/Kg de curcumina y 15 mg/Kg de K₂Cr₂O₇. El K₂Cr₂O₇ a la dosis de 15 mg/Kg generó un incremento significativo en la concentración de creatinina y nitrógeno ureico en sangre (BUN), siendo estos efectos atenuados por la coadministración de curcumina (Figura 9).

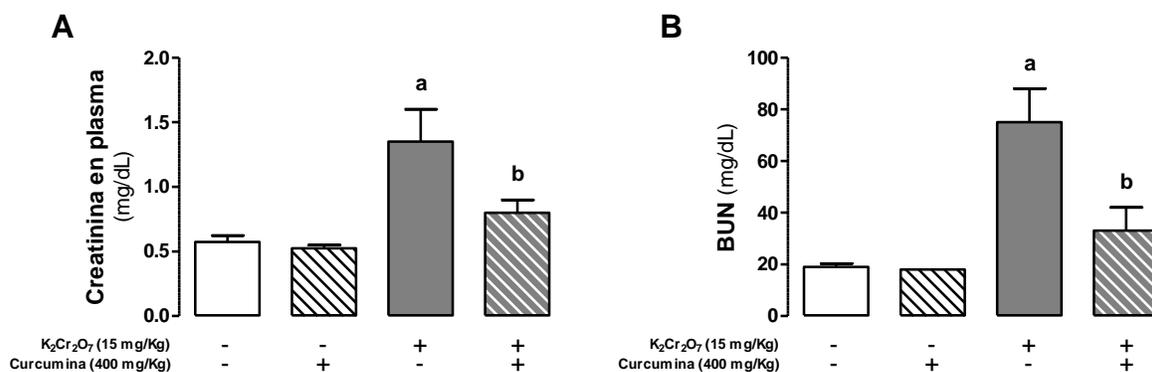


Fig. 9 Marcadores de daño renal en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de K₂Cr₂O₇, vía s.c. (A) creatinina en plasma y (B) BUN, nitrógeno ureico en sangre. Promedio ± EEM. n=4-5. ^ap<0.05 vs. control; ^bp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇ 15 mg/Kg.

3.1.2. Dosis repetidas de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.

La administración repetida de $K_2Cr_2O_7$ generó una alta toxicidad a la dosis de 17.5 mg/Kg, ya que de cinco animales expuestos, se murieron cuatro. Esta toxicidad se atenuó por la coadministración de 400 mg/Kg de curcumina, donde las cinco ratas sobrevivieron; empero, la ganancia en peso se redujo significativamente en relación al control. Además, la dosis de 15 mg/Kg disminuyó de forma significativa la ganancia de peso; así como en los grupos coadministrados con 400 mg/Kg curcumina y 10, 12.5 ó 15 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ (Figura 10A). La proporción hepática no se afectó en los grupos tratados (Figura 10B).

El $K_2Cr_2O_7$ indujo daño hepático, generando el aumento en la actividad de ALT a la dosis de 15 mg/Kg y en los grupos coadministrados con curcumina y con 15 ó 17.5 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$. El daño hepático no fue prevenido por la curcumina en estos grupos (Figura 11A). El $K_2Cr_2O_7$ a la dosis de 17.5 mg/Kg también aumentó las actividades de ALT, AST y LDH, pero como es un solo dato no se estableció su significancia. La dosis de $K_2Cr_2O_7$ de 15 mg/Kg incrementó de forma significativa la actividad de AST y la coadministración de curcumina redujo este incremento, aunque no a niveles similares a los controles. Además, el tratamiento con curcumina no disminuyó la actividad de AST promovida por el $K_2Cr_2O_7$ a la dosis de 17.5 mg/Kg (Figura 11B).

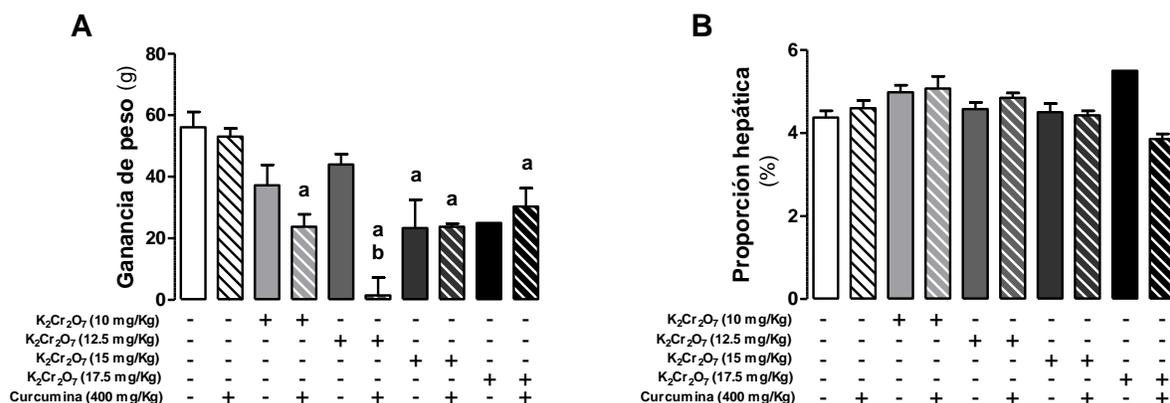


Fig. 10 Peso corporal en los grupos de ratas estudiados bajo el esquema de dosis repetidas de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p. (A) ganancia de peso corporal después de los 10 días de seguimiento y (B) proporción hepática de ratas tratadas con curcumina y/o $K_2Cr_2O_7$. Promedio \pm EEM. n=1-5. ^a p <0.05 vs. control; ^b p <0.05 vs. $K_2Cr_2O_7$ 12.5 mg/Kg.

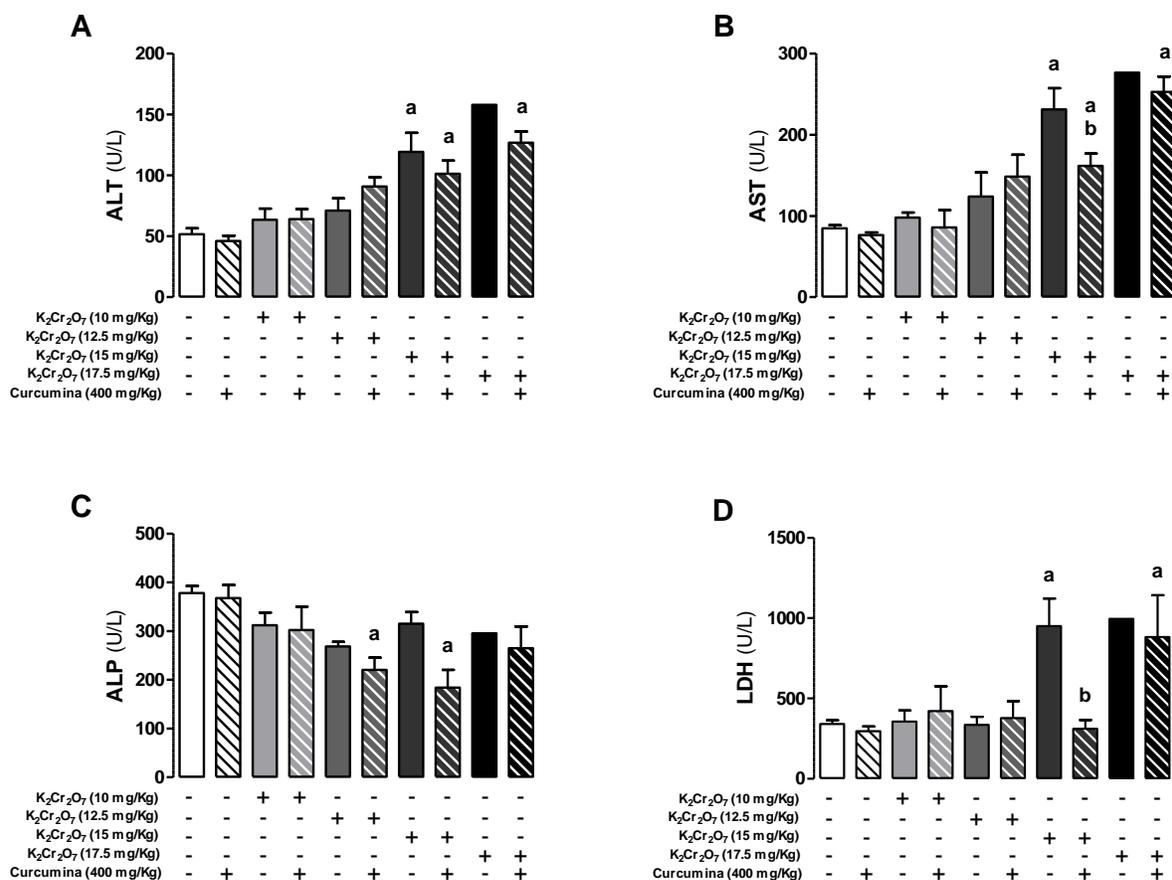


Fig. 11 Marcadores de daño hepático en los grupos de ratas estudiados bajo el esquema de dosis repetidas de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p. (A) ALT, alanina aminotransferasa; (B) AST, aspartato aminotransferasa; (C) ALP, fosfatasa alcalina y (D) LDH, lactato deshidrogenasa. Promedio \pm EEM. $n=1-5$. ^a $p<0.05$ vs. control; ^b $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ 15 mg/Kg.

La actividad de ALP disminuyó significativamente en los grupos coadministrados con curcumina y con 12.5 ó 15 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ (Figura 11C). La actividad de LDH se incrementó al inyectar a las ratas con 15 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ y en el grupo coadministrado con curcumina y con 17.5 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$. La coadministración de curcumina evitó el aumento de la actividad de LDH ocasionada por el $K_2Cr_2O_7$ a la dosis de 15 mg/Kg (Figura 11D).

Aunado a esto, la administración repetida de $K_2Cr_2O_7$ por vía i.p. produjo ascitis en los animales. El líquido ascítico se recuperó y cuantificó, identificándose que la dosis de 15 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ generó un incremento significativo en el volumen de ascitis

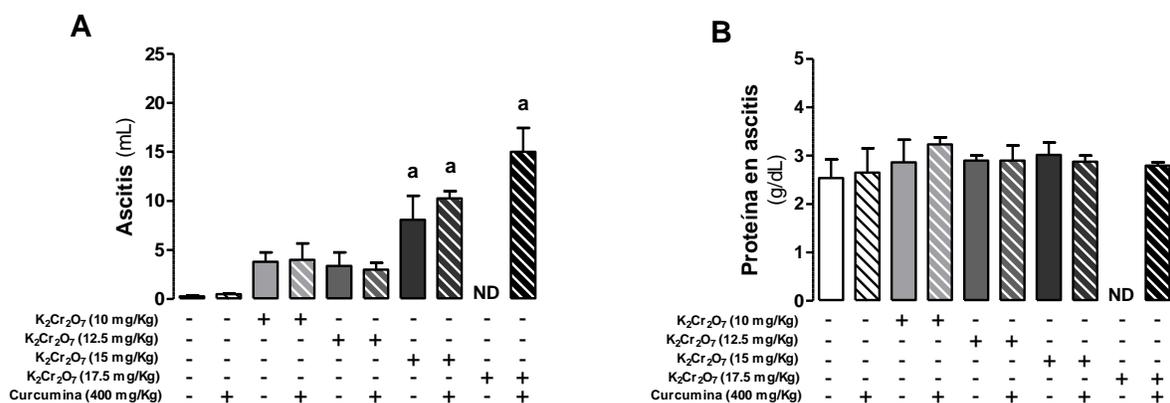


Fig. 12 Ascitis en los grupos de ratas estudiados bajo el esquema de dosis repetidas de K₂Cr₂O₇, vía i.p. (A) volumen ascítico y (B) contenido de proteínas en la ascitis. ND, no determinado. Promedio ± EEM. n=4-5. ^ap<0.05 vs. control.

obtenido. También, se observó que este efecto no se previno por la curcumina en los grupos coadministrados con 15 ó 17.5 mg/Kg de K₂Cr₂O₇ (Figura 12A). La cantidad de proteína en el líquido de ascitis se determinó por el método de Lowry y no se encontraron diferencias entre los grupos tratados (Figura 12B).

El K₂Cr₂O₇ a la dosis de 15 mg/Kg indujo daño renal generando un incremento en los marcadores de nefrotoxicidad creatinina y BUN. La coadministración de curcumina protegió del daño nefrotóxico (Figura 13).

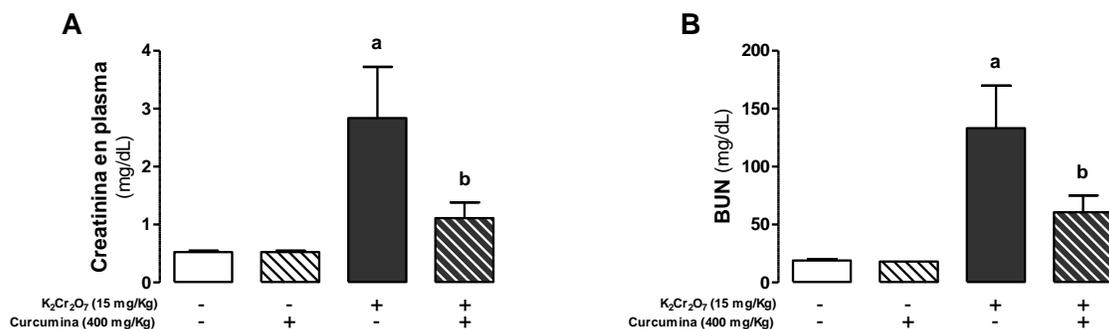


Fig. 13 Marcadores de daño renal en los grupos de ratas estudiados bajo el esquema de dosis repetidas de K₂Cr₂O₇, vía i.p. (A) creatinina en plasma y (B) BUN, nitrógeno ureico en sangre. Promedio ± EEM. n=4-5. ^ap<0.05 vs. control; ^bp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇ 15 mg/Kg.

3.1.3. Dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p.

La administración de una sola dosis de $K_2Cr_2O_7$ por vía i.p. ocasionó una menor toxicidad en los animales tratados. No se encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso entre los grupos tratados con curcumina y/o $K_2Cr_2O_7$ (Figura 14A), ni tampoco se modificó la proporción hepática (Figura 14B).

El $K_2Cr_2O_7$ causó daño hepático a las dosis de 15 y 17.5 mg/Kg. La actividad enzimática de los marcadores ALT y AST presentaron un incremento significativo en los grupos tratados con 15 y 17.5 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$. Por su parte, la coadministración de 400 mg/Kg de curcumina evitó de manera significativa el incremento en estos marcadores ocasionado por el $K_2Cr_2O_7$ a la dosis de 15 mg/Kg; sin embargo, no disminuyó la toxicidad hepática en el grupo coadministrado con 17.5 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ (Figuras 15A y 15B). La actividad de LDH aumentó de manera significativa en el grupo expuesto a 15 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ (Figura 15C). La actividad de ALP no se modificó en los grupos tratados con curcumina y/o $K_2Cr_2O_7$ en relación al control (Figura 15D).

La generación de ascitis fue también evidente en este esquema de exposición. El tratamiento con 15 y 17.5 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ favoreció el aumento significativo en el volumen de ascitis, así como en el grupo coadministrado con curcumina y con 15 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ (Figura 16A). La cantidad de proteína en este fluido no fue diferente entre los grupos (Figura 16B).

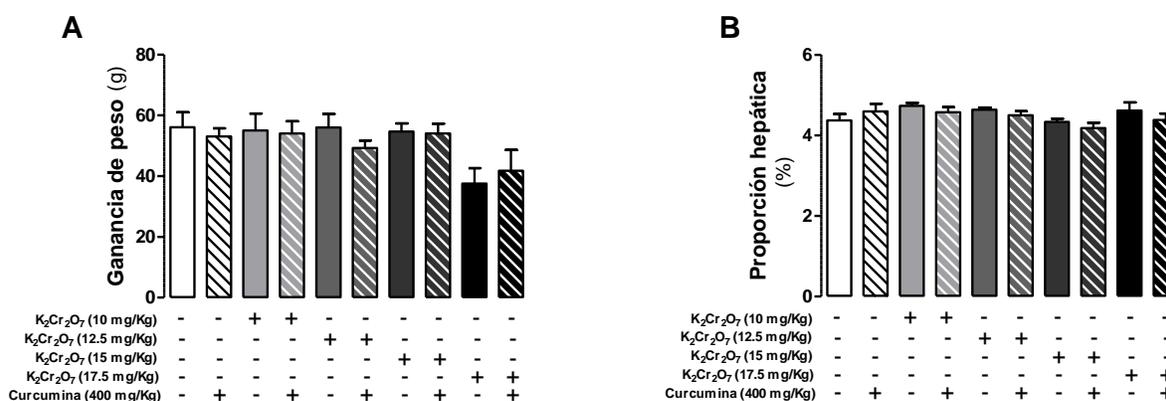


Fig. 14 Peso corporal en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p. (A) ganancia de peso corporal después de los 10 días de seguimiento y (B) proporción hepática de ratas tratadas con curcumina y/o $K_2Cr_2O_7$. Promedio \pm EEM. n=4-9.

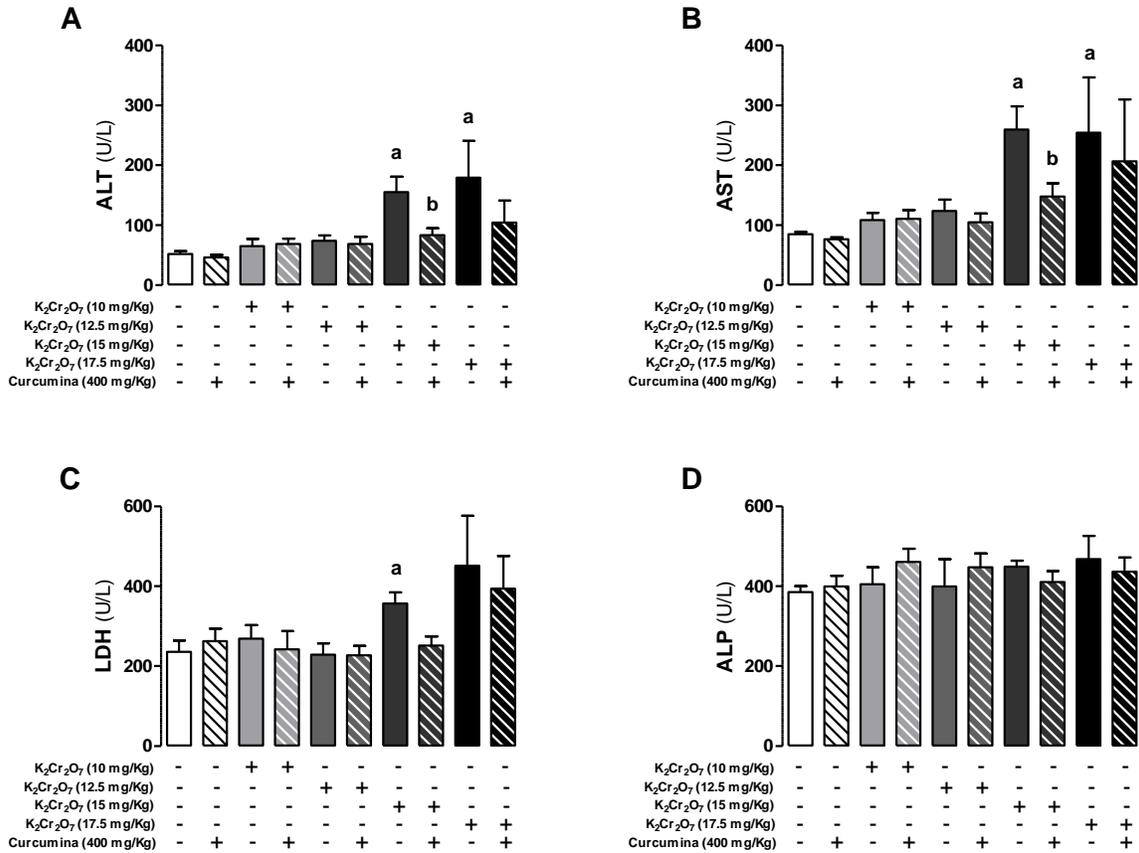


Fig. 15 Marcadores de daño hepático en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p. (A) ALT, alanina aminotransferasa; (B) AST, aspartato aminotransferasa; (C) ALP, fosfatasa alcalina y (D) LDH, lactato deshidrogenasa. Promedio \pm EEM. $n=4-9$. ^a $p<0.05$ vs. control; ^b $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ 15 mg/Kg.

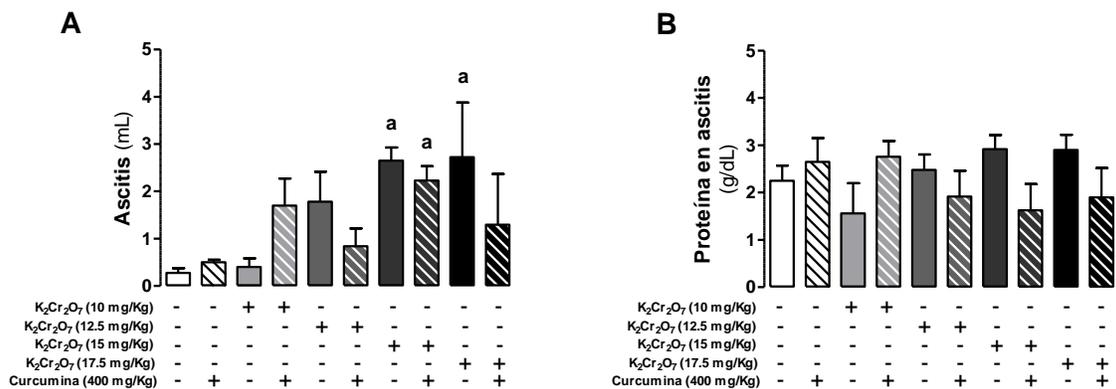


Fig. 16 Ascitis en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p. (A) volumen ascítico y (B) contenido de proteínas en la ascitis. ND, no determinado. Promedio \pm EEM. $n=4-9$. ^a $p<0.05$ vs. control.

Con este esquema de exposición, el daño renal se determinó mediante marcadores bioquímicos en el plasma y orina de ratas administradas con 400 mg/Kg de curcumina y/o 15 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$. El $K_2Cr_2O_7$ a la dosis de 15 mg/Kg, vía i.p. no generó nefrototoxicidad entre los grupos (Figura 17).

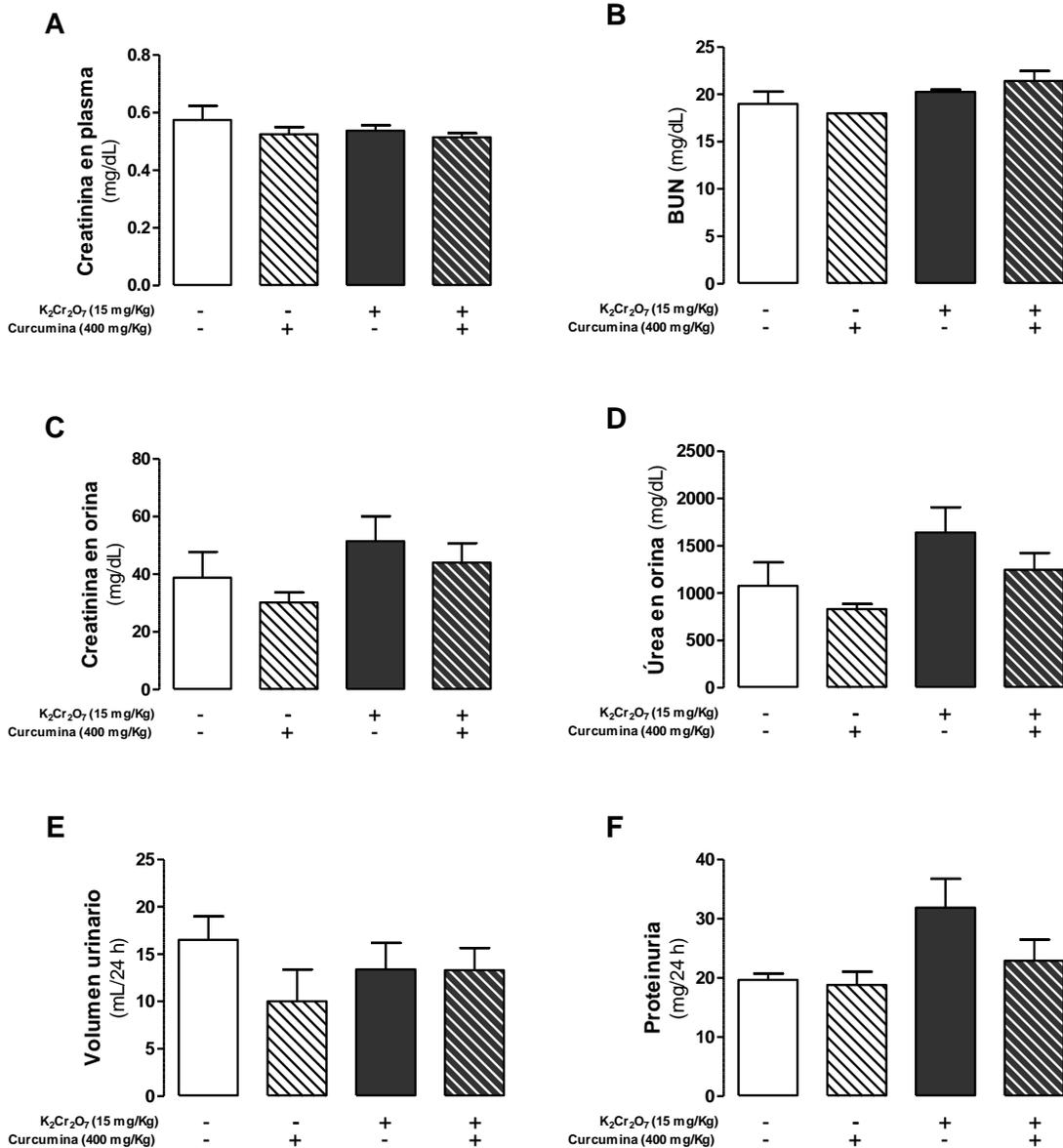


Fig. 17 Marcadores de daño renal en los grupos de ratas estudiados siguiendo el esquema de dosis única de $K_2Cr_2O_7$, vía i.p. (A) creatinina en plasma; (B) BUN, nitrógeno ureico en sangre; (C) creatinina en orina; (D) urea en orina; (E) volumen urinario y (F) proteinuria. Promedio \pm EEM. n=4-8.

3.2. Efecto de la curcumina sobre la hepatotoxicidad inducida por $K_2Cr_2O_7$ a la dosis de 15 mg/Kg, vía i.p.

El $K_2Cr_2O_7$ a la dosis de 15 mg/Kg, vía i.p. (dosis única), causó daño hepático luego de 24 h de haberse administrado [$K_2Cr_2O_7$ (24h)] el cual fue prevenido por la coadministración de 400 mg/Kg de curcumina (Figura 15), por lo que los grupos de $K_2Cr_2O_7$ (48 h) y el coadministrado con curcumina fueron incluidos para conocer si el daño hepático se mantenía después de 48 h de exposición al $K_2Cr_2O_7$ y si podía prevenirse por el tratamiento con curcumina, quedando así establecidas las condiciones del modelo para llevar a cabo los análisis bioquímicos e histopatológicos.

La ganancia de peso disminuyó significativamente en las ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$ (48 h) sin que fuera completamente atenuado por la coadministración de curcumina (Figura 18A). El peso del hígado y la proporción hepática aumentaron de manera significativa. La curcumina previno el aumento de ambos parámetros (Figuras 18B y 18C).

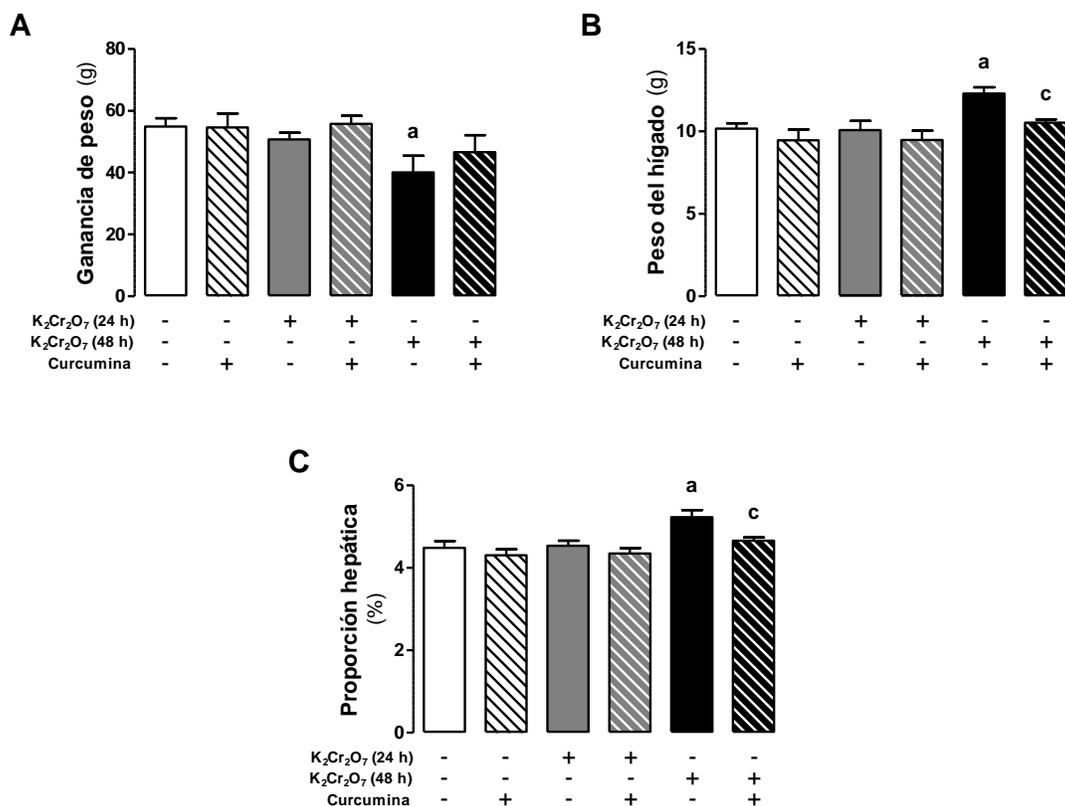


Fig. 18 Efecto de la curcumina sobre el peso corporal y del hígado en ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$. (A) ganancia de peso corporal después de los 10 días de seguimiento; (B) peso del hígado y (C) proporción hepática. Promedio \pm EEM. $n=7-8$. ^a $p<0.05$ vs. control; ^c $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (48 h).

La actividad de ALT, AST y LDH se incrementó significativamente en los grupos tratados con $K_2Cr_2O_7$ (24 h) y (48 h) (Figuras 19A, 19B y 19C). Mientras que, la actividad de LDH sólo aumentó de manera significativa en el grupo de $K_2Cr_2O_7$ (48 h) (Figura 19D). Por su parte, la coadministración de curcumina evitó de manera significativa el incremento en estos marcadores (Figura 19).

La acumulación de líquido de ascitis, una manifestación clínica de daño hepático, fue significativamente mayor en los grupos tratados con $K_2Cr_2O_7$ (24 h) y $K_2Cr_2O_7$ (48 h), siendo este volumen disminuido en el grupo coadministrado con curcumina y $K_2Cr_2O_7$ (48 h) (Figura 20A). La concentración de proteínas (Figuras 20B y 20C) y albúmina (Figuras 20D y 20E) en el líquido de ascitis y plasma no presentaron diferencias entre los grupos.

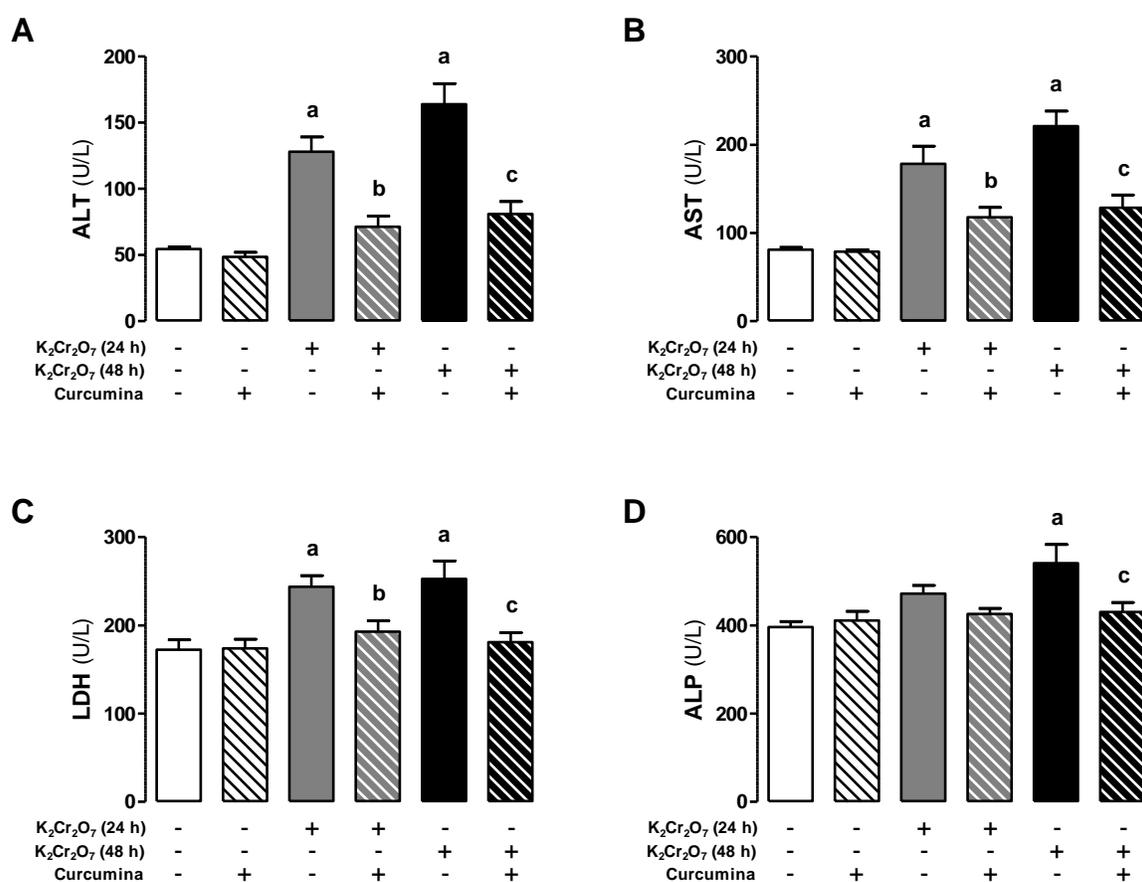


Fig. 19 Efecto de la curcumina sobre la actividad enzimática de (A) alanino aminotransferasa (ALT); (B) aspartato aminotransferasa (AST); (C) lactato deshidrogenasa (LDH) y (D) fosfatasa alcalina (ALP) en el plasma de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$. Promedio \pm EEM. n=5-8. ^a $p < 0.05$ vs. control; ^b $p < 0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (24 h), ^c $p < 0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (48 h).

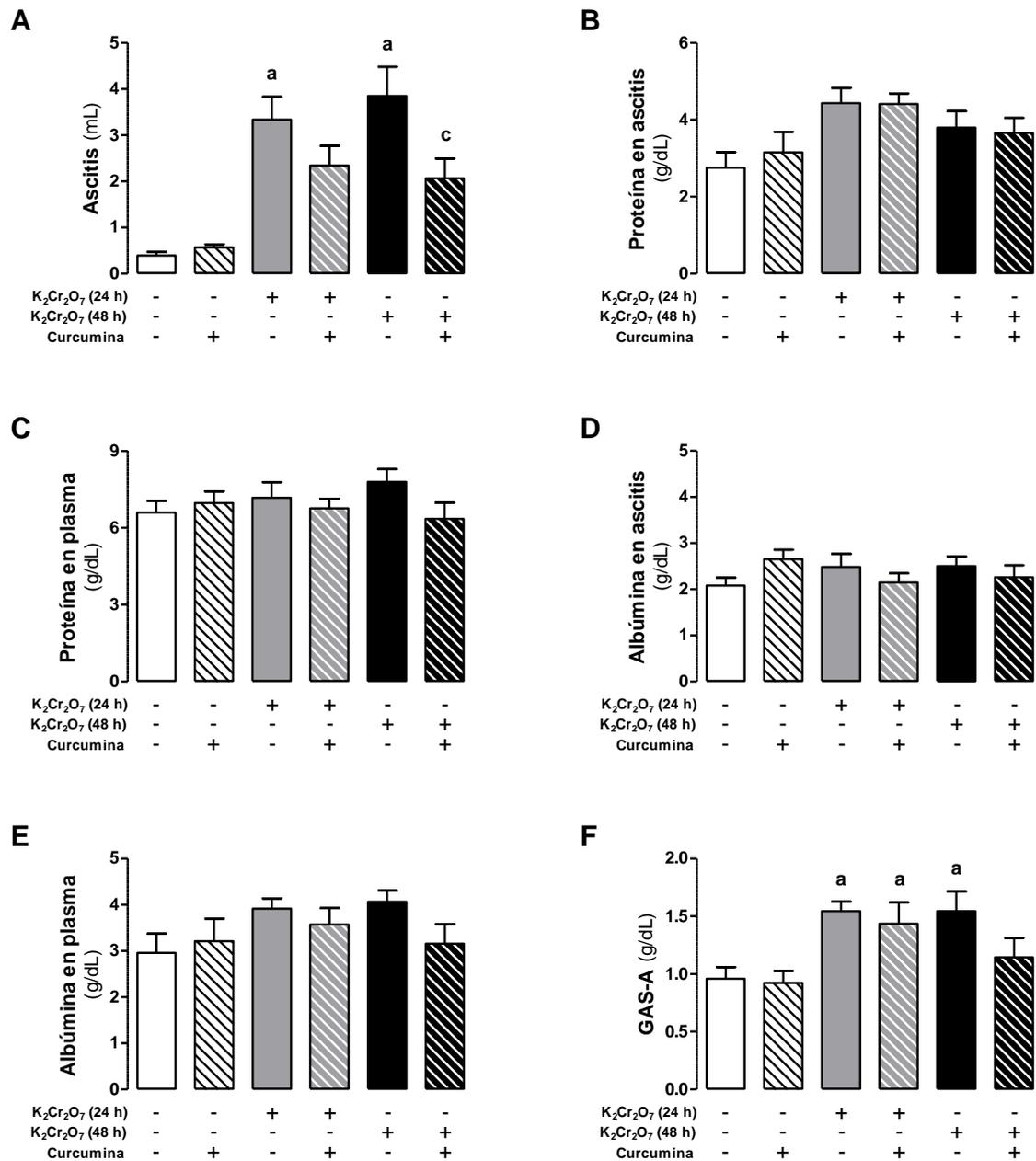


Fig. 20 Efecto de la curcumina sobre la generación de ascitis en ratas tratadas con K₂Cr₂O₇. (A) volumen ascítico; (B, C) contenido de proteínas en ascitis y plasma; (D, E) concentración de albúmina en ascitis y plasma; (E) GAS-A, gradiente de albúmina en plasma - albúmina en ascitis. Promedio ± EEM. n=5-8. ^ap<0.05 vs. control; ^cp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇ (48 h).

El gradiente entre la concentración de albúmina en suero y el líquido ascítico (GAS-A) es un parámetro para clasificar las causas de ascitis, según se deba o no a hipertensión portal. Cuando la diferencia entre la albúmina en plasma menos la albúmina

en la ascitis es >1.1 g/dL significa presencia de hipertensión portal con una certeza del 95% (Lira *et al.*, 2007). Así, los grupos tratados con $K_2Cr_2O_7$ (24 h), $K_2Cr_2O_7$ (48 h) y el coadministrado con curcumina y $K_2Cr_2O_7$ (24 h) presentaron un incremento significativo en GAS-A. Sin embargo, el pretratamiento con curcumina atenuó el incremento inducido por $K_2Cr_2O_7$ (48 h) (Figura 20F).

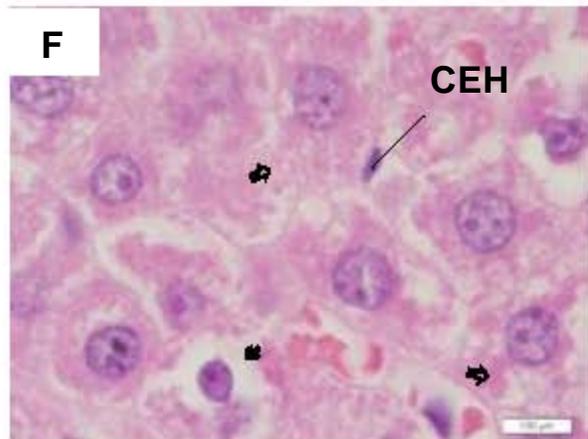
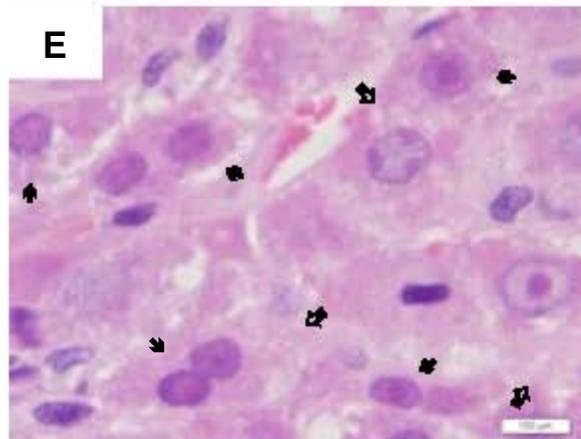
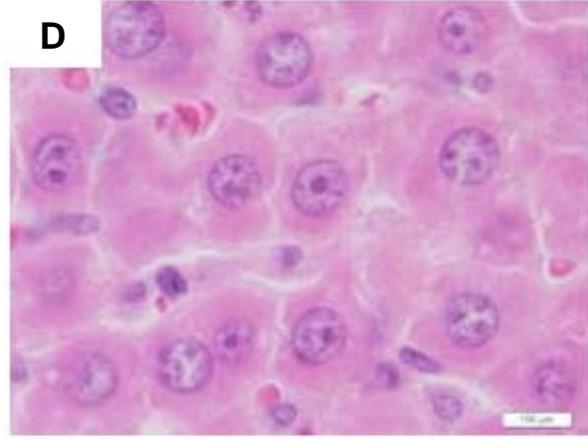
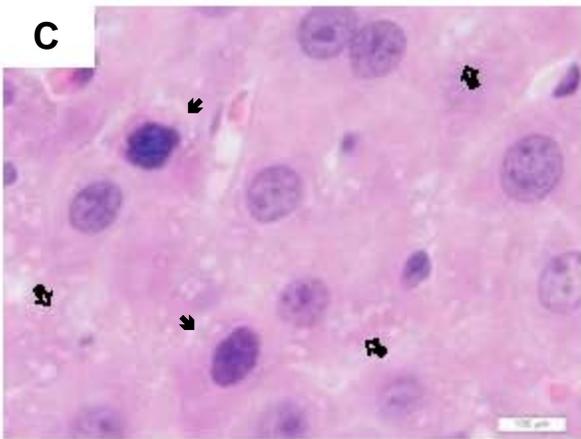
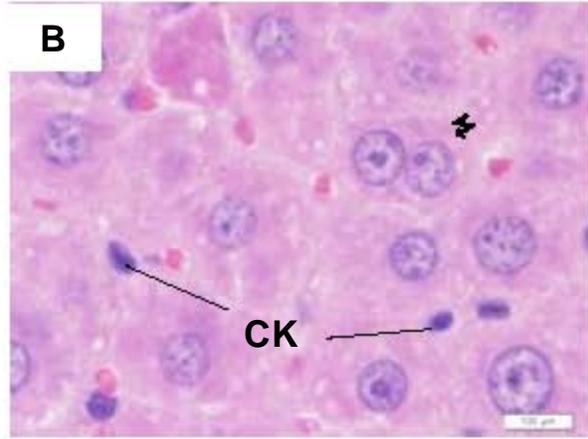
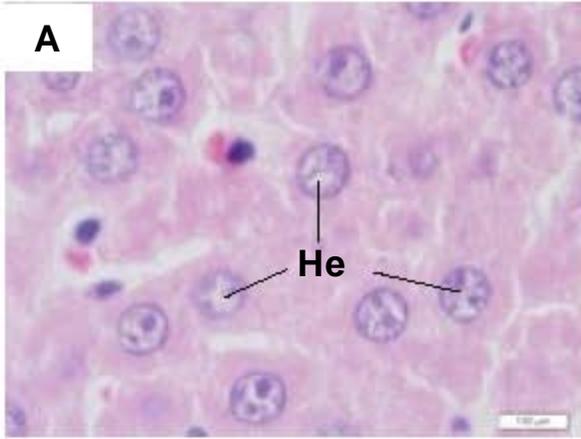
3.3. Protección histológica de la curcumina en hígado de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$

Los grupos control y el tratado con curcumina presentaron estructura hepática normal, caracterizada por hepatocitos de forma poligonal con contornos bien definidos citoplasma acidofílico ligeramente teñido con grandes núcleos localizados centralmente con cromatina dispersa; observándose algunas células binucleadas (Figuras 21A y 21D). Por otra parte, el tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ generó la muerte de los hepatocitos a las 24 y 48 h de exposición, de manera tiempo-dependiente (Figuras 21B y 21C); estas células presentaron extensa vacuolación citoplásmica con núcleos picnóticos correspondientes a células en proceso de apoptosis. También se reconoció en estos grupos, la generación de inflamación portal debido a la presencia de linfocitos en los espacios porta. En contraste, el grupo pretratado con curcumina y $K_2Cr_2O_7$ (24 h) presentó histología similar al control (Figura 21E); mientras que en el grupo coadministrado con curcumina y $K_2Cr_2O_7$ (48 h) se observaron algunos hepatocitos dañados (Figura 21F).

El análisis cuantitativo de hepatocitos dañados confirmó que el tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ produjo un incremento significativo en el porcentaje de muerte celular luego de 24 y 48 h de exposición de aproximadamente el 15 y 30%, respectivamente. Sin embargo, el pretratamiento con curcumina previno significativamente el daño a los hepatocitos (Figura 21G).

El efecto tóxico del tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ sobre diversos órganos se evaluó mediante análisis histopatológico, únicamente a las 24 h de exposición; sin embargo, no se identificaron alteraciones estructurales o la inducción de muerte celular (ver Anexos). En la corteza cerebral se observaron neuronas, astrocitos y oligodendrocitos sin lesiones aparentes (Figura 1S). En el miocardio, los cardiomiocitos preservaron su morfología (Figura 4S). En el pulmón, los alvéolos y bronquiolos, conformados por neumocitos y células epiteliales calciformes, respectivamente, no presentaron alteraciones evidentes (Figura 7S). En riñón, los glomérulos y las células epiteliales de los túbulos proximales y distales presentaron un arreglo ordenado y sin daño (Figura 10S). De forma similar, la túnica mucosa del estómago no fue afectada por el tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ (24 h),

manteniéndose las células adelomorfas y delomorfas intactas (Figura 13S). La mucosa intestinal constituida por las glándulas de Lieberkühn y células caliciformes, principalmente, no presentó alteraciones estructurales (Figura 16S).



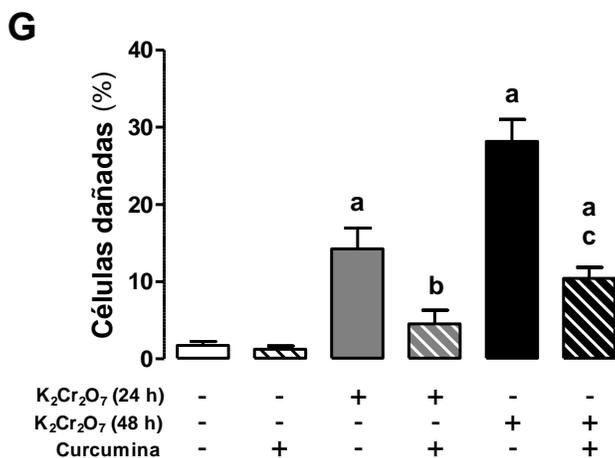


Figura 21. Histologías representativas de hígado de ratas tratadas con curcumina, K₂Cr₂O₇ o ambos. (A) las secciones de hígado de ratas control muestran la arquitectura hepática normal; (C y E) tejido de animales tratados con K₂Cr₂O₇ después de 24 ó 48 h de la administración, respectivamente. Se observaron hepatocitos dañados con condensación nuclear (⬆) y vacuolización citoplásmica (⊖); (B) la administración de curcumina no produjo daño histológico; (D) las ratas pretratadas con curcumina y exposición al K₂Cr₂O₇ por 24 h presentaron histología hepática normal; (F) las secciones de hígado después de 48 h de la administración de K₂Cr₂O₇ en animales pretratados con curcumina exhiben moderada vacuolización citoplásmica y picnosis. He, hepatocitos; CK, células de Kupffer; CEH, células estrelladas hepáticas. H&E, 1000X. (G) Morfometría cuantitativa que revela la significativa protección hepática en los grupos pretratados con curcumina. Promedio ± EEM. (n=3-4). ^ap<0.05 vs. control; ^bp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇ (24 h), ^cp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇ (48 h).

En cuanto al arreglo estructural del bazo, los corpúsculos de Malpighi (pulpa blanca), centros germinativos de Flemming y senos venosos (pulpa roja), constituidos principalmente por linfocitos, linfoblastos y macrófagos, no reveló evidencia de toxicidad inducida por el K₂Cr₂O₇ (24 h) (Figura 19S). Por último, los acinos pancreáticos conformados por células secretoras y células centroacinares tampoco fueron afectados por este agente oxidante a la dosis de 15 mg/Kg por vía i.p. y después de 24 h de exposición (Figura 22S).

3.4. Efecto de la curcumina contra el daño inducido por el estrés oxidante en tejido hepático de ratas tratadas con K₂Cr₂O₇

El tratamiento con K₂Cr₂O₇ ocasionó el incremento significativo en el contenido de MDA después de 24 y 48 h de exposición que fue atenuado por el pretratamiento con

curcumina (Figura 22A). El contenido de proteínas carboniladas aumentó significativamente en el grupo de $K_2Cr_2O_7$ (48 h); mientras que en los grupos pretratados con curcumina, los niveles de proteínas carboniladas se mantuvieron similares al control (Figura 22B). Por otra parte, el contenido de GSH fue abatido de manera significativa en el grupo tratado con $K_2Cr_2O_7$ (48 h), siendo significativamente restablecido por el pretratamiento con curcumina (Figura 22C).

El efecto oxidante del $K_2Cr_2O_7$ (24 h) se determinó en diversos órganos midiendo el contenido de MDA y GSH (ver Anexos). No obstante, bajo estas condiciones de exposición, ninguno de los órganos analizados resultó afectado, cerebro (Figura 2S); corazón (Figura 5S); pulmón (Figura 8S), estómago (Figura 14S), intestino (Figura 17S), bazo (Figura 20S) y páncreas (Figura 23S). En el caso del riñón, se obtuvo un incremento significativo en el contenido de GSH en el grupo de ratas pretratadas con curcumina y que fueron expuestas a $K_2Cr_2O_7$ por 24 h (Figura 11S).

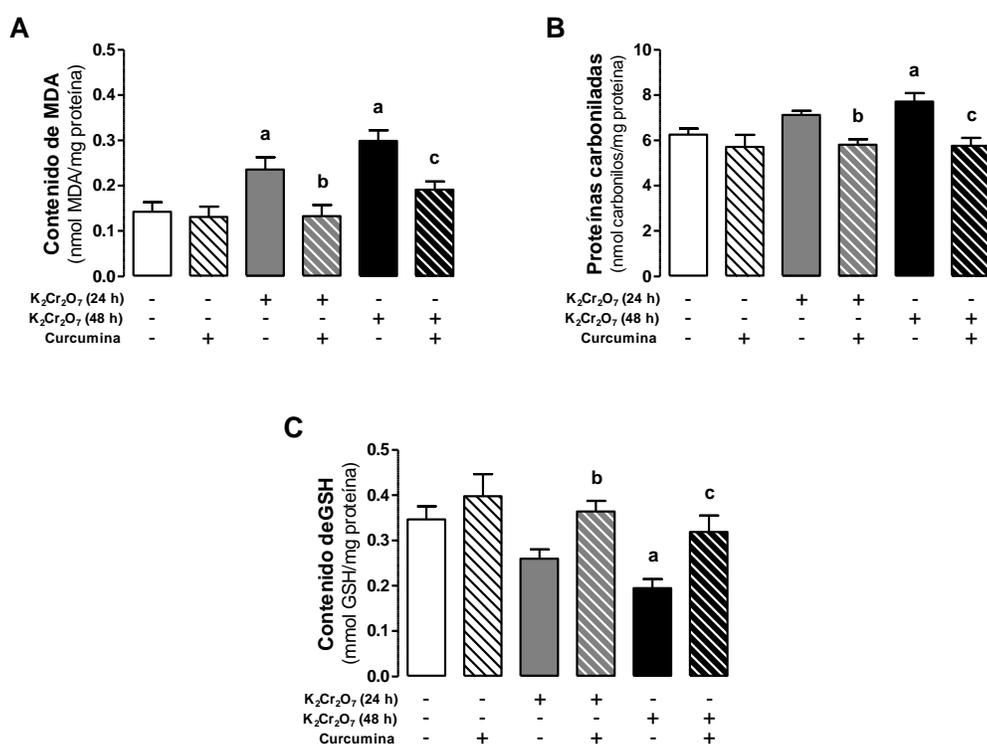


Fig. 22 Efecto de la curcumina sobre el contenido hepático de marcadores de estrés oxidante de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$. Contenido de (A) MDA, malondialdehído; (B) proteínas carboniladas y (C) GSH, glutatión forma reducida. Promedio \pm EEM. $n=5-6$. ^a $p<0.05$ vs. control; ^b $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (24 h), ^c $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (48 h).

3.5. Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes en el hígado de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$

El tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ (48 h) ocasionó la disminución significativa de la actividad de SOD y GR; en cuyo caso, el pretratamiento con curcumina abolió este efecto (Figuras 23A y 23D).

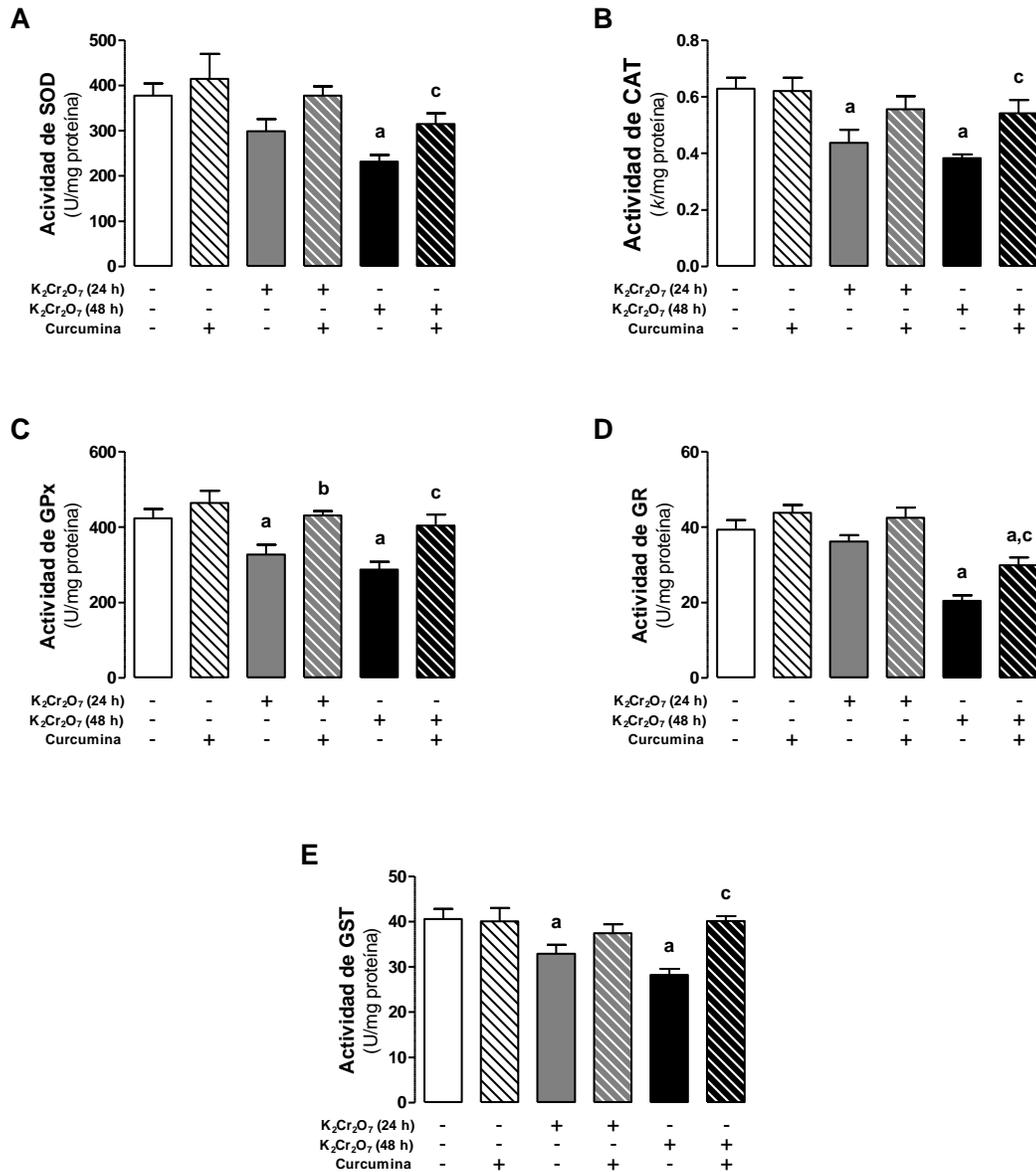


Fig. 23 Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes en hígado de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$. (A) SOD, superóxido dismutasa; (B) CAT, catalasa; (C) GPx, glutatión peroxidasa; (D) GR, glutatión reductasa y (E) GST, glutatión-S-transferasa. Promedio \pm EEM. $n=5-6$. ^a $p<0.05$ vs. control; ^b $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (24 h), ^c $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (48 h).

Además, las actividades enzimáticas de CAT, GPx y GST fueron disminuidas de forma significativa por el tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ a las 24 y 48 h. Sin embargo, el pretratamiento con curcumina evitó significativamente la disminución de las mismas (Figuras 23B, 23C y 23E).

Asimismo, se examinó el efecto del $K_2Cr_2O_7$ (24 h) sobre la actividad de enzimas antioxidantes en el tejido de diversos órganos (ver Anexos), identificándose que en ninguno de los órganos analizados se alteró la actividad de las enzimas. Estos tejidos fueron de cerebro (Figura 3S); corazón (Figura 6S); pulmón (Figura 9S), estómago (Figura 15S), intestino (Figura 18S), bazo (Figura 21S) y páncreas (Figura 24S). Aunque en el riñón, la coadministración con curcumina y $K_2Cr_2O_7$ (24 h) favoreció el incremento significativo de las actividades enzimáticas de GPx, GR y GST (Figura 12S).

3.6. Efecto de la curcumina contra el daño inducido por el estrés oxidante en mitocondrias hepáticas aisladas de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$

La disfunción mitocondrial está asociada con la acumulación de mitocondrias dañadas responsables de la formación anormal de ERO, depleción del GSH, alquilación de proteínas y alteraciones de los complejos respiratorios, en diferentes tejidos y órganos (Degli Esposti *et al.*, 2012). De esta manera, se evaluó el posible efecto protector de la curcumina sobre la disfunción mitocondrial inducida por el tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ en las mitocondrias hepáticas de las ratas tratadas con este agente.

El contenido de MDA y proteínas carboniladas aumentó significativamente en las mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$ (48 h). Mientras que el pretratamiento con curcumina protegió a las mitocondrias del incremento significativo en el contenido de estos marcadores inducido por $K_2Cr_2O_7$ (Figuras 24A y 24B). En contraparte, la exposición a $K_2Cr_2O_7$ por 24 y 48 h redujo significativamente el contenido de GSH en las mitocondrias hepáticas aisladas; siendo este efecto completamente prevenido por la curcumina (Figura 24C).

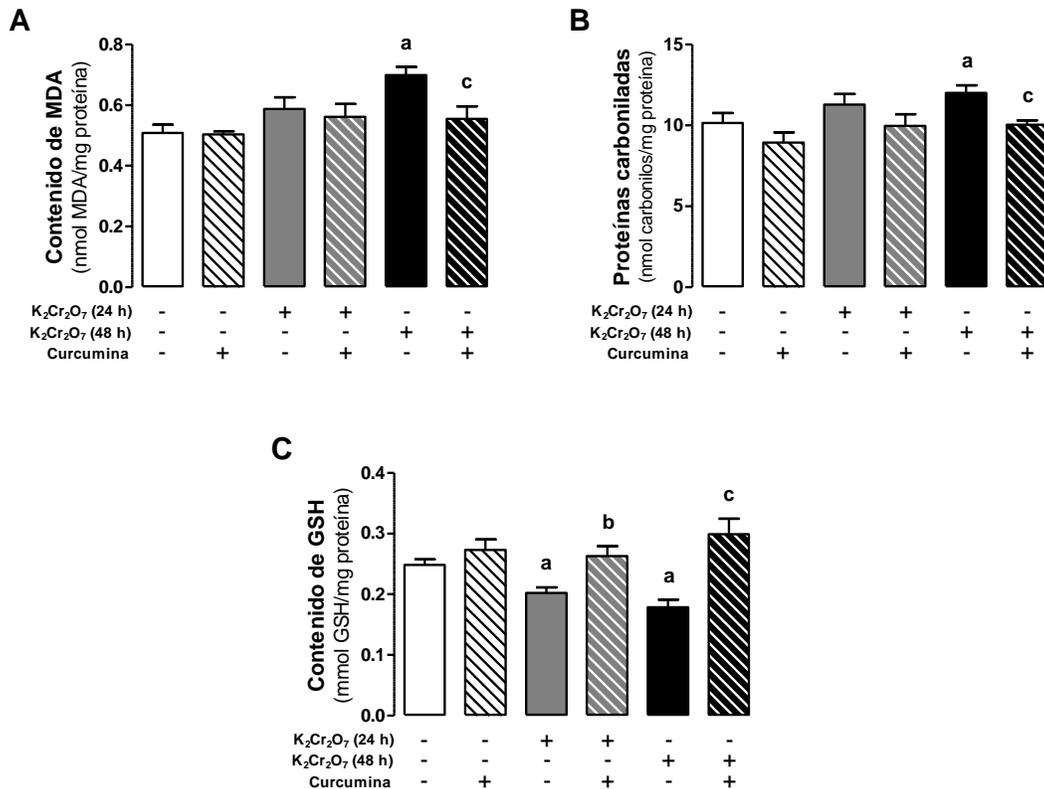


Fig. 24 Efecto de la curcumina sobre el daño inducido por el estrés oxidante en mitocondrias aisladas de ratas tratadas con K₂Cr₂O₇. Contenido de (A) MDA, malondialdehído; (B) proteínas carboniladas y (C) GSH, glutatión forma reducida. Promedio ± EEM. n=5-6. ^ap<0.05 vs. control; ^bp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇ (24 h), ^cp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇ (48 h).

3.7. Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes en mitocondrias hepáticas de ratas expuestas a K₂Cr₂O₇

La exposición de las ratas al K₂Cr₂O₇ por 24 y 48 h provocó la disminución significativa de la actividad de SOD y GR en las mitocondrias aisladas del hígado. Aunque el pretratamiento con curcumina protegió significativamente a las mitocondrias de este efecto (Figuras 25C y 25E). Las actividades de las enzimas SOD, CAT y GR fueron significativamente abatidas por el tratamiento con K₂Cr₂O₇ (48 h). A su vez, las mitocondrias del grupo coadministrado con curcumina mantuvieron los niveles de actividad similares al control (Figuras 25A, 25B y 25D).

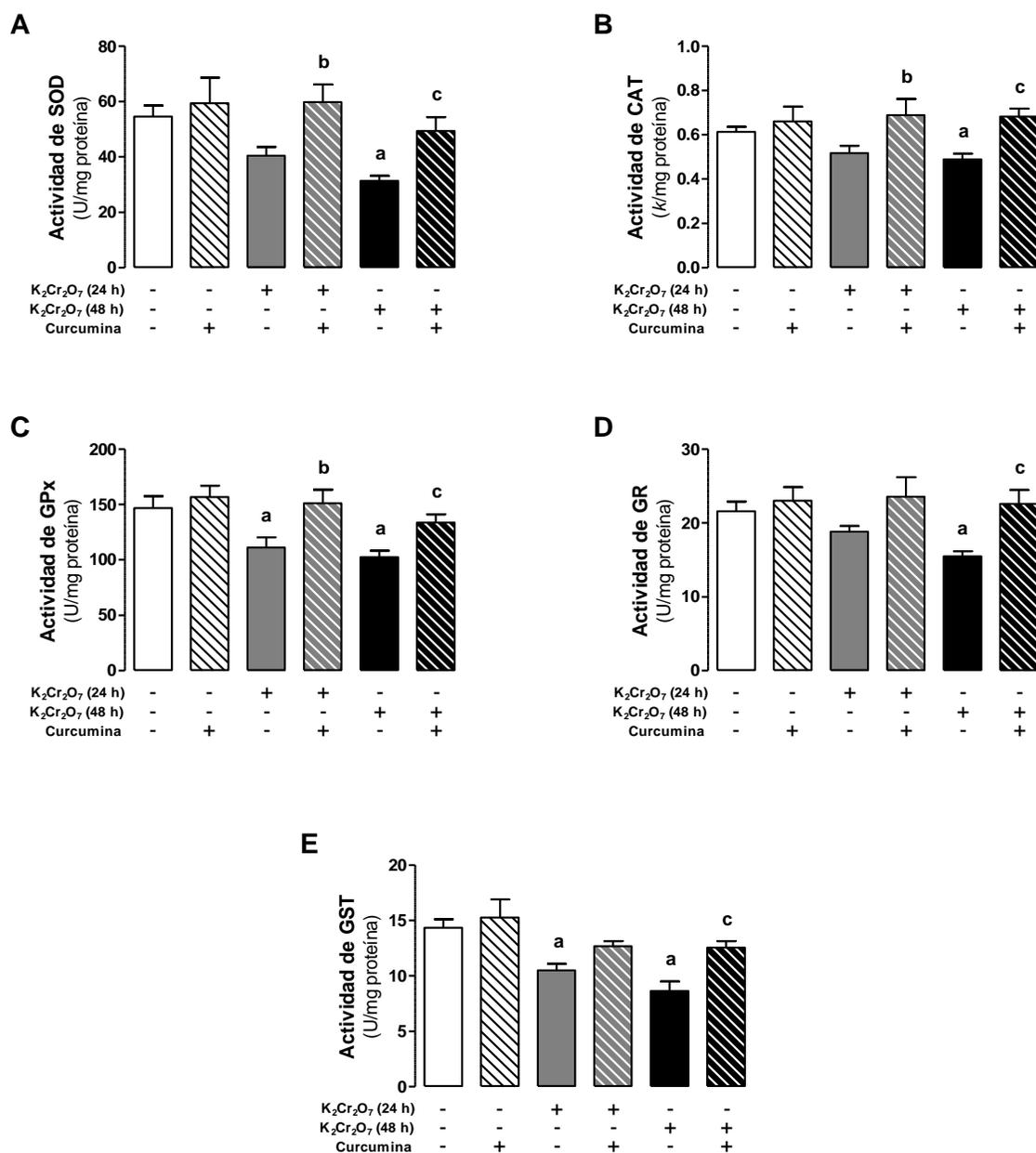


Fig. 25 Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes en mitocondrias hepáticas aisladas de ratas tratadas con K₂Cr₂O₇. (A) SOD, superóxido dismutasa; (B) CAT, catalasa; (C) GPx, glutatión peroxidasa; (D) GR, glutatión reductasa y (E) GST, glutatión-S-transferasa. Promedio ± EEM. n=5-6. ^ap<0.05 vs. control; ^bp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇ (24 h), ^cp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇ (48 h).

3.8. Efecto de la curcumina sobre la función de mitocondrias hepáticas aisladas de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$

El consumo de oxígeno es una de las mediciones más informativas y directas de función mitocondrial, siendo el análisis polarográfico una poderosa herramienta para la caracterización de la capacidad respiratoria mitocondrial (Barrientos *et al.*, 2009). Los trazos representativos del consumo de oxígeno por las mitocondrias aisladas de ratas tratadas con curcumina y/o $K_2Cr_2O_7$ usando glutamato/malato y succinato como sustratos se presentan en las figuras 26 y 28, respectivamente.

La curcumina previno de manera significativa la disminución inducida por el $K_2Cr_2O_7$ sobre la respiración mitocondrial evaluada en el estado 3 (en presencia de ADP) y en el control respiratorio a las 24 y 48 h (Figuras 27A y 27C). La respiración en el estado 4 (en ausencia de ADP) permaneció sin cambios en todos los grupos estudiados (Figura 27B). La prevención por la curcumina de la disminución inducida por el $K_2Cr_2O_7$ sobre la respiración desacoplada no fue significativa (Figura 27D). La curcumina también evitó la reducción de la relación ADP/O causada por el $K_2Cr_2O_7$ a las 48 h (Figura 27E) usando glutamato/malato como sustratos.

Los cambios observados usando succinato como sustrato fueron menos marcados, incluso ningún cambio fue observado a las 24 h. A las 48 h se encontró que el $K_2Cr_2O_7$ indujo la disminución del consumo de oxígeno en el estado 3 y en la respiración desacoplada, las cuales no fueron prevenidas significativamente por el pretratamiento con curcumina (Figuras 29A y 29D). No se observaron cambios en el consumo de oxígeno en el estado 4, el control respiratorio y la relación ADP/O (Figuras 29B, 29C y 29E).

Además, la acumulación de daño mitocondrial generada por ERO ocasionó la pérdida en la eficiencia de la cadena respiratoria y por lo tanto una disminución en la producción de ATP (Drew y Leeuwenburgh, 2003; Garcia-Fernandez *et al.*, 2011; Kozlov *et al.*, 2011). El tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ produjo la reducción en el contenido de ATP en las mitocondrias hepáticas aisladas después de 48 h de exposición, la cual fue prevenida por el tratamiento con curcumina (Figura 30).

La aconitasa es una enzima [4Fe-4S] particularmente susceptible al ataque e inactivación inducido por el $O_2^{\cdot-}$ (Gardner, 2002). La actividad de la aconitasa se redujo significativamente por el tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ a las 24 y 48 h, aproximadamente en un 50% en relación al control. Sin embargo, el pretratamiento con curcumina abolió este efecto, restableciendo su actividad a niveles similares a los del control (Figura 31A).

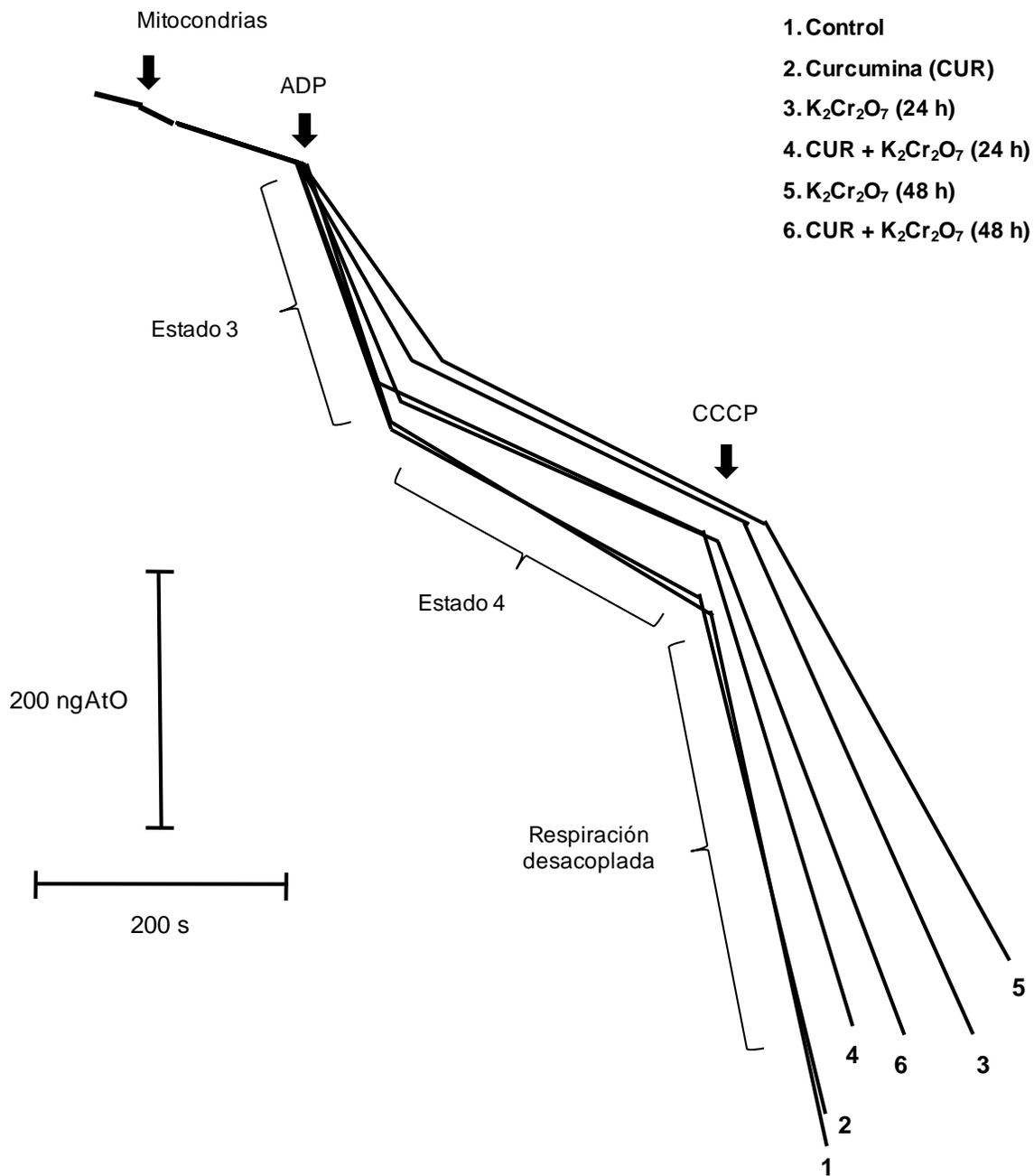


Fig. 26 Trazos representativos de al menos cuatro experimentos de consumo de oxígeno, en los seis grupos estudiados usando glutamato/malato como sustratos.

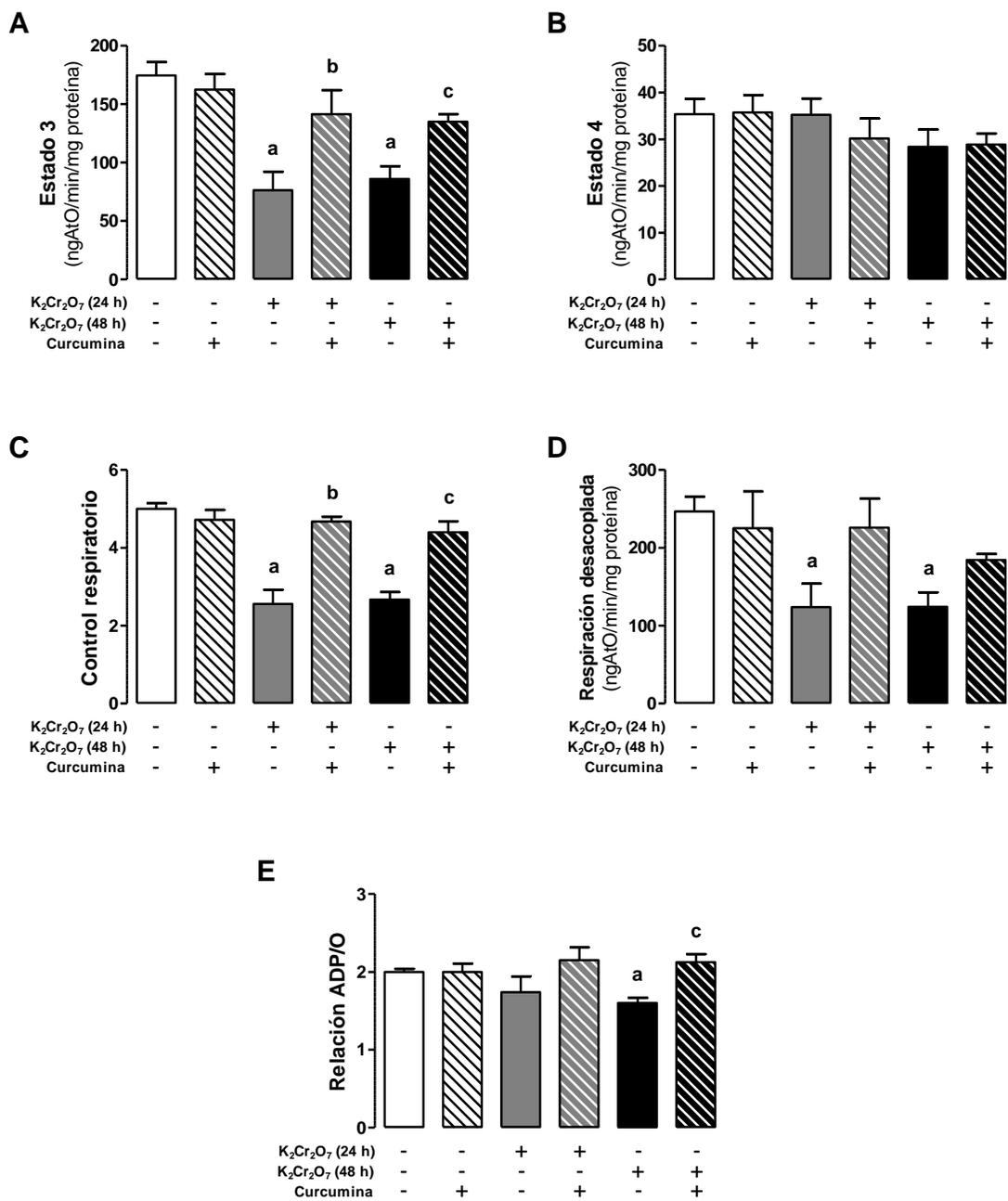


Fig. 27 Efecto de la curcumina sobre las alteraciones inducidas por el K₂Cr₂O₇ relativas al consumo de oxígeno mitocondrial usando glutamato/malato como sustratos. Promedio ± EEM. n=4-5. ^ap<0.05 vs. control; ^bp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇ (24 h); ^cp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇ (48 h).

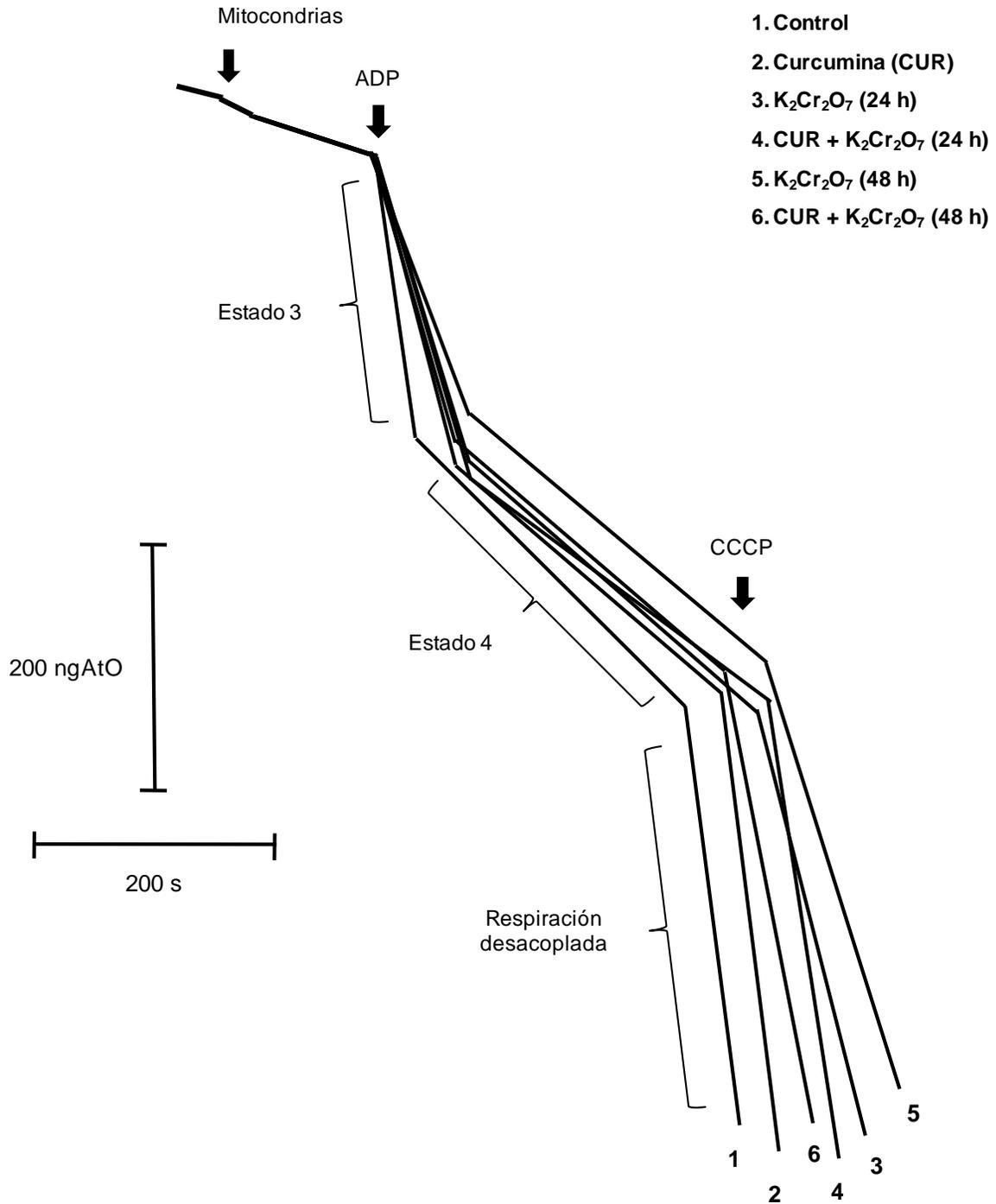


Fig. 28 Trazos representativos de al menos cuatro experimentos de consumo de oxígeno, en los seis grupos estudiados usando succinato como sustrato.

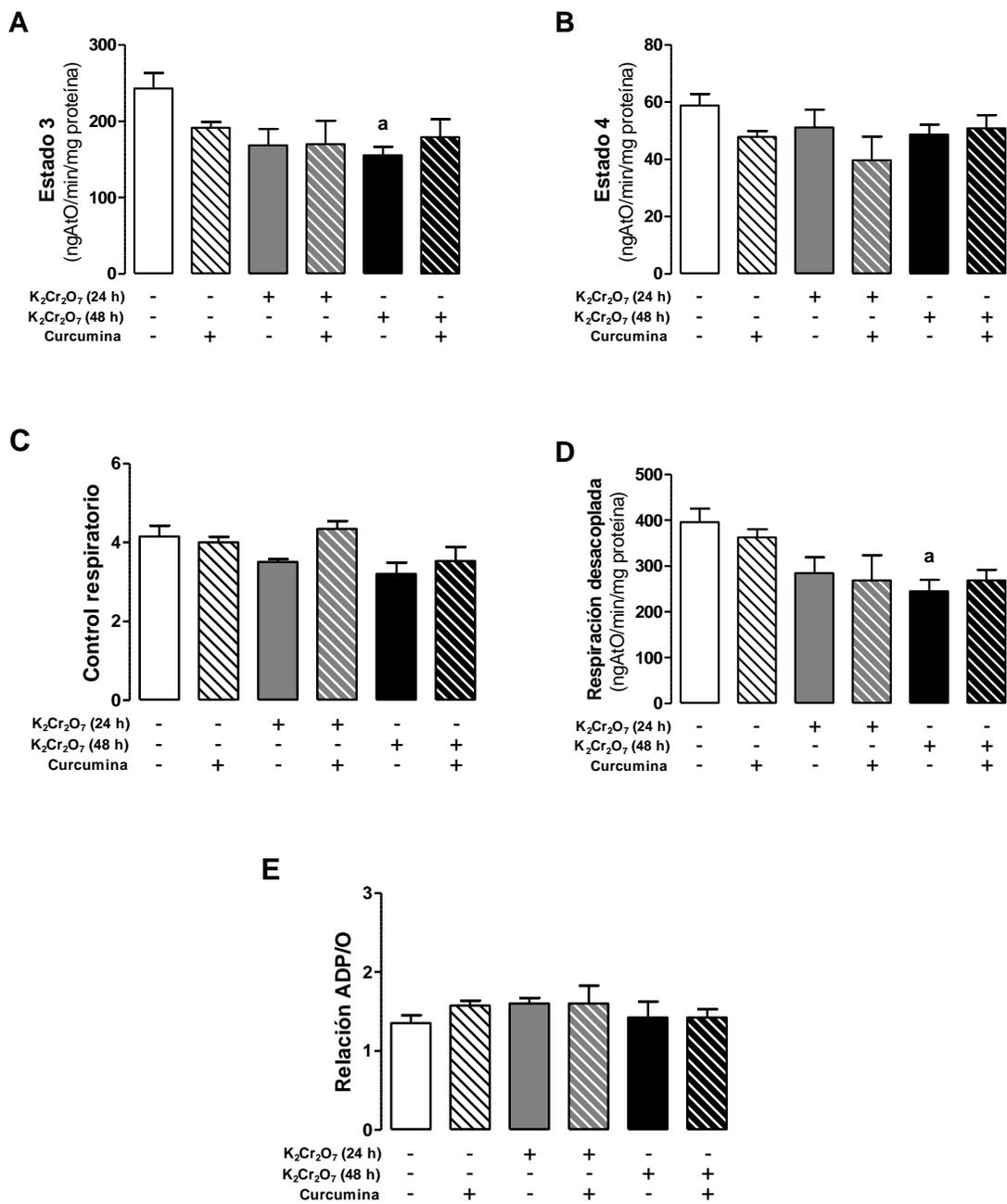


Fig. 29 Efecto de la curcumina sobre las alteraciones inducidas por el K₂Cr₂O₇ relativas al consumo de oxígeno mitocondrial usando succinato como sustrato. Promedio ± EEM. n=4-5. ^ap<0.05 vs. control.

Los complejos mitocondriales involucrados en la fosforilación oxidativa son sensibles al daño provocado por ERO (Hinerfeld et al., 2004). De esta manera, el $K_2Cr_2O_7$ disminuyó significativamente la actividad del complejo I a ambos tiempos de tratamiento, aproximadamente en un 40% y 70% a las 24 h y 48 h, respectivamente. Dicho efecto se previno efectivamente por el tratamiento con curcumina (Figura 31B). La actividad del complejo II se afectó significativamente por el tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ a las 48 h, al disminuir su actividad aproximadamente 50%. Además, la actividad de esta enzima no se recuperó completamente por el pretratamiento con curcumina, alcanzando sólo el 70% con respecto al control (Figura 31C). Similarmente, la actividad del complejo II+III disminuyó aproximadamente en un 40% de manera significativa en el grupo de $K_2Cr_2O_7$ (48 h). En este caso, la coadministración de curcumina restableció la actividad del complejo a un 80% (Figura 31E). Las actividades de los complejos III y IV no se modificaron de manera significativa por la exposición a la curcumina, $K_2Cr_2O_7$ o ambos (Figuras 31D y 31F). Por último, la actividad del complejo V disminuyó aproximadamente 60% de manera significativa por el $K_2Cr_2O_7$ luego de 48 h de tratamiento. El pretratamiento con curcumina evitó la disminución de la actividad de este complejo de forma significativa (Figura 31G). En el grupo $K_2Cr_2O_7$ (24 h) la reducción de la actividad fue alrededor del 30%; sin embargo, no fue significativa.

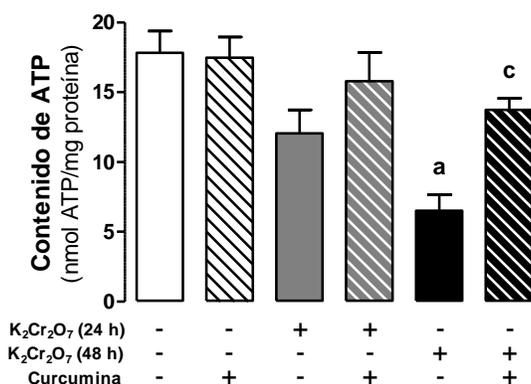


Fig. 30 Efecto del pretratamiento con curcumina sobre el contenido de ATP en mitocondrias hepáticas aisladas de ratas expuestas a $K_2Cr_2O_7$. Promedio \pm EEM. $n=6-7$. ^a $p<0.05$ vs. control; ^b $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (24 h); ^c $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (48 h).

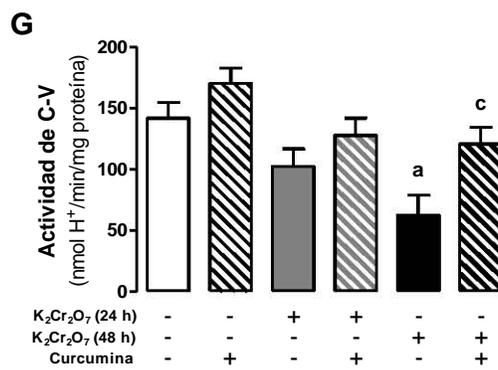
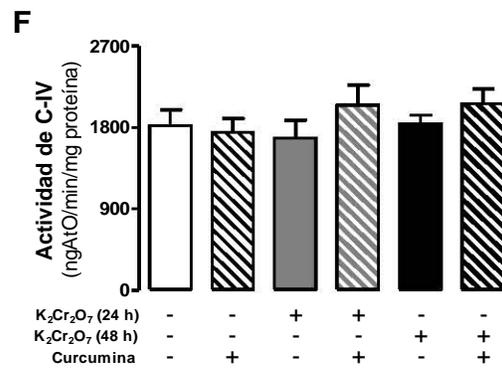
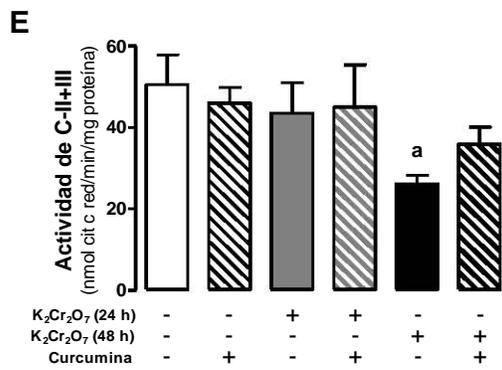
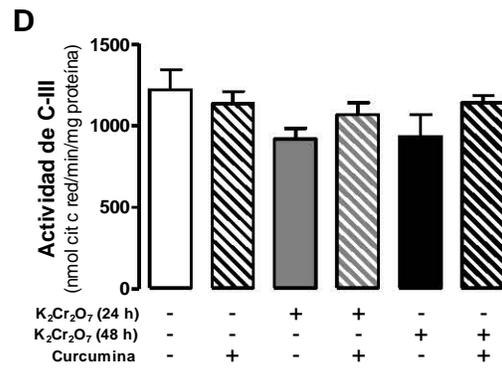
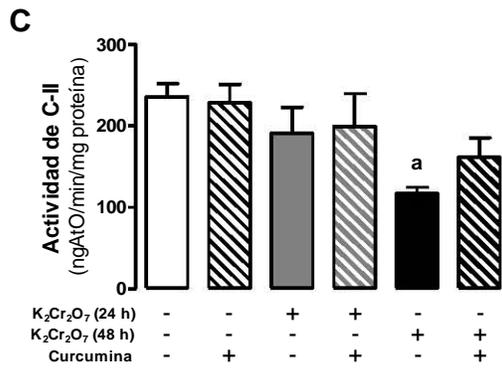
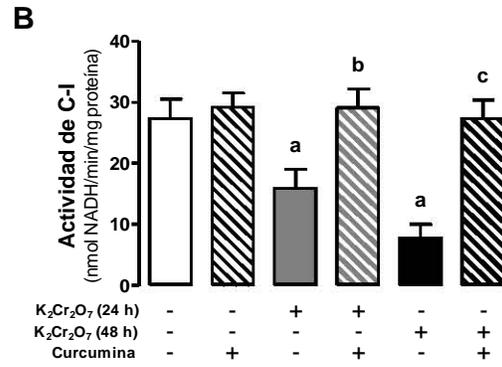
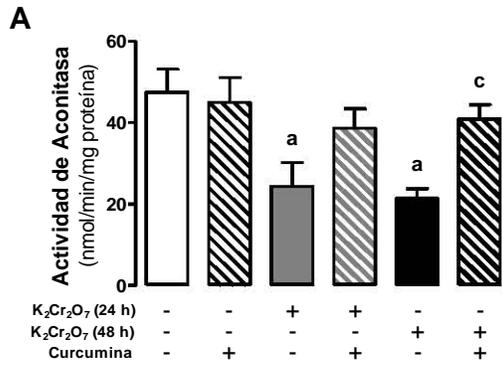


Fig. 31 Efecto del pretratamiento con curcumina sobre la actividad de enzimas mitocondriales hepáticas de ratas expuestas a $K_2Cr_2O_7$. (A) aconitasa; (B) NADH:ubiquinona oxidoreductasa (C-I); (C) succinato:ubiquinol oxidoreductasa (C-II); (D) ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa (C-III); (E) succinato:citocromo c oxidoreductasa (C-II+III); (F) citocromo c oxidasa (C-IV) y (G) ATP sintasa (C-V). Promedio \pm EEM. n=6-7. ^a $p < 0.05$ vs. control; ^b $p < 0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (24 h); ^c $p < 0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (48 h).

También el incremento de ERO en la matriz mitocondrial puede activar la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), causando el hinchamiento de las mitocondrias, la disipación del potencial de membrana, la salida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y la liberación de cit c (Cassarino *et al.*, 1998; Madamanchi y Runge, 2007). Así, el efecto del tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ y curcumina sobre la apertura del PTPm fue evaluado en las mitocondrias hepáticas de las ratas tratadas con estos agentes.

El $K_2Cr_2O_7$ rápidamente ocasionó el hinchamiento de las mitocondrias después de adicionar Ca^{2+} 50 μ M, como consecuencia de la pérdida de la permeabilidad (Figura 32A, líneas 3 y 6); la adición de CsA evitó este efecto (Figura 32A, líneas 4 y 7). Mientras que, las mitocondrias de las ratas pretratadas con curcumina presentaron marcadamente un menor hinchamiento (Figura 32A, líneas 5 y 8), reflejando así el papel protector de la curcumina sobre la apertura del PTPm. El grupo control y el tratado únicamente con curcumina presentaron una ligera disminución en la absorbancia a 540 nm (Figura 32A, líneas 1 y 2).

Los grupos tratados con $K_2Cr_2O_7$ por 24 ó 48 h, presentaron un rápido abatimiento del potencial de membrana luego de la adición de Ca^{2+} 50 μ M (Figura 32B, líneas 3 y 6), así como la pérdida de capacidad para manejar el Ca^{2+} (Figura 32C, líneas 3 y 6). Al utilizar la CsA como inhibidor del PTPm en las mitocondrias de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$, se conservó el potencial de membrana y la retención de Ca^{2+} (Figuras 32B y 32C, líneas 4 y 7), indicando que el $K_2Cr_2O_7$ puede inducir la apertura del PTPm. Por otra parte, las mitocondrias de los animales que recibieron el pretratamiento con curcumina fueron capaces de resistir el abatimiento del potencial de membrana por más tiempo y con menor despolarización que las que no recibieron el antioxidante (Figura 32B, líneas 5 y 8). También, mantuvieron la capacidad para manejar el Ca^{2+} , principalmente el grupo tratado por 24 h (Figura 32C, líneas 5 y 8). Los grupos control y el tratado únicamente con curcumina no presentaron disipación del potencial de membrana ni pérdida de retención del Ca^{2+} hasta la adición del protonóforo CCCP (Figuras 32B y 32C, líneas 1 y 2).

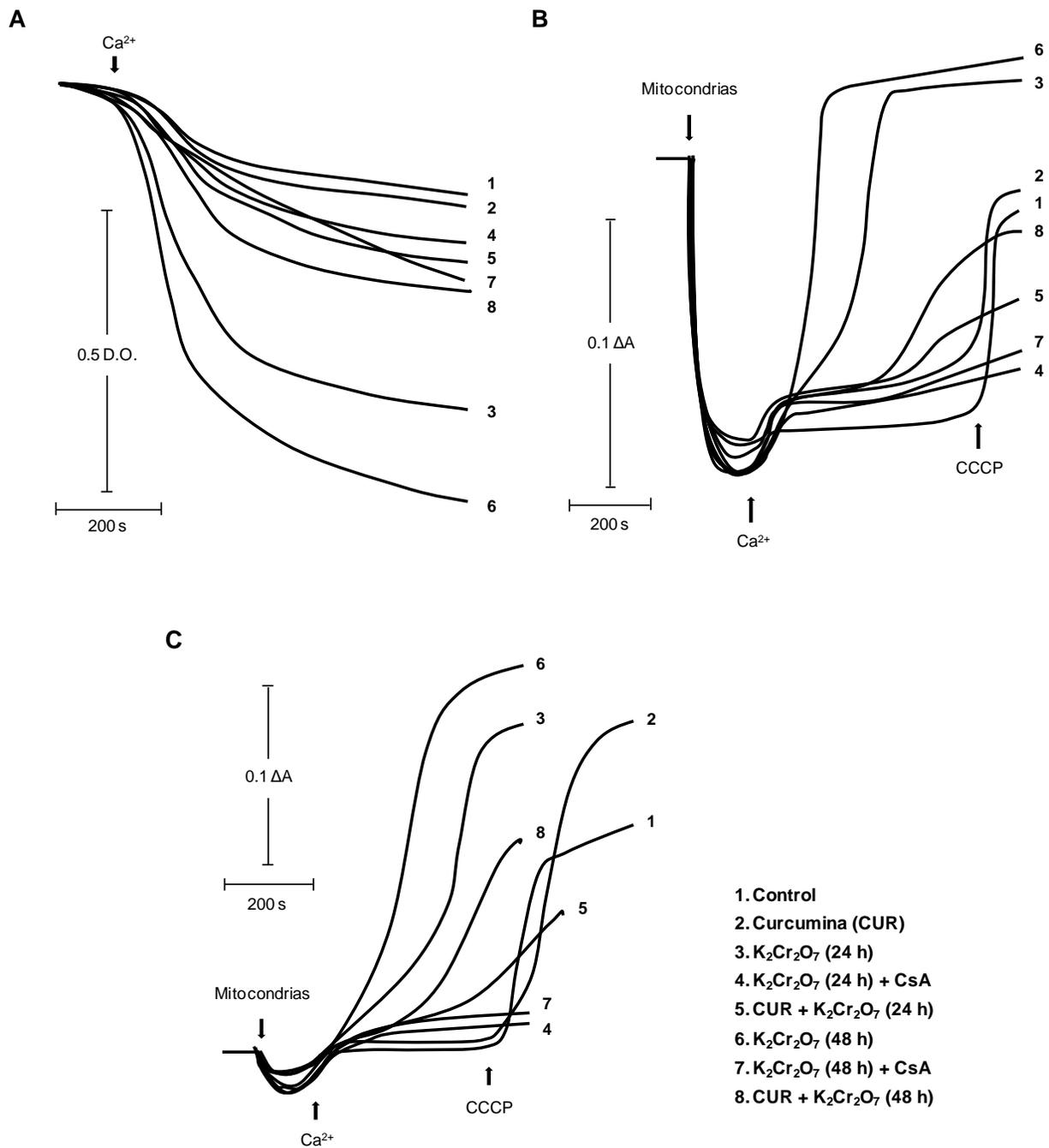


Fig. 32 Efecto de la curcumina sobre las alteraciones mitocondriales inducidas por el K₂Cr₂O₇ en (A) hinchamiento, (B) potencial de membrana y (C) la retención de Ca²⁺. Los trazos son representativos de al menos tres experimentos independientes. El CCCP se adicionó para inducir la pérdida del potencial de membrana y la liberación de Ca²⁺ en los grupos control y curcumina.

La apertura del PTPm puede resultar en la liberación del factor proapoptótico cit c al citosol (Lim *et al.*, 2002). Así, en este experimento se identificó que el tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ favoreció la apertura del PTPm resultando en la liberación del cit c al citosol a las 24 y 48 h de exposición (Figura 33A, columnas 3 y 6). La adición de CsA evitó la liberación de cit c inducida por el $K_2Cr_2O_7$ a ambos tiempos (Figura 33A, columnas 4 y 7). Interesantemente, el pretratamiento con curcumina evitó la liberación de cit c que fue inducida por el tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ y bajo condiciones de sobrecarga de calcio, atenuando la apertura del PTPm (Figura 33A, columnas 5 y 8). Ningún efecto fue observado en los grupos control y el tratado con curcumina (Figura 33A, columnas 1 y 2).

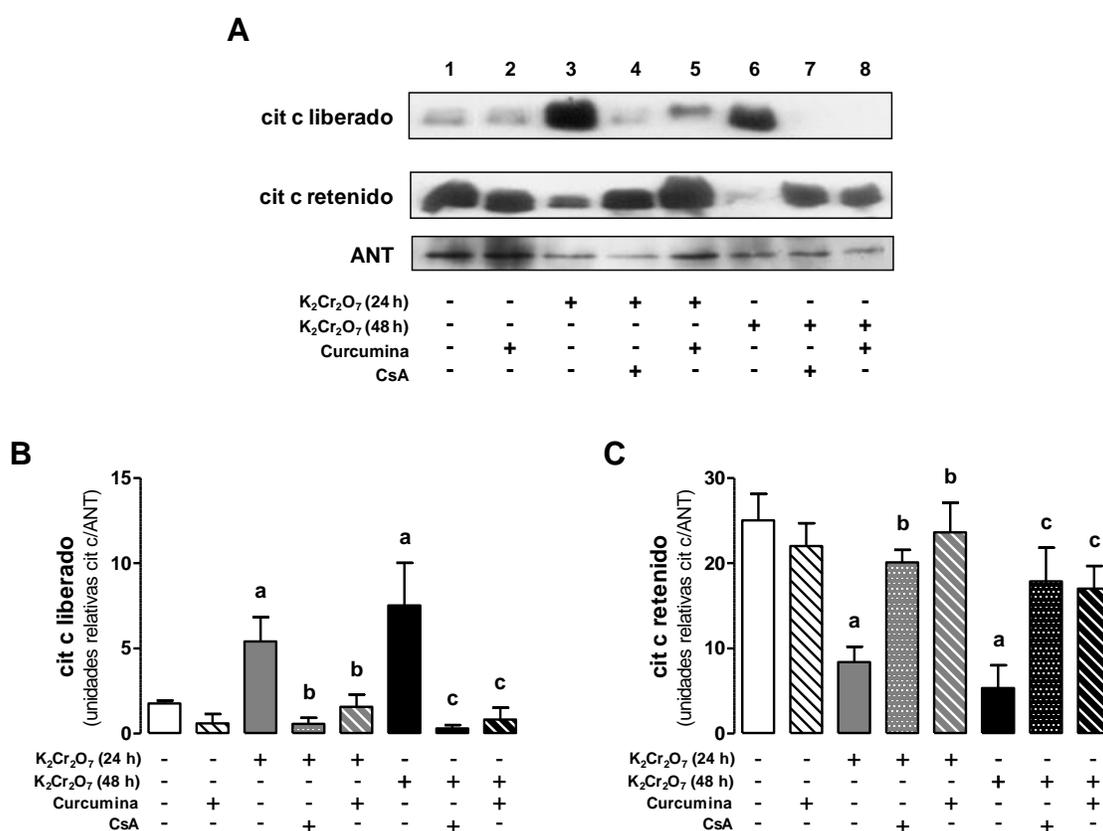


Fig. 33 Efecto de la curcumina sobre la liberación de citocromo c (cit c) inducida por el tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ en mitocondrias hepáticas aisladas de ratas tratadas con estos agentes. Las mitocondrias fueron incubadas por 10 min con Ca^{2+} 50 μ M, en presencia o ausencia de CsA. (A) análisis por Western blot del cit c mitocondrial liberado y del cit c retenido. La imagen es representativa de tres experimentos independientes; (B) proporción densitométrica del cit c liberado/ANT y (C) proporción densitométrica del cit c retenido/ANT. Promedio \pm EEM. $n=3$. ^a $p<0.05$ vs. control; ^b $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (24 h); ^c $p<0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (48 h). ANT, translocador de nucleótidos de adenina-1; CsA, ciclosporina A.

El análisis densitométrico reveló que la liberación del cit c aumenta significativamente en los grupos tratados con $K_2Cr_2O_7$ por 24 ó 48 h y que dicho aumento se previene por el pretratamiento con 400 mg/Kg de curcumina y con la CsA agregada al medio de incubación. En contraste, la proporción de cit c retenido por las mitocondrias fue significativamente más alta en los grupos coadministrados con la curcumina y el $K_2Cr_2O_7$, en comparación con los grupos tratados con $K_2Cr_2O_7$ a ambos tiempos.

4. DISCUSIÓN

Los metales pesados están incluidos en la categoría principal de contaminantes ambientales ya que pueden permanecer en el ambiente por largos periodos de tiempo y su acumulación es potencialmente peligrosa para los humanos, animales y las plantas (Azevedo y Azevedo, 2006). La toxicidad y carcinogenicidad inducida por metales, está mediada por la formación de radicales libres, los cuales causan modificaciones a las bases del ADN, incrementan la peroxidación lipídica y alteran la homeostasis del calcio y de los grupos sulfhidrilo (Ercal *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2005).

En el caso del Cr(VI), su toxicidad está influenciada por la capacidad de ingresar a la células más fácilmente que el Cr(III) y una vez dentro, ser reducido a estados de oxidación más bajos generando así un amplio espectro de ERO, lo que conlleva a las células a un estado de estrés oxidante y la subsecuente generación de daño en diversos tejidos (Patlolla *et al.*, 2009a). En diversos estudios se ha demostrado que el hígado es un órgano blanco para la toxicidad inducida por Cr(VI) debido a que una vez absorbido puede llegar a este órgano a través del suministro sanguíneo por la arteria hepática o la vena portal (Susa *et al.*, 1989; Woźniak *et al.*, 1991; Von Burg y Liu, 1993; Bagchi *et al.*, 1995a; Costa, 1997; Acharya *et al.*, 2001; Anand, 2005a; Rao *et al.*, 2006). La suplementación con antioxidantes puede ser considerado como el método alternativo para la prevención de los efectos dañinos ocasionados por este tipo de agentes y muchos extractos y compuestos aislados de plantas han demostrado tener actividad antioxidante (Maldonado *et al.*, 2003; Coballase-Urrutia *et al.*, 2010; Martínez-Abundis *et al.*, 2010; Guerrero-Beltrán *et al.*, 2012).

Los modelos experimentales de daño tóxico en hígado son utilizados para evaluar los procesos bioquímicos involucrados en muchas formas de enfermedad hepática y para evaluar los efectos farmacológicos de posibles hepatoprotectores como la curcumina (Rivera-Espinoza y Muriel, 2009). Los efectos anti-hepatotóxicos de la curcumina contra la toxicidad inducida por diversos agentes químicos y en desórdenes hepáticos son bien reconocidos y atribuidos a sus propiedades antioxidantes intrínsecas (Wei *et al.*, 2006; Alp *et al.*, 2012; Tokaç *et al.*, 2013). Debido al potencial terapéutico de la curcumina es de interés conocer si este compuesto presenta actividad hepatoprotectora contra la toxicidad inducida por Cr(VI), para que mediante la complementación de la dieta con este antioxidante, se busque prevenir, disminuir o evitar el riesgo de daño hepático en las poblaciones ocupacional o ambientalmente expuestas a este agente contaminante.

Debido a que el conocimiento actual de la toxicidad del Cr(VI) indica que los efectos de la exposición *in vivo* dependen de la vía de administración (Kim y Na, 1991; Wang *et al.*, 2006), se siguieron tres esquemas de exposición para obtener el modelo de hepatotoxicidad generado por $K_2Cr_2O_7$ [Cr(VI)], además de identificar la dosis a la cual la curcumina atenúa o evita esta toxicidad.

La administración de una sola dosis de $K_2Cr_2O_7$ por vía s.c. (15 y 20 mg/Kg) generaron toxicidad en los animales tratados después de 48 h de exposición. Sin embargo; esto sólo se manifestó en el peso corporal, incremento en la actividad de AST y de los marcadores de daño renal. Este aumento en la actividad de AST puede relacionarse también con el daño renal, ya que esta enzima se encuentra en niveles altos en riñón (Rej, 1989). Por otro lado, el incremento en los marcadores de daño renal en el plasma, correlaciona con lo informado por diversos autores, quienes identificaron que por esta vía se genera daño nefrotóxico (Kim y Na, 1991; Arreola-Mendoza *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2010). Adicionalmente, la curcumina protegió del daño renal inducido por el $K_2Cr_2O_7$, como previamente describió Molina-Jijón *et al.* (2011). La ausencia de efecto sobre la actividad de ALT, la cual es un marcador de daño hepático ya que la reserva más grande de esta enzima se encuentra en el citosol de las células parenquimales hepáticas y cuando existe daño hepatocelular son liberadas al torrente sanguíneo (Amacher, 1998), nos permitió identificar que siguiendo este esquema de exposición no se genera hepatotoxicidad. Estos resultados son congruentes con lo encontrado por Solis-Heredia *et al.* (2000), quienes no observaron incremento en la actividad de ALT después de 24 h en los animales tratados con 20 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ por vía s.c.

La administración de dosis repetidas de $K_2Cr_2O_7$ por vía i.p. (10 - 17.5 mg/Kg) durante 5 días cada 24 h ocasionó toxicidad elevada en las ratas tratadas con las dosis de 10 hasta 15 mg/Kg y mortalidad con la dosis de 17.5 mg/Kg, manifestándose en el peso corporal, la actividad de ALT, AST y LDH, la generación de ascitis e incremento en los marcadores de daño renal. Patlolla *et al.* (2009b) encontraron efectos significativos asociados a estrés oxidante y daños en el ADN a las dosis de 7.5 y 10 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ en ratas Sprague-Dawley. En su trabajo no evaluaron el daño hepático mediante marcadores bioquímicos ni tampoco hacen referencia a la generación de ascitis. Por ello, las pruebas en este modelo se realizaron a partir de la dosis de 10 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$. De esta manera; el incremento en la actividad de ALT, AST y LDH hace evidente el daño hepático y renal que se indujo bajo estas condiciones. La LDH es un buen indicador de daño o muerte celular; sin embargo, como está presente en numerosos tejidos, la

elevación en los niveles de esta enzima, no pueden considerarse como específicos (Cobben *et al.*, 1997). Además, una manifestación importante del daño hepático que se observó luego del tratamiento repetido con $K_2Cr_2O_7$ fue la generación de ascitis. La ascitis es la acumulación excesiva de líquido dentro de la cavidad peritoneal y representa un estado de retención corporal total de sodio y agua, siendo su causa más frecuente la cirrosis (Lira *et al.*, 2007; Román, 2007). Relacionado a este régimen de administraciones repetidas, Laborda *et al.* (1986) trataron intraperitonealmente a un grupo de ratas Wistar tres veces por semana con 2 mg/Kg de cloruro de cromo [Cr(III)] y otro grupo con 2 mg/Kg de cromato de sodio [Cr(VI)] también tres veces por semana, durante un período de 15 a 60 días. Estos autores identificaron que ambos tipos de compuestos generaban daño hepático, siendo más evidente y en menor tiempo en los animales tratados con Cr(VI). Asimismo, notaron que el Cr(VI) desarrolló mayor toxicidad en los animales, ya que ninguno sobrevivió las 8 semanas y que por esta vía se producía trasudado ascítico debido a cirrosis hepática y posiblemente a un bloqueo postsinusoidal, lo cual causó la muerte de los animales. De acuerdo con esto, el $K_2Cr_2O_7$ podría estar actuando de una manera similar, pero al ser dosis más altas y cada 24 h la toxicidad efectuada es mucho mayor y los efectos nocivos se aprecian en menor tiempo. Por otra parte, la coadministración con 400 mg/Kg de curcumina atenuó la toxicidad inducida por el $K_2Cr_2O_7$ evitando que los animales murieran, pero la dosis utilizada no fue suficiente para evitar que las ratas bajaran de peso, proteger al hígado del daño tóxico inducido por el $K_2Cr_2O_7$, ni tampoco evitó el desarrollo de ascitis. No obstante, en este punto debemos resaltar, que la curcumina protegió probablemente a nivel renal ya que favoreció la disminución en las enzimas AST y LDH, así como los marcadores de daño renal.

El esquema de tratamiento de dosis única de $K_2Cr_2O_7$ por vía i.p. (10 - 17.5 mg/Kg), resultó ser menos tóxico para los animales luego de 24 h de exposición, al no afectarse la ganancia de peso ni la relación entre el peso del hígado y el corporal. Sin embargo, el $K_2Cr_2O_7$ produjo daño hepático, favoreciendo la liberación de ALT y AST de los hepatocitos al torrente sanguíneo, así como la formación de líquido ascítico. En este caso no se ocasionó nefrotoxicidad a las ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$, como se demostró al evaluar los marcadores de daño en plasma y orina. De modo similar, Kim y Na (1991) utilizando $Na_2Cr_2O_7$ no observaron daño nefrotóxico por vía i.p. incluso a la dosis de 30 mg/Kg. En este esquema, el pretratamiento con 400 mg/Kg de curcumina protegió a los animales contra el daño hepático inducido por el $K_2Cr_2O_7$.

Por lo tanto, la administración de una sola dosis de 15 mg/kg de $K_2Cr_2O_7$ por vía i.p. fue seleccionada para establecer el modelo de hepatotoxicidad y de esta manera se evaluó el daño histológico, los marcadores de daño asociados a estrés oxidante y actividad de enzimas antioxidantes en los homogenados de hígado así como en las mitocondrias, además de la función mitocondrial. También se reconoció que la curcumina a la dosis de 400 mg/Kg atenúa o evita esta toxicidad.

Así, en el modelo de hepatotoxicidad inducida por el $K_2Cr_2O_7$ fue evidente la disminución en la ganancia del peso corporal, el peso del hígado y la proporción hepática, el incremento en las actividades de ALT, AST, LDH y ALP, las alteraciones histológicas y la presencia de ascitis. Kumar y Roy (2009) también encontraron que el cromo provoca la disminución en la ganancia de peso corporal, el peso del hígado y en la proporción hepática. Mientras que el incremento en plasma de las actividades de ALT, AST y ALP es indicativo de daño hepatocelular debido a la disrupción de la membrana plasmática y la liberación de las enzimas intracelulares al torrente sanguíneo (Amacher, 1998; Hassan *et al.*, 2012). El incremento en la actividad de ALP está relacionado con daño a los canalículos biliares y sugiere la obstrucción mecánica del ducto biliar, colangitis esclerosante primaria, cirrosis biliar primaria o hepatitis inducida por fármacos (Herlong, 1994). El tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ significativamente aumentó la actividad de estas enzimas de manera tiempo dependiente. La LDH en plasma es un marcador presuntivo de lesiones necróticas en los hepatocitos (Kalayarasan *et al.*, 2008). El pretratamiento con curcumina previno el incremento en las alteraciones mencionadas, demostrando el efecto hepatoprotector de la curcumina contra el daño inducido por el $K_2Cr_2O_7$. Estos descubrimientos son compatibles con los resultados de otros estudios usando curcumina contra la toxicidad hepática inducida por hierro (Reddy y Lokesh, 1996), o la fibrosis hepática inducida por tioacetamida (Wang *et al.*, 2012). En el hígado de las ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$ se observaron anormalidades histológicas de manera tiempo dependiente correspondiendo con el incremento en la actividad de las enzimas plasmáticas. Las alteraciones redox causadas por agentes oxidantes como los compuestos de Cr(VI), ha sido demostrado que inducen apoptosis y necrosis en hepatocitos y otros tipos celulares (Han *et al.*, 2006). De esta forma, el antioxidante curcumina previno el daño estructural inducida por el $K_2Cr_2O_7$, preservando la arquitectura normal en el tejido hepático y protegiendo a los hepatocitos de las ERO. En estudios previos se ha demostrado que la curcumina protege contra cambios histológicos en hígado inducidos por agentes tóxicos

como el tetracloruro de carbono (Fu *et al.*, 2008), acetaminofén (Kheradpezhohu *et al.*, 2010) o cipermetrina (Sankar *et al.*, 2012).

El Cr(VI) induce estrés oxidante a través de la producción exacerbada de ERO ocasionando daño en el ADN genómico, lípidos y proteínas (Bagchi *et al.*, 2002a). La lipoperoxidación genera una amplia variedad de productos terminales, incluyendo MDA, el cual es usado como un marcador de daño oxidante. El MDA puede dañar a su vez, a proteínas y lípidos (Adly, 2010). Mientras que, la formación de proteínas oxidadas es uno de los aspectos más destacados del estrés oxidante y los grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) son producidos sobre las cadenas laterales de las proteínas cuando son oxidadas (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos hacen evidente que el $K_2Cr_2O_7$ incrementó la lipoperoxidación y las proteínas oxidadas reflejando el daño oxidante hepático. El pretratamiento con curcumina pudo prevenir el daño oxidante inducido por el $K_2Cr_2O_7$ debido a que es considerada un agente antioxidante bifuncional ejerciendo efectos directos al atrapar radicales $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$ y peroxilos (Tuba y Ilhami, 2008) y efectos indirectos induciendo la expresión de enzimas antioxidantes (Dinkova-Kostova y Talalay, 2008).

El GSH es un tripéptido (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) responsable de la protección contra ERO y otras especies reactivas, y de la eliminación de toxinas endógenas y exógenas de naturaleza electrofílica (Lushchak, 2012). La disminución del contenido de GSH reduce la capacidad antioxidante, favoreciendo el estrés oxidante (Gutierrez *et al.*, 2006; Whillier *et al.*, 2011). Las ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$ presentaron bajos niveles de GSH en comparación con el control, como consecuencia del estrés oxidante inducido por este agente. Soudani *et al.* (2011) señaló que esta disminución en los niveles de GSH podría deberse a su consumo al atrapar a los radicales libres generados por el $K_2Cr_2O_7$. El pretratamiento con curcumina restauró los niveles de GSH, de manera similar a informes previos que han demostrado la efectividad de la curcumina en re-establecer el contenido de GSH en el hígado de ratas expuestas a paracetamol (Farghaly y Hussein, 2010) o aflatoxinas (El-Agamy, 2010).

Las enzimas antioxidantes son mecanismos protectores importantes contra las ERO. La SOD cataliza la dismutación de $O_2^{\cdot -}$ a O_2 y a la especie menos reactiva H_2O_2 . Los peróxidos pueden ser degradados por CAT o GPx (Matés *et al.*, 1999). La GR convierte GSSG a GSH usando NADPH, mientras que GST cataliza la conjugación de especies electrofílicas con GSH (Elia *et al.*, 2006). El $K_2Cr_2O_7$ disminuyó la actividad de SOD, CAT, GPx, GR y GST principalmente 48 h después del tratamiento. Este efecto puede ser

secundario a la disminución en los niveles de las enzimas (secundario a cambios en la síntesis y degradación de enzimas) o a la disminución en la actividad sin cambios en los niveles enzimáticos (p. ej. daño por estrés oxidante) (Whillier *et al.*, 2011). En este contexto, Kalayarasan *et al.* (2008) postuló que el $K_2Cr_2O_7$ produce altos niveles de $O_2^{\cdot-}$ el cual supera la actividad enzimática y provoca la caída en su concentración en el tejido hepático. El pretratamiento con curcumina restableció la actividad de las enzimas antioxidantes a la normalidad en los animales expuestos al $K_2Cr_2O_7$, como se ha observado en diferentes estudios de hepatoprotección de la curcumina contra la toxicidad por arsenito de sodio (El-Demerdash *et al.*, 2009), acrilonitrilo (Guangwei *et al.*, 2010), cloroquina (Al-Jassabi *et al.*, 2011) o trióxido de arsénico (Mathews *et al.*, 2012). Además, Iqbal *et al.* (2003) encontró que la curcumina incrementa muchas enzimas citoprotectoras, especialmente en el hígado.

La administración de una sola dosis de 15 mg/kg de $K_2Cr_2O_7$ por vía i.p a las 24 h no causó daño estructural, estrés oxidante o algún efecto sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, bazo y páncreas. En el riñón, la coadministración con curcumina y Cr(VI) favoreció el incremento en el contenido de GSH y de la actividad de las enzimas GPx, GR y GST. Al respecto, diversos autores han descrito que la generación de daño oxidante en el cerebro requiere altas dosis de $K_2Cr_2O_7$ y administraciones repetidas por vía oral (Travacio *et al.*, 2000; Bagchi *et al.*, 2002a; Nudler *et al.*, 2009). Taylor *et al.* (2003) utilizaron ratas Sprague-Dawley, a las cuales instilaron por vía intratraqueal con humos que contenían 2 mg/rata de cromo soluble en suspensión e identificaron que al tercer día se incrementaba la lipoperoxidación en el pulmón. Kim y Na (1991) encontraron nefrotoxicidad en riñón con la dosis de 30 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ al administrar a las ratas por vía i.p. De Flora *et al.* (1987) demostraron que los jugos gástricos reducen significativamente la absorción del cromo proporcionando una barrera protectora contra la toxicidad inducida por este metal. La producción de efectos oxidantes en el intestino requiere altas dosis de $K_2Cr_2O_7$ por vía oral (100–1500 mg/Kg) (Sengupta *et al.*, 1990; Arivarasu *et al.*, 2008). Además, la microflora intestinal protege contra la toxicidad inducida por el cromo (Upreti *et al.*, 2004; Shrivastava *et al.*, 2005). La dosis de CrO_3 de 8 mg/Kg por vía i.p. y la administración repetida por 28 días induce daño esplénico (Dey y Roy, 2009). Mientras que, la dosis única de 50 mg/Kg de $K_2Cr_2O_7$ por vía i.p. induce daño oxidante en páncreas (El-Saad *et al.*, 2010).

Los hepatocitos son normalmente ricos en mitocondrias y cada hepatocito contiene cerca de 800 mitocondrias ocupando alrededor del 18% del volumen celular del hígado (Wei *et al.*, 2008). Las mitocondrias son blanco de la toxicidad inducida por metales y en muchos casos está relacionada con estrés oxidante y disfunción mitocondrial (Königsberg *et al.*, 2001; Vatassery *et al.*, 2004; Pardo-Andreu *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2009). Además, las mitocondrias son la principal fuente intracelular de ERO como subproductos del consumo de oxígeno molecular en la cadena de transporte siendo estas mismas susceptibles de ser oxidadas, sin embargo, poseen un efectivo sistema antioxidante (Navarro y Boveris, 2004; Jurczuk *et al.*, 2006).

Los resultados experimentales en mitocondrias aisladas de ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$ demostraron un incremento de lípidos y proteínas oxidadas, depleción de GSH y reducción en las actividades de enzimas antioxidantes siendo este efecto más consistente después de 48 h de exposición. Estos efectos del $K_2Cr_2O_7$ sobre las mitocondrias concuerdan con estudios previos (Jasso-Chávez *et al.*, 2010; Rembacz *et al.*, 2012). Por su parte, la curcumina exitosamente previno el daño oxidante y las alteraciones ocasionadas por el $K_2Cr_2O_7$ sobre las actividades de las enzimas antioxidantes en las mitocondrias. La curcumina puede proteger a las mitocondrias hepáticas de la lipoperoxidación y la oxidación de proteínas inducidas por las ERO donando átomos de H de sus grupos fenólicos y metilénicos del motivo β -dicetona (Priyadarsini *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2006), aumentando los niveles de GSH (Zhu *et al.*, 2004; González-Salazar *et al.*, 2011), o incrementando las defensas citoprotectoras, de manera similar a como actúa en otros modelos experimentales (He *et al.*, 2012; Waseem *et al.*, 2013).

El estrés oxidante genera disfunción mitocondrial, disminuyendo el consumo de oxígeno y la producción de ATP, alterando la homeostasis del calcio, oxidando lípidos, proteínas y ADN, abriendo el PTPm, modificando la expresión de enzimas antioxidantes e incrementando la expresión y/o unión de numerosos factores de transcripción al ADN (Calabrese *et al.*, 2005; Lin y Beal, 2006; Oliveira *et al.*, 2006). Las alteraciones en el consumo de oxígeno en el estado 3, el control respiratorio, la respiración desacoplada, la relación ADP/O usando glutamato/malato; así como los efectos negativos del $K_2Cr_2O_7$ usando succinato sobre la respiración en el estado 3 y la desacoplada, pueden asociarse con la actividad oxidante del Cr(VI) sobre la bioenergética mitocondrial en el hígado, la cual tiene efectos nocivos al desviar electrones de los donadores electrónicos acoplados a la producción de ATP, y de la habilidad del Cr(III), derivado de la reducción del Cr(VI), para formar complejos estables con los precursores y las enzimas involucradas en la

síntesis de ATP (Debetto et al., 1982; Ryberg y Alexander, 1984). De esta manera, también se explica la disminución en el contenido de ATP en las mitocondrias hepáticas de las ratas que fueron tratadas con el $K_2Cr_2O_7$. Notablemente, el pretratamiento con curcumina restauró la respiración mitocondrial manteniendo la homeostasis redox o protegiendo a los complejos respiratorios mitocondriales (Raza et al., 2008; Sivalingam et al., 2008). Además, El-Maraghy et al. (2009) sugirieron que la curcumina restaura los niveles de ATP evitando la oxidación de los sustratos en un modelo de sobrecarga de hierro.

El sistema de fosforilación oxidativa se compone de cuatro complejos enzimáticos (I-IV) que conforman la cadena respiratoria mitocondrial, y el complejo ATP sintasa (complejo V), la cual usa la energía generada por el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria para producir ATP (Shoubridge, 2001). Los resultados presentados indican que el $K_2Cr_2O_7$ puede dañar la actividad de biomoléculas involucradas en la fosforilación oxidativa, particularmente a los complejos I, II y V.

La NADH:ubiquinona oxidoreductasa (complejo I) es un complejo enzimático de cerca de 40 subunidades embebidas en la membrana mitocondrial interna y tiene un papel central en la producción de energía en la cadena respiratoria, proveyendo alrededor del 40% de la fuerza protón-motriz requerida para la síntesis de ATP. El complejo I acepta electrones donados de sustratos ligados a NADH y después de una serie de reacciones redox, los dona a la ubiquinona. (Efremov et al., 2010). La disfunción del complejo I es el defecto mitocondrial más común guiando a la célula a muerte y enfermedad (Gonzalez-Halphen et al., 2011). La succinato:ubiquinol oxidoreductasa (complejo II) cataliza la oxidación de succinato en la membrana interna de las mitocondrias. Además de su función como una deshidrogenasa en el sistema respiratorio, el complejo II juega un papel importante en el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Esta enzima es una proteína integral de membrana que consiste de cuatro subunidades, las cuales son las responsables de transferir los electrones de sustratos ligados a FADH a la ubiquinona (Miyadera et al., 2003). Aunque los complejos I y III son reconocidos como los suministros de ERO, en los últimos años se ha establecido también que el complejo II es un productor eficiente de ERO, particularmente superóxidos (Yankovskaya et al., 2003; Ishii et al., 2005). Mientras que, la ATP sintasa (complejo V) -también llamada F_1F_0 ATPasa, o simplemente F-ATPasa- está presente en la membrana interna de las mitocondrias eucarióticas. Es una enzima motora que termina la fosforilación oxidativa mediante la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato. Debido a la reversibilidad termodinámica y mecánica, la ATP sintasa se

convierte en una F_1F_0 -ATPasa favoreciendo la hidrólisis de ATP y el bombeo de protones bajo condiciones de colapso parcial o total del gradiente de protones, por ejemplo, durante la isquemia en las mitocondrias (García-Trejo y Morales-Ríos, 2008).

Rossi y Wetterhahn (1989), determinaron en partículas submitocondriales que los complejos I, II y IV son los sitios de la cadena de transporte de electrones donde se efectúa la reducción del Cr(VI). No obstante, Fernandes *et al.* (2002), demostraron, en mitocondrias hepáticas aisladas tratadas con $K_2Cr_2O_7$, que el Cr(VI) interfiere con la bioenergética mitocondrial induciendo perturbaciones en los complejos I y II del sistema de transporte de electrones, así como en el sistema de fosforilación (complejo V). Estos efectos se han asociado con la reducción del Cr(VI), al sustraer electrones del sistema de transporte de electrones mitocondrial (Debetto *et al.*, 1982). Las actividades de los complejos III y IV no presentaron alteraciones. Por otra parte, Ryberg y Alexander (1984), identificaron en mitocondrias hepáticas aisladas expuestas a cromato de sodio, que los grupos tioles del complejo I pueden ser directamente oxidados por el Cr(VI) al reducirse a Cr(III) inhibiendo de esta manera la respiración mitocondrial. Posteriormente, Ryberg y Alexander (1990) indicaron que la toxicidad del Cr(VI) en la mitocondria puede deberse a la depleción del NADH como resultado de la oxidación directa por el Cr(VI), así como a la disminución en la formación de NADH debido a la inhibición específica de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa inducida por Cr(VI).

Por otro lado, el pretratamiento con curcumina preservó la actividad de los complejos posiblemente atrapando ERO, evitando la oxidación de los grupos tioles de los complejos de la cadena de transporte de electrones, así como la oxidación del NADH. Además, la curcumina podría interferir con la reducción del Cr(VI) y de esta manera evitar la inhibición del complejo V por el Cr(III). Recientemente, se ha descrito que la curcumina atenúa la disminución en la actividad de los complejos I, II y V inducida por $K_2Cr_2O_7$ en un modelo de nefrotoxicidad (Molina-Jijón *et al.*, 2011), así como también evitó la pérdida de actividad del complejo I en un modelo de neurotoxicidad generada por peroxinitrito (Mythri *et al.*, 2011). También, la curcumina restauró las tasas de respiración asociadas a los complejos I, II y IV en un modelo de cardiotoxicidad producida por catecolaminas (Izem-Meziane *et al.*, 2012).

El término transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM) se refiere a un aumento brusco en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a los solutos de bajo peso molecular. Debido a las fuerzas osmóticas, la TPM es paralela a una entrada masiva de agua en la matriz mitocondrial, lo que eventualmente conduce al colapso

estructural del organelo. Además, la TPM parece estar mediada por la apertura del PTPm, una entidad supramolecular anclada en las uniones entre las membranas mitocondriales interna y externa (Bonora et al., 2013). El tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ causó la apertura del PTPm en las mitocondrias hepáticas, ocasionando la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, el incremento en la concentración del Ca^{2+} citosólico, el hinchamiento de la matriz y la ruptura de la membrana mitocondrial externa. Esto último favoreció la liberación de moléculas proapoptóticas como el cit-c al espacio intermembranal y al citosol. El pretratamiento con curcumina atenúo marcadamente la activación del PTPm al proteger a las mitocondrias de los efectos nocivos generados por el $K_2Cr_2O_7$. La curcumina puede inhibir la inducción del PTPm debido a sus propiedades antioxidantes que evitan la producción del $O_2^{\cdot-}$ y la peroxidación lipídica que lleva a las mitocondrias a estrés oxidante (Ligeret et al., 2004).

En conclusión, la curcumina protegió al hígado de la toxicidad inducida por el $K_2Cr_2O_7$, asociada con disfunción mitocondrial (Figura 34).

5. CONCLUSIONES

1. El pretratamiento con curcumina puede prevenir la hepatotoxicidad inducida por $K_2Cr_2O_7$.
2. El antioxidante curcumina evita la generación de estrés oxidante inducido por $K_2Cr_2O_7$ en el hígado y en mitocondrias hepáticas.
3. La curcumina protege a las mitocondrias hepáticas de la disfunción mitocondrial y evita la apertura de PTPm inducidos por $K_2Cr_2O_7$.
4. La curcumina podría ser usada como un agente preventivo contra la intoxicación por Cr(VI).

6. PERSPECTIVAS

1. Identificar el mecanismo fisiológico, bioquímico y/o molecular por medio del cual el $K_2Cr_2O_7$ induce la generación de la ascitis.
2. Reconocer en mitocondrias aisladas si la curcumina tiene efectos protectores contra el daño asociado con el estrés oxidante inducido por el $K_2Cr_2O_7$.
3. Evaluar el efecto preventivo de la curcumina contra el daño hepático en poblaciones ocupacional o ambientalmente expuestas a cromo.

7. REFERENCIAS

- ACGIH (1999) TLVs and BEIs. Threshold limit values for chemical substances and physical agents, biological exposure indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati, Ohio.
- Acharya S, Mehta K, Krishnan S, Rao C (2001) A subtoxic interactive toxicity study of ethanol and chromium in male Wistar rats. *Alcohol* 23:99–108.
- Acworth I, McCabe D, Maher T (1997) The analysis of free radicals, their reaction products, and antioxidants. In: *Oxidants, antioxidants and free radicals*. (Bassin S, Salem H, eds), 23–77 pp. United States of America: Taylor & Francis.
- Adly A (2010) Oxidative stress and disease: an updated review. *Res J Immunol* 3:129–145.
- Aggarwal B, Bhatt I, Ichikawa H, Ahn K, Sethi G, Sandur S, Natarajan C, Seeram N, Shishodia S (2007) Curcumin - biological and medicinal properties. *Turmeric genus Curcuma; Med Aromat plants-industrial profiles* CRC Press United States Am:297–368.
- Aggarwal B, Kumar A, Bharti A (2003) Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 23:363–398.
- Aggarwal BB, Ichikawa H, Garodia P, Weerasinghe P, Sethi G, Bhatt ID, Pandey MK, Shishodia S, Nair MG (2006) From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 10:87–118.
- Ahalya N, Ramachandra T V, Kanamadi RD (2003) Biosorption of heavy metals. *Res J Chem Environmet* 7:71–79.
- Ahmed H, Mannaa F (2004) Curcumin as an effective protective agent against ethinylestradiol-induced hepatocellular cholestasis. *Egypt J Med Lab Sci* 13:1–14.
- Ahsan H, Parveen N, Khan NU, Hadi SM (1999) Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chem Biol Interact* 121:161–175.
- Ak T, Gülcin I (2008) Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact* 174:27–37.
- Alexander J, Aaseth J (1995) Uptake of chromate in human red blood cells and isolated rat liver cells: the role of the anion carrier. *Analyst* 120:931–933.
- Alissa E, Ferns G (2011) Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. *J Toxicol* 2011:1–21.

- Al-Jassabi S, Ahmed KA, Ameen M (2012) Antioxidant effect of curcumin against microcystin-LR-induced renal oxidative damage in Balb/c mice. *Trop J Pharm Res* 11:531–536.
- Al-Jassabi S, Azirun M, Saad A (2011) Biochemical studies on the role of curcumin in the protection of liver and kidney damage by anti-malaria drug, chloroquine. *Am J Toxicol Sci* 3:17–22.
- Allegri P, Mastromarino A, Neri P (2010) Management of chronic anterior uveitis relapses: efficacy of oral phospholipidic curcumin treatment. Long-term follow-up. *Clin Ophthalmol* 4:1201–1206.
- Alp H, Aytakin I, Hatipoglu N, Alp A, Ogun M (2012) Effects of sulforaphane and curcumin on oxidative stress created by acute malathion toxicity in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16:144–148.
- Amacher DE (1998) Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. *Regul Toxicol Pharmacol* 27:119–130.
- Ammon HP, Wahl MA (1991) Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med* 57:1–7.
- Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 4:807–818.
- Anand S (2005a) Protective effect of vitamin B6 in chromium-induced oxidative stress in liver. *J Appl Toxicol* 25:440–443.
- Anand SS (2005b) Pyridoxine attenuates chromium-induced oxidative stress in rat kidney. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97:58–60.
- Anderson R (1997) Chromium as an essential nutrient for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 26:S35–41.
- Anderson R (1998) Chromium, glucose intolerance and diabetes. *J Am Coll Nutr* 17:548–555.
- Anderson R (2003) Chromium and insulin resistance. *Nutr Res Rev* 16:267–275.
- Appenroth K-J (2010) Definition of “heavy metals” and their role in biological systems. In: *Soil heavy metals, soil biology* (Sherameti I, Varma A, eds), 19–30 pp. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Arivarasu NA, Fatima S, Mahmood R (2008) Oral administration of potassium dichromate inhibits brush border membrane enzymes and alters anti-oxidant status of rat intestine. *Arch Toxicol* 82:951–958.
- Armienta M, Morton O, Rodríguez R, Cruz O, Aguayo A, Cenicerros N (2001) Chromium in a tannery wastewater irrigated area, León Valley, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 66:189–195.

- Armienta-Hernández MA, Rodríguez-Castillo R (1995) Environmental exposure to chromium compounds in the valley of León, México. *Environ Health Perspect* 103:47–51.
- Arreola-Mendoza L, Reyes JL, Melendez E, Martín D, Namorado MC, Sanchez E, Del Razo LM (2006) Alpha-tocopherol protects against the renal damage caused by potassium dichromate. *Toxicology* 218:237–246.
- Aruldhas M, Subramanian S, Sekar P, Vengatesh G, Chandrahasan G, Govindarajulu P, Akbarsha M (2005) Chronic chromium exposure-induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: study in a non-human primate (*Macaca radiata* Geoffroy). *Hum Reprod* 20:2801–2813.
- Asai A, Miyazawa T (2000) Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. *Life Sci* 67:2785–2793.
- ATSDR (2000a) Resumen de Salud Pública. Cromo. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR (2000b) Toxicological profile for chromium. (Final report). Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR (2008) Case Studies in Environmental Medicine (CSEM). Chromium toxicity. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Aw T (1997) Clinical and epidemiological data on lung cancer at a chromate plant. *Regul Toxicol Pharmacol* 26:S8–12.
- Azevedo JA, Azevedo RA (2006) Heavy metals and oxidative stress: where do we go from here? *Commun Biometry Crop Sci* 1:135–138.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs S (2001) Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biochem* 222:149–158.
- Bagchi D, Balmoori J, Bagchi M, Ye X, Williams CB, Stohs SJ (2002a) Comparative effects of TCDD, endrin, naphthalene and chromium (VI) on oxidative stress and tissue damage in the liver and brain tissues of mice. *Toxicology* 175:73–82.
- Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M, Muldoon D, Stohs S (1995a) Oxidative stress induced by chronic administration of sodium dichromate [Cr(VI)] to rats. *Comp Biochem Physiol* 110:281–287.
- Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M, Stohs S (1995b) Chromium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, nitric oxide production, and generation of reactive oxygen species in Sprague-Dawley rats. *Comp Biochem Physiol* 110:177–187.
- Bagchi D, Stohs S, Downs B, Bagchi M, Preuss H (2002b) Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 180:5–22.

- Bailey M, Boohaker J, Sawyer R, Behling J, Rasco J, Jernigan J, Hood R, Vincent J (2006) Exposure of pregnant mice to chromium picolinate results in skeletal defects in their offspring. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 77:244–249.
- Balasubramanyam M, Koteswari AA, Kumar RS, Monickaraj SF, Maheswari JU, Mohan V (2003) Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications. *J Biosci* 28:715–721.
- Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R (2003) Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 371:887–895.
- Barrera D, Maldonado P, Medina-Campos O, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio M, 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* 73:3027–3041.
- Barrientos A (2002) In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* 26:307–316.
- Barrientos A, Fontanesi F, Díaz F (2009) Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Curr Protoc Hum Genet* 19.3.
- Barthelemy S, Vergnes L, Moynier M, Guyot D, Labidalle S, Bahraoui E (1998) Curcumin and curcumin derivatives inhibit Tat-mediated transactivation of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Res Virol* 149:43–52.
- Basnet P, Skalko-Basnet N (2011) Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules* 16:4567–4598.
- Baum L, Ng A (2004) Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models. *J Alzheimer's Dis* 6:367–377.
- Beaver L, Stemmy E, Constant S, Schwartz A, Little L, Gigley J, Chun G, Sugden K, Ceryak S, Patierno S (2009) Lung injury, inflammation and Akt signaling following inhalation of particulate hexavalent chromium. *Toxicol Appl Pharmacol* 235:47–56.
- Belcaro G, Cesarone MR, Dugall M, Pellegrini L, Ledda A, Grossi MG, Togni S, Appendino G (2010) Efficacy and safety of Meriva®, a curcumin-phosphatidylcholine complex, during extended administration in osteoarthritis patients. *Altern Med Rev* 15:337–344.
- Bengmark S, Mesa MD, Gil A (2009) Plant-derived health: the effects of turmeric and curcuminoids. *Nutr Hosp* 24:273–281.
- Bereswill S, Muñoz M, Fischer A, Plickert R, Haag L, Otto B, Kühl A, Loddenkemper C, Göbel U, Heimesaat M (2010) Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS One*:e15099.

- Bonora M, Bononi A, De Marchi E, Giorgi C, Lebiezinska M, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Suski JM, Wojtala A, Wieckowski MR, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P (2013) Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle* 12:674–683.
- Buelna-Chontal M, Correa F, Hernández-Reséndiz S, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J (2011) Protective effect of α -mangostin on cardiac reperfusion damage by attenuation of oxidative stress. *J Med Food* 14:1370–1374.
- Buelna-Chontal M, Zazueta C (2013) Redox activation of Nrf2 & NF- κ B: a double end sword? *Cell Signal* 25:2548–2557.
- Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangiameli A, Pennisi G, Stella A, Butterfield D (2005) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 233:145–162.
- Cassarino DS, Swerdlow RH, Parks JK, Parker WD, Bennett JP (1998) Cyclosporin A increases resting mitochondrial membrane potential in SY5Y cells and reverses the depressed mitochondrial membrane potential of Alzheimer's disease cybrids. *Biochem Biophys Res Commun* 248:168–173.
- CDC (2009) Fourth National report on human exposure to environmental chemicals. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention.
- Chainani-Wu N (2003) Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of turmeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med* 9:161–168.
- Chandran B, Goel A (2012) A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. *Phyther Res* 26:1719–1725.
- Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK (2004) Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. *Curr Sci* 87:44–53.
- Cheng AL et al. (2001) Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res* 21:2895–2900.
- Chirino Y, Sánchez-González D, Martínez-Martínez C, Cruz C, Pedraza-Chaverri J (2008) Protective effects of apocynin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology* 245:18–23.
- Chirino Y, Sánchez-Pérez Y, Osornio-Vargas A, Morales-Bárcenas R, Gutiérrez-Ruiz M, Segura-García Y, Rosas I, Pedraza-Chaverri J, García-Cuellar C (2010) PM(10) impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicol Lett* 193:209–216.
- Çıkrıkçı S, Moziöğlü E, Yılmaz H (2008) Biological activity of curcuminoids isolated from *Curcuma longa*. *Rec Nat Prod* 2:19–24.

- Clarkson PM (1997) Effects of exercise on chromium levels. Is supplementation required? *Sport Med* 23:341–349.
- Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Camacho-Carranza R, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, Medina-Campos ON, Mendoza-Cruz M, Delgado-Lamas G, Espinosa-Aguirre JJ (2010) Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology* 276:41–48.
- Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, García-Cruz M, Ramírez-Morales A, Sánchez-González D, Martínez-Martínez C, Camacho-Carranza R, Espinosa-Aguirre J (2011) Hepatoprotective effect of acetonetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* 63:363–370.
- Cobben NAM, Drent M, Schols AMWJ, Lamers RJS, Wouters EFM, Van Dieijen-Visser MP (1997) Serum lactate dehydrogenase pattern in ex-coalminers and its isoenzyme. *Respir Med* 91:616–623.
- Copple IM, Goldring CE, Kitteringham N, Park BK (2008) The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology* 246:24–33.
- Correa F, Buelna-Chontal M, Hernández-Reséndiz S, García-Niño WR, Roldán FJ, Soto V, Silva-Palacios A, Amador A, Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Zazueta C (2013) Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease. *Free Radic Biol Med* 61:119–129.
- Correa F, García N, Robles C, Martínez-Abundis E, Zazueta C (2008) Relationship between oxidative stress and mitochondrial function in the post-conditioned heart. *J Bioenerg Biomembr* 40:599–606.
- Correa F, Soto V, Zazueta C (2007) Mitochondrial permeability transition relevance for apoptotic triggering in the post-ischemic heart. *Int J Biochem Cell Biol* 39:787–798.
- Cortinas de Nava C (2007) Regulación de los residuos peligrosos en México. SEMARNAT.
- Costa M (1997) Toxicity and carcinogenicity of Cr(VI) in animal models and humans. *Crit Rev Toxicol* 27:431–442.
- Cruz-Correa M, Shoskes DA, Sanchez P, Zhao R, Hylind LM, Wexner SD, Giardiello FM (2006) Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4:1035–1038.
- Dairam A, Fogel R, Daya S, Limson JL (2008) Antioxidant and iron-binding properties of curcumin, capsaicin, and S-allylcysteine reduce oxidative stress in rat brain homogenate. *J Agric Food Chem* 56:3350–3356.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329:23–38.

- Das L, Vinayak M (2012) Anti-carcinogenic action of curcumin by activation of antioxidant defence system and inhibition of NF- κ B signalling in lymphoma-bearing mice. *Biosci Rep* 32:161–170.
- Davis CM, Vincent JB (1997) Chromium oligopeptide activates insulin receptor tyrosine kinase activity. *Biochemistry* 36:4382–4385.
- De Flora S, Badolati GS, Serra D, Picciotto A, Magnolia MR, Savarino V (1987) Circadian reduction of chromium in the gastric environment. *Mutat Res* 192:169–174.
- Debetto P, Dal Toso R, Varotto R, Bianchi V, Luciani S (1982) Effects of potassium dichromate on ATP content of mammalian cells cultured in vitro. *Chem Biol Interact* 41:15–24.
- Degli Esposti D, Hamelin J, Bosselut N, Saffroy R, Sebah M, Pommier A, Martel C, Lemoine A (2012) Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury. *Biochem Res Int* 2012:387626.
- Deodhar SD, Sethi R, C SR (1980) Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *Indian J Med Res* 71:632–634.
- Dey SK, Roy S (2009) Effect of chromium on certain aspects of cellular toxicity. *Iran J Toxicol* 2:260–267.
- Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, Wolff RA, Kunnumakkara AB, Abbruzzese JL, Ng CS, Badmaev V, Kurzrock R (2008) Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 14:4491–4499.
- Díaz-Barriga F (1996) Los residuos peligrosos en México. Evaluación del riesgo para la salud. *Salud Publica Mex* 38:280–291.
- Ding M, Shi X (2002) Molecular mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 234-235:293–300.
- Dinkova-Kostova A, Talalay P (2008) Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52:S128–38.
- 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 U S A* 98:3404–3409.
- Dinkova-Kostova AT, Talalay P (1999) Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 20:911–914.
- Doumas BT, Watson WA, Biggs HG (1971) Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 31:87–96.

- Drew B, Leeuwenburgh C (2003) Method for measuring ATP production in isolated mitochondria: ATP production in brain and liver mitochondria of Fischer-344 rats with age and caloric restriction. *Am J Physiol* 285:R1259–R1267.
- Efremov R, Baradaran R, Sazanov L (2010) The architecture of respiratory complex I. *Nature* 465:441–445.
- El-Agamy D (2010) Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B(1)-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol* 84:389–396.
- El-Demerdash F, Yousef M, Radwan F (2009) Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food Chem Toxicol* 47:249–254.
- Elejalde JI (2001) Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna* 18:326–335.
- Elia A, Dörr A, Mastrangelo C, Prearo M, Abete M (2006) Glutathione and antioxidant enzymes in the hepatopancreas of Crayfish *procambarus Clarkii* (Girard, 1852) of Lake Trasimeno (Italy). *Bull Français la Pêche la Piscic* 380-381:1351–1361.
- El-Maraghy SA, Rizk SM, El-Sawalhi MM (2009) Hepatoprotective potential of crocin and curcumin against iron overload-induced biochemical alterations in rat. *African J Biochem Res* 3:215–221.
- El-Saad AMA, Abdel-Moneim A, Abdel-Karim HM (2010) N-acetylcysteine an Allium plant compound protects against chromium (VI) induced oxidant stress and ultrastructural changes of pancreatic beta-cells in rats. *J Med Plants Res* 4:2290–2297.
- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1:529–539.
- Ermolli M, Menné C, Pozzi G, Serra M, Clerici L (2001) Nickel, cobalt and chromium-induced cytotoxicity and intracellular accumulation in human haecat keratinocytes. *Toxicology* 159:23–31.
- Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IMA, Chin D, Wagner AE, Rimbach G (2012) Curcumin-from molecule to biological function. *Angew Chemie* 51:5308–5332.
- Eybl V, Kotyzová D, Bludovská M (2004) The effect of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the liver of rats and mice. *Toxicol Lett* 151:79–85.
- Fang Y, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872–879.
- FAO (2004) Chemical and Technical Assessment. 61st JECFA. Food and Agriculture Organization.

- Farghaly H, Hussein M (2010) Protective effect of curcumin against paracetamol-induced liver damage. *Aust J Basic Appl Sci* 4:4266–4274.
- Farombi E, Shrotriya S, Na H, Kim S, Surh Y (2008) Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1. *Food Chem Toxicol* 46:1279–1287.
- Fernandes M, Santos M, Alpoim M, Madeira V, Vicente J (2002) Chromium(VI) interaction with plant and animal mitochondrial bioenergetics: a comparative study. *J Biochem Mol Toxicol* 16:53–63.
- Ferrer A (2003) Metal poisoning. *An Sis San Navarra* 26:141–153.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239–247.
- Flora S, Pachauri V (2010) Chelation in metal intoxication. *Int J Environ Res Public Health* 7:2745–2788.
- Flora SJ (2009) Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2:191–206.
- Flora SJ, Mittal M, Mehta A (2008) Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* 128:501–523.
- Fu Y, Zheng S, Lin J, Ryerse J, Chen A (2008) Curcumin protects the rat liver from CCl₄-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Mol Pharmacol* 73:399–409.
- Fujisawa S, Atsumi T, Ishihara M, Kadoma Y (2004) Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical scavenging activity of curcumin and related compounds. *Anticancer Res* 24:563–570.
- Galvao LA, Corey G (1987) *Cromo. Serie de vigilancia 5*. México: Centro Panamericano de Ecología y Salud.
- Gaona-Gaona L, Molina-Jijón E, Tapia E, Zazueta C, Hernández-Pando R, Calderón-Oliver M, Zarco-Márquez G, Pinzón E, Pedraza-Chaverri J (2011) Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology* 286:20–27.
- Garcea G, Berry DP, Jones DJL, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ (2005) Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:120–125.
- Garcea G, Jones DJL, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ, Berry DP (2004) Detection of curcumin and its metabolites in hepatic

- tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer* 90:1011–1015.
- García N, Zazueta C, Carrillo R, Correa F, Chávez E (2000) Copper sensitizes the mitochondrial permeability transition to carboxyatractyloside and oleate. *Mol Cell Biochem* 209:119–123.
- Garcia-Fernandez M, Sierra I, Puche JE, Guerra L, Castilla-Cortazar I (2011) Liver mitochondrial dysfunction is reverted by insulin-like growth factor II (IGF-II) in aging rats. *J Transl Med* 9:123.
- García-Trejo JJ, Morales-Ríos E (2008) Regulation of the F1F0-ATP synthase rotary nanomotor in its monomeric-bacterial and dimeric-mitochondrial forms. *J Biol Phys* 34:197–212.
- Gardner PR (2002) Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol* 349:9–23.
- Gatto N, Kelsh M, Mai D, Suh M, Proctor D (2010) Occupational exposure to hexavalent chromium and cancers of the gastrointestinal tract: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol* 34:388–399.
- Gonzalez-Halphen D, Ghelli A, Iommarini L, Carelli V, Esposti M (2011) Mitochondrial complex I and cell death: a semi-automatic shotgun model. *Cell Death Dis* 2:e222.
- González-Morán T, Rodríguez-Castillo R (1989) Monitoreo geofísico en el entorno de un basurero industrial de desechos de cromo. *Geof Int* 28:409–416.
- González-Reyes S, Guzmán-Beltrán S, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J (2013) Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats. *Oxid Med Cell Longev* 2013:801418.
- González-Salazar A, Molina-Jijón E, Correa F, Zarco-Márquez G, Calderón-Oliver M, Tapia E, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J (2011) Curcumin protects from cardiac reperfusion damage by attenuation of oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol* 11:357–364.
- Grant KE, Chandler RM, Castle AL, Ivy JL (1997) Chromium and exercise training: effect on obese women. *Med Sci Sports Exerc* 29:992–998.
- Guangwei X, Rongzhu L, Wenrong X, Suhua W, Xiaowu Z, Shizhong W, Ye Z, Aschner M, Kulkarni S, Bishnoi M (2010) Curcumin pretreatment protects against acute acrylonitrile-induced oxidative damage in rats. *Toxicology* 267:140–146.
- Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y (2001) Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7:175–189.

- Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI (2012) Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp Toxicol Pathol* 64:503–508.
- Gulati K, Banerjee B, Lall SB, Ray A (2010) Effects of diesel exhaust, heavy metals and pesticides on various organ systems: Possible mechanisms and strategies for prevention and treatment. *Indian J Exp Biol* 48:710–721.
- Gunaratnam M, Grant MH (2008) Cr (VI) inhibits DNA, RNA and protein syntheses in hepatocytes: involvement of glutathione reductase, reduced glutathione and DT-diaphorase. *Toxicol In Vitro* 22:879–886.
- Gupta SC, Prasad S, Kim JH, Patchva S, Webb LJ, Priyadarsini IK, Aggarwal BB (2011) Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat Prod Rep* 28:1937–1955.
- Gutierrez L, Mazzotti N, Araújo A, Klipel R, Fernandes T, Llesuy S, Belló-Klein A (2006) Peripheral markers of oxidative stress in chronic mercuric chloride intoxication. *Brazilian J Med Biol Res* 39:767–772.
- Gutiérrez-Ruiz ME, Bocco G, Castillo S (1986) Contaminación por cromo en el norte de la Ciudad de México. Un enfoque interdisciplinario. *Biol Inst Geof* 16:77–125.
- Gutiérrez-Ruiz ME, Villalobos-Peñalosa M, Miranda JA (1990) Chromium pollution evaluation in groundwaters of North Mexico City. *Rev Int Contam Ambient* 6:5–18.
- Gutteridge JM, Halliwell B (1999) Antioxidant protection and oxygen radical signaling. In: *Reactive oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach* (Gilbert DL, Colton CA, eds), 189–218 pp. United States of America: Kluwer Academic Press.
- Halliwell B (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 31:261–272.
- Halliwell B, Gutteridge J (2007) *Free radicals in biology and medicine*. 851 pp. Great Britain: Biosciences Oxford.
- Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N (2006) Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291:G1–G7.
- Hassan Z, Elobeid M, Virk P, Omer S, ElAmin M, Daghestani M, AlOlayan E (2012) Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxid Med Cell Longev* 2012:1–6.
- He H, Wang G, Gao Y, Ling W, Yu Z, Jin T (2012) Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. *World J Diabetes* 3:94–104.
- Hemeida R, Mohafez O (2008) Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats. *J Egypt Natl Canc Inst* 20:141–148.

- Henke DC (2008) Cystic fibrosis bench to bedside for Curcuma longa L in cystic fibrosis - Curcumin's controversial role as therapy. *U S Respir Dis* 4:76–78.
- Henkler F, Brinkmann J, Luch A (2010) The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. *Cancers (Basel)* 2:376–396.
- Hennig B, Ettinger AS, Jandacek RJ, Koo S, McClain C, Seifried H, Silverstone A, Watkins B, Suk WA (2007) Using nutrition for intervention and prevention against environmental chemical toxicity and associated diseases. *Environ Health Perspect* 115:493–495.
- Hennig B, Ormsbee L, McClain CJ, Watkins BA, Blumberg B, Bachas LG, Sanderson W, Thompson C, Suk WA (2012) Nutrition can modulate the toxicity of environmental pollutants: implications in risk assessment and human health. *Environ Health Perspect* 120:771–774.
- Hennig B, Toborek M, Bachas LG, Suk WA (2004) Emerging issues: Nutritional awareness in environmental toxicology. *J Nutr Biochem* 15:194–195.
- Hinerfeld D, Traini MD, Weinberger RP, Cochran B, Doctrow SR, Harry J, Melov S (2004) Endogenous mitochondrial oxidative stress: neurodegeneration, proteomic analysis, specific respiratory chain defects, and efficacious antioxidant therapy in superoxide dismutase 2 null mice. *J Neurochem* 88:657–667.
- Holt PR, Katz S, Kirshoff R (2005) Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: a pilot study. *Dig Dis Sci* 50:2191–2193.
- Hong F, Sekhar KR, Freeman ML, Liebler DC (2005) Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation. *J Biol Chem* 280:31768–31775.
- Hsu C, Cheng A (2007) Clinical studies with curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595:471–480.
- Hughes W (1996) *Essentials of environmental toxicology: The effects of environmentally hazardous substances on human health*. Loma, Lind California: Taylor & Francis Group.
- Hummel M, Standl E, Schnell O (2007) Chromium in metabolic and cardiovascular disease. *Horm Metab Res* 39:743–751.
- IARC (1990) *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Chromium, nickel and welding*. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France.
- ICDA (2004) *Statistical bulletin 2005 edition*. International Chromium Development Association. Paris, France.
- Iqbal M, Sharma S, Okazaki Y, Fujisawa M, Okada S (2003) Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice:

possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol Toxicol* 92:33–38.

Ireson C, Orr S, Jones DJL, Verschoyle R, Lim C-K, Luo J-L, Howells L, Plummer S, Jukes R, Williams M, Steward WP, Gescher A (2001) Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res* 61:1058–1064.

Ishii T, Yasuda K, Akatsuka A, Hino O, Hartman P, Ishii N (2005) A mutation in the SDHC gene of complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis. *Cancer Res* 65:203–209.

IUPAC (2002) “Heavy metals”-A meaningless term?(IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 74:793–807.

Izem-Meziane M, Djerdjouri B, Rimbaud S, Caffin F, Fortin D, Garnier A, Veksler V, Joubert F, Ventura-Clapier R (2012) Catecholamine-induced cardiac mitochondrial dysfunction and mPTP opening: protective effect of curcumin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H665–H674.

James JS (1994) Curcumin trial results: antiviral effect reported. *AIDS Treat News* 198:1.

Jana M, Rajaram A, Rajaram R (2009) Chromium picolinate induced apoptosis of lymphocytes and the signaling mechanisms thereof. *Toxicol Appl Pharmacol* 237:331–344.

Jannetto P, Antholine W, Myers C (2001) Cytochrome b(5) plays a key role in human microsomal chromium(VI) reduction. *Toxicology* 159:119–133.

Jarup L (2003) Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* 68:167–182.

Jasso-Chávez R, Pacheco-Rosales A, Lira-Silva E, Gallardo-Pérez J, García N, Moreno-Sánchez R (2010) Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. *Aquat Toxicol* 100:329–338.

Jovanovic S V, Steenken S, Boone CW, Simic MG (1999) H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *J Am Chem Soc* 121:9677–9681.

Jurczuk M, Moniuszko-Jakoniuk J, Rogalska J (2006) Evaluation of oxidative stress in hepatic mitochondria of rats exposed to cadmium and ethanol. *Polish J Environ Stud* 15:853–860.

Jurenka J (2009) Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev* 14:141–153.

- Kalahasthi RB, Rao RHR, Murthy RBK, Kumar MK (2006) Effect of chromium(VI) on the status of plasma lipid peroxidation and erythrocyte antioxidant enzymes in chromium plating workers. *Chem Biol Interact* 164:192–199.
- Kalayarasan S, Sriram N, Sureshkumar A, Sudhandiran G (2008) Chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis is reduced by garlic and its derivative S-allylcysteine through the activation of Nrf2 in the hepatocytes of Wistar rats. *J Appl Toxicol* 28:908–919.
- Kandiannan S, Thankamani CK, Srinivasan V, Rajeev P (2008) Turmeric. Indian Institute of Spices. Extension pamphlet. Kochi: Niseema Printers & Publishers.
- Kang ES, Kim GH, Kim HJ, Woo IS, Ham SA, Jin H, Kim MY, Lee JH, Chang KC, Seo HG, Hwang JY (2008) Nrf2 regulates curcumin-induced aldose reductase expression indirectly via nuclear factor-kappaB. *Pharmacol Res* 58:15–21.
- Khan MR, Siddiqui S, Parveen K, Javed S, Diwakar S, Siddiqui WA (2010) Nephroprotective action of tocotrienol-rich fraction (TRF) from palm oil against potassium dichromate (K₂Cr₂O₇)-induced acute renal injury in rats. *Chem Biol Interact* 186:228–238.
- Kheradpezhoh E, Panjehshahin M, Miri R, Javidnia K, Noorafshan A, Monabati A, Dehpour A (2010) Curcumin protects rats against acetaminophen-induced hepatorenal damages and shows synergistic activity with N-acetyl cysteine. *Eur J Pharmacol* 628:274–281.
- Kim DH, Phillips JF, Lockey RF (2011) Oral curcumin supplementation in patients with atopic asthma. *Allergy Rhinol* 2:e51–3.
- Kim E, Na K (1991) Nephrotoxicity of sodium dichromate depending on the route of administration. *Arch Toxicol* 65:537–541.
- Kim S, Ha K, Choi E, Jung S, Kim M, Kwon D, Yang H, Kim M, Kang H, Back H, Kim S, Park S, Baek H, Kim Y, Lee J, Chae S (2013) The effectiveness of fermented turmeric powder in subjects with elevated alanine transaminase levels: a randomised controlled study. *BMC Complement Altern Med* 13:58.
- Kohli K, Ali J, Ansari M, Raheman Z (2005) Curcumin: a natural antiinflammatory agent. *Indian J Pharmacol* 37:141–147.
- Königsberg M, López-Díazguerrero NE, Bucio L, Gutiérrez-Ruiz MC (2001) Uncoupling effect of mercuric chloride on mitochondria isolated from an hepatic cell line. *J Appl Toxicol* 21:323–329.
- Kozlov A V, Bahrami S, Calzia E, Dungal P, Gille L, Kuznetsov A V, Troppmair J (2011) Mitochondrial dysfunction and biogenesis: do ICU patients die from mitochondrial failure? *Ann Intensive Care* 1:41.
- Kumar K, Maliakel BP (2007) Curcumin: a natural yellow pigment with great potential. *AgroFood Ind Hi-Tech* 18:52–53.

- Kumar S (2011) Free radicals and antioxidants: human and food system. *Adv Appl Sci Res* 2:129–135.
- Kumar S, Roy S (2009) Effect of chromium on certain aspects of cellular toxicity. *Iran J Toxicol* 2:260–267.
- Kurd SK, Smith N, VanVoorhees A, Troxel AB, Badmaev V, Seykora JT, Gelfand JM (2008) Oral curcumin in the treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: A prospective clinical trial. *J Am Acad Dermatol* 58:625–631.
- Kurosaki K, Nakamura T, Mukai T, Endo T (1995) Unusual findings in a fatal case of poisoning with chromate compounds. *Forensic Sci Int* 75:57–65.
- Kutluay SB, Doroghazi J, Roemer ME, Triezenberg SJ (2008) Curcumin inhibits herpes simplex virus immediate-early gene expression by a mechanism independent of p300/CBP histone acetyltransferase activity. *Virology* 373:239–247.
- Laborda R, Díaz-Mayans J, Núñez A (1986) Nephrotoxic and hepatotoxic effects of chromium compounds in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 36:332–336.
- Lal B, Kapoor AK, Asthana OP, Agrawal PK, Prasad R, Kumar P, Srimal RC (1999) Efficacy of curcumin in the management of chronic anterior uveitis. *Phyther Res* 13:318–322.
- Langard S (1979) The time-related subcellular distribution of chromium in the rat liver cell after intravenous administration of Na₂ (51)CrO₄. *Biol Trace Elem Res* 1:45–54.
- Langseth L (1995) Oxidants, antioxidants, and disease prevention. Belgium: ILSI Europe.
- Lao CD, Ruffin MT, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, Boggs ME, Crowell J, Rock CL, Brenner DE (2006) Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med* 6:10.
- Lim M, Lum MG, Hansen TM, Roucou X, Nagley P (2002) On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *J Biomed Sci* 9:488–506.
- Lin C, Wu M, Yang C, Ger J, Tsai W, Deng J (2009) Acute severe chromium poisoning after dermal exposure to hexavalent chromium. *J Chinese Med Assoc* 72:219–221.
- Lin M, Beal M (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787–795.
- Linos A, Petralias A, Christophi C, Christoforidou E, Kouroutou P, Stoltidis M, Veloudaki A, Tzala E, Makris K, Karagas M (2011) Oral ingestion of hexavalent chromium through drinking water and cancer mortality in an industrial area of Greece-an ecological study. *Environ Heal* 10:50.

- Lira MA, Mendoza E, Quezada JE, Muñoz L (2007) Ascitis. In: Hepatología. Desde la biología molecular al diagnóstico, tratamiento y prevención. (Muñoz LE, ed), 303–319 pp. China: McGraw Hill.
- Liu K, Shi X (2001) In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol Cell Biochem* 222:41–47.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4:118–126.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Lukaski HC (2000) Magnesium, zinc, and chromium nutriture and physical activity. *Am J Clin Nutr* 72:585S–593S.
- Lushchak V (2012) Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids* 2012:1–26.
- Madamanchi NR, Runge MS (2007) Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 100:460–473.
- Maldonado P, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos O, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J (2003) Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* 35:317–324.
- 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.
- Martinez-Zamudio R, Ha H (2011) Environmental epigenetics in metal exposure. *Epigenetics* 6:820–827.
- Matés J, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595–603.
- Mathews V, Binu P, Sauganth-Paul M, Abhilash M, Manju A, Nair R (2012) Hepatoprotective efficacy of curcumin against arsenic trioxide toxicity. *Asian Pac J Trop Biomed* 2:S706–11.
- Matos RC, Bessa M, Oliveira H, Gonçalves F, de Lourdes Pereira M, Nunes B (2013) Mechanisms of kidney toxicity for chromium- and arsenic-based preservatives: Potential involvement of a pro-oxidative pathway. *Environ Toxicol Pharmacol* 36:929–936.
- Medina-Campos ON, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado PD, Mendoza-Patiño N, Pedraza-Chaverri J (2007) S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK(1) cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food Chem Toxicol* 45:2030–2039.

- Mertz W (1969) Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol Rev* 49:163–239.
- Mertz W (1993) Chromium in human nutrition: a review. *Am Inst Nutr* 123:626–633.
- Miyadera H, Shiomi K, Ui H, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Miyoshi H, Osanai A, Kita K, Omura S (2003) Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:473–477.
- Molina-Jijón E, Tapia E, Zazueta C, El Hafidi M, Zatarain-Barrón Z, Hernández-Pando R, Medina-Campos O, Zarco-Márquez G, Torres I, Pedraza-Chaverri J (2011) Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. *Free Radic Biol Med* 51:1543–1557.
- Molina-Jijón E, Zarco-Márquez G, Medina-Campos O, Zatarain-Barrón Z, Hernández-Pando R, Pinzón E, Zavaleta R, Tapia E, Pedraza-Chaverri J (2012) Deferoxamine pretreatment prevents Cr(VI)-induced nephrotoxicity and oxidant stress: role of Cr(VI) chelation. *Toxicology* 291:93–101.
- Morton-Bermea O, Hernández-Álvarez E, Lozano R, Guzmán-Morales J, Martínez G (2010) Spatial distribution of heavy metals in top soils around the industrial facilities of Cromatos de México, Tultitlan Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 85:520–524.
- Myers CR, Antholine WE, Myers JM (2010) The pro-oxidant chromium(VI) inhibits mitochondrial complex I, complex II, and aconitase in the bronchial epithelium: EPR markers for Fe-S proteins. *Free Radic Biol Med* 49:1903–1915.
- Myers J, Antholine W, Myers C (2008) Hexavalent chromium causes the oxidation of thioredoxin in human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 246:222–233.
- Myers J, Antholine W, Myers C (2011) The intracellular redox stress caused by hexavalent chromium is selective for proteins that have key roles in cell survival and thiol redox control. *Toxicology* 281:37–47.
- Mythri R, Harish G, Dubey S, Misra K, Bharath M (2011) Glutamoyl diester of the dietary polyphenol curcumin offers improved protection against peroxynitrite-mediated nitrosative stress and damage of brain mitochondria in vitro: implications for Parkinson's disease. *Mol Cell Biochem* 347:135–143.
- Nanji A, Jokelainen K, Tipoe G, Rahemtulla A, Thomas P, Dannenberg A (2003) Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappa B-dependent genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G321–7.
- Navarro A, Boveris A (2004) Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R1244–R1249.
- Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Medina-Campos ON, Zatarain-Barrón ZL, Hernández-Pando R, Torres I, Tapia E, Pedraza-Chaverri J (2013) Sulforaphane

attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity: role of mitochondrial protection. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2013:135314.

NIH (2007) Phase III trial of gemcitabine , curcumin and celebrex in patients with advance or inoperable pancreatic cancer. Clinical Trial.gov identifier: NCT00486460. National Istitutes of health (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=curcumin>, last acces.

NIOSH (2007) NIOSH pocket guide to chemical hazards. Department of Health and Human Services. National Institute for Occupational Safety and Health. Cincinnati, Ohio.

NTP (2011) Chromium hexavalent compounds. Report on carcinogens. U.S. Department of Health and Human Services. National Toxicology Program.

Nudler S, Quinteros F, Miler E, Cabilla J, Ronchetti S, Duvilanski B (2009) Chromium VI administration induces oxidative stress in hypothalamus and anterior pituitary gland from male rats. *Toxicol Lett* 185:187–192.

Nwokocha CR, Owu DU, Nwokocha MI, Ufearo CS, Iwuala MO (2012) Comparative study on the efficacy of *Allium sativum* (garlic) in reducing some heavy metal accumulation in liver of wistar rats. *Food Chem Toxicol* 50:222–226.

O'Flaherty EJ (1996) A physiologically based model of chromium kinetics in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 64:54–64.

Oetari S, Sudibyo M, Commandeur JN, Samhoedi R, Vermeulen NP (1996) Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochem Pharmacol* 51:39–45.

Oliveira C, Coelho A, Barbeiro H, Lima V, Soriano F, Ribeiro C, Molan N, Alves V, Souza HP, Machado M, Carrilho F (2006) Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Brazilian J Med Biol Res* 39:189–194.

Orozco-Ibarra M, Medina-Campos O, Sánchez-González D, Martínez-Martínez C, Floriano-Sánchez, E Santamaría A, Ramirez V, Bobadilla N, Pedraza-Chaverri J (2007) Evaluation of oxidative stress in D-serine induced nephrotoxicity. *Toxicology* 229:123–135.

OSHA (2006) OSHA issues final standard on hexavalent chromium. Occupational Safety and Health Administration. National News Release: 06-342-NAT.

OSHA (2009) Hexavalent Chromium. Occupational Safety and Health Administration. 3373-10.

Pan M, Huang T, Lin J (1999) Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos* 27:486–494.

Pardo-Andreu G, Inada N, Vercesi A, Curti C (2009) Uncoupling and oxidative stress in liver mitochondria isolated from rats with acute iron overload. *Arch Toxicol* 83:47–53.

- Patlolla AK, Barnes C, Hackett D, Tchounwou PB (2009a) Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int J Environ Res Public Health* 6:643–653.
- Patlolla AK, Barnes C, Yedjou C, Velma V, Tchounwou P (2009b) Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley rats. *Environ Toxicol* 24:66–73.
- Pawlikowski M, Szalińska E, Wardas M, Dominik J (2006) Chromium originating from tanneries in river sediments: a preliminary investigation from the upper Dunajec river (Poland). *Polish J Environ Stud* 15:885–894.
- Pedraza-Chaverrí J, Barrera D, Medina-Campos O, Carvajal R, Hernández-Pando R, Macías-Ruvalcaba N, Maldonado P, Salcedo M, Tapia E, Saldívar L, Castilla M, Ibarra-Rubio M (2005) Time course study of oxidative and nitrosative stress and antioxidant enzymes in K₂Cr₂O₇-induced nephrotoxicity. *BMC Nephrol* 6:1–12.
- Pedraza-Chaverrí J, Maldonado P, Medina-Campos O, Olivares-Corichi I, Granados-Silvestre M, Hernández-Pando R, Ibarra-Ruio M (2000) Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 29:602–611.
- Pedraza-Chaverri J, Yam-Canul P, Chirino Y, Sánchez-González D, Martínez-Martínez C, Cruz C, Medina-Campos O (2008) Protective effects of garlic powder against potassium dichromate-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol* 46:619–627.
- Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Andrés-Martínez L, Santamaría A (2006) Protective effect of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes. *Brain Res Bull* 68:379–383.
- Perkins S, Verschoyle RD, Hill K, Parveen I, Threadgill MD, Sharma RA, Williams ML, Steward WP, Gescher AJ (2002) Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the Min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:535–540.
- Piper JT, Singhal SS, Salameh MS, Torman T, Awasthi YC, Awasthi S (1998) Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol* 30:445–456.
- Pittler MH, Stevinson C, Ernst E (2003) Chromium picolinate for reducing body weight: meta-analysis of randomized trials. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:522–529.
- Pourahmad J, Mihajlovic A, O'Brien P (2001) Hepatocyte lysis induced by environmental metal toxins may involve apoptotic death signals initiated by mitochondrial injury. *Adv Exp Med Biol* 500:249–252.
- Pourahmad J, O'Brien P (2001) Biological reactive intermediates that mediate chromium (VI) toxicity. *Adv Exp Med Biol* 500:203–207.

- Pourahmad J, Rabiei M, Jokar F, O'Brien P (2005) A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for chromate and arsenite. *Toxicology* 206:449–460.
- Pritchard D, Ceryak S, Ha L, Fornsgaglio J, Hartman S, O'Brien T, Patierno S (2001) Mechanism of apoptosis and determination of cellular fate in chromium(VI)-exposed populations of telomerase-immortalized human fibroblasts. *Cell Growth Differ* 12:487–496.
- Pritchard D, Singh J, Carlisle D, Patierno S (2000) Cyclosporin A inhibits chromium (VI)-induced apoptosis and mitochondrial cytochrome c release and restores clonogenic survival in CHO cells. *Carcinogenesis* 21:2027–2033.
- Priyadarsini K, Maity D, Naik G, Kumar M, Unnikrishnan M, Satav J, Mohan H (2003) Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic Biol Med* 35:475–484.
- Prüss-Üstün A, Corvalán C (2006) Preventing disease through healthy environments. Towards an estimate of the environmental burden of disease. *World Heal Organ*:104 pp.
- Qi W, Reiter RJ, Tan D-X, Garcia JJ, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR (2000) Chromium(III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. *Environ Health Perspect* 108:399–402.
- Quinteros F, Machiavelli L, Miler E, Cabilla J, Duvilanski B (2008) Mechanisms of chromium (VI)-induced apoptosis in anterior pituitary cells. *Toxicology* 249:109–115.
- Rafael A, Almeida A, Santos P, Parreira I, Madeira V, Alves R, Cabrita A, Alpoim M (2007) A role for transforming growth factor- β apoptotic signaling pathway in liver injury induced by ingestion of water contaminated with high levels of Cr(VI). *Toxicol Appl Pharmacol* 224:163–173.
- Rahman K (2007) Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging* 2:219–236.
- Raja N, Nair B (2008) Chromium(III) complexes inhibit transcription factors binding to DNA and associated gene expression. *Toxicology* 251:61–65.
- Rao M, Parekh S, Chawla S (2006) Vitamin-E Supplementation Ameliorates Chromium-and/or Nickel Induced Oxidative Stress in Vivo. *J Heal Sci* 52:142–147.
- Rashid K, Sinha K, Sil PC (2013) An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food Chem Toxicol* 62:584–600.
- Ravindranath V, Chandrasekhara N (1981) Metabolism of curcumin-studies with [^3H]curcumin. *Toxicology* 22:337–344.
- Raza H, John A, Brown E, Benedict S, Kambal A (2008) Alterations in mitochondrial respiratory functions, redox metabolism and apoptosis by oxidant 4-hydroxynonenal

- and antioxidants curcumin and melatonin in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 226:161–168.
- Reddy AC, Lokesh BR (1992) Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem* 111:117–124.
- Reddy AC, Lokesh BR (1996) Effect of curcumin and eugenol on iron-induced hepatic toxicity in rats. *Toxicology* 107:39–45.
- Reddy AC, Lokesh BR (1994) Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol Cell Biochem* 137:1–8.
- Rej R (1989) Aminotransferases in disease. *Clin Lab Med* 9:667–687.
- Rembacz K, Sawicka E, Długosz A (2012) Role of estradiol in chromium-induced oxidative stress. *Acta Pol Pharm* 69:1372–1379.
- Reyes-Gutiérrez LR, Romero-Guzmán ET, Olmos-Salinas MG, Rodríguez-Castillo R (2009) Chemical species of chromate of an industrial landfill in the León valley, Guanajuato, Mexico. *Rev Mex Ciencias Biológicas* 26:104–116.
- Rezende M, Macedo M, Tirapegui J (2005) Considerations about chromium, insulin and physical exercise. *Rev Bras Med do Esporte* 11:246–250.
- Ringman JM, Frautschy SA, Teng E, Begum AN, Bardens J, Beigi M, Gylys KH, Badmaev V, Heath DD, Apostolova LG, Porter V, Vanek Z, Marshall GA, Hellemann G, Sugar C, Masterman DL, Montine TJ, Cummings JL, Cole GM (2012) Oral curcumin for Alzheimer's disease: tolerability and efficacy in a 24-week randomized, double blind, placebo-controlled study. *Alzheimer's Res Ther* 4:43.
- Rivera-Espinoza Y, Muriel P (2009) Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. *Liver Int* 29:1457–1466.
- Román R (2007) Ascites. *Acta Médica Peru* 24:34–39.
- Rossi SC, Wetterhahn KE (1989) Chromium(V) is produced upon reduction of chromate by mitochondrial electron transport chain complexes. *Carcinogenesis* 10:913–920.
- Roughley PJ, Whiting DA (1973) Experiments in the biosynthesis of curcumin. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1:2379–2388.
- Roy D, Mandal S, Sen G, Biswas T (2009) Superoxide anion mediated mitochondrial dysfunction leads to hepatocyte apoptosis preferentially in the periportal region during copper toxicity in rats. *Chem Biol Interact* 182:136–147.
- Rudolf E, Cervinka M, Cerman J, Schroterova L (2005) Hexavalent chromium disrupts the actin cytoskeleton and induces mitochondria-dependent apoptosis in human dermal fibroblasts. *Toxicol In Vitro* 19:713–723.

- Rui F, Bovenzi M, Prodi A, Fortina AB, Romano I, Peserico A, Corradin MT, Carrabba E, Filon FL (2010) Nickel, cobalt and chromate sensitization and occupation. *Contact Dermatitis* 62:225–231.
- Rybczynska M (1994) Biochemical aspects of free radical mediated tissue injury. *Postepy Hig Med Dosw* 48:419–441.
- Ryberg D, Alexander J (1984) Inhibitory action of hexavalent chromium (Cr(VI)) on the mitochondrial respiration and a possible coupling to the reduction of Cr(VI). *Biochem Pharmacol* 33:2461–2466.
- Ryberg D, Alexander J (1990) Mechanisms of chromium toxicity in mitochondria. *Chem Biol Interact* 75:141–151.
- Saïdi S, Azaza M, Windmolders P, van Pelt J, El-Feki A (2013) Cytotoxicity evaluation and antioxidant enzyme expression related to heavy metals found in tuna by-products meal: An in vitro study in human and rat liver cell lines. *Exp Toxicol Pathol*:1–9.
- Sankar P, Telang A, Manimaran A (2012) Protective effect of curcumin on cypermethrin-induced oxidative stress in Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol* 64:487–493.
- Sanmukhani J, Satodia V, Trivedi J, Patel T, Tiwari D, Panchal B, Goel A, Tripathi CB (2013) Efficacy and safety of curcumin in major depressive disorder: a randomized controlled trial. *Phyther Res*.
- Sengupta T, Chattopadhyay D, Ghosh N, Das M, Chatterjee GC (1990) Effect of chromium administration on glutathione cycle of rat intestinal epithelial cells. *Indian J Exp Biol* 28:1132–1135.
- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP (2005) Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 41:1955–1968.
- Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ (2007) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595:453–470.
- Shoubridge EA (2001) Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Hum Mol Genet* 10:2277–2284.
- Shrivastava R, Kannan A, Upreti RK, Chaturvedi UC (2005) Effects of chromium on the resident gut bacteria of rat. *Toxicol Mech Methods* 15:211–218.
- Shrivastava R, Upreti RK, Seth P, Chaturvedi UC (2002) Effects of chromium on the immune system. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34:1–7.
- Shukla PK, Khanna VK, Khan MY, Srimal RC (2003) Protective effect of curcumin against lead neurotoxicity in rat. *Hum Exp Toxicol* 22:653–658.

- Singh S, Vrishni S, Singh BK, Rahman I, Kakkar P (2010) Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radic Res* 44:1267–1288.
- Sivalingam N, Basivireddy J, Balasubramanian K, Jacob M (2008) Curcumin attenuates indomethacin-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Arch Toxicol* 82:471–481.
- Solis-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B, Sierra-Santoyo A, Hernández JM, Brambila E, Cebrián ME, Albores A (2000) Chromium increases pancreatic metallothionein in the rat. *Toxicology* 142:111–117.
- Son Y, Hitron J, Wang X, Chang Q, Pan J, Zhang Z, Liu J, Wang S, Lee J, Shi X (2010) Cr(VI) induces mitochondrial-mediated and caspase-dependent apoptosis through reactive oxygen species-mediated p53 activation in JB6 Cl41 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 245:226–235.
- Soni KB, Kuttan R (1992) Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. *Indian J Physiol Pharmacol* 36:273–275.
- Soudani N, Ben Amara I, Sefi M, Boudawara T, Zeghal N (2011) Effects of selenium on chromium (VI)-induced hepatotoxicity in adult rats. *Exp Toxicol Pathol* 63:541–548.
- Soudani N, Bouaziz H, Sefi M, Chtourou Y, Boudawara T, Zeghal N (2013) Toxic effects of chromium (VI) by maternal ingestion on liver function of female rats and their suckling pups. *Environ Toxicol* 28:11–20.
- Sreejayan, Rao MN (1997) Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 49:105–107.
- Stearns D, Silveira S, Wolf K, Luke A (2002) Chromium(III) tris(picolinate) is mutagenic at the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase locus in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 513:135–142.
- Stift A, Friedl J, Längle F, Berlakovich G, Steininger R, Mühlbacher F (2000) Successful treatment of a patient suffering from severe acute potassium dichromate poisoning with liver transplantation. *Transplantation* 69:2454–2455.
- Stohs S, Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18:321–336.
- Suresh D, Srinivasan K (2010) Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. *Indian J Med Res* 131:682–691.
- Surh Y (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3:768–780.
- Susa N, Ueno S, Furukawa Y, Michiba N, Minoura S (1989) Induction of lipid peroxidation in mice by hexavalent chromium and its relation to the toxicity. *Nihon juigaku zasshi* 51:1103–1110.

- Tajbakhsh S, Mohammadi K, Deilami I, Zandi K, Ramedani E, Asayesh G (2008) Antibacterial activity of indium curcumin and indium diacetylcurcumin. *African J Biotechnol* 7:3832–3835.
- Tanikawa K, Torimura T (2006) Studies on oxidative stress in liver diseases: important future trends in liver research. *Med Mol Morphol* 39:22–27.
- Tapia E, Soto V, Ortiz-Vega K, Zarco-Márquez G, Molina-Jijón E, Cristóbal-García M, Santamaría J, García-Niño W, Correa F, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J (2012) Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxid Med Cell Longev* 2012:269039.
- Tapia E, Zatarain-Barrón Z, Hernández-Pando R, Zarco-Márquez G, Molina-Jijón E, Cristóbal-García M, Santamaría J, Pedraza-Chaverri J (2013) Curcumin reverses glomerular hemodynamic alterations and oxidant stress in 5/6 nephrectomized rats. *Phytomedicine* 20:359–366.
- Taylor MD, Roberts JR, Leonard SS, Shi X, Antonini JM (2003) Effects of welding fumes of differing composition and solubility on free radical production and acute lung injury and inflammation in rats. *Toxicol Sci* 75:181–191.
- Tokaç M, Taner G, Aydın S, Ozkardeş A, Dündar H, Taşlıpınar M, Arıkök A, Kilic M, Başaran A, Basaran N (2013) Protective effects of curcumin against oxidative stress parameters and DNA damage in the livers and kidneys of rats with biliary obstruction. *Food Chem Toxicol* 69:53–57.
- Travacio M, María Polo J, Llesuy S (2000) Chromium(VI) induces oxidative stress in the mouse brain. *Toxicology* 150:137–146.
- Trujillo J, Chirinio Y, Molina-Jijón E, Andérica-Romero C, Tapia E, J P-C (2013) Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: recent findings. *Redox Biol* 1:448–456.
- U.S. EPA (1998) Toxicological review of hexavalent chromium. U.S. Environmental Protection Agency. CAS No. 18540-29-9.
- U.S. EPA (2010) Chromium-6 in drinking water. Office of Water. U.S. Environmental Protection Agency. 815-F-10-005.
- Ueno S, Kashimoto T, Susa N, Furukawa Y, Ishii M, Yokoi K, Yasuno M, Sasaki YF, Ueda J, Nishimura Y, Sugiyama M (2001) Detection of dichromate (VI)-induced DNA strand breaks and formation of paramagnetic chromium in multiple mouse organs. *Toxicol Appl Pharmacol* 170:56–62.
- Ueno S, Susa N, Furukawa Y, Aikawa K, Itagaki I (1989) Cellular injury and lipid peroxidation induced by hexavalent chromium in isolated rat hepatocytes. *Nihon Juigaku Zasshi* 51:137–145.

- Upreti RK, Shrivastava R, Chaturvedi UC (2004) Gut microflora & toxic metals: chromium as a model. *Indian J Med Res* 119:49–59.
- Uruno A, Motohashi H (2011) The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. *Nitric Oxide* 25:153–160.
- Valko M, Morris H, Cronin M (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12:1161–1208.
- Vatassery G, DeMaster E, Lai J, Smith W, Quach H (2004) Iron uncouples oxidative phosphorylation in brain mitochondria isolated from vitamin E-deficient rats. *Biochim Biophys Acta* 1688:265–273.
- Vera-Ramirez L, Pérez-Lopez P, Varela-Lopez A, Ramirez-Tortosa M, Battino M, Quiles JL (2013) Curcumin and liver disease. *BioFactors* 39:88–100.
- Vincent JB (2000) Quest for the molecular mechanism of chromium action and its relationship to diabetes. *Nutr Rev* 58:67–72.
- Vincent JB (2003) The potential value and toxicity of chromium picolinate as a nutritional supplement, weight loss agent and muscle development agent. *Sport Med* 33:213–230.
- Volke T, Velasco JA, De la Rosa DA (2005) Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. 141 pp. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología.
- Von Burg R, Liu D (1993) Chromium and hexavalent chromium. *J Appl Toxicol* 13:225–230.
- Wang L, Shen Y, Song R, Sun Y, Xu J, Xu Q (2009) An anticancer effect of curcumin mediated by down-regulating phosphatase of regenerating liver-3 expression on highly metastatic melanoma cells. *Mol Pharmacol* 76:1238–1245.
- Wang M, Chen Y, Chen I, Hsieh S, Chen S, Chiu C (2012) Curcumin protects against thioacetamide-induced hepatic fibrosis by attenuating the inflammatory response and inducing apoptosis of damaged hepatocytes. *J Nutr Biochem* 23:1352–1366.
- Wang X, Xing M, Shen Y, Zhu X, Xu L (2006) Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology* 228:16–23.
- Wang YJ, Pan MH, Cheng a L, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, Lin JK (1997) Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal* 15:1867–1876.
- Waseem M, Kaushik P, Parvez S (2013) Mitochondria-mediated mitigatory role of curcumin in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Cell Biochem Funct* 31:678–684.

- Wedeen RP, Qian L (1991) Chromium-induced kidney disease. *Environ Health Perspect* 92:71–74.
- Wei Q, Chen W, Zhou B, Yang L, Liu Z (2006) Inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation in rat liver mitochondria by curcumin and its analogues. *Biochim Biophys Acta* 1760:70–77.
- Wei Y, Rector R, Thyfault J, Ibdah J (2008) Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol* 14:193–199.
- Whillier S, Kuchel P, Raftos J (2011) Oxidative Stress in Type II Diabetes Mellitus and the Role of the Endogenous Antioxidant Glutathione. In: Role of the adipocyte in development of type 2 diabetes (Croniger C, ed), 129–252 pp. Croatia: InTech Europe.
- WHO (2003) Chromium in drinking-water background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. World Health Organization. Ginebra, Suiza.
- Witmer C, Faria E, Park H, Sadrieh N, Yurkow E, Connell S, Sirak A, Schleyer H (1994) In vivo effects of chromium. *Environ Health Perspect* 102:169–176.
- Wood R, Knobel GJ, Hurlow WE, Stokol JM, Town C (1990) Acute dichromate poisoning after use of traditional purgatives. *77:640–642*.
- Woźniak F, Borzecki Z, Swies Z (1991) Histopathologic and histochemical examination of rat liver after prolonged experimental application of potassium bichromate. *Ann Univ Mariae Curie-Skłodowska* 46:65–68.
- Xiao F, Feng X, Zeng M, Guan L, Hu Q, Zhong C (2012) Hexavalent chromium induces energy metabolism disturbance and p53-dependent cell cycle arrest via reactive oxygen species in L-02 hepatocytes. *Mol Cell Biochem* 371:65–76.
- Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* (80-) 299:700–704.
- Ye J, Wang S, Leonard S, Sun Y, Butterworth L, Antonini J, Ding M, Rojanasakul Y, Vallyathan V, Castranova V, Shi X (1999) Role of reactive oxygen species and p53 in chromium(VI)-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274:34974–34980.
- Yuann J, Liu K, Hamilton J, Wetterhahn K (1999) In vivo effects of ascorbate and glutathione on the uptake of chromium, formation of chromium(V), chromium-DNA binding and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in liver and kidney of osteogenic disorder shionogi rats following treatment with chromium(VI). *Carcinogenesis* 20:1267–1275.
- Zazueta C, Franco M, Correa F, García N, Santamaría J, Martínez-Abundis E, Chávez E (2007) Hypothyroidism provides resistance to kidney mitochondria against the injury induced by renal ischemia-reperfusion. *Life Sci* 80:1252–1258.

- Zazueta C, García N, Martínez-Abundis E, Pavón N, Hernández-Esquivel L, Chávez E (2010) Reduced capacity of Ca^{2+} retention in liver as compared to kidney mitochondria. ADP requirement. *J Bioenerg Biomembr* 42:381–386.
- Zhao R, Yang B, Wang L, Xue P, Deng B, Zhang G, Jiang S, Zhang M, Liu M, Pi J, Guan D (2013) Curcumin protects human keratinocytes against inorganic arsenite-induced acute cytotoxicity through an NRF2-dependent mechanism. *Oxid Med Cell Longev* 2013:412576.
- Zhu Y, Chen X, Chen Z, Zeng Y, Shi G, Su Y, Peng X (2004) Curcumin protects mitochondria from oxidative damage and attenuates apoptosis in cortical neurons. *Acta Pharmacol Sin* 25:1606–1612.
- Ziemacki G, Viviano G, Merli F (1989) Heavy metals: sources and environmental presence. *Ann Ist Super Sanita* 25:531–536.
- Zima T, Mestek O, Tesar V, Tesarova P, Nemecek K, Zak A, Zeman M (1998) Chromium levels in patients with internal diseases. *Biochem Mol Biol Int* 46:365–374.
- Zúñiga-Toalá A, Tapia E, Zazueta C, Correa F, Zatarain-Barrón Z, Hernández-Pando R, Zarco-Márquez G, Medina-Campos O, Pedraza-Chaverrí J (2012) Nordihydroguaiaretic acid pretreatment prevents ischemia and reperfusion induced renal injury, oxidant stress and mitochondrial alterations. *J Med Plants Res* 6:2938–2947.

8. ANEXOS

8.1. Efecto del tratamiento con curcumina y/o $K_2Cr_2O_7$ a la dosis de 15 mg/Kg (24 h) sobre diversos órganos

8.1.1. Cerebro

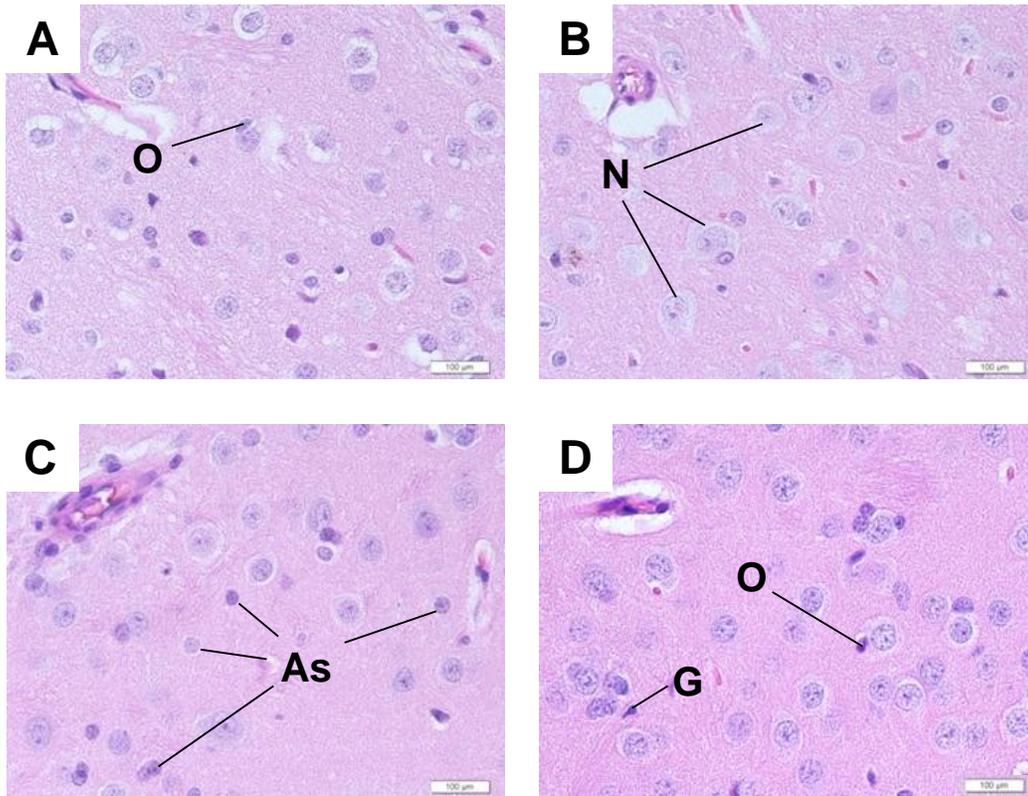


Fig. 1S Micrografías representativas de la corteza cerebral, de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). O, oligodendrocito; N, neuronas; As, astrocitos; G, célula glial. H&E, 400X.

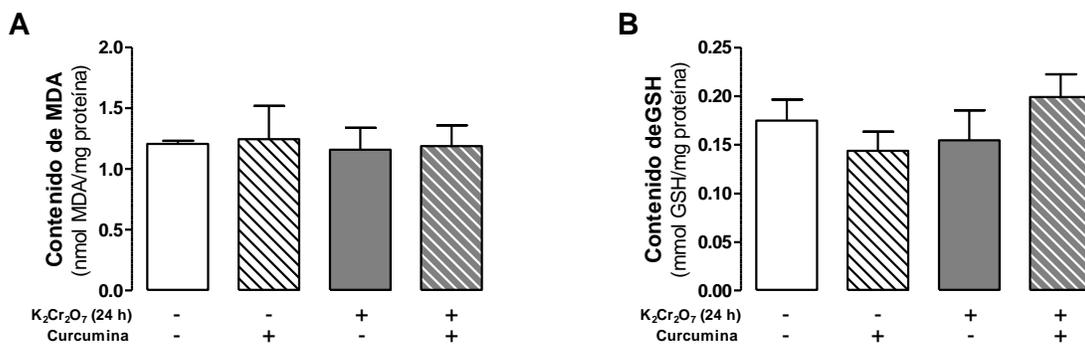


Fig. 2S Marcadores de estrés en cerebro de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). Promedio \pm EEM. n=4-5.

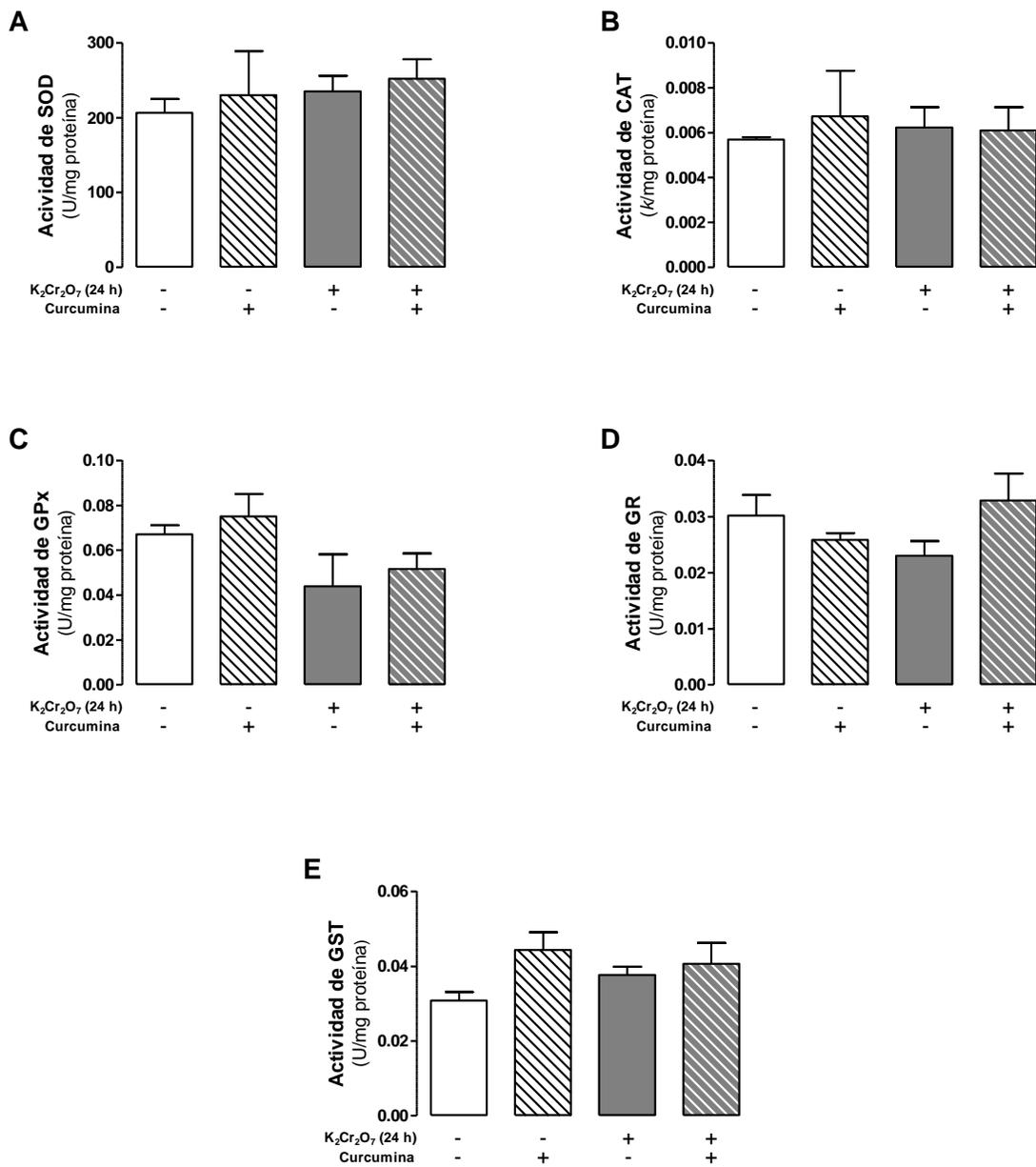


Fig. 3S Actividad de enzimas antioxidantes en cerebro de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). Promedio \pm EEM. n=4-5.

8.1.2. Corazón

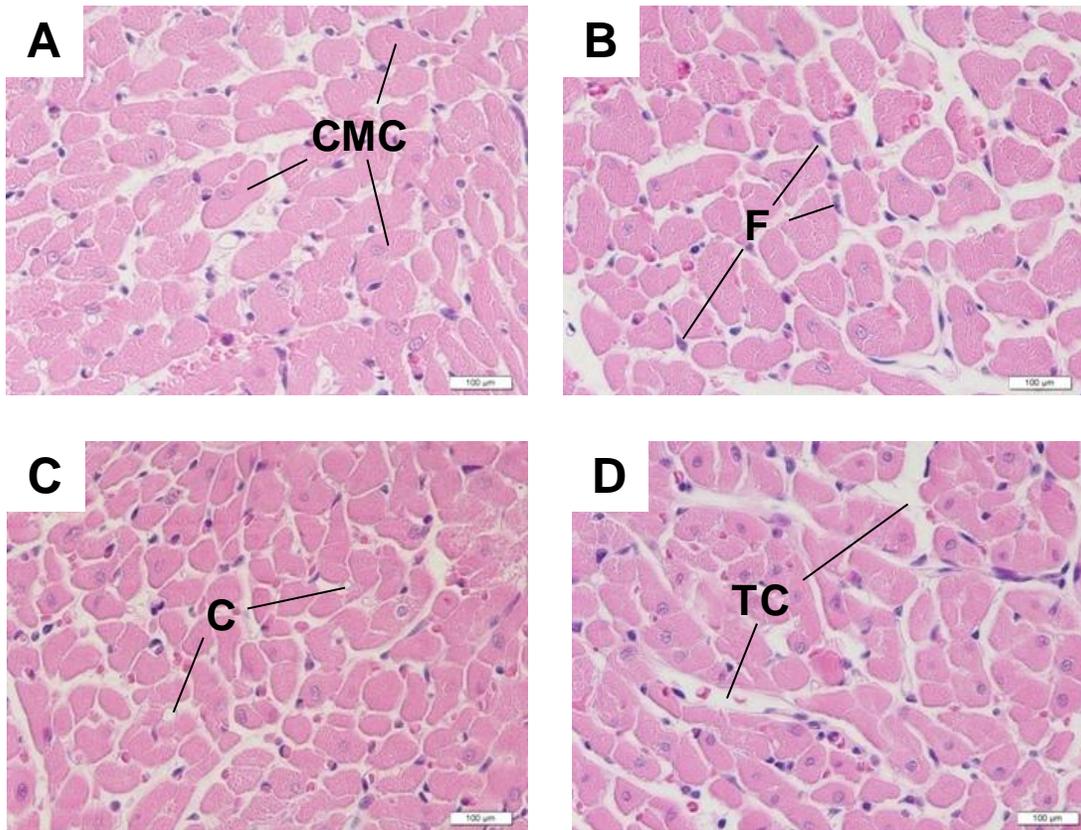


Fig. 4S Micrografías representativas del miocardio de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). CMC, células musculares cardíacas; F, fibroblastos; C, capilares; TC, tejido conjuntivo. H&E, 400X.

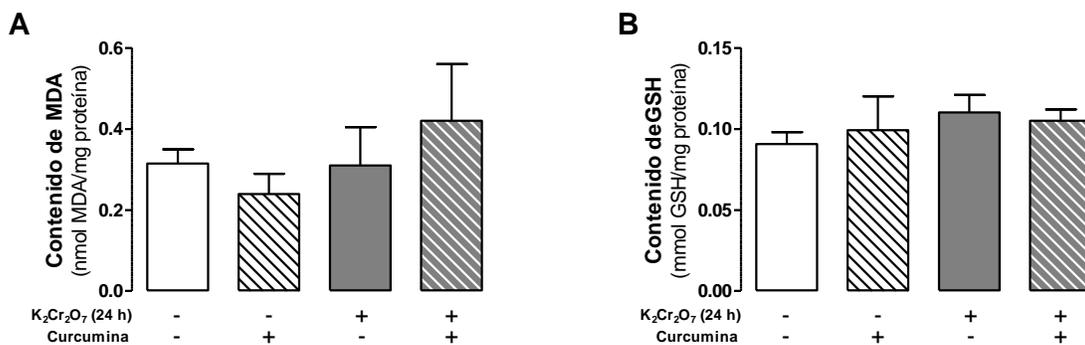


Fig. 5S Marcadores de estrés oxidante en corazón de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). Promedio \pm EEM. n=4-5.

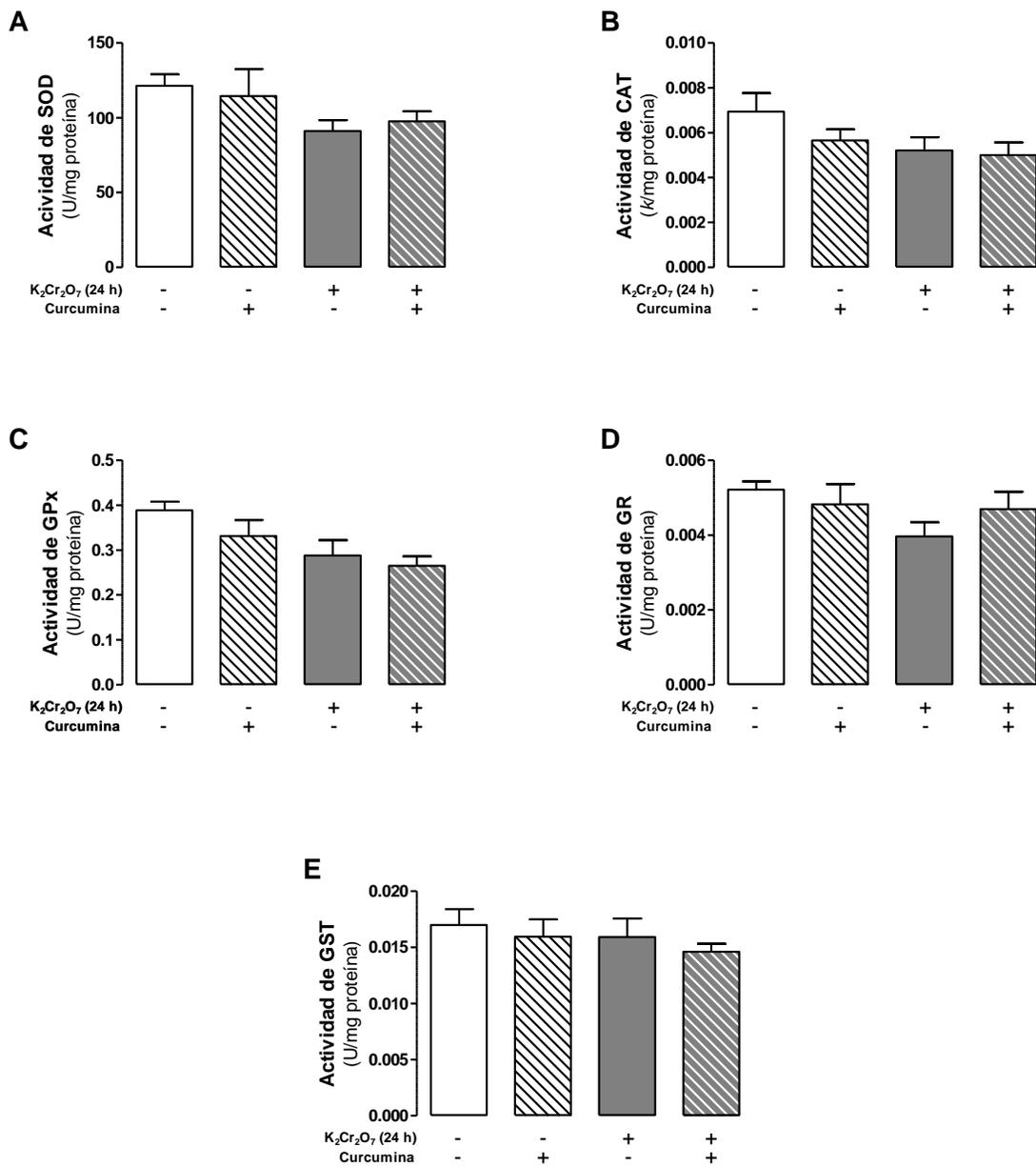


Fig. 6S Actividad de enzimas antioxidantes en corazón de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) K₂Cr₂O₇ (24 h); (D) curcumina + K₂Cr₂O₇ (24 h). Promedio ± EEM. n=4-5.

8.1.3. Pulmón

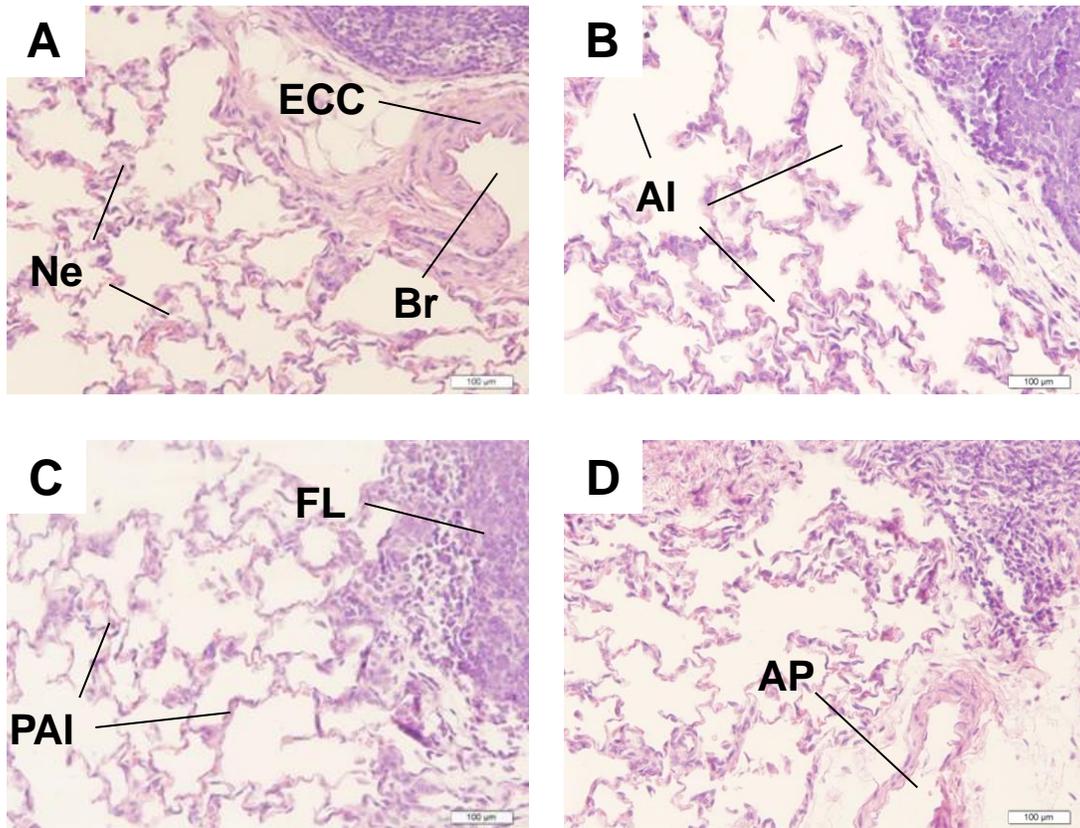


Fig. 7S Micrografías representativas del tejido pulmonar de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). Ne, neumocitos; Br, bronquiolo; ECC, epitelio con células calciformes; AI, alvéolos; FL, folículo linfático; PAI, pared alveolar; AP, arteria pulmonar. H&E, 200X.

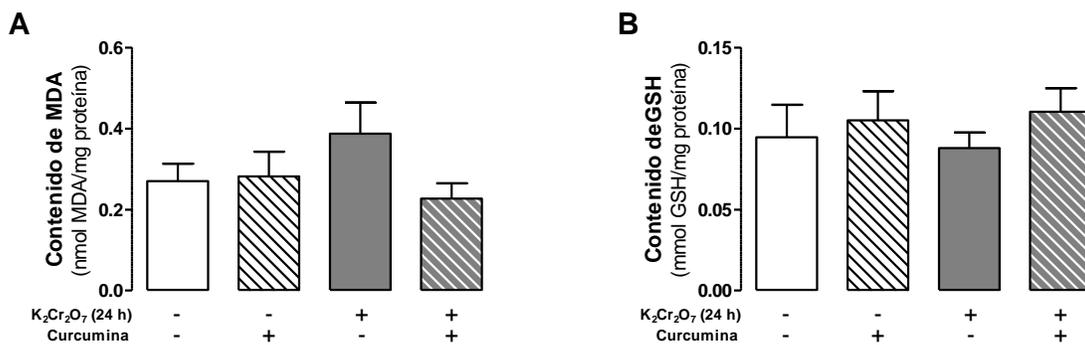


Fig. 8S Marcadores de estrés oxidante en pulmón de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). Promedio \pm EEM. n=4-5.

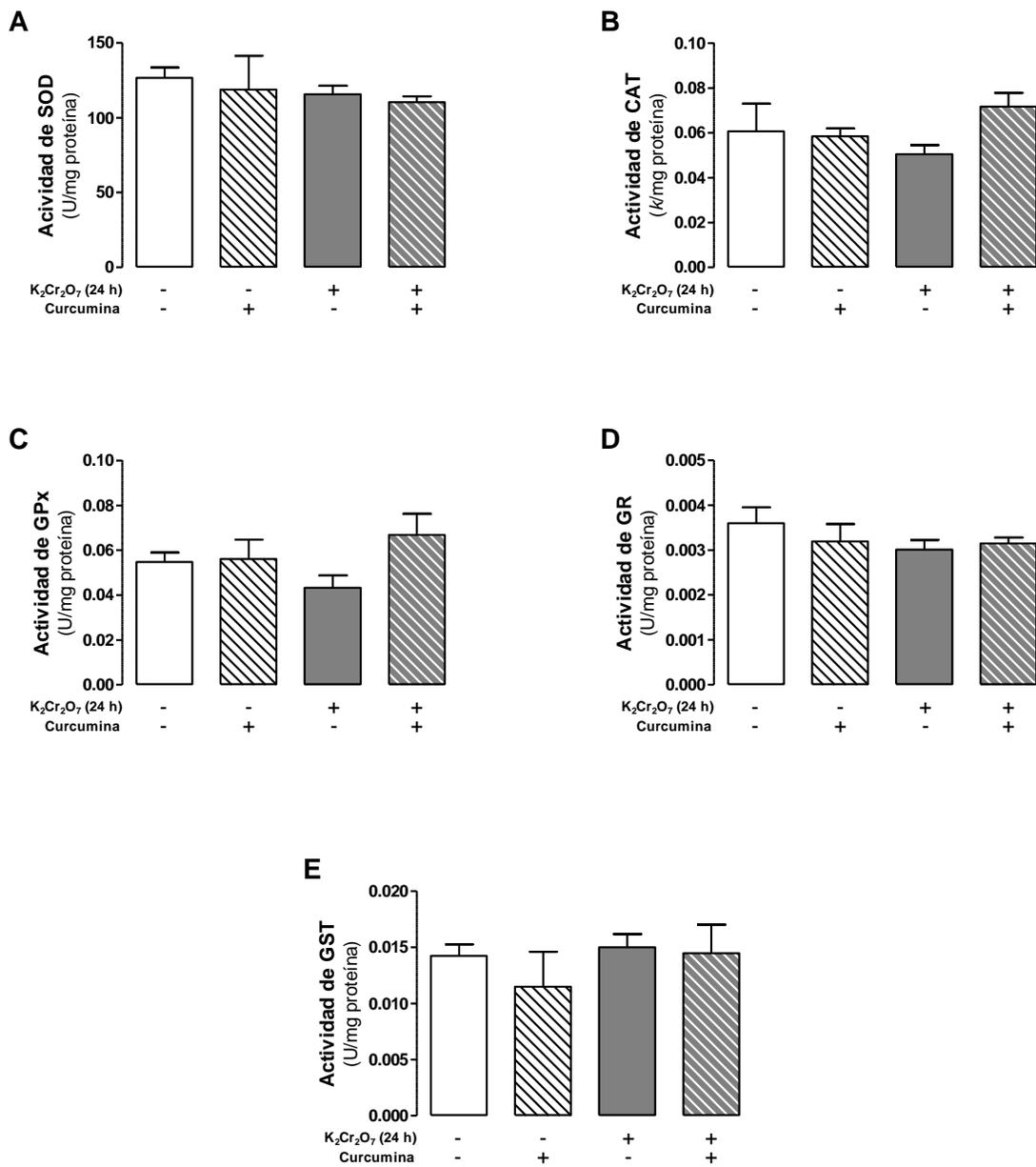


Fig. 9S Actividad de enzimas antioxidantes en pulmón de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) K₂Cr₂O₇ (24 h); (D) curcumina + K₂Cr₂O₇ (24 h). Promedio ± EEM. n=4-5.

8.1.4. Riñón

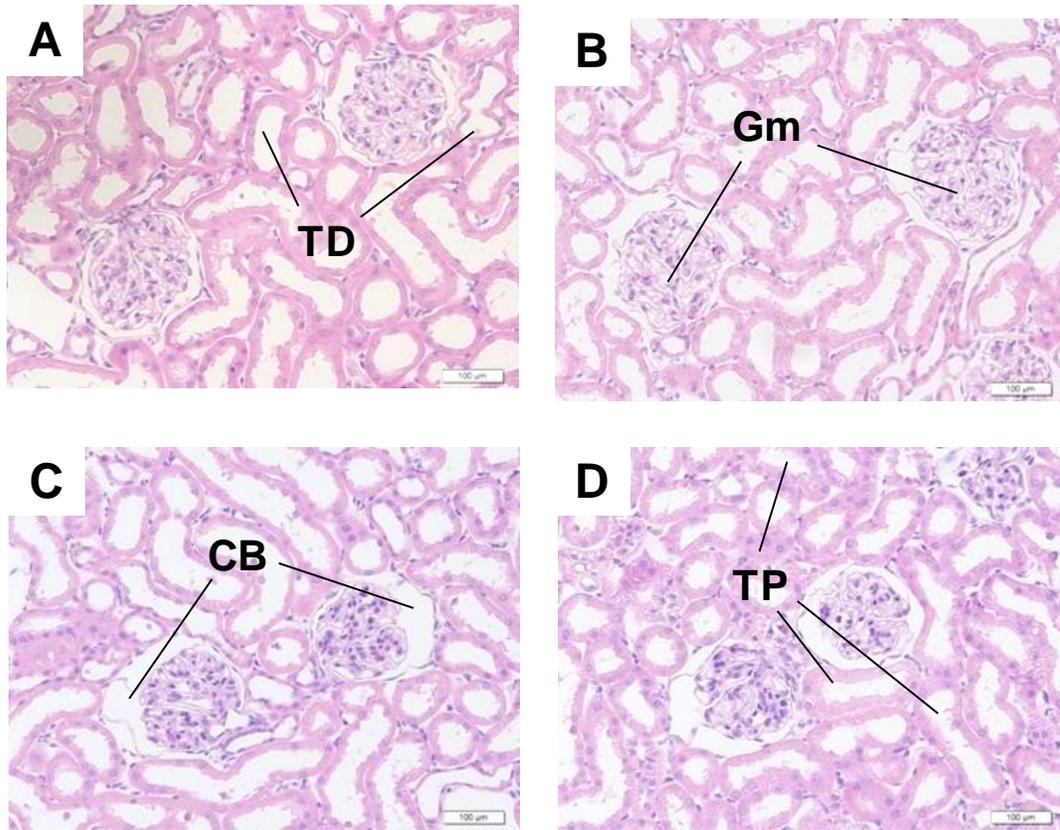


Fig. 10S Micrografías representativas de la corteza renal de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). TD, túbulos distales; Gm, glomérulos; CB, cápsula de Bowmann; TP, túbulos proximales. H&E, 400X.

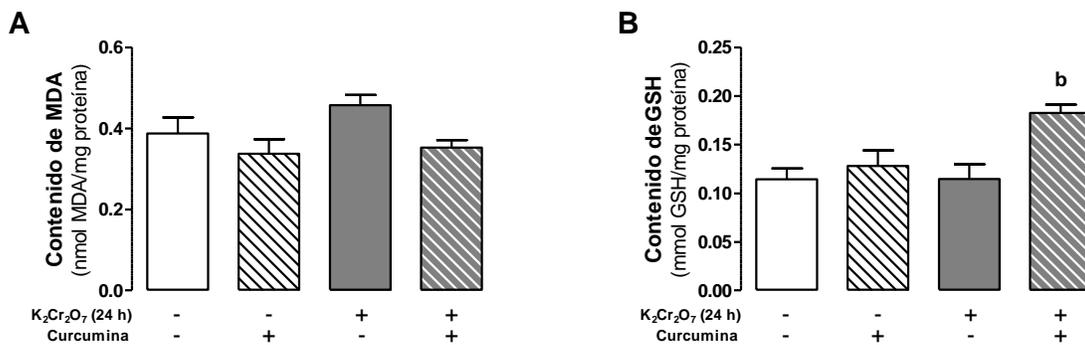


Fig. 11S Marcadores de estrés oxidante en riñón de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). Promedio \pm EEM. $n=4-5$. ^b $p < 0.05$ vs. $K_2Cr_2O_7$ (48 h).

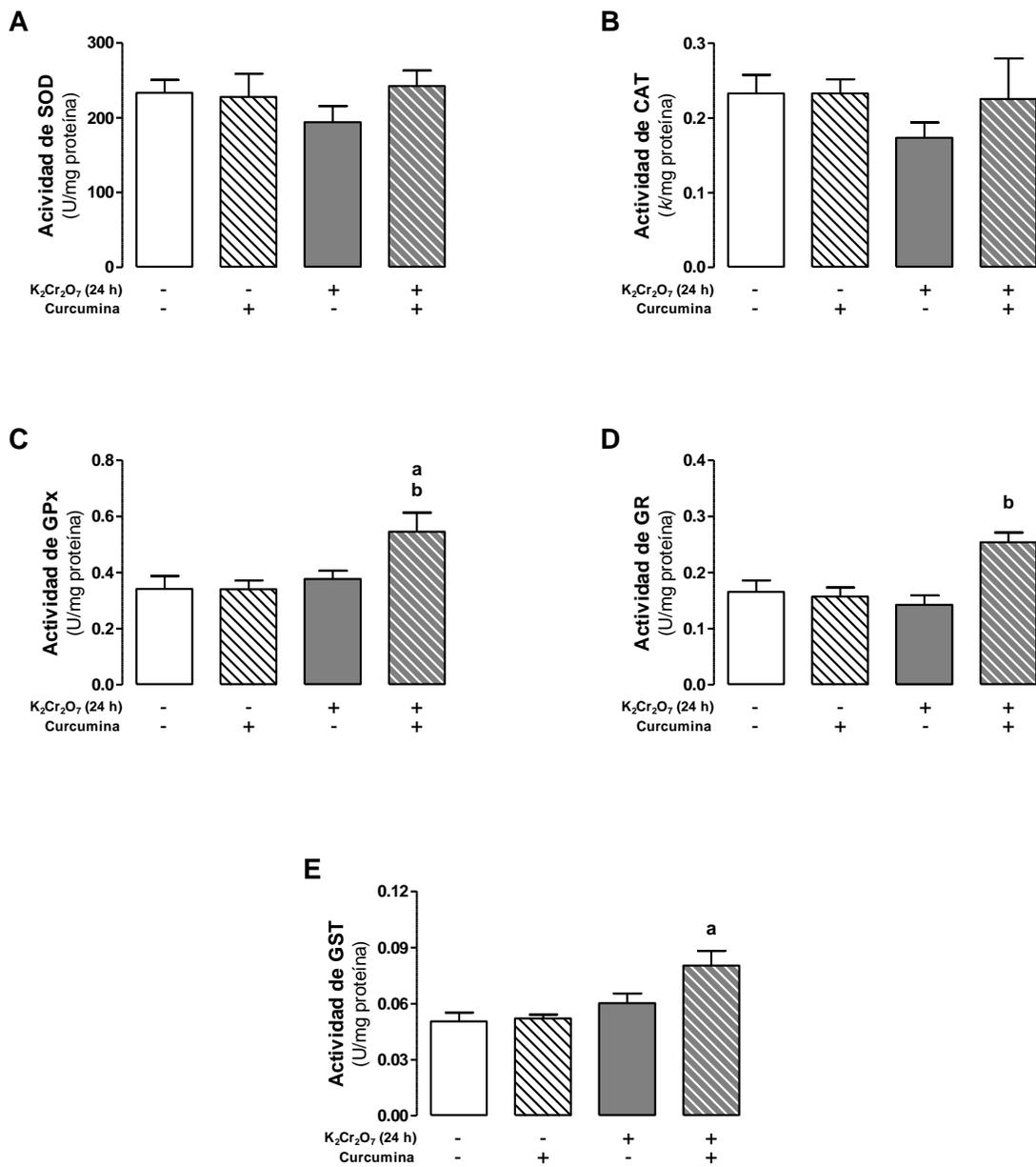


Fig. 12S Actividad de enzimas antioxidantes en riñón de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) K₂Cr₂O₇ (24 h); (D) curcumina + K₂Cr₂O₇ (24 h). Promedio ± EEM. n=4-5. ^ap<0.05 vs. control; ^bp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇ (24 h).

8.1.5. Estómago

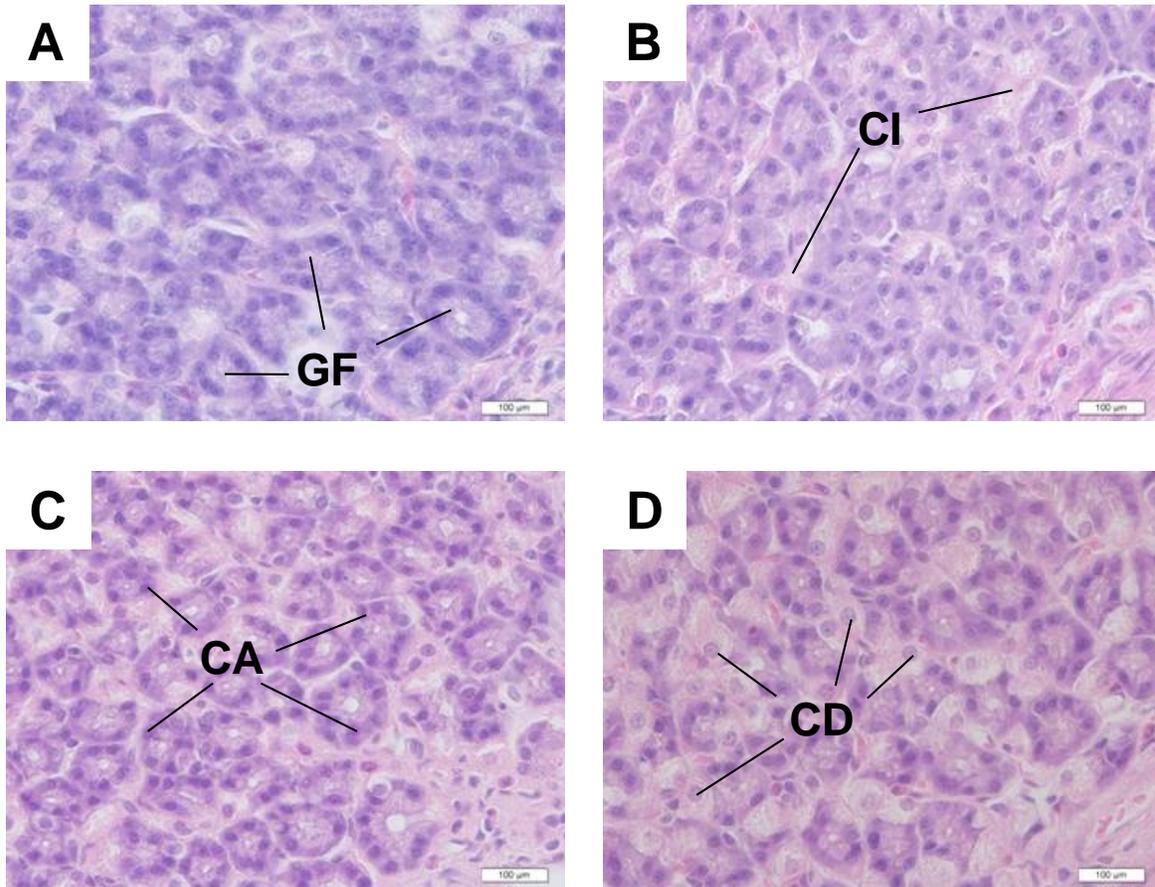


Fig. 13S Micrografías representativas de la túnica mucosa del estómago de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). GF, glándulas fúndicas; CI, corion interglandular; CA, células adelomorfas o principales; CD, células delomorfas o accesorias. H&E, 400X.

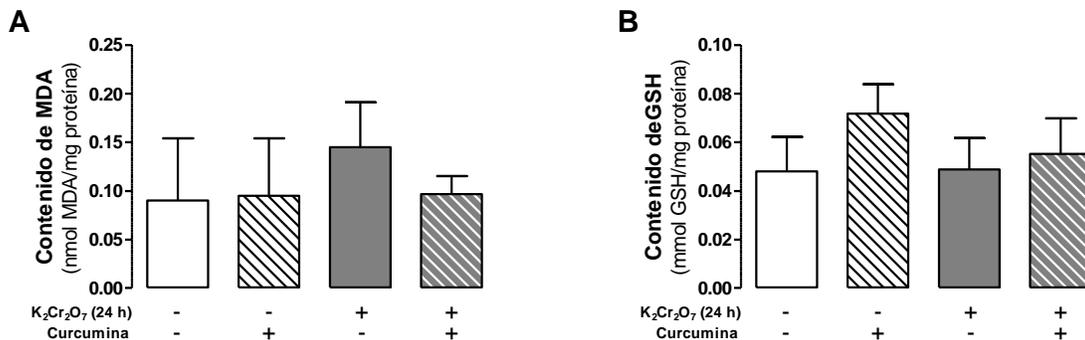


Fig. 14S Marcadores de estrés oxidante en estómago de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). Promedio \pm EEM. n=4-5.

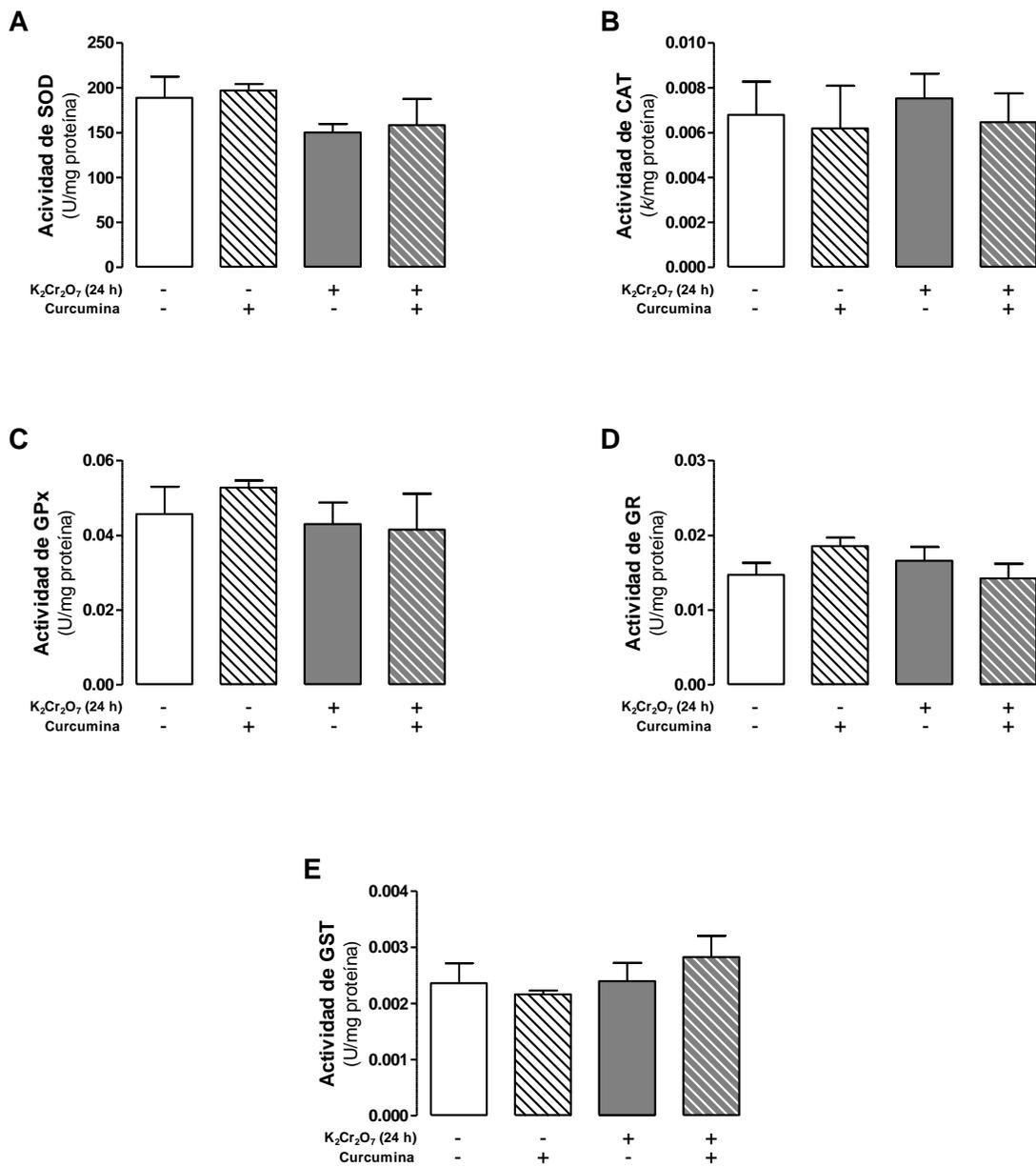


Fig. 15S Actividad de enzimas antioxidantes en estómago de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) K₂Cr₂O₇ (24 h); (D) curcumina + K₂Cr₂O₇ (24 h). Promedio ± EEM. n=4-5.

8.1.6. Intestino

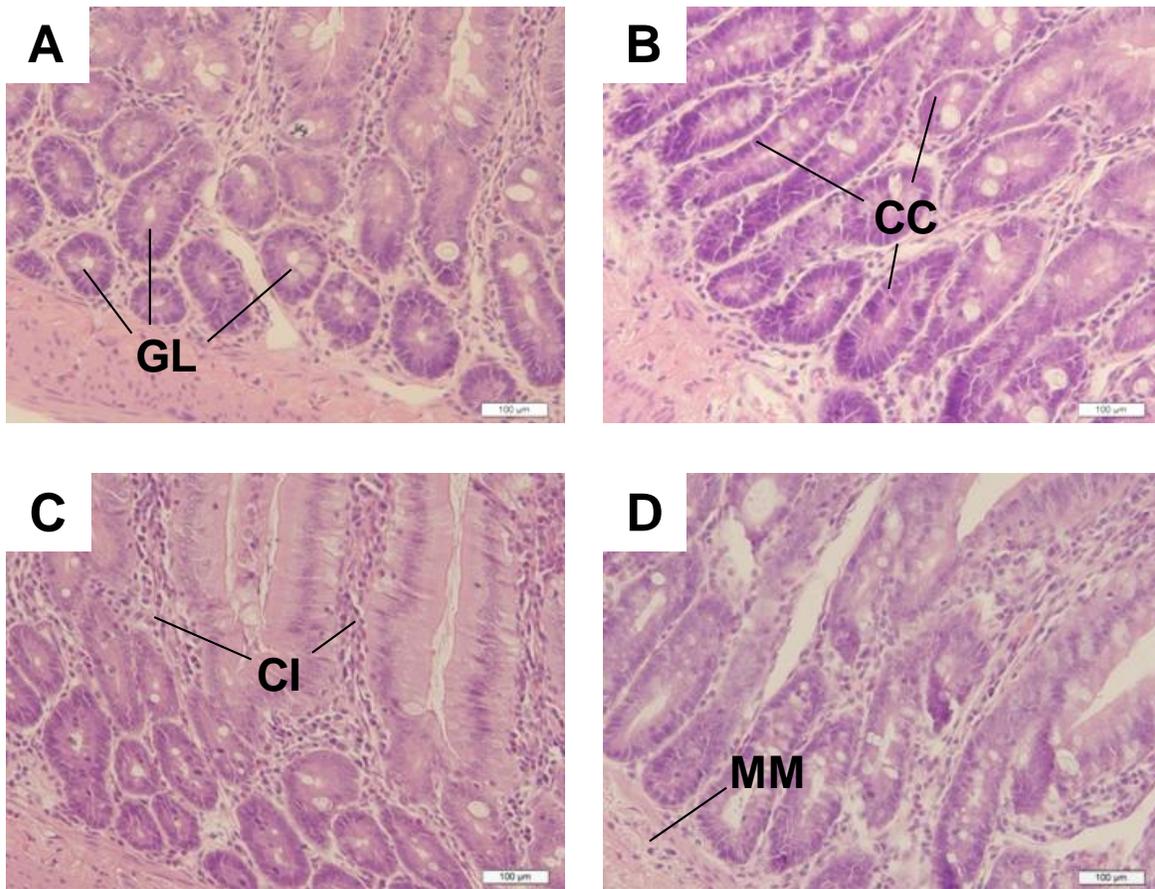


Fig. 16S Micrografías representativas de la mucosa intestinal de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). GL, glándulas de Lieberkühn; CC, células caliciformes; CI, corion interglandular; MM, tejido muscular de la mucosa. H&E, 400X.

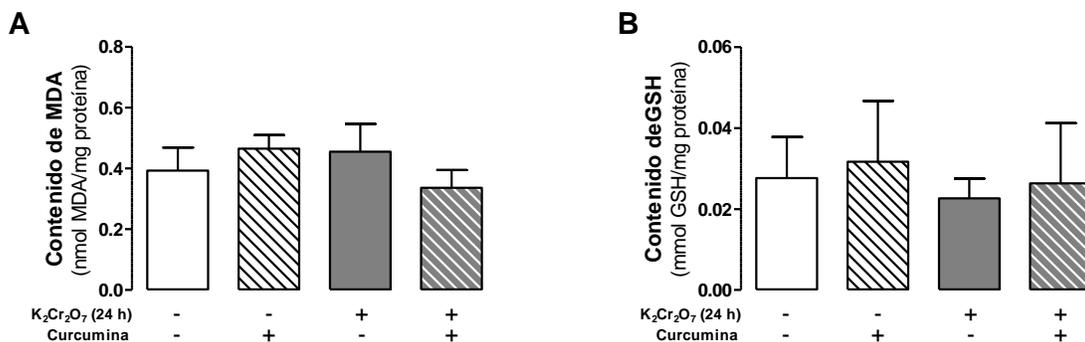


Fig. 17S Marcadores de estrés oxidante en intestino de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). Promedio \pm EEM. n=4-5.

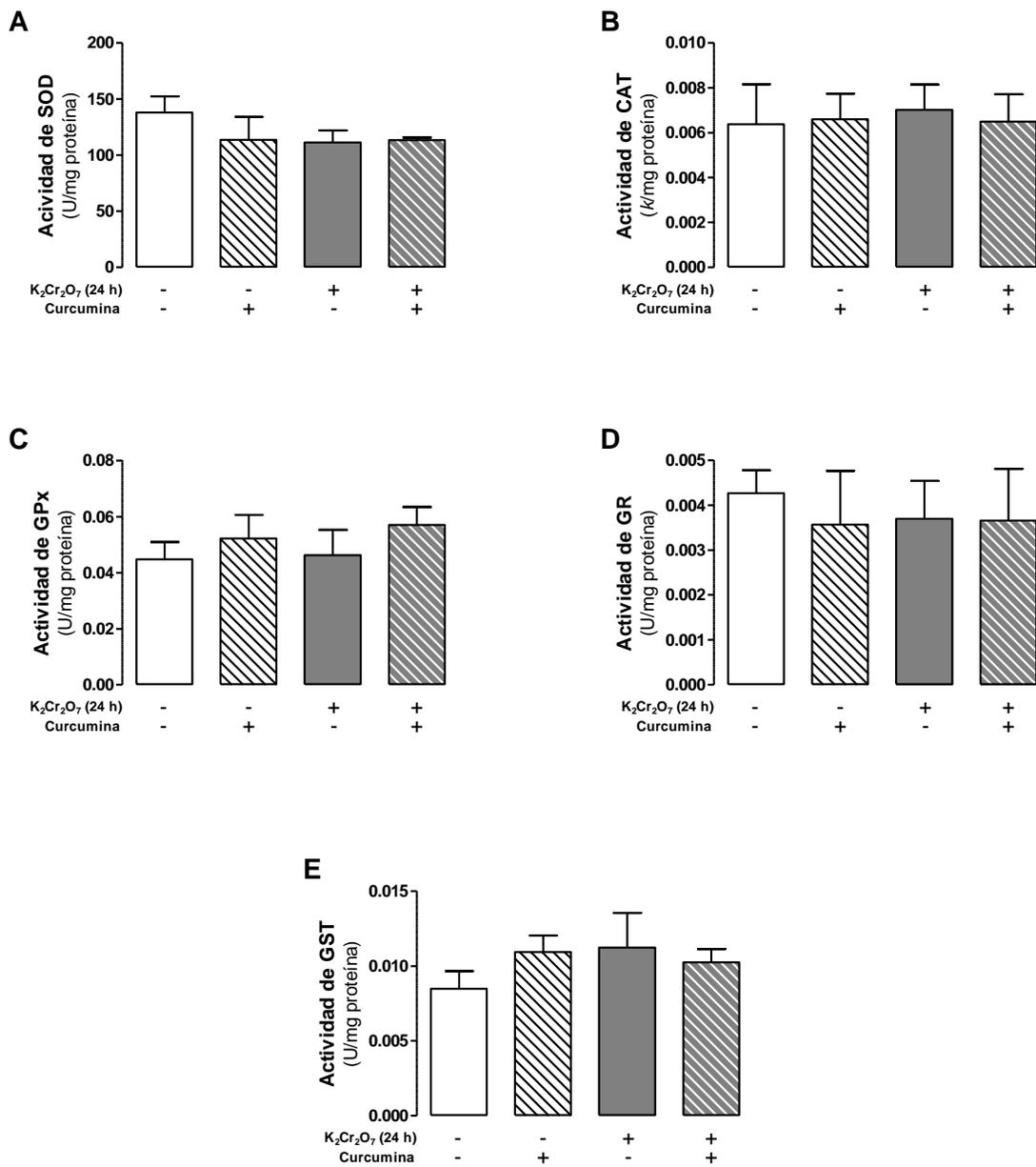


Fig. 18S Actividad de enzimas antioxidantes en intestino de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) K₂Cr₂O₇ (24 h); (D) curcumina + K₂Cr₂O₇ (24 h). Promedio ± EEM. n=4-5.

8.1.7. Bazo

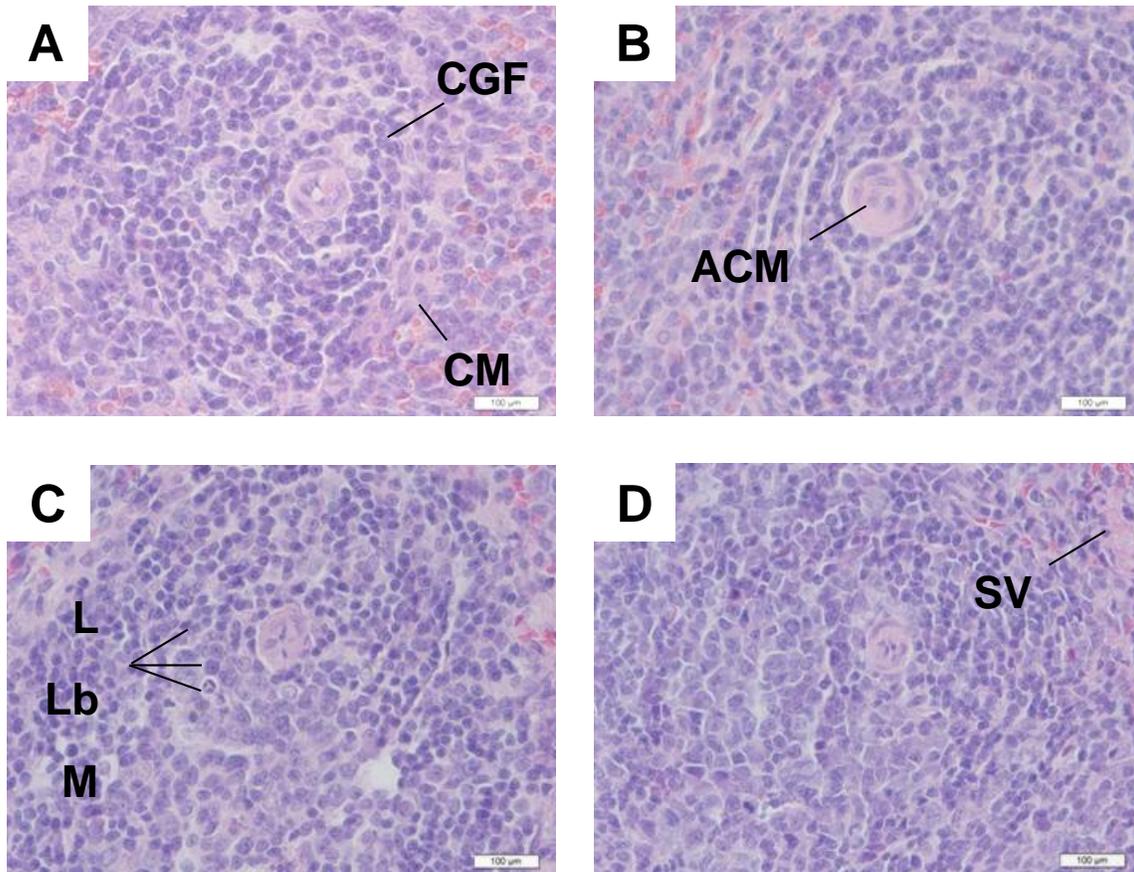


Fig. 19S Micrografías representativas del bazo de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). CM, corpúsculo de Malpighi (pulpa blanca); ACM, arteriola del corpúsculo de Malpighi; Lb, linfoblastos; L, linfocitos; M, macrófagos; SV, senos venosos (pulpa roja). H&E, 400X.

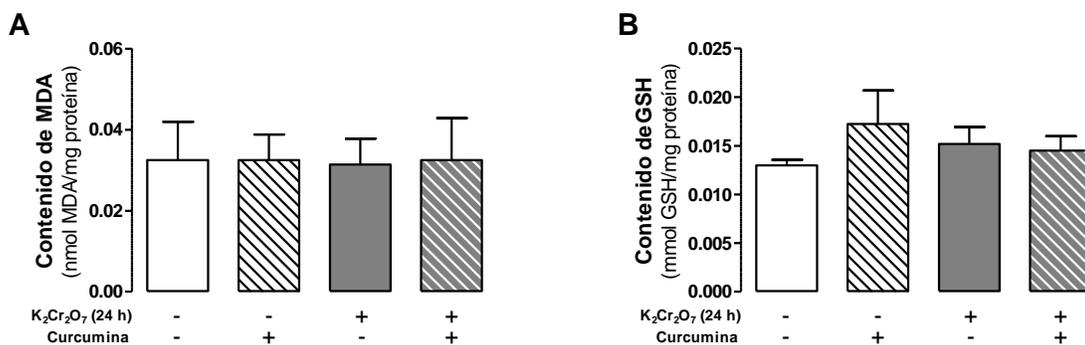


Fig. 20S Marcadores de estrés oxidante en bazo de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). Promedio \pm EEM. n=4-5.

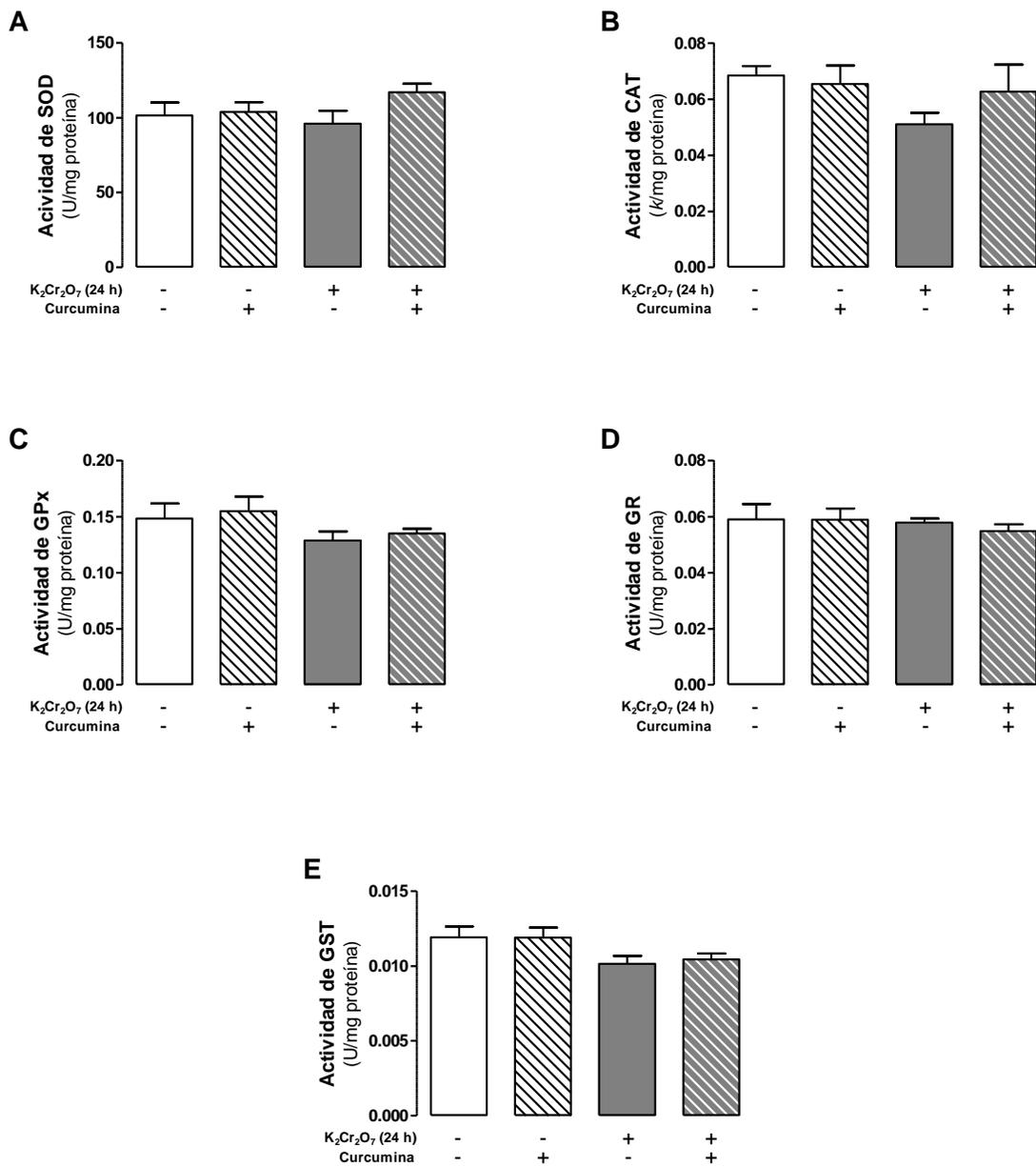


Fig. 21S Actividad de enzimas antioxidantes en bazo de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) K₂Cr₂O₇ (24 h); (D) curcumina + K₂Cr₂O₇ (24 h). Promedio ± EEM. n=4-5.

8.1.8. Páncreas

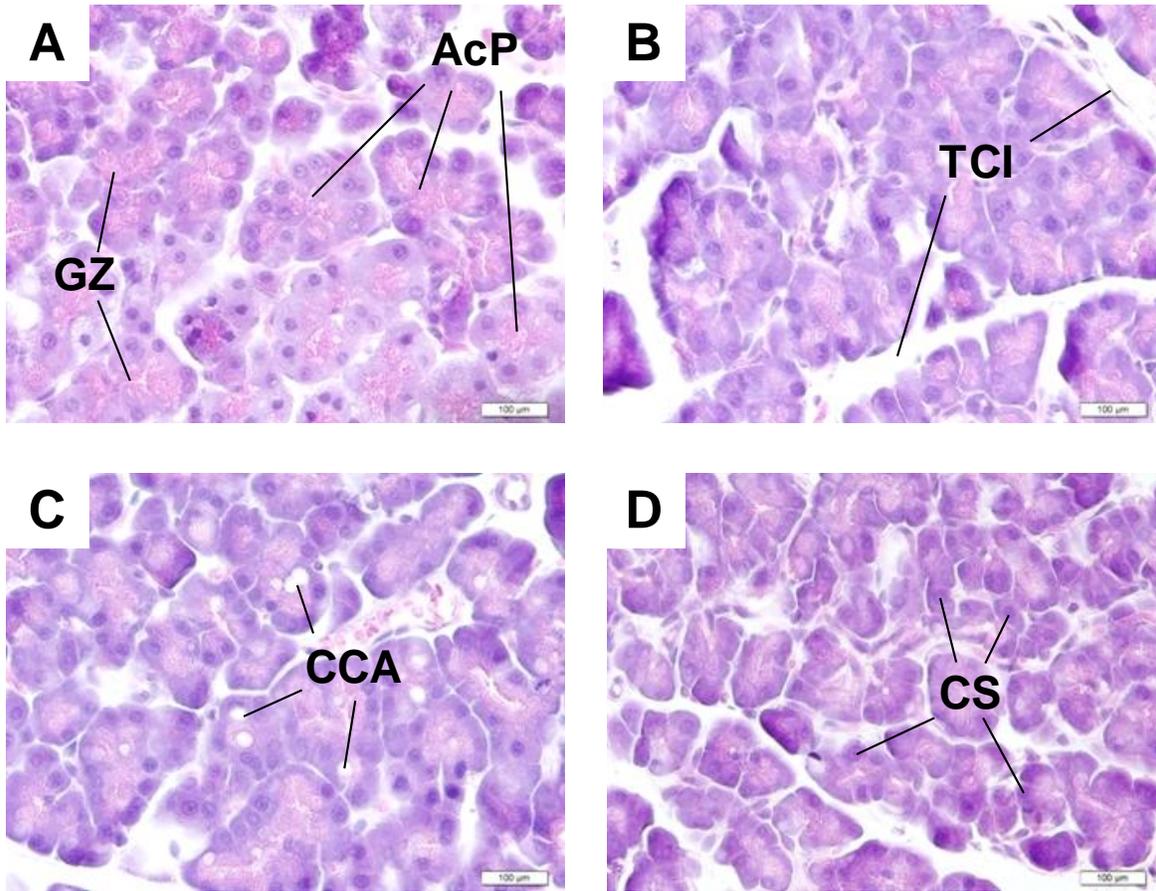


Fig. 22S Micrografías representativas de los acinos pancreáticos de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). AcP, acinos pancreáticos; GZ, gránulos de zimógeno; TCI, tejido conectivo interlobulillar; CCA, células centroacinares; CS, células secretoras. H&E, 400X.

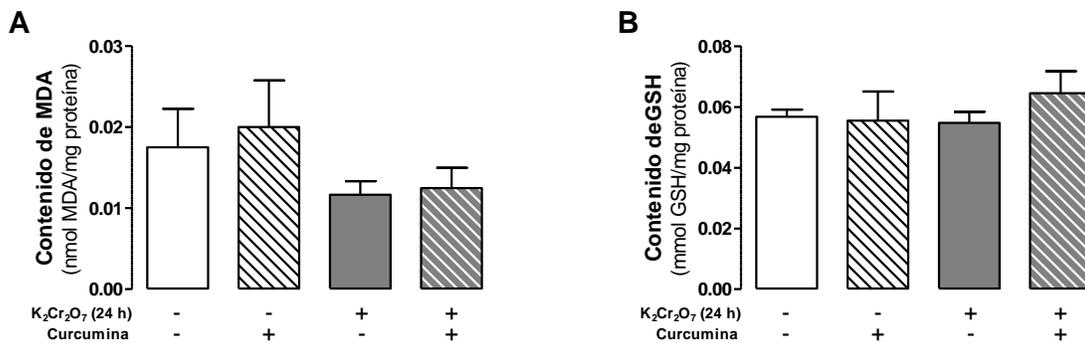


Fig. 23S Marcadores de estrés oxidante en páncreas de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) $K_2Cr_2O_7$ (24 h); (D) curcumina + $K_2Cr_2O_7$ (24 h). Promedio \pm EEM. n=4-5.

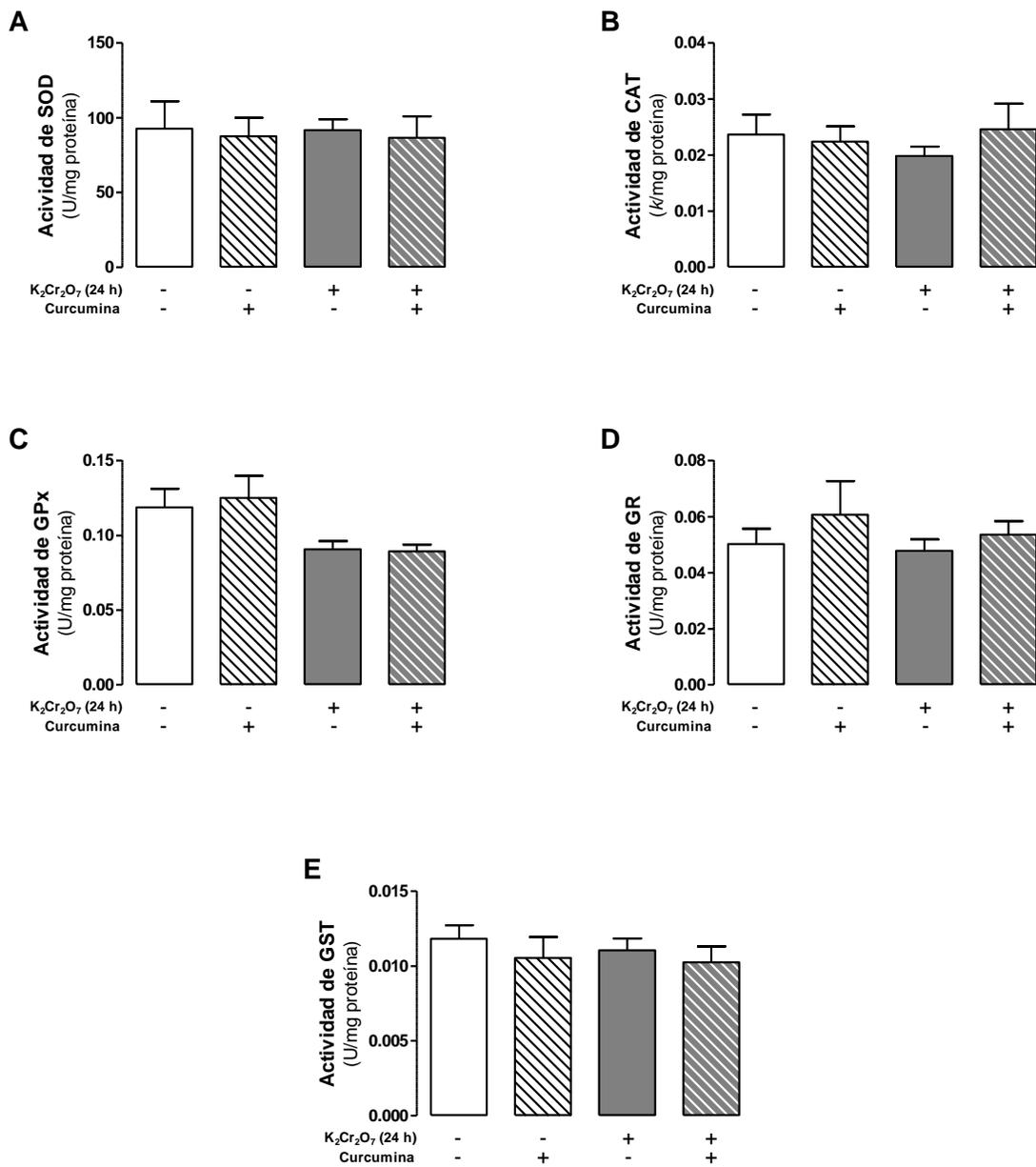


Fig. 24S Actividad de enzimas antioxidantes en páncreas de los grupos estudiados. (A) control; (B) curcumina; (C) K₂Cr₂O₇ (24 h); (D) curcumina + K₂Cr₂O₇ (24 h). Promedio ± EEM. n=4-5.

8.2. Artículos derivados del proyecto de tesis de Doctorado

Hindawi Publishing Corporation
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2013, Article ID 424692, 19 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/424692>

Research Article

Curcumin Pretreatment Prevents Potassium Dichromate-Induced Hepatotoxicity, Oxidative Stress, Decreased Respiratory Complex I Activity, and Membrane Permeability Transition Pore Opening

Willy Ramsés García-Niño,¹ Edilia Tapia,² Cecilia Zazueta,³
Zyanya Lucía Zatarain-Barrón,⁴ Rogelio Hernández-Pando,⁴
Claudia Cecilia Vega-García,⁵ and José Pedraza-Chaverri¹

¹ Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM), University City, 04510 Mexico City, DF, Mexico

² Renal Pathophysiology Laboratory, Department of Nephrology, National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez", 14080 Mexico City, DF, Mexico

³ Department of Cardiovascular Biomedicine, National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez", 14080 Mexico City, DF, Mexico

⁴ Experimental Pathology Section, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", 14060 Mexico City, DF, Mexico

⁵ Department of Preclinical Toxicology, National Polytechnic Institute, 14740 Mexico City, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Edilia Tapia; ediliatapia@hotmail.com and José Pedraza-Chaverri; pedraza@unam.mx

Received 18 March 2013; Revised 7 June 2013; Accepted 16 June 2013

Academic Editor: Shrikant Anant

Copyright © 2013 Willy Ramsés García-Niño et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Curcumin is a polyphenol derived from turmeric with recognized antioxidant properties. Hexavalent chromium is an environmental toxic and carcinogen compound that induces oxidative stress. The objective of this study was to evaluate the potential protective effect of curcumin on the hepatic damage generated by potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) in rats. Animals were pretreated daily by 9–10 days with curcumin (100 mg/kg b.w.) before the injection of a single intraperitoneal of $K_2Cr_2O_7$ (15 mg/kg b.w.). Groups of animals were sacrificed 24 and 48 h later. $K_2Cr_2O_7$ -induced damage to the liver was evident by histological alterations and increase in the liver weight and in the activity of alanine amino transferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, and alkaline phosphatase in plasma. In addition, $K_2Cr_2O_7$ induced oxidative damage in liver and isolated mitochondria, which was evident by the increase in the content of malondialdehyde and protein carbonyl and decrease in the glutathione content and in the activity of several antioxidant enzymes. Moreover, $K_2Cr_2O_7$ induced decrease in mitochondrial oxygen consumption, in the activity of respiratory complex I, and permeability transition pore opening. All the above-mentioned alterations were prevented by curcumin pretreatment. The beneficial effects of curcumin against $K_2Cr_2O_7$ -induced liver oxidative damage were associated with prevention of mitochondrial dysfunction.

1. Introduction

Curcumin or diferuloylmetane (1,7-bis[4-hydroxy-3-methoxyphenyl]-1,6-heptadiene-3,5-dione) is a hydrophobic polyphenol derived from turmeric: the rhizome of the herb *Curcuma longa* [1]. Traditionally, turmeric has been used

in therapeutic preparations for various ailments in different parts of the world [2]. At present, turmeric is used as a dietary spice, by the food industry as additive, flavouring, preservative and as colouring agent in foods and textiles [3, 4]. Curcumin is a major component of turmeric and it

8.3. Artículos derivados de colaboraciones durante el proyecto de Doctorado

Hindawi Publishing Corporation
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2012, Article ID 269039, 14 pages
doi:10.1155/2012/269039

Research Article

Curcumin Induces Nrf2 Nuclear Translocation and Prevents Glomerular Hypertension, Hyperfiltration, Oxidant Stress, and the Decrease in Antioxidant Enzymes in 5/6 Nephrectomized Rats

Edilia Tapia,¹ Virgilia Soto,² Karla Mariana Ortiz-Vega,¹
Guillermo Zarco-Márquez,³ Eduardo Molina-Jijón,³ Magdalena Cristóbal-García,¹
José Santamaría,¹ Wylly Ramsés García-Niño,³ Francisco Correa,⁴
Cecilia Zazueta,⁴ and José Pedraza-Chaverri³

¹Renal Pathophysiology Laboratory, Department of Nephrology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, 14080 Mexico City, DF, Mexico

²Department of Pathology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, 14080 Mexico City, DF, Mexico

³Department of Biology, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 04510 Mexico City, DF, Mexico

⁴Department of Biochemistry, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, 14080 Mexico City, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Edilia Tapia, ediliatapia@hotmail.com

Received 4 May 2012; Accepted 4 June 2012

Academic Editor: Felipe Dal-Pizzol

Copyright © 2012 Edilia Tapia et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Renal injury resulting from renal ablation induced by 5/6 nephrectomy (5/6NX) is associated with oxidant stress, glomerular hypertension, hyperfiltration, and impaired Nrf2-Kap1 pathway. The purpose of this work was to know if the bifunctional antioxidant curcumin may induce nuclear translocation of Nrf2 and prevents 5/6NX-induced oxidant stress, renal injury, decrease in antioxidant enzymes, and glomerular hypertension and hyperfiltration. Four groups of rats were studied: (1) control, (2) 5/6NX, (3) 5/6NX+CUR, and (4) CUR ($n = 8-10$). Curcumin was given by gavage to NX5/6+CUR and CUR groups (50 mg/kg/day) starting seven days before surgery. Rats were studied 30 days after NX5/6 or sham surgery. Curcumin attenuated 5/6NX-induced proteinuria, systemic and glomerular hypertension, hyperfiltration, glomerular sclerosis, interstitial fibrosis, interstitial inflammation, and increase in plasma creatinine and blood urea nitrogen. This protective effect was associated with enhanced nuclear translocation of Nrf2 and with prevention of 5/6NX-induced oxidant stress and decrease in the activity of antioxidant enzymes. It is concluded that the protective effect of curcumin against 5/6NX-induced glomerular and systemic hypertension, hyperfiltration, renal dysfunction, and renal injury was associated with the nuclear translocation of Nrf2 and the prevention of both oxidant stress and the decrease of antioxidant enzymes.

1. Introduction

Curcumin is the major active component of turmeric, a yellow compound isolated from the plant *Curcuma longa* and has been used for centuries in traditional medicines [1]. Extensive research over the past 30 years has indicated that this molecule has therapeutic potential against a wide range of diseases, such as cancer, lung diseases, renal diseases, neurological diseases, liver diseases, metabolic diseases, cardiovascular diseases, and various other inflammatory diseases [1–3]. Numerous lines of evidence indicate that

curcumin is highly pleiotropic with anti-inflammatory [4–6], hypoglycemic [7], antioxidant [8–11], wound healing [12] and antimicrobial activities [13]. Curcumin exerts both direct and indirect antioxidant effects by scavenging reactive oxygen species (ROS) [14, 15] and inducing the expression of cytoprotective proteins in an Nrf2-dependent way [16], respectively. It is considered a bifunctional antioxidant [17]. The nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 (Nrf2), is a cap "n" collar (CNC) basic region leucine zipper transcription protein and a ubiquitous master transcription factor which induces cytoprotective proteins through binding



Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease



Francisco Correa^{a,b,1}, Mabel Buelna-Chontal^{a,b,1}, Sauri Hernández-Reséndiz^b,
Wylly R. García-Niño^c, Francisco J. Roldán^d, Virgilia Soto^e,
Alejandro Silva-Palacios^a, Alejandra Amador^a, José Pedraza-Chaverri^f, Edilia Tapia^c,
Cecilia Zazueta^{a,b,g,h}

^a Department of Cardiovascular Biomedicine, National Institute of Cardiology Ignacio Chávez, Mexico City, 14080 DF, Mexico

^b Department of Biochemistry, National Institute of Cardiology Ignacio Chávez, Mexico City, 14080 DF, Mexico

^c Renal Pathophysiology Laboratory, Department of Nephrology, National Institute of Cardiology Ignacio Chávez, Mexico City, 14080 DF, Mexico

^d Department of Franciscology, National Institute of Cardiology Ignacio Chávez, Mexico City, 14080 DF, Mexico

^e Department of Pathology, National Institute of Cardiology Ignacio Chávez, Mexico City, 14080 DF, Mexico

^f Department of Biology, Faculty of Chemistry, UNAM, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 September 2012

Received in revised form

21 March 2013

Accepted 22 March 2013

Available online 30 March 2013

Keywords:

Curcumin

Cardiac dysfunction

Oxidative stress

Mitochondrial function

Electrophilic response element

Free radicals

Abstract Curcumin, a natural pigment with antioxidant activity obtained from turmeric and largely used in traditional medicine, is currently being studied in the chemoprevention of several diseases for its pleiotropic effects and nontoxicity. In chronic renal failure, the pathogenic mechanisms leading to cardiovascular disorders have been associated with increased oxidative stress, a process inevitably linked with mitochondrial dysfunction. Thus, in this study we aimed at investigating if curcumin pretreatment exerts cardioprotective effects in a rat model of subtotal nephrectomy (5/6Nx) and its impact on mitochondrial homeostasis. Curcumin was orally administered (120 mg/kg) to Wistar rats 7 days before nephrectomy and after surgery for 60 days (5/6Nx+cur). Renal dysfunction was detected a few days after nephrectomy, whereas changes in cardiac function were observed until the end of the protocol. Our results indicate that curcumin treatment protects against pathological remodeling, diminishes ischemic events, and preserves cardiac function in azotemic rats. Cardioprotection was related to diminished reactive oxygen species production, decreased oxidative stress markers, increased antioxidant response, and diminution of active metalloproteinase-2. We also observed that curcumin's cardioprotective effects were related to maintaining mitochondrial function. Acetylase activity was significantly higher in the 5/6Nx + cur (408.5 ± 68.7 nmol/min/mg protein) than in the 5/6Nx group (104.4 ± 52.3 nmol/min/mg protein, $P < 0.05$), and mitochondria from curcumin-treated rats showed enhanced oxidative phosphorylation capacities with both NADH-linked substrates and succinate plus rotenone (3.6 ± 1 vs. 1.1 ± 0.9 and 3.1 ± 0.7 vs. 1.2 ± 0.8, respectively, $P < 0.05$). The mechanisms involved in cardioprotection included both direct antioxidant effects and indirect strategies that could be related to protein kinase C-activated downstream signaling.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Chronic renal failure (CRF) is associated with a high incidence of cardiovascular complications. In fact, CRF diagnosis is so clinically relevant that it places the patient into the highest cardiovascular risk level, irrespective of stratification, according to traditional cardiovascular risk factors [1]. Strikingly, the high

mortality in CRF patients is mainly due to cardiovascular events, rather than to advanced kidney dysfunction, and may occur even before the need for renal replacement therapy [2]. In CRF patients, it has been suggested that the high prevalence of acute-phase inflammation and oxidative stress could account for the high rate of cardiovascular morbidity and mortality [3].

A fundamental response to intrinsic and biomechanical stress in CRF is cardiomyocyte and chamber hypertrophy, which at first stages may be successfully compensatory, but inevitably will progress to dilation and heart failure. In this sense, the observation that over-expression of the intrinsic antioxidant enzyme glutathione peroxidase ameliorates post-myocardial infarction remodeling [4] supports the relationship between oxidative stress and

* Corresponding author at: National Institute of Cardiology I.C.I., Department of Cardiovascular Biomedicine, Juan Rodolfo No. 1, Colonia Sección XVI, 14080 D.F. MEXICO, Mexico. (fax: +52 5555772891).

E-mail address: azazueta@yahoodom.com (C. Zazueta).

¹ These authors contributed equally to this work.