



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE CURCUMINA SOBRE LA
NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR MALEATO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTAN

**ALVARO CERECEDO MARÍN
ESTEFANÍA GARCIA CONTRERAS**



MÉXICO, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ**
VOCAL: **Profesor: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**
SECRETARIO: **Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA**
1er. SUPLENTE: **Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ**
2° SUPLENTE: **Profesor: LAURA CARMONA SALAZAR**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE FISIOPATOLOGÍA RENAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ” CON APOYO DE LOS PROYECTOS: DGAPA PAPIIT CLAVE No. IN210713, CONACYT CLAVES No. 220046 Y No. 167949

ASESOR DEL TEMA:

DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. EDILIA TAPIA RODRÍGUEZ

SUSTENTANTES:

ALVARO CERECEDO MARÍN

ESTEFANÍA GARCÍA CONTRERAS

Índice

	Página
Abreviaturas	6
Resumen	8
1. Introducción	9
1.1 Insuficiencia renal aguda	10
1.1.1 IRA pre-renal	10
1.1.2 IRA Intrarrenal	10
1.1.3 IRA post-renal	10
1.2 Síndrome de Fanconi	10
1.2.1 Síndrome de Fanconi hereditario	11
1.2.2 Síndrome de Fanconi adquirido	11
1.3 Maleato como inductor de síndrome de Fanconi	11
1.4 Estrés oxidante e insuficiencia renal aguda	14
1.4.1 Radicales libres y especies reactivas de oxígeno	14
1.4.2 Estrés oxidante	15
1.5 Sistemas antioxidantes	16
1.5.1 Antioxidantes enzimáticos	17
1.5.2 Compuestos antioxidantes no enzimáticos	17
1.6. Curcumina	19
2. Justificación	22
3. Hipótesis	22
4. Objetivos	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos particulares	22
5. Material y métodos	23
5.1 Diseño experimental	24
5.2 Obtención de muestras (riñón, plasma y orina)	25
5.3 Medición de la presión arterial media y flujo sanguíneo renal	25
5.4 Medición de la tasa de filtración glomerular	26
5.5 Excreción urinaria de sodio	28
5.6 Excreción urinaria de proteínas	28
5.7 Determinación de creatinina	30
5.8 Excreción urinaria de glucosa	30
5.9 Osmolalidad urinaria	31
5.10 Determinación de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG)	32
5.11 Histología renal	33
5.12 Determinación de Lipocaína asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL)	33
5.13 Marcadores de estrés oxidante en corteza renal	35
5.13.1 Malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE)	36
5.13.2 Proteínas oxidadas	36
5.14 Bifuncionalidad de la curcumina: Actividad enzimática y activación del factor de transcripción Nrf2	37
5.14.1 Actividad de la SOD	37
5.14.2 Cuantificación del factor transcripcional Nrf2	38

5.15 Análisis estadístico	39
6. Resultados	39
6.1 Presión arterial media, flujo sanguíneo renal y resistencia vascular renal	39
6.2 Tasa de filtración glomerular y fracción de filtración	41
6.3 Excreción urinaria de sodio	42
6.4 Excreción urinaria de proteínas	43
6.5 Excreción urinaria de glucosa	44
6.6 Osmolalidad urinaria	44
6.7 NAG	45
6.8 Histología Renal	46
6.9 NGAL	47
6.10 Marcadores de estrés oxidante	48
6.10.1 MDA	49
6.10.2 4-HNE	49
6.10.3 Proteínas oxidadas	50
6.11 Actividad de SOD y niveles de factor de transcripción Nrf2	50
6.11.1 Actividad de la SOD	51
6.11.2 Niveles de factor de transcripción Nrf2	52
7. Discusión de resultados	52
8. Conclusión	58
9. Perspectivas	58
10. Referencias	59

Abreviaturas

1M-2F	N-metil-2-fenilindol
4-HNE	4-hidroxinonenal
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ATP	Adenosintrifosfato
BHT	Butilhidroxitolueno
BSA	Albúmina sérica bovina
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
CAT	Catalasa
CMC	Carboximetilcelulosa
CoA	Coenzima A
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA o ADN	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EtOH	Etanol
FF	Fracción de filtración
G-6-PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GFR	Tasa de filtración glomerular
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S-transferasa
H&E	Hematoxilina y eosina
HO-1	Hemooxigenasa 1
HRP	Peroxidasa de rábano
i.p.	Intraperitoneal
INCICH	Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”
IR	Insuficiencia renal
IRA	Insuficiencia renal aguda
Keap1	Kelch-like-ECH-associated protein-1
KIM-1	Molécula de daño renal 1
Mal+Cur	Maleato + curcumina
MAP	Presión arterial media
MDA	Malondialdehído
MR	Mezcla de reacción
NADH	Nicotinamida adenina Dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAG	N-acetil- β -D-glucosaminidasa
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NF- κ B	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B

	activadas
NGAL	Lipocaína asociada a gelatinasa de neutrófilo
NOM	Norma oficial mexicana
NQO1	Quinoneoxidoreductasa-1
Nrf2	Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45
OATs	Transportadores de aniones orgánicos
PBS	Amortiguador de fosfatos
PE	Polietileno
PUFAs	Ácidos lipídicos poliinsaturados
PVDF	Fluoruro de polivinilo
RBF	Flujo sanguíneo renal
REM	Emisión de radiación electromagnética
RL	Radicales libres
RNA o ARN	Ácido ribonucleico
RVR	Resistencia vascular renal
SCOTasa	Succinil-CoA:3 cetoácido –CoA transferasa
SF	Síndrome de Fanconi
SOD	Superóxido dismutasa
SSI	Solución salina isotónica
TBS	Amortiguador salino tris
TCA	Ácido tricloroacético
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
TMPO	1,1-3,3 tetrametoxipropano
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TTBS	Tween-amortiguador salino TRIS
Tx	Tratamiento
U	Unidad enzimática
UA	Unidades arbitrarias
UNa	Excreción urinaria de sodio
Uprot	Excreción urinaria de proteínas
XO	Xantina oxidasa

Resumen

La insuficiencia renal aguda (IRA) es una enfermedad caracterizada por una disminución abrupta de la función renal debido a diversos factores que afectan la homeostasis de líquidos y electrolitos y la eliminación de productos terminales del metabolismo. En la actualidad diversos informes hospitalarios describen un incremento en la incidencia de este padecimiento, principalmente debido al estilo de vida sedentario, una dieta poco saludable así como al consumo o exposición a agentes tóxicos. Por eso es importante determinar nuevos enfoques de acercamiento al tratamiento y prevención de la IRA. Lo anterior apoyándose en modelos experimentales como el uso de maleato como inductor de daño tubular, el cual está claramente asociado a la progresión de la IRA con el estrés oxidante. El objetivo de esta investigación es evaluar si la administración previa de un agente antioxidante como la curcumina protege del daño renal inducido por maleato, un modelo del Síndrome de Fanconi. En el presente trabajo se emplearon ratas macho de la cepa Wistar durante 6 días. Los animales se dividieron en 4 grupos (n=7/grupo): Grupo 1: Control, las ratas se administraron con el vehículo carboximetilcelulosa (CMC), Grupo 2: Maleato, las ratas se administraron con una sola dosis (400 mg/Kg) de ácido maleico, Grupo 3: Curcumina + ácido maleico, las ratas se administraron con suspensión de curcumina por 5 días antes de la inyección del ácido maleico y Grupo 4: Curcumina, las ratas se administraron intragástricamente con suspensión de curcumina en CMC (dosis de 120 mg/kg/día por 5 días). El daño inducido se determinó mediante la medición de parámetros hemodinámicos (flujo sanguíneo renal, resistencia renal vascular y fracción de filtración), indicadores de función renal (excreción urinaria de sodio, proteinuria, glucosuria), parámetros bioquímicos (malondialdehído, 4-hidroxinonenal y proteínas oxidadas). El tratamiento con curcumina disminuyó o normalizó significativamente los valores alterados por el maleato además de prevenir la disminución de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) y la expresión del factor de transcripción relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45 (Nrf2). En conclusión, la curcumina presentó un

efecto protector frente al daño renal inducido por maleato lo que se asoció con la prevención del daño oxidante.

“EFECTO DE CURCUMINA SOBRE LA NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR MALEATO”

1. Introducción

1.1. Insuficiencia renal aguda (IRA)

Una de las más importantes funciones del riñón es la homeostasis de fluidos y electrolitos, la regulación de la presión sanguínea y la filtración y excreción de productos de desecho del metabolismo que ya no son necesarios como la urea (del metabolismo de los aminoácidos), la creatinina (creatina muscular) y el ácido úrico (del metabolismo de los ácidos nucleicos) (Guyton y Hall, 2001). Los niveles elevados de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina sirven como indicadores de la disminución de la función renal, específicamente de la depuración de estos productos de desecho del metabolismo (Basile *et al.*, 2012a).

La IRA es un síndrome que se caracteriza por la disminución abrupta de la filtración glomerular que resulta en la incapacidad del riñón para excretar productos nitrogenados, concentrar la orina, conservar los electrolitos, y mantener el equilibrio de líquidos (Schrier *et al.*, 2004; Díaz de León, 2005).

Según el informe de egresos hospitalarios del Sistema Nacional de Salud, la IRA es una de las principales causas de atención hospitalaria, ocupa el 4° lugar en hombres y el 10° en mujeres, con una tasa de 110 casos por cada 100,000 habitantes. La mortalidad hospitalaria en población masculina representa el 10° lugar mientras que en mujeres ocupa el 8° lugar (Díaz de León, 2005; Lameire *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013).

Clínicamente, la IRA puede ser agrupada en etiología renales como la perfusión renal sin daño celular, isquemia, nefrotoxicidad, obstrucción renal tubular, alteraciones túbulo intersticiales o glomerulares y dividida en tres grandes grupos (Basile *et al.*, 2012a; He *et al.*, 2012):

1.1.1. IRA pre-renal: es la insuficiencia renal aguda secundaria a la disminución de la irrigación sanguínea del riñón. Puede ser consecuencia de:

- a) Insuficiencia cardíaca, que reduce el gasto cardíaco y la presión arterial.
- b) Cuadros asociados a una disminución del volumen sanguíneo y de la presión arterial.

1.1.2. IRA intrarrenal: secundaria a alteraciones dentro del propio riñón, entre ellas las que afecta a los vasos sanguíneos de los glomérulos (glomerulonefritis aguda) y túbulos (necrosis tubular aguda).

1.1.3. IRA post-renal: secundaria a una obstrucción del sistema colector de la orina en un lugar entre los cálices y el tracto de salida de la vejiga.

1.2. Síndrome de Fanconi

El síndrome de DeToni-Debré-Fanconi, o simplemente síndrome de Fanconi (SF), es el término que se designa a un grupo de enfermedades que presentan en común una disfunción múltiple del túbulo proximal, sin afectación glomerular primaria y que se caracteriza por un trastorno de la reabsorción de glucosa, aminoácidos, fosfato y con frecuencia también de bicarbonato (Rodríguez, 1996; Roth *et al.*, 1981), también una pérdida renal de ácido úrico y otros compuestos orgánicos. Los síntomas cardinales del síndrome son hiperaminoaciduria, glucosuria, hipercalciuria e hiperfosfaturia ante un nivel sérico normal. Otros síntomas que pueden estar asociados son acidificación renal, concentración de la orina y conservación del potasio (Izzedine *et al.*, 2003).

La etiología del SF puede ser tanto de carácter hereditario como adquirido (Guyton y Hall, 2001; Rodríguez, 1996; Izzedine *et al.*, 2003)

1.2.1. SF hereditario

- a) Idiopático primario: de carácter autosómico dominante, recesivo o ligado a gen x en el cromosoma 15, causa no identificable.
- b) Idiopático secundario: cistinosis, tirosinemia, síndrome de Lowe, galactosemia, intolerancia a la fructosa, desórdenes de almacenamiento de glucógeno y citopatías mitocondriales.

1.2.2. SF adquirido

- a) Enfermedad intrínseca renal: necrosis aguda tubular, nefritis intersticial, nefropatía hipocalémica, mieloma, amiloidosis y rechazo de trasplante.
- b) Hiperparatiroidismo.
- c) Drogas: cisplatino, ifosfamida, gentamicina, tetraciclina.
- d) Toxinas: metales pesados, ácido maleico.

Los síntomas con los que cursa el SF son la eliminación de grandes cantidades de orina, en las que puede haber presencia de sodio (natriuria), fósforo, aminoácidos (proteinuria) y que pudiera llevar a deshidratación, dolor en los huesos, debilidad, retraso en el crecimiento, osteomalacia, raquitismo, acidosis tubular renal tipo 2, trasplante de riñón; enfermedad por precipitación de las cadenas ligeras (insuficiencia renal) y mieloma múltiple (Sawas-Dimopoulou *et al.*, 1996).

1.3. Maleato como inductor de SF

El ácido cis-butenodioico o ácido maleico, un compuesto orgánico dicarboxílico, es el isómero cis del ácido fumárico, un sustrato que interviene en la vía metabólica del ciclo del ácido tricarbóxico o ciclo de Krebs (Carey, 2006; Nelson y Cox, 2009).

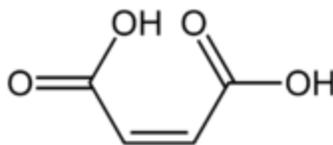


Figura 1. Estructura química del ácido maleico.

Normalmente se encuentra en su forma ionizada (maleato) y forma parte de compuestos que tienen uso desde la industria automotriz (pinturas, lacas, barnices), la industria farmacéutica (usado para formar sales de adición que ayudan a estabilizar fármacos) y en estudios bioquímicos como inhibidor de transaminasas (Felthouse *et al.*, 2001).

En estudios anteriores, se ha demostrado que la administración de ácido maleico causa, de manera reversible, un desorden en la reabsorción tubular parecido al que se presenta en el SF (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2006). Aunque no se sabe con exactitud cuál es el mecanismo de acción del ácido maleico, se ha encontrado que su actividad en la nefrona es de tipo dosis dependiente y que afecta a los túbulos en especial al túbulo proximal (Eiam-ong *et al.*, 1995).

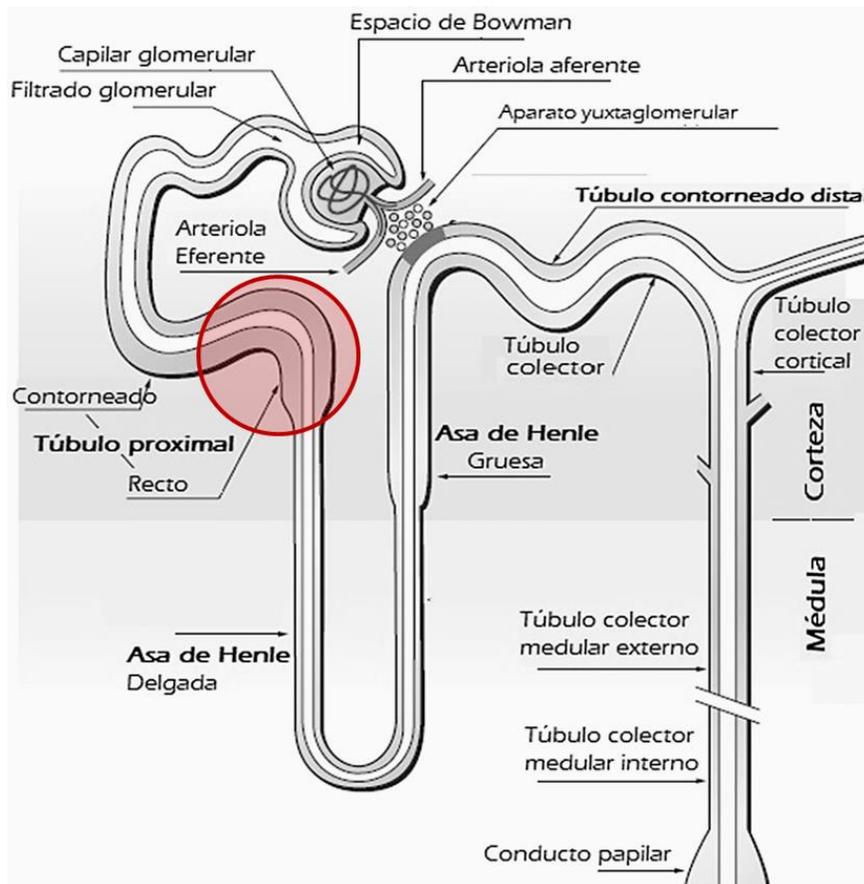


Figura 2. Representación de una nefrona; el círculo indica el blanco del ácido maleico.

A nivel fisiológico el ácido maleico inhibe la actividad de la ATPasa/sodio/potasio ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$) cuya principal función es el transporte de solutos en el túbulo proximal, por lo que el defecto en el transporte de solutos es el mecanismo más probable por la cual el ácido maleico induce SF (Coor *et al.*, 1997). Eiam-ong *et al.* (1995) demostraron que el maleato disminuye la cantidad de adenosín trifosfato (ATP) y la reabsorción de bicarbonato, generando acidosis tubular en la corteza renal; lo anterior debido a que el ATP es indispensable para la reabsorción de bicarbonatos por la bomba H^+ -ATPasa independiente de Na^+ .

Al ser administrado en animales, el ácido maleico es captado con relativa selectividad por células del túbulo proximal mediante transportadores de aniones orgánicos (OATs). Una vez que alcanza altos niveles intracelulares se ha demostrado que el ácido maleico puede actuar como aceptor de coenzima A (CoA) en la reacción catalizada por la succinil-CoA: 3-oxoácido-CoA transferasa (SCOTasa) siendo el producto de dicha reacción el maleil-CoA, que reacciona espontáneamente con los grupos sulfhidrilo (-SH) en la CoA libre para formar un compuesto de adición, este producto se transforma en un tioéter estable e inerte que resulta en una inactivación completa de la molécula de CoA (Pacanis *et al.*, 1981). Lo anterior lleva a la subsecuente disminución de CoA la cual es necesaria para la formación de ATP. Una disminución en los niveles de CoA conlleva a una baja producción de ATP que conducirá a daño celular tubular (Eiam-ong *et al.*, 1995; Zager *et al.*, 2008).

Adicionalmente, el maleato es capaz de conjugarse con el grupo -SH del glutatión reducido (GSH) provocando el agotamiento de GSH y un estrés oxidante tubular. Dependiendo de la severidad de estos procesos, ya sea en el funcionamiento de los transportadores o defectos en la filtración o necrosis tubular, el resultado es una falla renal como la IRA (Zager *et al.*, 2008).

El modelo de IRA inducido por maleato ha recibido escasa atención en la literatura de IRA debido a que no hay un equivalente clínico de toxicidad por maleato, en contraste con modelos de IRA como los inducido por glicerol, aminoglucósidos o cisplatino. A pesar de la falta de correlación clínica directa, el modelo de maleato se ha utilizado porque responde a un esquema dosis-dependiente y porque posee

una mayor especificidad por células del túbulo proximal y una disminución de ATP y GSH (Zager et al., 2008).

1.4. Estrés oxidante e IRA

1.4.1 Radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (EROs)

Como resultado del metabolismo celular se generan moléculas denominadas RL, las cuales contienen en su estructura química uno o más electrones desapareados lo que les confiere una gran reactividad.

El oxígeno molecular es indispensable para organismos aeróbicos como el aceptor final de electrones del metabolismo de las células en la cadena respiratoria. Sin embargo, el oxígeno resulta tóxico bajo algunas condiciones de pérdida de la homeostasis (Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2005).

La mayoría de los RL en sistemas biológicos son EROs, las cuales son generadas por metabolismo aeróbico; se forman principalmente por la ruptura o excitación del oxígeno, por la reducción del oxígeno en la mitocondria (Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2005; Vaziri *et al.*, 2003) y como resultado de algunos desórdenes de inflamación.

El exceso de citocinas y la estimulación de células fagocíticas son determinantes para la formación de EROs, debido a su reactividad pueden ser altamente citotóxicas ya que pueden reaccionar o dañar enzimas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos (Himmelfarb *et al.*, 2004).

Durante la cadena respiratoria, el paso de electrones puede generar intermediarios reactivos, capaces de la adición de un electrón al oxígeno molecular (O_2) para formar el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Rahman, 2007). Cuando la velocidad de entrada de electrones en la cadena respiratoria y la velocidad de transferencia de electrones a través de la cadena no están ajustadas, aumenta la formación del $O_2^{\cdot-}$, este radical actúa sobre la aconitasa liberando Fe^{2+} (hierro II) que cataliza la reacción Fenton, la cual conduce a la formación del radical hidroxilo (OH^{\cdot}), una especie aún más reactiva (Nelson y Cox, 2009).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es formado por la enzima superóxido dismutasa (SOD), aunque no es un radical libre, tiene una gran lipofilicidad que le permite atravesar las membranas celulares y reaccionar con el $O_2^{\cdot -}$ en presencia de metales de transición, para generar el OH^{\cdot} (Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2005).

1.4.2 Estrés oxidante

Naturalmente el organismo cuenta con sistemas para impedir el daño causado por los RL; al desequilibrio entre la producción de RL y los mecanismos de defensa endógenos se le denomina un estrés oxidante (Sung *et al.*, 2013).

Como consecuencia de una desregulación en la respuesta inflamatoria en pacientes con IRA se dispara la formación de RL y con ello el estrés oxidante. La falla renal es por sí misma reconocida como un estímulo adicional para el estrés oxidante. Un acrecentado estrés oxidante es considerado un mecanismo patológico importante en el desarrollo de lesión renal tubular isquémica y tóxica (Himmelfarb *et al.*, 2004).

El estrés oxidante conduce frecuentemente al daño oxidante el cual se puede hacer evidente evaluando los siguientes parámetros (Noiri *et al.*, 2001):

1. Peroxidación de lípidos: los enlaces dobles de las cadenas de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana, son muy vulnerables a las reacciones con EROs, como resultado de la peroxidación se obtiene una exaltada permeabilidad de la membrana de las células, que en ocasiones tiene graves efectos sobre la estructura y funcionamiento. Por ejemplo la elevada permeabilidad de las membranas de las células tubulares renales puede llevar a la pérdida de las funciones de transporte, en las membranas de las mitocondrias un incremento en la permeabilidad puede afectar la fosforilación oxidativa y una incrementada permeabilidad lisosomal puede resultar en la liberación de enzimas hidrolíticas y una acelerada degradación celular (Paller *et al.*, 1984; Melo y Cuamatzi, 2006).
2. Alteraciones en proteínas: el estrés oxidante puede causar daños en la integridad de proteínas estructurales o la pérdida de la actividad

catalítica de las enzimas pudiendo llegar a interrumpir rutas metabólicas. Los efectos de las EROs sobre las proteínas pueden ser oxidación de residuos de aminoácidos, rompimiento de enlaces peptídicos y agregación entre proteínas (Berlett y Standtman, 1997; Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2005).

3. Daño oxidante al ácido desoxirribonucleico (DNA): Un desarrollo importante en los últimos 20 años ha sido la comprensión de que el daño y mutación del DNA surge de productos endógenos del metabolismo celular. Las ERO generadas durante la reducción del O₂ pueden atacar bases o residuos de desoxirribosa del DNA para producir bases dañadas y rupturas en la cadena; alternativamente, las EROs pueden atacar otros componentes celulares como lípidos, generando reactivos intermediarios que reaccionan con el DNA para formar aductos (Marnett, 2000; Sung et al., 2013).

En estudios recientes se ha demostrado que factores como una dieta poco saludable y un estilo de vida sedentario, aumentan la producción de EROs, aunado a los factores ambientales (radiación, exposición a metales, pesticidas y partículas en el aire) y genéticos, el estrés oxidante puede favorecer el desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis y desórdenes neurodegenerativos (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2008).

1.5. Sistemas antioxidantes.

En los organismos aerobios, el oxígeno es esencial para la producción eficiente de energía, pero paradójicamente, produce estrés tóxico crónico en las células, al formar EROs y RL (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2008).

Para controlar los niveles de EROs y proteger a las células bajo condiciones de estrés, los organismos aerobios cuentan con un sistema antioxidante que protege al organismo con diversas enzimas que contrarrestan las EROs, enzimas detoxificantes de productos de peroxidación de lípidos, enzimas que regeneran las formas activas de los antioxidantes y una red de antioxidantes de bajo peso molecular (Blokhina *et al.*, 2003).

1.5.1. Antioxidantes enzimáticos.

Los organismos aeróbicos también sintetizan numerosas enzimas antioxidantes y otras proteínas en un intento por minimizar el daño oxidante, la más conocida de las enzimas es la SOD, que cataliza la conversión de moléculas de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y O_2 , todos los miembros de la SOD utilizan metales de transición en sus sitios activos como cobre (Cu), zinc (Zn) y manganeso (Mn). El H_2O_2 es claramente tóxico y debe ser removido rápidamente, la conversión del H_2O_2 la realizan dos familias de enzimas, las glutatión peroxidasa (GPx) y las catalasas (CAT). Las GPx utilizan el poder reductor del GSH para llevar a cabo la reducción del H_2O_2 en H_2O y O_2 ; una vez que la GPx está en su forma inactiva tras la reducción de la molécula de H_2O_2 , la enzima concomitante glutatión reductasa (GR) utiliza nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para reducir el glutatión oxidado (GSSG) permitiendo la acción continua de la GPx. En la mayoría de las células de mamíferos, la catalasa se encuentra casi exclusivamente en los peroxisomas donde tiene como función la remoción del H_2O_2 generado de la β -oxidación de ácidos grasos. Ya que la difusión de H_2O_2 al citoplasma es poco probable, parece que la GPx metaboliza el H_2O_2 citoplasmático en condiciones de estrés oxidante y la catalasa reacciona con el H_2O_2 liberado de los peroxisomas por peroxidación de lípidos (Davies, 2000). Otra enzima protectora es la glutatión S-transferasa (GST), la cual cataliza la unión del GSH con moléculas electrofílicas, ofreciendo una protección contra los xenobióticos electrofílicos incluidos los carcinogénicos (Mannervik, 2012).

1.5.2. Compuestos antioxidantes no enzimáticos.

Las células utilizan una serie de antioxidantes que pueden o no ser endógenos y que no son de origen enzimático además de que son de bajo peso molecular. Este tipo de moléculas se pueden clasificar en dos grupos:

1. Antioxidantes directos: son moléculas que tienen la capacidad de reaccionar directamente con los agentes oxidantes reduciéndolos e inhibiendo así la iniciación o propagación de la cadena de reacciones de oxidación. La vitamina C (ácido ascórbico) y el ácido úrico son los antioxidantes de fase acuosa más importantes y la vitamina E (el mayor

antioxidante de unión a membrana), el β -caroteno y la ubiquinona son agentes antioxidantes liposolubles (Davies, 2000). Por otra parte, existen los antioxidantes directos con grupos tiol entre los que destaca el GSH. Este antioxidante contiene un grupo tiol cuya reactividad química aunado al potencial de óxido-reducción de la molécula, hacen que actúe como un efectivo aceptor de electrones. La naturaleza nucleofílica del grupo tiol es importante en la formación de puentes mercapturo con metales y electrófilos (Xiang *et al.*, 2001).

2. Antioxidantes indirectos: son moléculas que no reaccionan directamente con los agentes oxidantes si no que promueven la transcripción de enzimas citoprotectoras mediante la vía Kelch-like-ECH-associated protein 1 (Keap1)/ Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45 (Nrf2)/ elemento de respuesta antioxidante (ARE) o Keap1/Nrf2/ARE; estos antioxidantes no se consumen, tienen larga vida media y es improbable que evoquen efectos pro-oxidantes. Además están involucrados en una interacción funcional compleja, de tal manera que muchas proteínas citoprotectoras participan en la síntesis y/o regeneración de antioxidantes directos (Dinkova-Kostova y Talalay, 2008).

El factor transcripcional Nrf2 es el que regula la expresión de genes involucrados en la transcripción de enzimas citoprotectoras involucradas en la actividad antioxidante. En condiciones basales en la célula, el factor de transcripción Nrf2 interactúa con la proteína anclada a la actina Keap1 (complejo Nrf2/Keap1) permitiendo que Nrf2 sea degradada por medio de un proteosoma, manteniendo los niveles de expresión de antioxidantes enzimáticos bajos (Nguyen *et al.*, 2003).

Sin embargo, cuando las células están expuestas a estrés oxidante, o bien debido a un estímulo de una molécula exógena como el antioxidante indirecto, la proteína Nrf2 se libera de la proteína Keap1, migrando del citoplasma al núcleo donde se une a la región ARE (antioxidant response element) transactivando la expresión de genes citoprotectores (Nyugen *et al.*, 2003).

3. Antioxidantes bifuncionales: son aquellos antioxidantes que tienen la capacidad de actuar directamente sobre el agente oxidante y de activar la vía Keap1/ Nrf2/ARE.

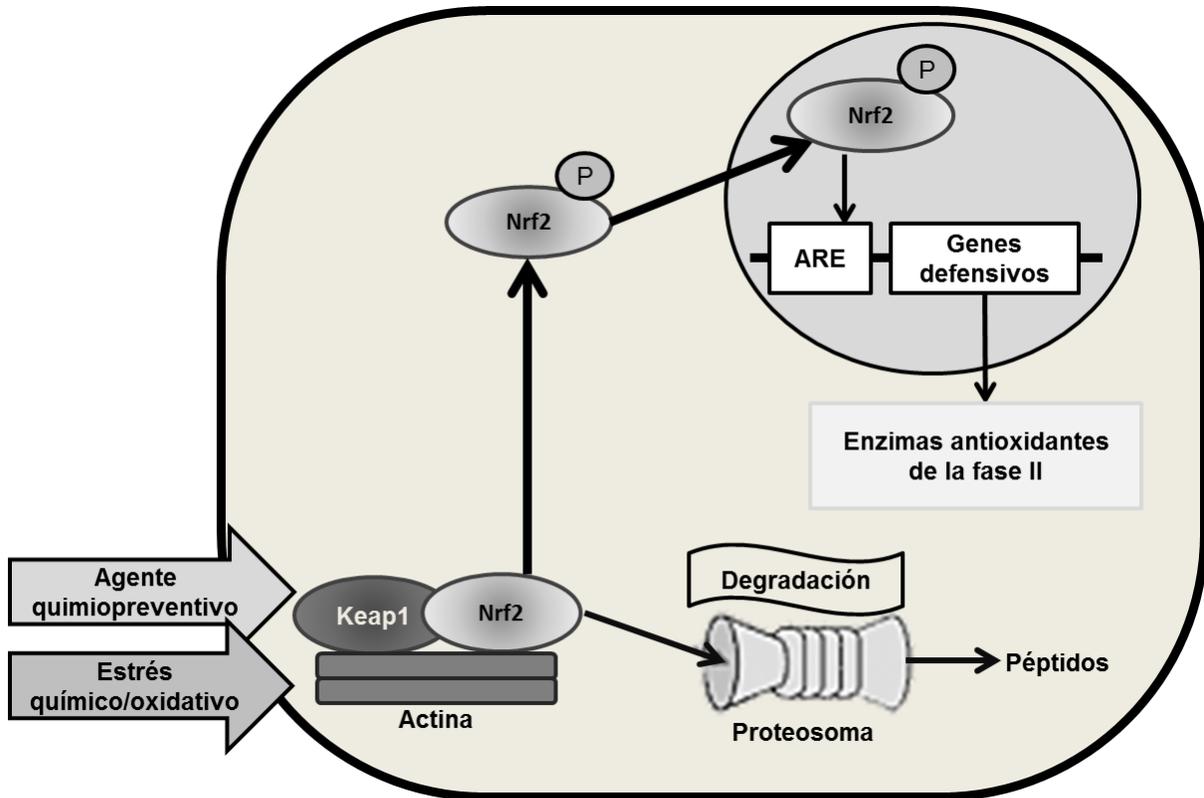


Figura 3. Representación de la vía Keap1/Nrf2/ARE.

1.6. Curcumina

Por años ha habido estudios basados en el uso de compuestos naturales derivados de plantas como potenciales agentes terapéuticos para enfermedades en el humano. La curcumina (diferuloilmetano, Fig. 4) es un compuesto polifenólico con 70% de abundancia entre los curcuminoides extraídos de la raíz de la *Curcuma longa* o turmérico, una planta de origen asiático que pertenece a la familia de las plantas conocida como Zingiberáceas (Trujillo *et al.*, 2013; Chattopadhyay *et al.*, 2004).

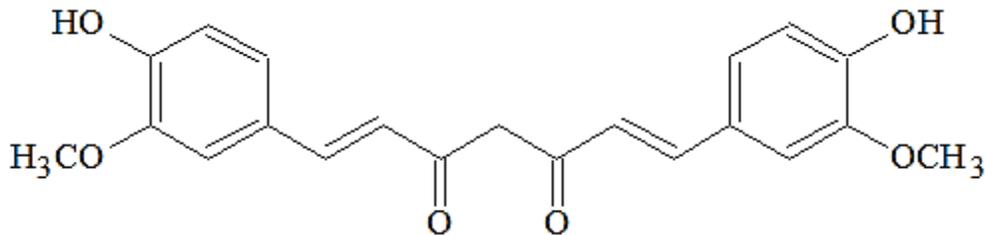


Figura 4. Estructura química de la curcumina

En la medicina tradicional de la India está documentado que la curcumina se ha usado en el tratamiento de varias condiciones respiratorias como asma, hiperactividad bronquial, alergia; así como desórdenes del hígado, anorexia, reumatismo y heridas en pacientes diabéticos (Trujillo *et al.*, 2013). Se ha descrito que presenta propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, anticarcinógenas y antimicrobianas (Trujillo *et al.*, 2013).

La curcumina es un sólido de color amarillo-naranja poco soluble en agua pero muy soluble en algunos disolventes como el etanol (EtOH), dimetilsulfóxido (DMSO) y acetona. En solución se encuentra principalmente en forma enólica lo que favorece la acción antioxidante al atrapar RL, aunque también se encuentra en forma β -dicetona (Okada *et al.*, 2001).

A nivel molecular, se ha demostrado que la curcumina modula una amplia gama de moléculas de señalización. La curcumina puede regular a la alza o a la baja estas moléculas dependiendo de la diana y contexto celular; estos blancos se dividen en dos categorías: aquellos a los que la curcumina se une directamente y aquellos cuya actividad es modulada indirectamente. Se incluyen entre los objetivos indirectos a los factores de transcripción (Nrf2) evidenciando una actividad antioxidante indirecta, enzimas, mediadores de la inflamación, las proteínas cinasas, proteínas reguladoras del ciclo celular y proteínas de supervivencia (Gupta *et al.*, 2012).

En diversos estudios se ha demostrado que tiene una notable actividad como antioxidante ya que puede neutralizar o eliminar diferentes especies de RL, óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO₂) y EROs como O₂⁻ y OH• demostrando

su actividad directa como antioxidante (Trujillo *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2012; Okada *et al.*, 2001).

La actividad de la curcumina como un eliminador de RL y antioxidante se ha demostrado a partir de varios estudios *in vitro*, esta actividad puede surgir por el grupo hidroxilo o el grupo metileno del resto de β -dicetona (Gupta *et al.*, 2012).

En ensayos previos que implican un modelo de insuficiencia renal (IR) inducido por ciclosporina, se ha demostrado que la administración de curcumina produce una respuesta dosis dependiente previniendo el aumento de BUN y creatinina sérica, manteniendo estables los valores de depuración de urea y creatinina (Tirkey *et al.*, 2005). En cuanto a estudios de estrés nitrosativo inducido, donde sin tratamiento de curcumina los niveles de nitritos séricos y tisulares aumentaron, la curcumina ofreció protección al mantener estable, en dosis dependiente, estos niveles tisulares y séricos (Tirkey *et al.*, 2005; Reddy y Lokesh, 1992). Estas tendencias permanecen en los estudios de peroxidación de lípidos donde la curcumina redujo considerablemente la peroxidación de los lípidos con respecto a animales no tratados con curcumina, en el modelo de IRA inducido por maleato. En el perfil enzimático, la curcumina mantiene de manera dosis dependiente la actividad de las enzimas catalasa, SOD y GPx con respecto a animales con IRA y sin tratamiento de curcumina cuya actividad disminuyó. La curcumina *per se* no modificó el perfil enzimático (Tirkey *et al.*, 2005).

2. Justificación

Este proyecto explora una opción alterna para disminuir la tasa de estrés oxidante al usar un compuesto natural como la curcumina como sustancia antioxidante y citoprotectora. Médicamente, el estrés oxidante está presente en enfermedades de importancia clínica como la IRA.

La IRA es una de las principales causas de ingreso y mortalidad de las Unidades de Cuidados Intensivos y Servicios de Nefrología en nuestro país, pues afecta del 1 al 25% de los pacientes de estos servicios (Díaz de León, 2005); aun cuando es una enfermedad que se presenta de forma repentina y de condición reversible, hay una gran tasa de mortalidad que no es explicable por las condiciones de la IRA si no porque la falla renal incrementa el riesgo de desarrollar complicaciones severas no renales (Levy *et al.*, 1996). Actualmente no existe un esquema profiláctico para la IRA por lo que sólo se poseen medidas terapéuticas invasivas para el tratamiento de la IRA y que no necesariamente eliminan o atenúan otros daños inherentes al estrés oxidante y daño celular.

3. Hipótesis

La administración previa del antioxidante curcumina en ratas protegerá al riñón del daño oxidante inducido por una inyección de maleato.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar si la administración previa de curcumina protege del daño renal inducido por maleato.

4.2. Objetivos particulares

- Establecer el grado de daño renal obtenido en los diferentes grupos del modelo aplicado mediante la medición de parámetros hemodinámicos como medición de la presión arterial media, flujo sanguíneo renal y filtración glomerular.

- Comprobar que el modelo agudo de administración de maleato simula SF realizando los estudios bioquímicos de rutina para el diagnóstico de IR en orina (sodio, proteinuria, depuración de creatinina y glucosuria)
- Determinar el grado de lesión renal mediante estudios histológicos y la excreción urinaria de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) y de la gelatinasa de neutrófilos asociada a lipocaína (NGAL).
- Estudiar el grado de estrés oxidante mediante la determinación de marcadores de estrés y daño renal como 4-hidroxinonenal (4-HNE), malondialdehído (MDA) y proteínas oxidadas.
- Determinar la función antioxidante indirecta de la curcumina con un perfil de actividad de la enzima antioxidante SOD y cuantificación de los niveles del factor de transcripción Nrf2 por Western blot.
- Determinar si el tratamiento con curcumina modifica los parámetros clínicos inherentes a la nefrotoxicidad inducida por maleato respecto a un grupo sin tratamiento previo de curcumina (grupo maleato).

5. Material y Métodos

5.1. Diseño experimental

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar del bioterio del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH), con un peso corporal entre 200 y 300 g divididas en 4 grupos (n=7/grupo) que se organizaron de la siguiente manera:

- **Grupo 1:** Control, las ratas se administraron con vehículo carboximetilcelulosa (CMC) vía intragástrica.
- **Grupo 2:** Maleato, las ratas se administraron con una sola dosis (400 mg/Kg) de ácido maleico vía intraperitoneal (i.p.).
- **Grupo 3:** Curcumina + ácido maleico, las ratas se administraron intragástricamente con suspensión de curcumina (120 mg/kg/día) en CMC por 5 días previo a la inyección del ácido maleico (400 mg/Kg).
- **Grupo 4:** Curcumina, las ratas se administraron intragástricamente con suspensión de curcumina en CMC a una dosis de 120 mg/kg/día por 5 días.

Como se puede observar en la Figura 5, durante 5 días previos a la administración de maleato, las ratas se administraron intragástricamente por sonda (dosis: 120 mg/kg/día) con CMC al 0.5% o con una suspensión de curcumina en CMC según el grupo correspondiente; la CMC es un disolvente orgánico que no tiene efectos deletéreos al ser administrado por esta vía. Para la dosificación intragástrica se utilizó una sonda de polietileno (PE) blando (PE-90, diámetro exterior 1,7 mm) unida a una aguja 16G y una jeringa, todo el material se lavó y se esterilizó previamente (Tapia *et al.*, 2013; Ahmad, 2013).

Al día cero (0), las ratas se administraron vía i.p. con solución salina isotónica (SSI) estéril o con ácido maleico en SSI a una dosis de 400 mg/kg. La administración intraperitoneal se realizó con una aguja hipodérmica 30G (Ware *et al.*, 2011).

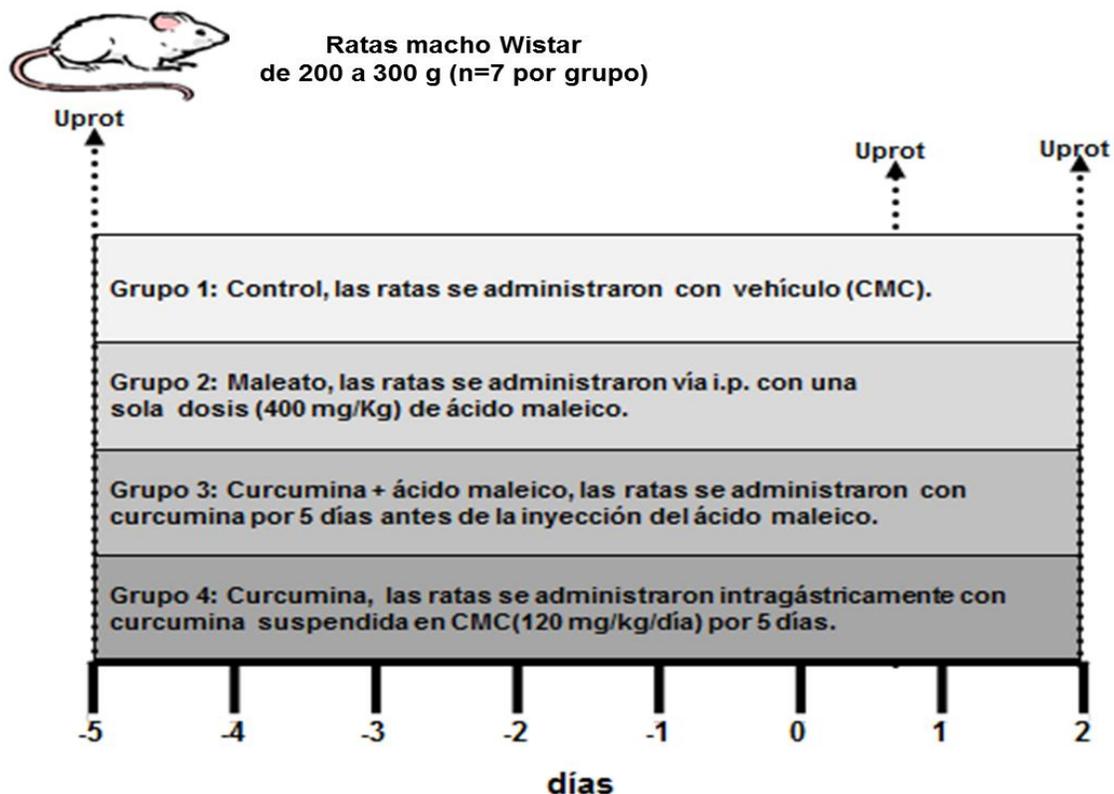


Figura 5. Representación esquemática del diseño experimental, donde Uprot es la excreción urinaria de proteínas en los diferentes períodos de tiempo.

Una vez administradas vía i.p., las ratas se colocaron en jaulas metabólicas (Nalgene Company, Rochester, New York, USA) por 24 h para la recolección de la orina y al día uno las ratas se sacrificaron para obtener la muestra sanguínea y los riñones (Tapia *et al.*, 2013). Todos los datos informados en esta tesis se obtuvieron en muestras de animales sacrificados a las 24 h de la inyección de la inyección del maleato.

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para la experimentación y atención animal (NOM-062-ZOO-2001).

5.2. Obtención de muestras (riñón, plasma y orina)

El día de sacrificio, las ratas se anestesiaron utilizando pentobarbital sódico (60 mg/kg). Se obtuvo la sangre mediante la punción de la arteria aorta abdominal utilizando una aguja estéril 18G y una jeringa con heparina para evitar la coagulación. El plasma se obtuvo centrifugando las muestras de sangre a 3,000 x g durante 10 min; el plasma se separó en alícuotas y cada una se guardó a -80°C. Los riñones se limpiaron con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a 4°C por perfusión. Una vez limpios, se retiraron con el 100% de la masa renal funcional, el riñón izquierdo se separó en médula y corteza, ambas partes se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento para determinaciones de estrés oxidante y enzimáticas; el riñón derecho se fijó con paraformaldehído al 4% para análisis histológico.

Para las muestras de orina, se midió el volumen total de orina en el tubo recolector y se separó en dos o tres alícuotas de 3 mL colocadas a -20°C.

5.3. Medición de la presión arterial media (MAP) y del flujo sanguíneo renal (RBF)

Para la medición de MAP y RBF se utilizaron ratas macho Wistar (n=6-8/grupo), se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg vía i.p). Posteriormente el área abdominal se rasuró y se colocó la rata en una tabla homeotérmica para mantener la temperatura constante a 37°C. Se cateterizaron la tráquea, las dos venas yugulares, las dos femorales y la vejiga con tubos PE-240, PE-50, y PE-90,

respectivamente). Las ratas se mantuvieron en condiciones euvolémicas por infusión (10 mL/kg de peso corporal) de albúmina sérica bovina (BSA) isotónica durante la cirugía, seguido de una infusión de SSI a 2.2 mL/h, la MAP se midió constantemente con un transductor de presión fisiológica modelo (MLT844, AD Instruments Colorado Springs, CO, USA) y los datos se grabaron en un sistema de adquisición de datos (Power Lab, AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA). El riñón izquierdo se expuso y se colocó en un soporte de acrílico cubierto con un algodón impregnado en solución Ringer. La arteria renal izquierda se colocó dentro de una sonda de flujo ultrasónica de 2 mm, cubierto con un gel de ultrasonido para registrar el RBF (Tapia *et al.*, 2013). La resistencia vascular renal (RVR) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$RVR = \frac{MAP}{RBF}$$

5.4. Medición de la filtración glomerular (GFR)

La GFR se determinó por el método descrito por Davidson y Sacker (1963).

Fundamento: el método se basa en la medición colorimétrica del polifructosán a una longitud de onda de 620 nm. El polifructosán (Figura 6) es un polímero de fructosa similar en estructura a la inulina, estos polisacáridos no son metabolizados en la sangre humana y pasan a los riñones sin ser modificados por lo que son utilizados como parámetro para medir la función renal. El polifructosán, a diferencia de la inulina, es más soluble en la orina evitando la formación de cristales.

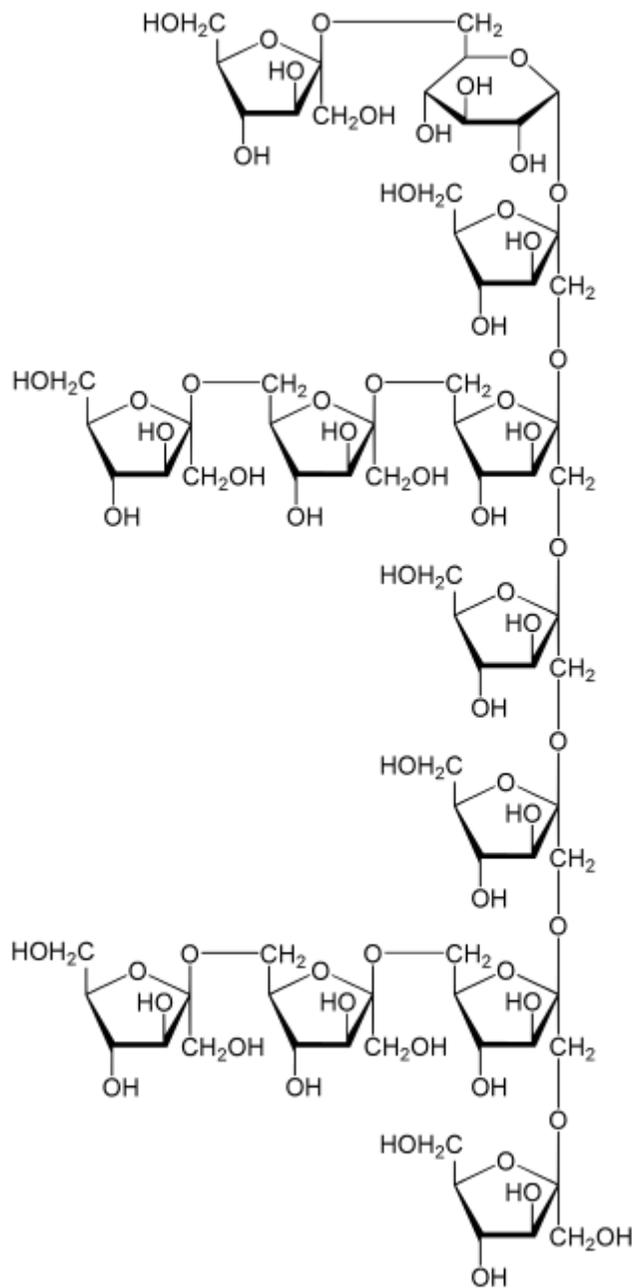


Figura 6. Estructura del polifructosán

Metodología: para el ensayo se obtuvo una muestra de plasma basal, posteriormente la rata se infundió con polifructosán al 5% en SSI a una velocidad de 2.2 mL/h por un período de 60 min (con el fin de alcanzar el equilibrio), transcurrido dicho tiempo se obtuvo una segunda muestra de plasma y después de 30 minutos se obtuvieron muestras de orina y plasma (Toto, 1995)

Al final del experimento los riñones se lavaron y se perfundieron con PBS, ambos riñones se extirparon con el 100% de la masa renal funcional, se pesó el riñón izquierdo y ambos riñones se separaron en médula y corteza y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior procesamiento.

5.5. Excreción urinaria de sodio (UNa)

La UNa se midió mediante la técnica de fotometría de flama.

Fundamento: Se basa en la medida de la emisión de Radiación electromagnética (REM) emitida por un electrón previamente excitado con el calor de una llama. Las transiciones electrónicas que se producen son características de cada elemento, por lo tanto, la longitud de onda (λ) de la REM emitida da información cualitativa (coloración de la llama) y cuantitativa del mismo (medición de la λ) (Geller *et al.*, 1972; Meloche, 1956).

Metodología: Las muestras de orina previamente diluidas 1:2 en agua desionizada se analizaron mediante el fotómetro de flama IL943.

5.6. Excreción urinaria de proteínas (proteinuria).

La medición de las proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford. Los datos se expresaron en mg/24 h.

Fundamento: Método espectrofotométrico que se fundamenta en la interacción del colorante Azul de Coomasie G-250 (color pardo) con las regiones hidrófobas de los residuos de arginina de las proteínas formando un complejo (proteína-colorante) de color azul con máximo de absorción de 595 nm (Lott *et al.*, 1983).

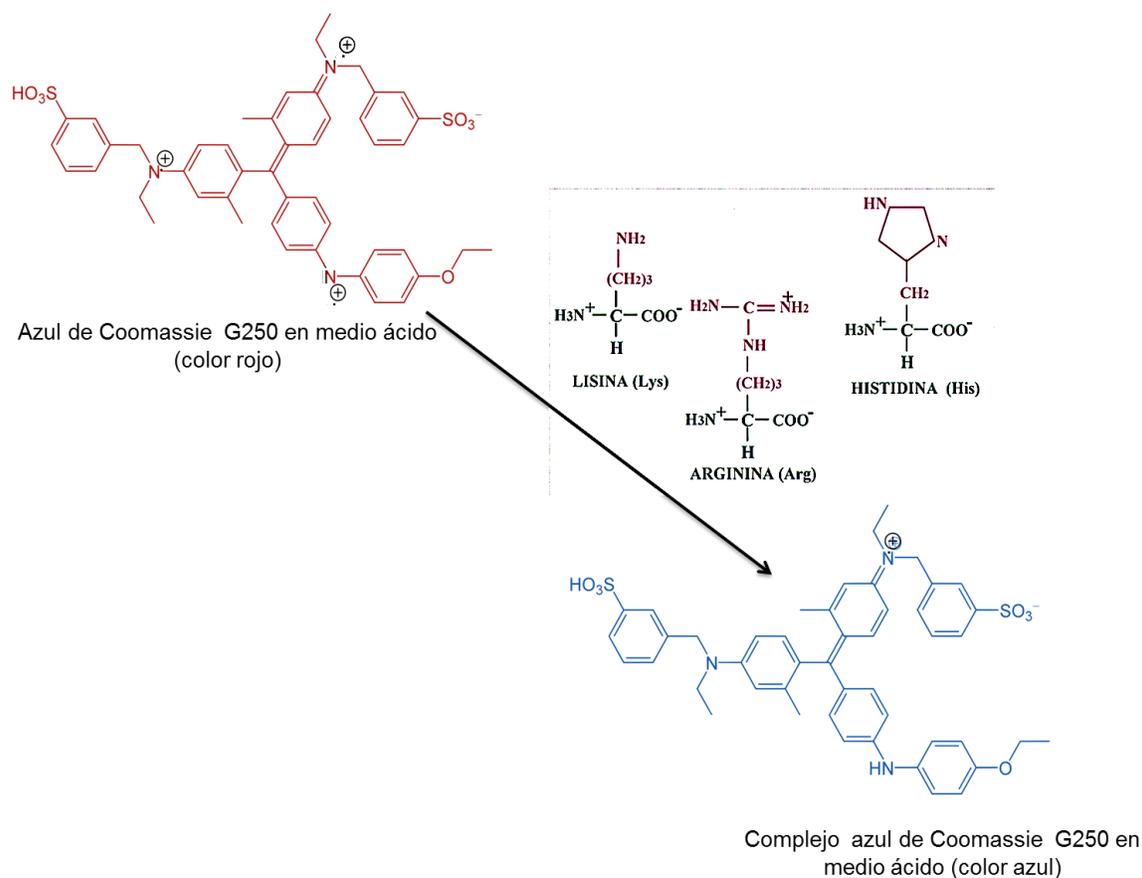


Figura 7. Reacción de Bradford

Metodología: Las muestras se diluyeron 1:100 en agua desionizada con la finalidad de que el valor obtenido se encontrara dentro de la zona lineal de la curva estándar (Ley de Lamber-Beer). Para la determinación se empleó una curva estándar de BSA en concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; en un tubo eppendorf con capacidad de 1.5 mL se adicionó la cantidad de BSA según la concentración del punto de la curva más agua desionizada para completar 100 μL , para los problemas se requirieron 100 μL de la muestra diluida, posteriormente se adicionaron 900 μL del reactivo de Bradford previamente preparado (Azul de Coomassie 0.01%, EtOH 4.7%, H_3PO_4 al 85%, filtrado con papel Whatman No. 31) y se dejó incubar por 15 minutos. Al finalizar este tiempo se dispusieron 200 μL de cada punto de la curva (por duplicado) y de las muestras en una microplaca y se leyó a una longitud de onda de 595 nm en el equipo Biotek Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (Winooski, Vermont, USA) utilizando software de análisis de Gen5.

5.7. Determinación de creatinina.

La determinación de creatinina se realizó mediante el ensayo colorimétrico basado en la reacción de Jaffé, la medición se llevó a cabo en el laboratorio de bioquímica del Departamento de Nefrología del INCICH mediante el analizador de química clínica automatizado ILAB300 plus (Instrumentation Laboratory, Colorado Springs, CO, USA). Los valores se utilizaron para la corrección de datos en la determinación de NGAL.

Fundamento: Se basa en la formación de un complejo colorido picrato-creatinina en un medio alcalino, dicho complejo tiene un máximo de absorción a 462 nm. (Husdan y Rapoport, 1968).

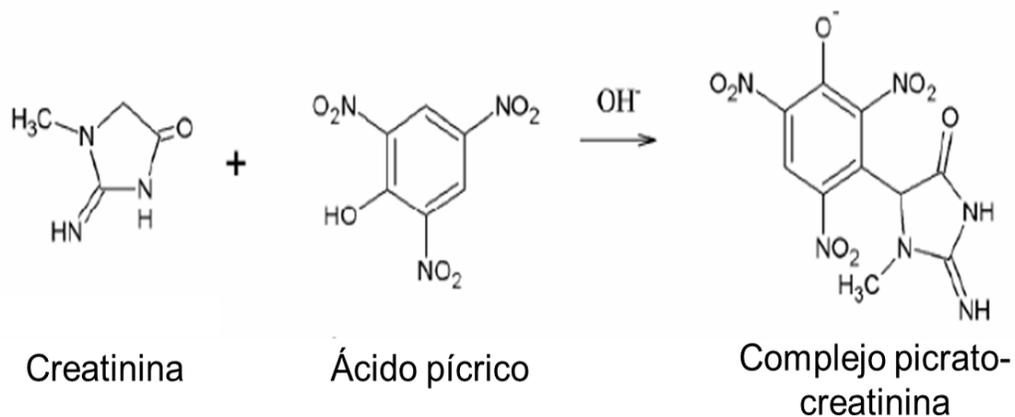


Figura 8. Reacción de Jaffé

5.8. Excreción urinaria de glucosa (glucosuria).

La glucosuria se determinó mediante un método enzimático utilizando el kit para análisis de Glucosa-SL de Genzyme Diagnostics.

Fundamento: Se fundamenta en la detección del aumento de la absorbancia a 340 nm por la formación de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) que es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra (Díaz-Portillo *et al.*, 1997) .

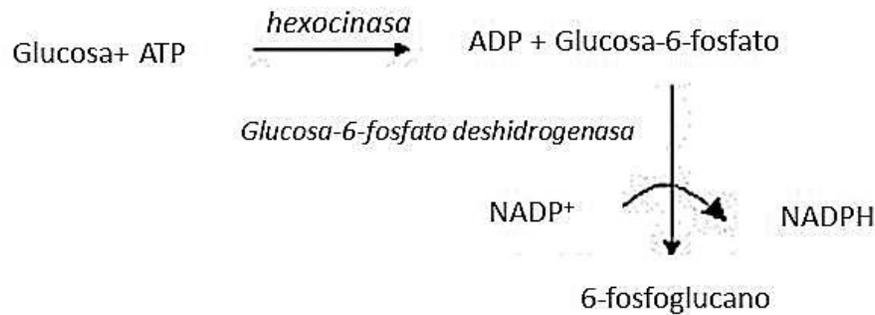


Figura 9. Reacción enzimática que cataliza la hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH)

Metodología: Se realizó una curva estándar de glucosa, para ello se disolvieron 600 mg de glucosa en 100 mL de agua desionizada y a partir de ahí se realizaron diluciones para obtener por lo menos 5 puntos de la curva (300, 150, 75, 37.5, 18.75 mg/mL). En una microplaca se colocaron 2.5 μL de muestra o estándar y 250 μL de reactivo (Glucosa-SL); la microplaca se analizó a 340 nm mediante el Equipo Biotek Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader utilizando software de análisis de Gen5.

5.9. Osmolalidad urinaria

La osmolalidad urinaria evalúa la concentración de partículas presentes en la orina. La medición del punto de congelación de una solución está relacionada con la "concentración osmótica" de esa solución. La concentración osmótica puede ser definida como la concentración de partículas de soluto por unidad de cantidad de disolvente (Koumantakis y Wyndham, 1989). Se midió haciendo uso del osmómetro modelo 3D Advanced DigiMatic (Advanced Instruments, Inc.) en el INCICH. El resultado se expresa como el número de partículas (osmoles) por kilogramo de agua presente.

5.10. Determinación de NAG

La actividad de la NAG se determinó mediante un método espectrofotométrico a 405 nm utilizando p-nitrofenil-n-acetil-β-D-glucosaminido (Horak *et al.*, 1981).

La NAG es una enzima lisosomal que se localiza en los túbulos renales; debido a su alto peso molecular no se excreta de manera regular, por eso las altas concentraciones urinarias tienen un origen tubular que sugiere daño celular o mayor actividad lisosomal (Espinoza-Sevilla *et al.*, 2013).

Fundamento: Se basa en la medición indirecta de NAG por medio de la detección a 405 nm del p-nitrofenol formado como resultado de la hidrólisis del p-nitrofenil-D-glucosaminido, catalizada por la NAG (Horak *et al.*, 1981).

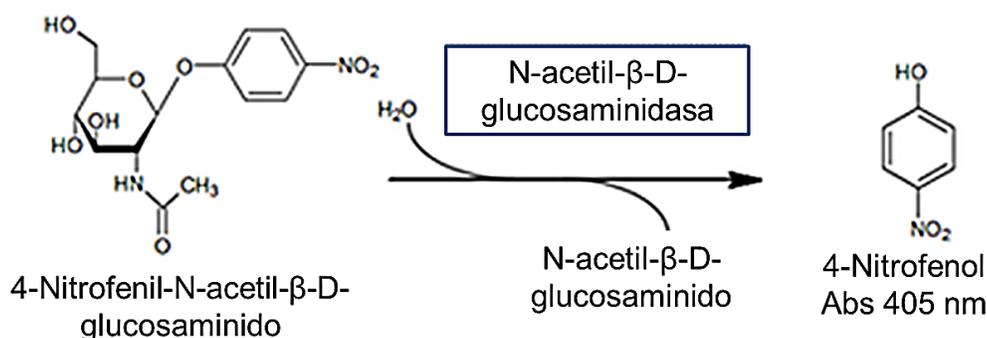


Figura 10. Reacción colorimétrica entre el NAG y el 4-Nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminido

Metodología: Se utilizaron muestras de orina diluidas 1:3 en PBS (50 mM, pH 7.4). Reactivos: 1) Amortiguador de citratos con p-nitrofenil-n-acetil-β-D-glucosaminido (0.1 M, pH 4.4), 2) Amortiguador de carbonatos (0.2 M, pH 10.4). Se rotularon tubos por duplicado para cada determinación, blanco y muestra. Se pipetearon en cada tubo:

	Blanco	Muestra
Agua destilada (μL)	30	-
Reactivo 1 (μL)	450	450
Muestra (μL)	-	30

Se agitó y se incubó en un Baño María por 30 minutos, transcurrido este tiempo se adicionaron 150 μL del reactivo 2 a ambos tubos como alcalinizante para detener

la reacción. Se pipetearon 200 μ L de cada tubo en una microplaca y se realizó la lectura a 405 nm en el Equipo Biotek Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader utilizando software de análisis de Gen5.

Para calcular las unidades de NAG por muestra se ocupó una curva estándar de p-nitrofenol. Los valores obtenidos se expresaron en Unidad enzimática (U)/24h. La U se define como la cantidad de enzima requerida para catalizar la conversión de un μ mol de sustrato en un minuto (Nelson y Cox, 2009).

5.11. Histología renal

Los riñones fijados en paraformaldehído se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol, se embebieron en parafilm y se cortaron a 2 μ m de grosor y subsecuentemente se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Los cortes fueron analizados por un patólogo (ciego al diseño experimental) usando un microscopio de luz (AxioPhot 2, Zeiss) con un objetivo de 40x, se tomaron 8 microfotografías digitales de cada riñón (n=5-6/grupo). La evaluación de la necrosis tubular se realizó por un programa morfométrico automatizado (AxioVision 4.8, Zeiss). Se calculó el área epitelial tubular total y el porcentaje de daño epitelial.

5.12. Determinación de NGAL

La NGAL es una proteína de la familia de las lipocaínas ligada a la gelatinasa de neutrófilos, en específico de los granulocitos. Tiene funciones como marcador de inflamación aguda; en el riñón el ácido ribonucleico (ARN) mensajero de NGAL se libera con pocas horas de isquemia o daño tubular tóxico, por lo tanto la medición en orina de NGAL puede servir como marcador de lesión renal aguda (Ware, *et al.*, 2011).

Fundamento: El Western blot se basa en la identificación quimioluminiscente de una proteína específica mediante su interacción con una serie de anticuerpos, uno de ellos conjugado a peroxidasa de rábano que en presencia de H₂O₂ degrada el luminol emitiendo luz (Deverajan, 2010).

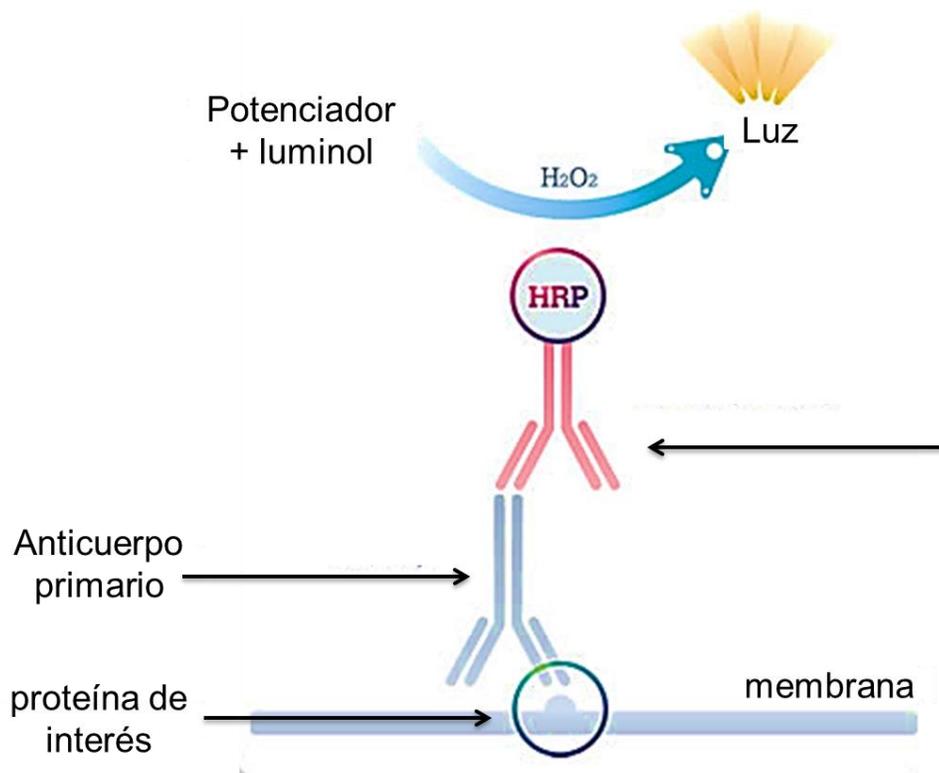


Figura 11. Reacción proteína-anticuerpo llevada a cabo en el Western blot

Metodología: Se precipitó la proteína de la orina utilizando una mezcla de metanol y acetona, el botón se resuspendió en amortiguador Tris-Gli 0.25 M. Se prepararon 30 µg de proteína precipitada y fueron cargados para la electroforesis en geles prefabricados [Ready gel de Tris-ácido clorhídrico (HCl) 12% o 4%-15%, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA]. Una vez acabada la electroforesis se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilo (PVDF) por electrotransferencia. Para confirmar la transferencia se adicionó colorante rojo de Ponceau seguido de un bloqueo de los sitios de unión inespecíficos remanentes en la membrana. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (anti-NGAL diluido 1:500) a 4°C durante toda la noche. Después de lavar con una mezcla de amortiguador salino de Tris (TBS) con Tween 20 (TTBS), la membrana se incubó con el anticuerpo secundario IgG anti conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Cell Signalling, Danvers, MA, EUA). El revelado se realizó utilizando un estuche de quimioluminiscencia (Immun-Star HRP, Bio-Rad Laboratories). La quimioluminiscencia se registró y se cuantificó usando el sistema de análisis de imágenes (Kodak Digital Science, Rochester, NY, EUA).

5.13. Marcadores de estrés oxidante en corteza renal

Las muestras utilizadas para 4-HNE, MDA y proteínas oxidadas se obtuvieron por homogenización de tejido renal en PBS 20 mM, pH 7.4 adicionado con butilhidroxitolueno (BHT) 0.5 M, en una dilución 1:10 p/v. Las muestras se centrifugaron a 3,000 x g por 10 min, el sobrenadante se separó en alícuotas y se guardó a -80°C. Adicionalmente a los homogenizados se les agregó un cóctel de proteasas (Halt Protease Inhibitor, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) ajustado a pH 7.2.

5.13.1. MDA y 4-HNE

El 4-HNE y el MDA son importantes compuestos tóxicos formados de la peroxidación de lípidos, útiles para medir el daño celular.

Fundamento: Esta técnica se fundamenta en la reacción de un reactivo colorido N-metil-2-fenilindol (1M-2F), con el MDA o el 4-HNE de una muestra de tejido a 45°C teniendo como resultado la formación de un cromóforo (carbocianina) con un máximo de absorción a 586 nm (Noiri *et al.*, 2001; Houglum *et al.*, 1990).

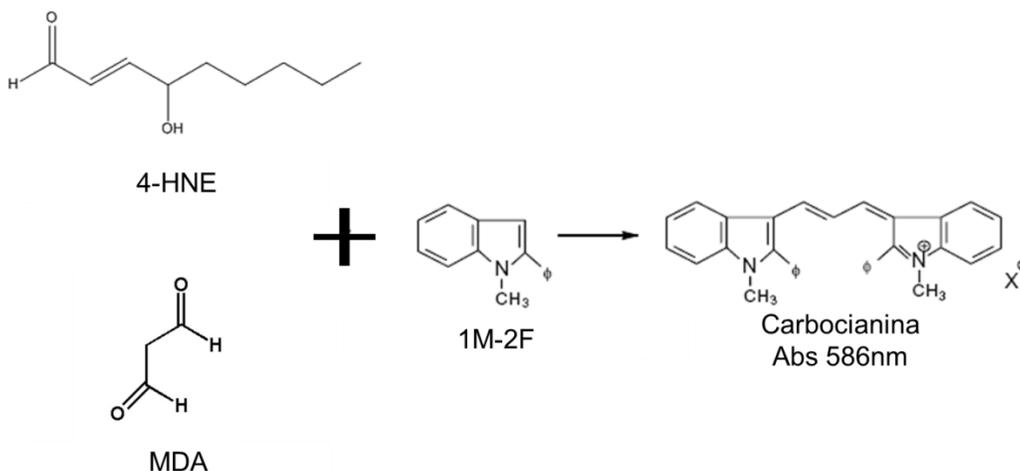


Figura 12. Reacción de determinación de marcadores de peroxidación de lípidos

Metodología: El contenido de MDA se determinó utilizando una curva de estándar de 1,1-3,3 tetrametoxipropano (TMPO). La determinación se llevó a cabo utilizando las muestras y sus blancos, a cada muestra de homogenizado se añadió una mezcla 3:1 de acetonitrilo-metanol con una solución de 1M-2F (10 mM), la reacción se inició mediante la adición de HCl al 37%, los blancos y las muestras se incubaron a 40°C por 45 min. Después de esto las muestras se centrifugaron a

3,000 x g por 5 min. La determinación de 4-HNE se realizó utilizando la misma técnica empleada para medir MDA, pero empleando ácido metanesulfónico con cloruro de hierro III en lugar de HCl. En ambos casos, el blanco lleva la misma cantidad de muestra, la mezcla de acetonitrilo-metanol y el HCl o ácido metanesulfónico pero no el 1M-2F. El sobrenadante de cada tubo se pipeteó a una microplaca la cual se midió a 586 nm por el equipo Biotek Synergy H1 Hybrid Multi-ModeMicroplate Reader utilizando software de análisis de Gen5. Los datos se expresan como nmol 4-HNE o MDA /mg de proteína.

5.13.2. Proteínas oxidadas

Las ERO tienen un tiempo de vida muy corto y son difíciles de detectar de manera directa, por ello una alternativa para evidenciar la presencia de estrés oxidante es medir los productos estables finales de las reacciones oxidativas.

Fundamento: El método de las proteínas oxidadas o carboniladas da evidencia indirecta de la actividad de las EROs y se basa en la reactividad de los grupos carbonilo de las proteínas oxidadas con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar un complejo proteína-hidrazona con un máximo de absorbancia a 370 nm (Levine, *et al.* 1990).

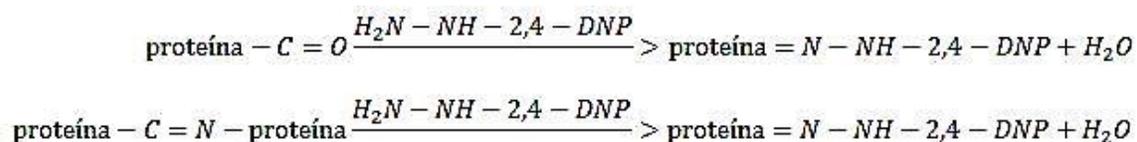


Figura 13. Reacción entre los productos oxidados de las proteínas y la DNPH

Metodología: Para el ensayo, los homogenizados se incubaron durante la noche con sulfato de estreptomicina al 10% para eliminar los ácidos nucleicos. Posteriormente se siguió el método descrito por Levine *et al.* (1990), se tomaron dos tubos de homogenizado, uno se marca como "muestra" y el otro como "blanco", a la muestra se le adicionó DNPH 10 mM preparado en HCl 2.5 M y al blanco solo se le adicionó HCl 2.5 M. El contenido se mezcló a fondo y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 h. Los tubos se agitaron de forma intermitente cada 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó el ácido tricloroacético (TCA) al 20% a ambos tubos. Los

tubos se centrifugaron a 3,500 x g durante 15 min para obtener el precipitado de proteína, el sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó una vez con TCA al 10% y se centrifugó. Finalmente los precipitados se lavaron tres veces con una mezcla de EtOH: acetato de etilo (1:1, v / v) para eliminar DNPH sin reaccionar y restos de lípidos. El sedimento final de proteína se disolvió en clorhidrato de guanidina 6 M a 37°C durante 10 min. Los materiales insolubles se eliminaron por centrifugación. La absorbancia se midió a 370 nm en un lector Synergy H1 híbrido Multi-modo de microplaca utilizando software de análisis de Gen5. El contenido de carbonilo se expresó como nmoles de carbonilo / mg de proteína.

5.14. Bifuncionalidad de la curcumina: Actividad enzimática y activación de Nrf2

5.14.1. Superóxido dismutasa

Fundamento: El ensayo se basa en la determinación indirecta de la actividad de la SOD mediante la detección del formazán que es la forma reducida del azul de nitrotetrazolio (NBT), la actividad de la SOD inhibe la reducción del NBT al formazán, al evitar que el radical superóxido actúe sobre el NBT (Nandi y Chatterjee, 1988).

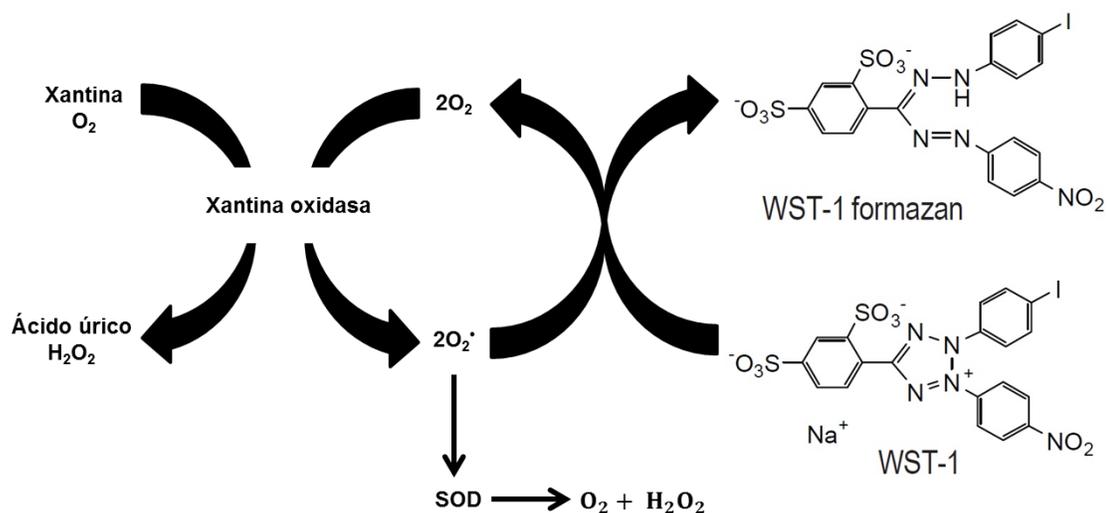


Figura 14. Sistema generador de superóxido y actividad de la SOD.

Metodología: Para el ensayo se realizó una mezcla de reacción (MR) que está constituida por: xantina (0.3 mM), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0.6

mM), NBT (150 μ M), carbonato de sodio (Na_2CO_3) (400 mM), BSA (0.1%). Se verificó que el sistema generador de $\text{O}_2^{\cdot -}$ funcionara midiendo la absorbancia a 560 nm de un tubo al cual se le adicionó la MR, PBS (50 mM pH. 7.0) y xantina oxidasa (XO), se dejó incubar 30 min a 27°C y finalmente se adicionó CuCl_2 (0.8 mM) para detener la reacción; este tubo representó el punto de referencia para el cálculo del ensayo. El ensayo completo se llevó a cabo de la siguiente forma:

	Blanco de reacción	Blanco de muestra	Muestra
MR (mL)	1.225	1.225	1.225
Muestra (μ L)	---	250	250
PBS (μ L)	275	25	--
XO (μ L)	---	---	25
Incubación 30 min a 27°C			
CuCl_2 (μ L)	500	500	500

Se pipetearon 200 μ L de cada tubo en una microplaca y se midió la absorbancia a 560 nm en un lector Synergy H1 híbrido Multi-modo de microplaca utilizando software de análisis de Gen5. El resultado se expresó en U/mg proteína.

5.14.2. Cuantificación del factor de transcripción Nrf2 (Western blot)

Metodología: La precipitación y la electroforesis se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito para la determinación de NGAL. Una vez acabada la electroforesis se transfirió a una membrana de PVDF por electrotransferencia. Para confirmar la transferencia se adicionó colorante rojo de Ponceau seguido de un bloqueo de los sitios de unión inespecíficos remanentes en la membrana mediante la incubación con una solución de leche en polvo sin grasa al 5% en PBS 1X conteniendo 0.4% de Tween 20 por 1 h a temperatura ambiente. Se incubaron las membranas con el anticuerpo primario (anti-Nrf2 diluido 1:500) a 4°C durante toda la noche. Después de lavar con TTBS (una mezcla de amortiguador salino de Tris o TBS con Tween 20), la membrana se incubó con el anticuerpo secundario IgG anti conejo acoplado a HRP 1:10,000 por 1 h. El inmunoblot se reveló usando el agente de detección primaria de Western blot

ECL™ (Amersham, GE Healthcare) y la quimioluminiscencia se detectó en un sistema de imágenes EC3 (UVP Bioluminescence Systems). La densidad de la banda de la proteína se cuantificó por densitometría de transmisión (Software UVP Bioluminescence System) (Farombi *et al.*, 2008).

5.15. Análisis estadístico

Los valores están expresados como media \pm EEM (error estándar), el análisis estadístico de elección fue el ANOVA de una vía. Cuando el valor de ANOVA fue de $p < 0.05$, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Una $p < 0.05$ se consideró significativa. El análisis estadístico se realizó con el software Prism versión 5.04 (Graph Pad Software, San Diego CA).

6. Resultados

6.1. MAP, RBF y RVR

La administración de maleato y/o curcumina no modificó la MAP con respecto al control (Figura 15).

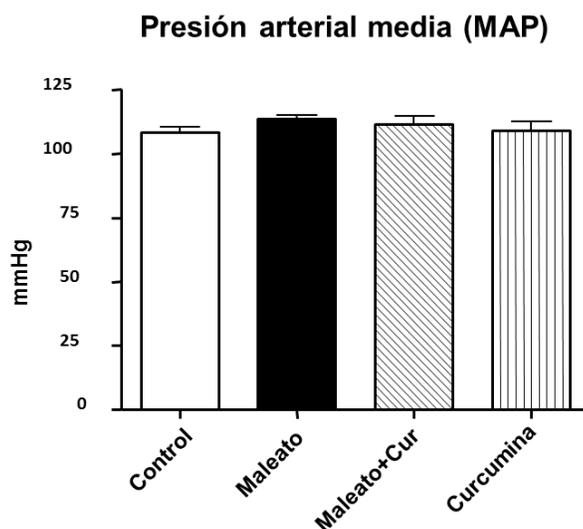


Figura 15. Presión arterial media. Los datos se expresan como media \pm EEM, $n=7$ /grupo.

En el grupo administrado con maleato hubo un decremento significativo en el RBF, aproximadamente un 40%, en comparación a los grupos administrados con curcumina y el grupo Control (Figura 16). La curcumina previno esta disminución en el grupo Maleato + Curcumina (Figura 16). También se observó que la administración de curcumina (Grupo curcumina) no modificó *per se* este parámetro.

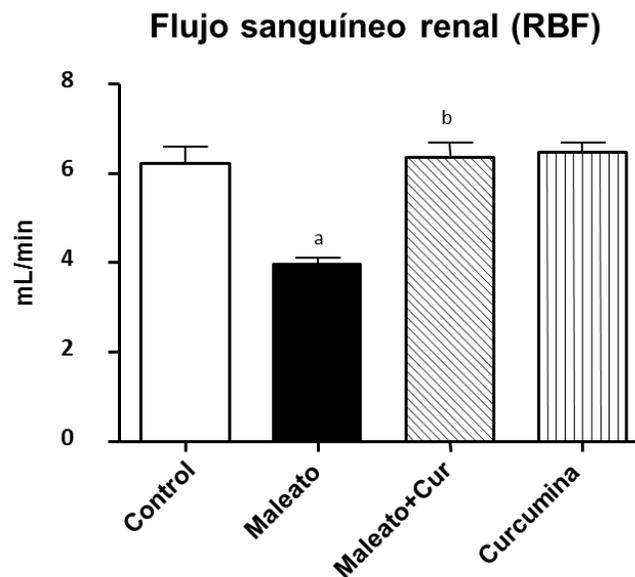


Figura 16. Flujo sanguíneo. Los datos se expresan como media \pm EEM, $n=7$ /grupo. Grupo: a) $p < 0.001$ vs. Control; b) $p < 0.001$ vs. Maleato.

El tratamiento con maleato indujo un incremento significativo en la RVR, mientras que la administración de curcumina previa a la administración de maleato previno los cambios hemodinámicos que alteran la RVR; la administración *per se* de curcumina no modificó estos parámetros comparado con el Control (Figura 17).

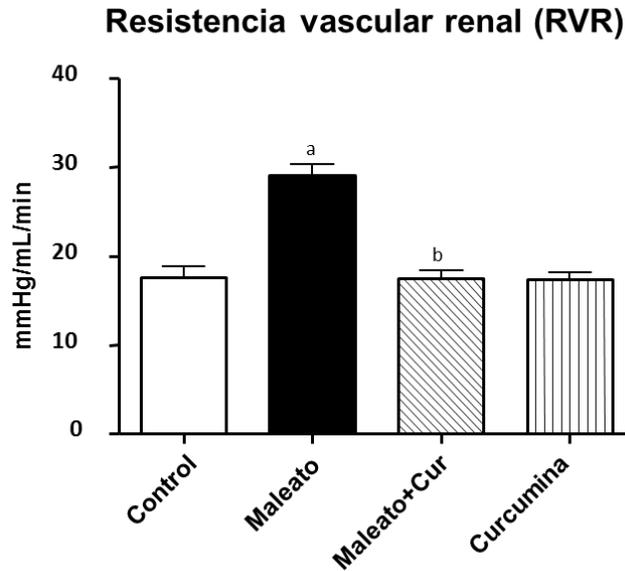


Figura 17. Resistencia vascular renal. Los datos se expresan como media \pm EEM, n=7/grupo. Grupo: a) p<0.001 vs. Control; b) p<0.001 vs. Maleato.

6.2. Medición de la GFR

La administración de maleato y/o de curcumina no modificó significativamente los valores de GFR respecto al grupo control (Figura 18).

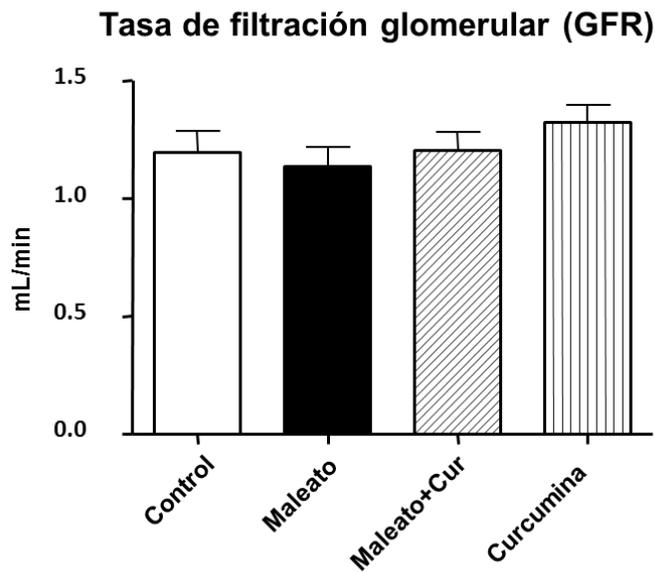


Figura 18. Tasa de filtración glomerular. Los datos se expresan como media \pm EEM, n=7/grupo.

En la Figura 19 se observó que la administración de maleato tuvo un efecto sobre la fracción de filtración (FF) al incrementar de forma significativa la proporción de fluido que pasa el glomérulo y que alcanza los túbulos renales (Fracción de filtración).

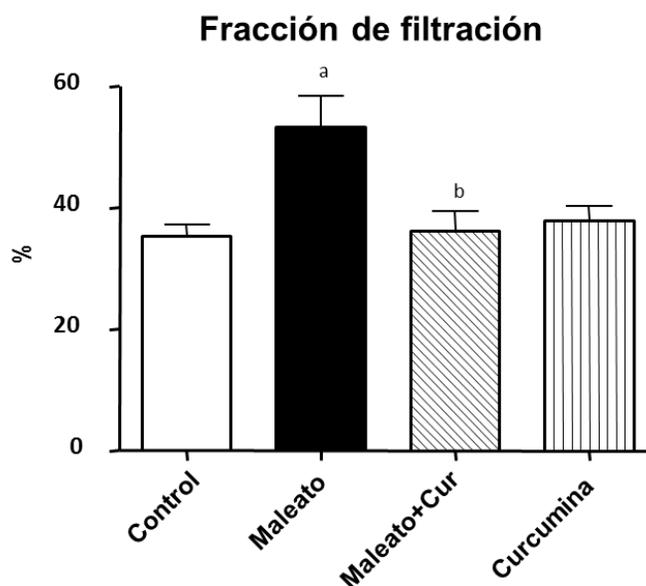


Figura 19. Fracción de filtración. Los datos se expresan como media \pm EEM, $n=7$ /grupo. ANOVA de 2 vías. Grupo: a) $p<0.05$ vs. Control; b) $p<0.05$ vs. Maleato.

6.3. UNa

La administración de maleato se asoció a una pérdida significativa de sodio por vía urinaria. En el grupo administrado previamente con curcumina (Mal+Cur) se observó un efecto protector al evitar la pérdida urinaria de sodio; los valores obtenidos del grupo Mal+Cur no presentaron diferencia significativa con los valores del grupo Control. El grupo administrado sólo con curcumina, no presentó una alteración en la excreción urinaria de sodio en comparación del Control (Figura 20).

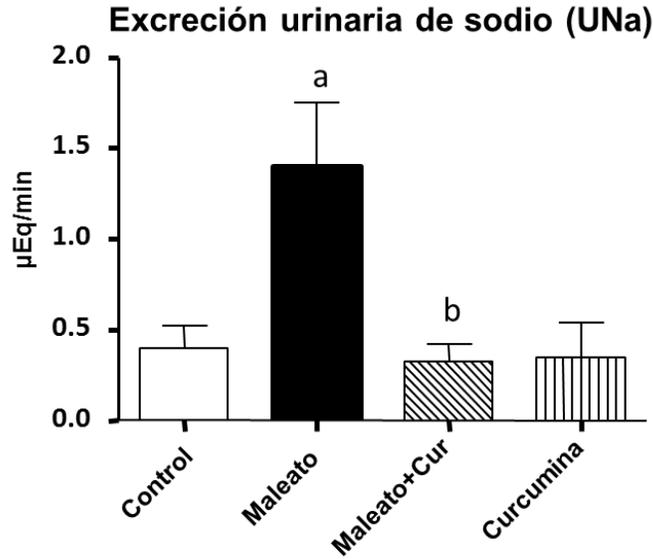


Figura 20. Excreción urinaria de sodio. Los datos se expresan como media \pm EEM, $n=7$ /grupo. Grupo: a) $p<0.001$ vs. Control; b) $p<0.001$ vs. Maleato.

6.4. Excreción urinaria de proteínas (Proteinuria)

Transcurrido el tiempo de tratamiento (24 h) se observó que la administración previa de curcumina disminuyó los valores de proteínas excretadas en orina en comparación con el grupo Maleato (Figura 21)

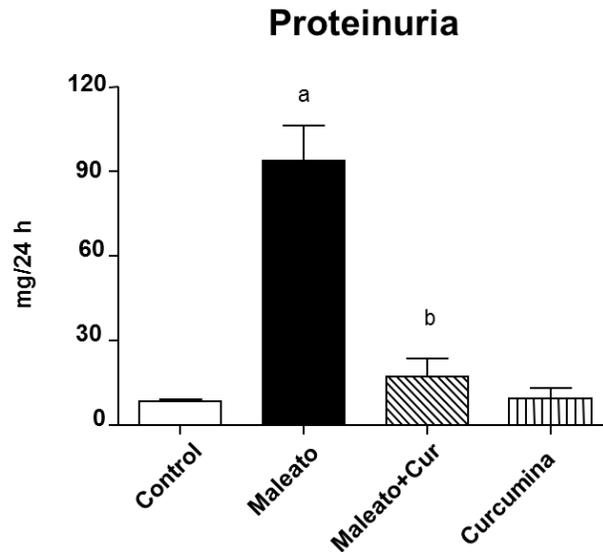


Figura 21. Proteinuria. Los datos se expresan como media \pm EEM, $n=7$ /grupo. Grupo: a) $p<0.001$ vs. Control; b) $p<0.001$ vs. Maleato.

6.5. Glucosa en orina

La administración de maleato resultó en el aumento de glucosa excretada en orina (Figura 22). La administración de curcumina antes de la inyección de maleato disminuyó los valores de glucosa en orina en comparación al grupo maleato, sin embargo la administración de curcumina sin maleato no indujo un cambio significativo en la excreción de glucosa en comparación al control.

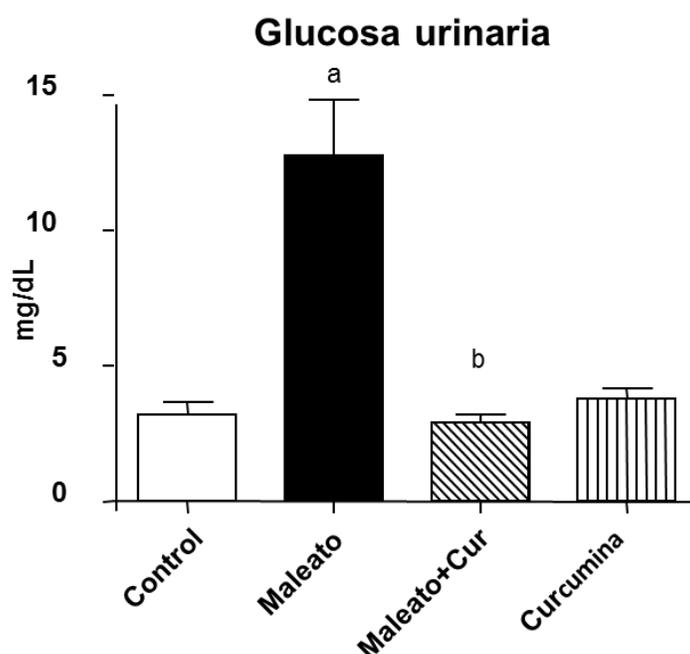


Figura 22. Glucosuria. Los datos se expresan como media \pm EEM, n=7/grupo. Grupo: a) $p < 0.001$ vs. Control; b) $p < 0.001$ vs. Maleato.

6.6. Osmolalidad urinaria

La administración de maleato indujo un aumento en la osmolalidad lo que indica un aumento en la cantidad de solutos presentes en el filtrado renal, resultado que es coherente con el aumento en la glucosuria (Figura 23). Los valores obtenidos del grupo administrado previamente con curcumina indicaron un mecanismo antagonista a los efectos del maleato al reducir los osmoles en orina.

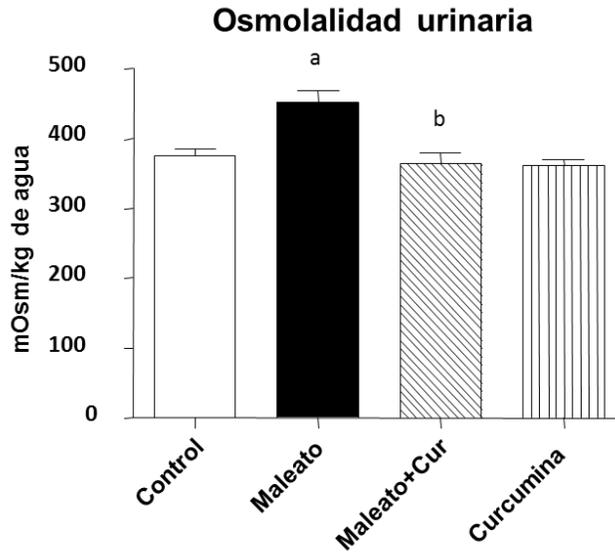


Figura 23. Osmolalidad urinaria. Los datos se expresan como media \pm EEM, n=7/grupo. Grupo: a) p<0.05 vs. Control; b) p<0.05 vs. Maleato.

6.7. NAG

La administración de maleato produjo un daño renal agudo que se demostró por el incremento en la excreción urinaria del marcador de daño renal tubular NAG (Figura 24). Dicho daño se previno con la administración de curcumina previa a la administración de maleato.

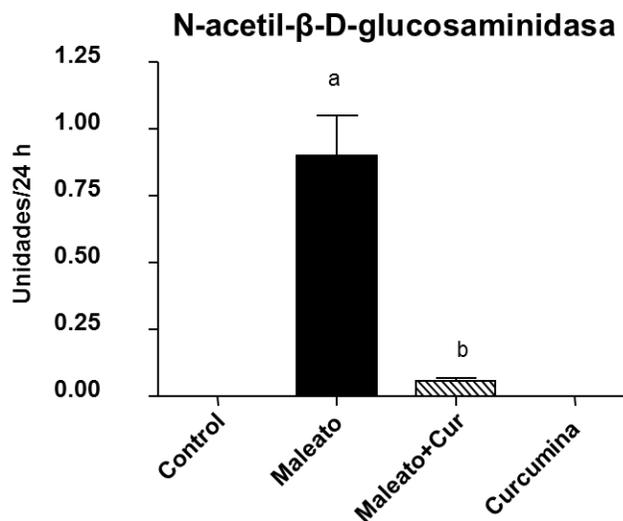


Figura 24. NAG. Los datos se expresan como media \pm EEM, n=7/grupo. Grupo: a) p<0.001 vs. Control; b) p<0.001 vs. Maleato

6.8. Histología renal

En la Figura 25 se presentan las micrografías obtenidas de la corteza de riñón, en la micrografía B se observa el daño al epitelio tubular causado por el maleato, en el análisis cuantitativo (Figura 26) se obtuvo que de cada 100 micras cuadradas de epitelio tubular el 20% tiene daño en el grupo de maleato. Por otra parte, en la micrografía C se observa que la administración previa de curcumina a la inyección de maleato, disminuyó a sólo 5.6% el daño del epitelio tubular proximal.

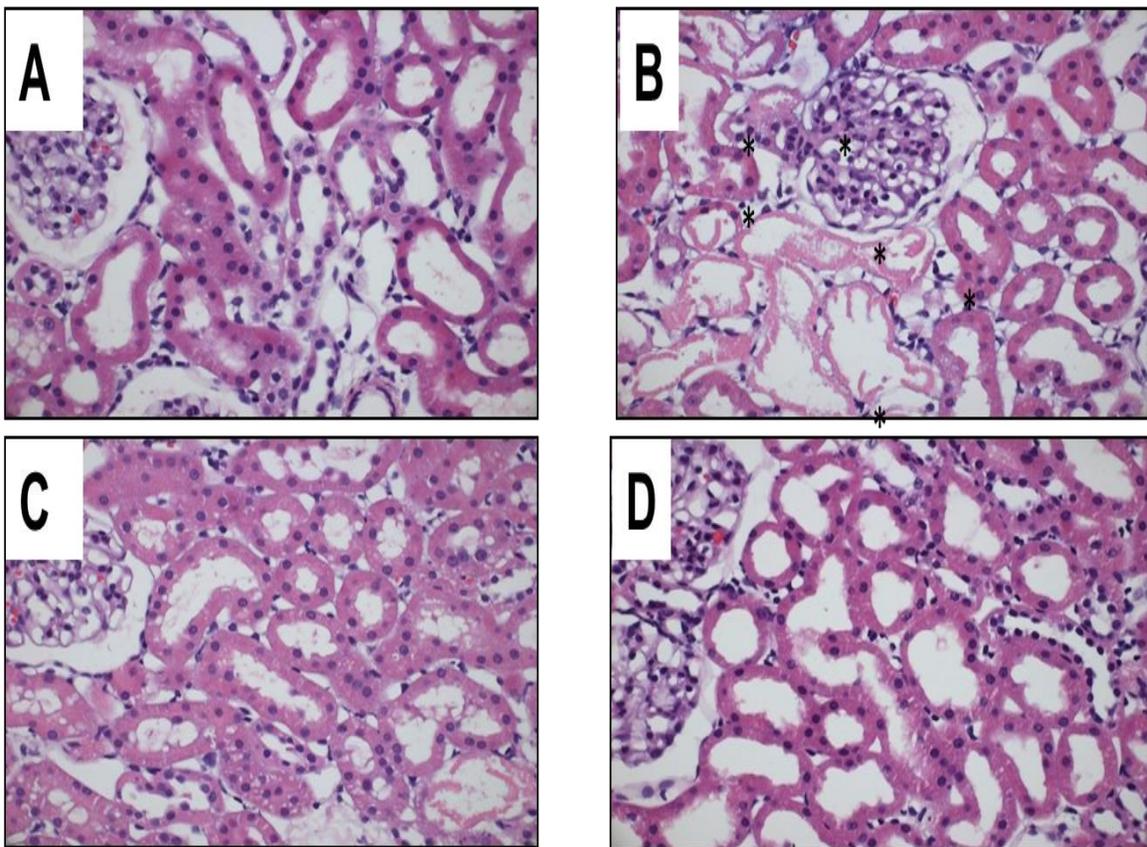


Figura 25. Cortes histológicos con tinción de hematoxilina y eosina para evidenciar necrosis tubular. Grupos: A) Control, B) Maleato, C) Mal+Cur, D) Control Curcumina.

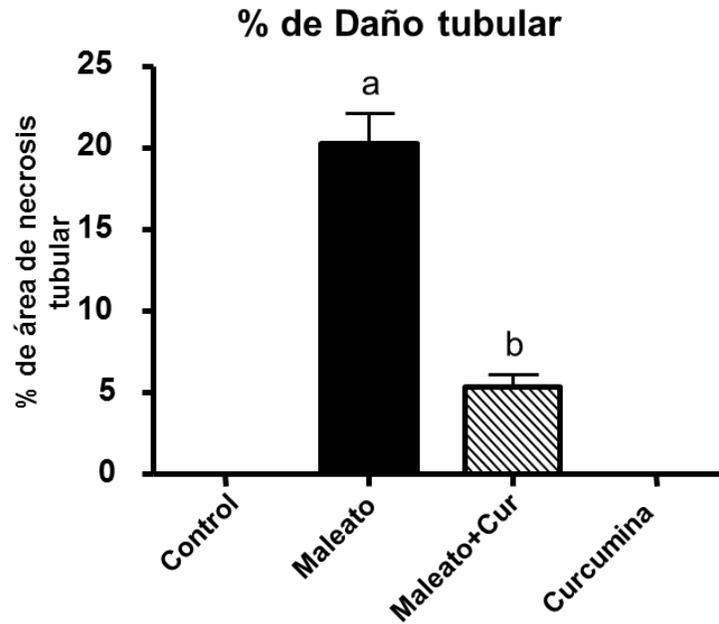


Figura 26. Porcentaje de daño epitelial tubular. Los datos se expresan como media \pm EEM, $n=7$ /grupo. Grupo: a) $p < 0.0001$ vs. Control; b) $p < 0.0001$ vs. Maleato.

6.9. NGAL

El NGAL es un marcador útil de inflamación o daño de los túbulos renales. En las Figuras 27 y 28 se puede observar que la administración de maleato aumentó significativamente la excreción urinaria de la proteína NGAL al inducir daño tubular. La excreción de NGAL se previno con la administración de curcumina. La administración de curcumina sin maleato, no indujo un cambio significativo en la expresión de NGAL comparado con el control.

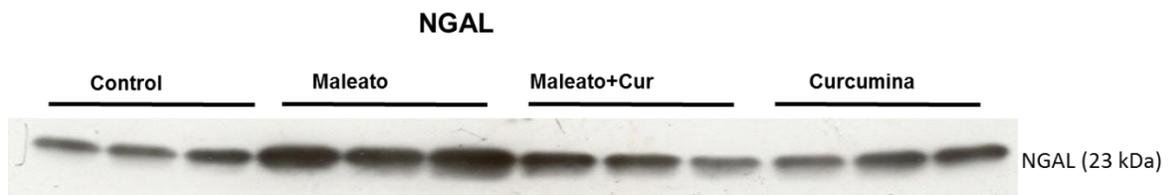


Figura 27. Western blot de la proteína NGAL

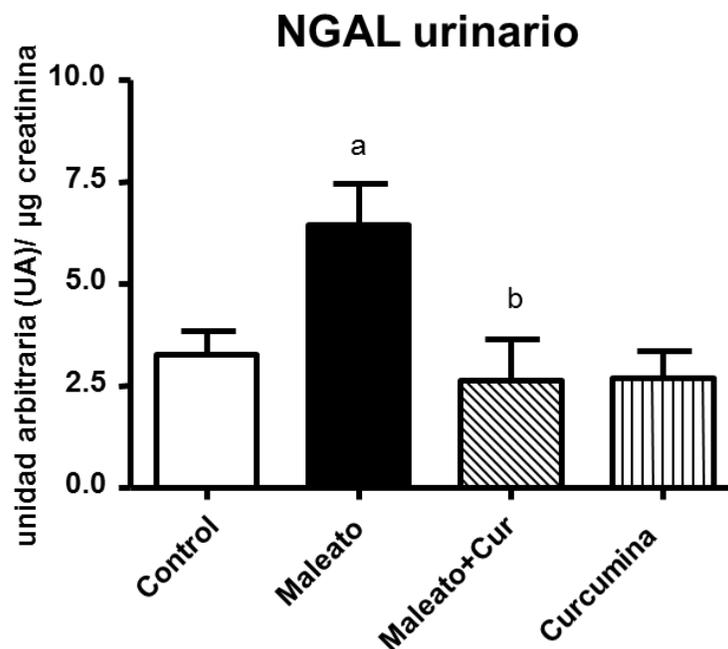


Figura 28. Expresión de la proteína NGAL. Los datos se expresan como media \pm EEM, n=7/grupo. Grupo: a) p<0.001 vs. Control; b) p<0.001 vs. Maleato. UA = Unidades arbitrarias

6.10. Marcadores de estrés oxidante

Para determinar el efecto del tratamiento con curcumina en nuestro modelo de IRA inducido por maleato, se evaluó el estrés oxidante. Los niveles de MDA y 4-HNE se midieron para evaluar la peroxidación de lípidos. Los niveles de MDA y 4-HNE aumentaron en el grupo administrado con maleato; dicho aumento se previno en el grupo administrado con curcumina antes de la inyección con maleato (Figuras 29 y 30). Para determinar la acción de las EROs en la oxidación de proteínas se realizó el ensayo de proteínas oxidadas (Figura 31) y se encontró un aumento en dichos niveles el cual se previno con la administración de curcumina antes del maleato. La administración de curcumina *per se* no indujo cambios en estos marcadores.

6.10.1. MDA

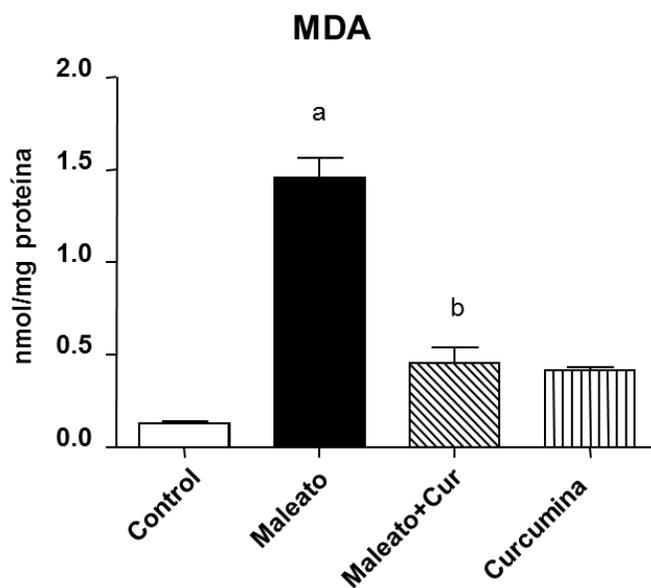


Figura 29. MDA. Los datos se expresan como media \pm EEM, n=7/grupo. Grupo: a) $p < 0.001$ vs. Control; b) $p < 0.001$ vs. Maleato.

6.10.2. 4-HNE

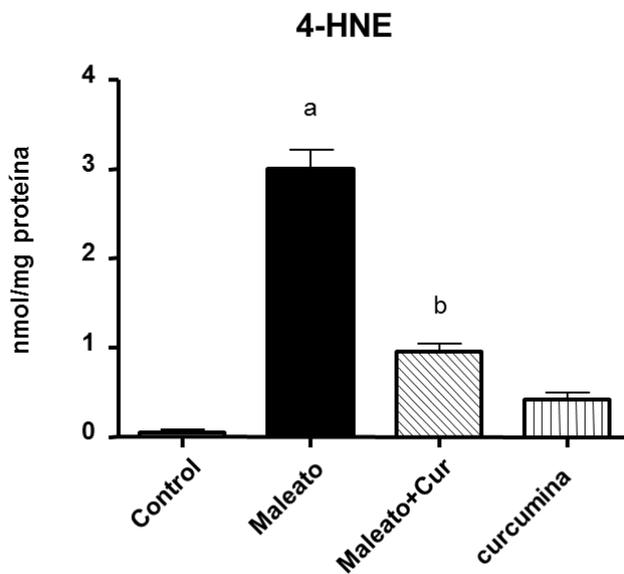


Figura 30. 4-HNE. Los datos se expresan como media \pm EEM, n=7/grupo. Grupo: a) $p < 0.001$ vs. Control; b) $p < 0.001$ vs. Maleato.

6.10.3. Proteínas oxidadas

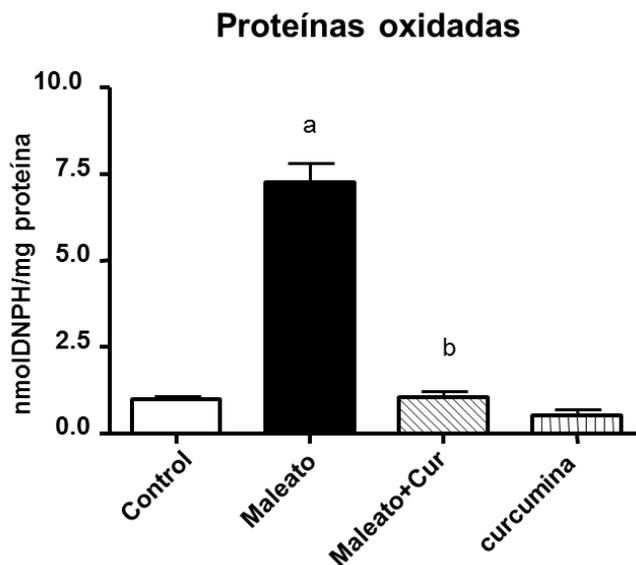


Figura 31. Proteínas oxidadas. Los datos se expresan como media \pm EEM, n=7/grupo. Grupo: a) p<0.001 vs. Control; b) p<0.001 vs. Maleato.

6.11. Actividad de SOD y niveles de Nrf2

6.11.1. Actividad de SOD

El $O_2^{\cdot-}$ es una ERO que se forman en los organismos aerobios, con consecuencias fatales si no es removido del organismo. La SOD es una de las enzimas antioxidantes más importante y representa la primera línea de defensa contra las EROs. La actividad de SOD disminuyó en el grupo administrado con maleato, mientras que en el grupo previamente tratado con curcumina la disminución de la actividad enzimática se previno (Figura 32). La administración *per se* de curcumina no alteró significativamente los valores de la SOD respecto al control.

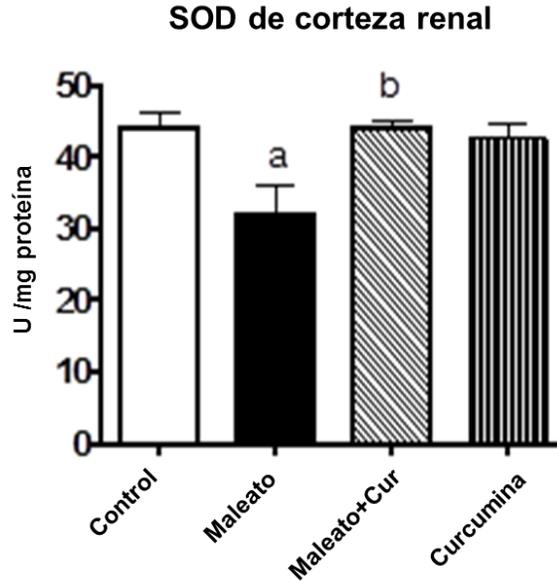


Figura 32. Actividad de la SOD en corteza de riñón. Los datos se expresan como media \pm EEM, n=7/grupo. Grupo: a) $p < 0.01$ vs. Control; b) $p < 0.01$ vs. Maleato.

6.11.2. Niveles del factor de transcripción Nrf2

El factor de transcripción Nrf2 es el responsable de la regulación de la expresión de genes cuyos productos proteicos están involucrados en la actividad antioxidante. El maleato disminuyó la expresión del factor Nrf2 la cual se previno en el grupo con maleato + curcumina. La curcumina *per se* no indujo cambios en la expresión de Nrf2 respecto al control (Figuras 33 y 34).

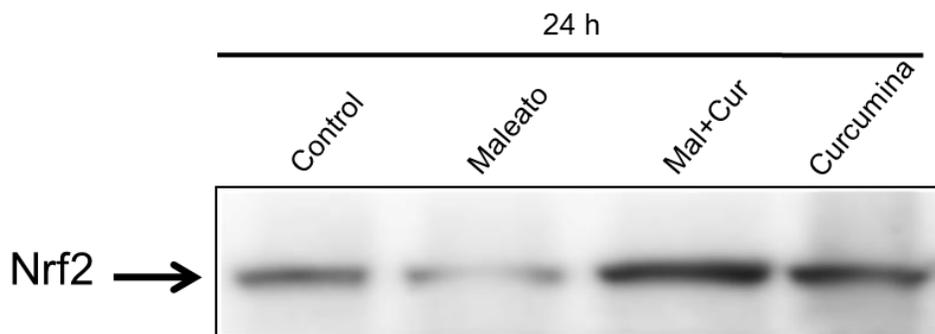


Figura 33. Western Blot de la transcripción Nrf2.

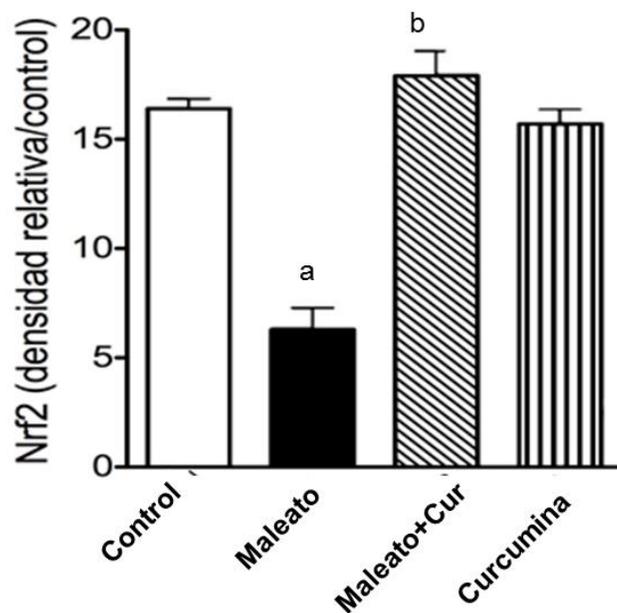


Figura 34. Expresión del factor de transcripción Nrf2. Los datos se expresan como media \pm EEM, n=7/grupo. Grupo: a) $p < 0.001$ vs. Control; b) $p < 0.001$ vs. Maleato.

7. Discusión de resultados

En este trabajo se encontró que la curcumina (120 mg/kg/día) protege contra la nefropatía por maleato, un modelo experimental del síndrome de Fanconi. En estudios previos se ha demostrado, en un modelo de daño renal crónico como el inducido por la nefrectomía 5/6, que la administración de curcumina en dosis de 60 mg/kg, 30 días antes del procedimiento quirúrgico, fue efectiva para prevenir alteraciones hemodinámicas y parámetros fisiológicos del riñón, mientras que una dosis de 120 mg/kg fue eficiente para favorecer la actividad enzimática y protección contra estrés oxidante en estudios agudos (Tapia *et al.*, 2013).

El daño renal producido por el maleato, se evidenció por alteraciones en los parámetros hemodinámicos RBF, RVR y FF, parámetros bioquímicos asociados al funcionamiento renal (excreción urinaria de sodio, proteinuria, glucosuria, excreción urinaria de NAG y NGAL), así como evidencias de daño a nivel histológico con aumento en la necrosis tisular. En los estudios de hemodinámica no se encontró que el maleato modificara la MAP ni la GFR lo que es coherente

con estudios previos en modelos de IRA (Basile *et al.*, 2012b; Nath *et al.*, 2010). En el análisis hemodinámico se encontró un incremento significativo en la RVR en el grupo tratado con maleato. Fadel *et al.* (2012) condujeron un estudio de inducción de estrés oxidante en el cual hallaron que EROs como $O_2^{\cdot-}$ y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) como anión peroxinitrito ($ONOO^-$) favorecen la constricción simpática en músculo. Por otro lado, Thomas *et al.* (2001) en su estudio encaminado a la vasoconstricción y su relación con infartos al miocardio encontraron que un aumento en los niveles de EROs y otros RL (que induce estrés oxidante) exacerbaban la vasoconstricción al inhibir la acción vasodilatadora del NO. Estos hallazgos ayudan a explicar lo encontrado en nuestro estudio donde se observa un aumento en la RVR provocada por la disminución del lumen vascular, haciendo que se desfavorezca el RBF (Figura 10). En 2004 Herget-Rosenthal *et al.* Definieron como característica, para uso clínico de detección de daño renal, una disminución del GFR. Incluso Hsu y Hsu (2011) indican que los valores disminuidos de GFR son un parámetro a considerar en el diagnóstico y evolución de IRA, de igual forma encontraron que un daño renal inducido por agentes tóxicos inducen una caída en el GFR. Los cambios hemodinámicos de GFR hallados en esta investigación no fueron significativos entre grupos, esto se puede explicar por el hecho de que la vasoconstricción inducida por EROs y ERNs afectó arterias posteriores a la sección glomerular, no afectando la filtración en el glomérulo. En los estudios de Basile *et al.* (2012b) y Burnett *et al.* (1984) se ha observado que los agentes que aumentan la resistencia vascular (angiotensina II o el factor auricular natriurético) de manera secundaria a una disminución del RBF, están asociados a una mayor porción del plasma que alcanza los túbulos, es decir un aumento en la FF tal y como se observó en este estudio (Figura 13).

El maleato induce daño renal al atacar preferentemente a los túbulos proximales (Eiam-ong, *et al.*, 1995) disminuyendo la capacidad de las células tubulares para reabsorber y degradar las proteínas filtradas al espacio urinario lo que se refleja en una proteinuria elevada (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2006; Christensen y Maunsbach, 1980). Los túbulos proximales juegan un papel en la reabsorción de agua y solutos como la glucosa en el riñón por mecanismos acoplados a Na^+ (Eiam-ong *et al.*,

1995). La administración de maleato inhibe las bombas asociadas a Na^+ que tiene como resultado glucosuria. Debido al elevado peso molecular de la NAG, esta no es filtrada por el glomérulo, su síntesis se encuentra a nivel renal en el túbulo proximal excretándose en la orina en mayores cantidades durante la necrosis (Liangos *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la excreción urinaria de NAG es de valor diagnóstico para la detección temprana de la lesión renal aguda. Mori y Nakao *et al.* (2007) han analizado modelos animales de IRA para encontrar marcadores moleculares de daño renal, hallando que NGAL está regulado a la alza tras el daño renal, por isquemia, nefrotoxicidad, daño parenquimal y rechazo de trasplante; encontraron que esta proteína es liberada pocas horas después de que se ha establecido el daño, estando presente antes de marcadores como creatinina y NAG, haciéndolo un marcador en "tiempo real". Incluso Mishra *et al.* (2004) demostraron que la administración i.p. o subcutánea de NGAL recombinante en ratones disminuye el daño por perfusión o isquemia; aunque aun cuando la expresión es evidente en horas y de gran magnitud no ofrece una protección suficiente para lesión tubular aguda exacerbada. Cuando hay una lesión aguda en el riñón, como en la necrosis tubular aguda, la reabsorción de sodio se afecta y hay un aumento en la excreción de sodio que resulta en niveles de sodio urinario elevadas (Jacob, 2003) aunado a la glucosuria y proteinuria, la osmolalidad de la orina se eleva claramente (Figura 17).

En modelos de daño renal como el inducido por maleato (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2006), nefrectomía 5/6 (Tapia *et al.*, 2013), ifosfamida (Nissim y Weinberg, 1996), acetaminofén (Cekmen *et al.*, 2009) e isquemia-reperfusión (Hammad *et al.*, 2012), se ha encontrado un daño histológico con cambios morfológicos incluyendo degeneración epitelial tubular, vacuolización, descamación celular, necrosis y distensión tubular con material necrótico. Estos datos concuerdan con los obtenidos en este proyecto. La administración previa de curcumina fue capaz de prevenir el daño histológico renal gracias a su actividad antioxidante (Carl *et al.*, 2014).

El estrés oxidante puede promover la formación de una variedad de mediadores vasoactivos que pueden afectar la función renal directamente causando vasoconstricción renal y decremento de la capilaridad glomerular, coeficiente de ultrafiltración, y de la GFR (Tirkey *et al.*, 2005). Shoskes (1998) y Trujillo *et al.* (2013) demostraron que parte de la actividad protectora de la curcumina reside en la regulación a la baja de citocinas profibróticas, del factor de crecimiento endotelial vascular y del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). También reduce las respuestas renales de inflamación por la atenuación de la infiltración renal de macrófagos, atenuación de la óxido nítrico sintasa inducible, de los niveles del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa\beta$) y de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). En general la función de la mayoría de estos factores es liberar directa o indirectamente NO (molécula importante en estrés oxidante ya que favorece la formación del peroxinitrito citotóxico), y actuando como moduladores vasoactivos así como favoreciendo la formación de tejido fibrótico, muerte celular y aumento de la permeabilidad vascular. Además la curcumina presenta una amplia actividad antioxidante gracias a su estructura polifenólica (Bengmark, 2006). La administración previa de curcumina favoreció la modulación de los factores antes mencionados y en consecuencia la reversión de las alteraciones hemodinámicas (RBF, RVR y FF) y alteraciones en el filtrado tubular (excreción urinaria de proteínas, glucosa y sodio) causados por estrés oxidante, reafirmando su capacidad antioxidante (Figura 29).

La administración de maleato fomentó un desequilibrio entre las EROs formadas y la actividad antioxidante endógena al aumentar la producción de las primeras y exacerbar la depleción de moléculas antioxidantes como GSH lo que conduce a estrés oxidante. Las EROs son capaces de reaccionar con los dobles enlaces de los ácidos lipídicos poliinsaturados (PUFAs) formando lípidos hidroperoxidados y otros subproductos como el MDA y 4-HNE que tienen actividad citotóxica, de igual forma las EROs pueden reaccionar con los grupos aromáticos de las proteínas, oxidándolas o carbonilándolas (Sung *et al.*, 2013). La curcumina previno el incremento de la MDA y 4-HNE (peroxidación lipídica) así como de las proteínas

oxidadas resultado del estrés oxidante inducido por maleato (Figura 29); esto gracias al mecanismo antioxidante de la curcumina que se debe a la estructura específica conjugada de dos fenoles metoxilados y una forma enol de β -dicetona. Esta estructura es responsable de la capacidad de captura de radicales libres como un antioxidante de ruptura de la cadena, además de tener una gran capacidad quelante que le permite “secuestrar” iones metálicos que pueden promover el estrés oxidante y daño celular (Aziza *et al.*, 2014).

Las propiedades defensivas de la curcumina parecen estar mediadas por su capacidad de neutralización de radicales libres directa o indirectamente a través de la regulación de los sistemas de antioxidantes celulares endógenos que incluyen la inducción por Nrf2 (Figura 29). El Nrf2 en realidad realiza el papel de un activador transcripcional del ARE lo que induce la expresión de genes. Esto incluye a la fase II de desintoxicación, enzimas como la hemo oxigenasa-1 (HO-1), la GPx, la subunidad moduladora de gamma-glutamil cisteína ligasa (involucrada en la síntesis de glutatión), la SOD y la NADPH: quinona oxidoreductasa-1 (NQO1). Por lo tanto, la modulación de estos genes, podría ser un factor que contribuye a las propiedades antioxidantes y citoprotectoras de la curcumina. En el presente estudio se pudo observar que la expresión del factor Nrf2 y la actividad de la SOD se vieron favorecidas por la administración previa de la curcumina a la inyección de maleato (Alrawaiq y Abdullah, 2014).

Esquema integrativo de los factores asociados a la renoprotección de la curcumina			
	Blancos estudiados	Resultados experimentales (maleato + curcumina vs. maleato)	Efecto del tratamiento con curcumina
Parámetros hemodinámicos	MAP RBF GFR RVR FF	↑RBF ↓RVR ↓FF MAP y GFR sin cambios	Atenuación de la actividad de citocinas proinflamatorias bloqueando su sobreexpresión.
Parámetros bioquímicos	Proteinuria Glucosuria Natriuria Osmolalidad NAG NGAL	↓Proteinuria ↓Glucosuria ↓Natriuria ↓Osmolalidad ↓NAG ↓NGAL	Mediante la acción antioxidante directa sobre RL, EROs y ERNs, disminuye el daño tubular generado por estrés oxidante inducido con la administración de maleato.
Histología	Epitelio tubular	↓ daño tubular ↓ necrosis tubular	
Marcadores de daño oxidante	MDA 4-HNE Proteínas oxidadas	↓MDA ↓4-HNE ↓Proteínas oxidadas	
Antioxidantes	SOD	↑ Actividad SOD	Aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes y la expresión mediante la activación de ARE por Nrf2.
Factores de Transcripción	Nrf2	↑ Expresión factor Nrf2	Previene la degradación del Nrf2 por ubiquitinación.

Figura 29. Esquema representativo de hallazgos. MAP: presión arterial media; RBF: flujo sanguíneo renal; GFR: tasa de filtración glomerular; RVR: resistencia vascular renal; FF: fracción de filtración; NAG: n-acetil-β-D-glucosaminidasa; NGAL: lipocaína asociada a galatinasa de neutrófilo; MDA: malondialdehído; 4-HNE: 4-hidroxinonenal; SOD: superóxido dismutasa; Nrf2: factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45.

8. Conclusión

El presente estudio constituye uno de los pocos trabajos realizados de un modelo agudo reversible que utilizan maleato y curcumina

La administración de curcumina a una dosis de 120 mg/kg/día, previa a la inyección de maleato, previno las alteraciones inherentes al daño renal en el modelo de nefropatía inducida por maleato (alteraciones hemodinámicas, bioquímicas e histológicas). Esta protección se asoció con la atenuación directa del daño oxidante y activación indirecta de sistemas de respuesta antioxidante.

La administración de curcumina sin la inducción de daño tubular, no altera significativamente los valores de los parámetros medidos en relación con el control.

9. Perspectivas

Se propone realizar un curso temporal para poder determinar cuándo se presenta el máximo daño renal inducido por el maleato.

Con el fin de profundizar más en el efecto antioxidante indirecto de la curcumina, se podría determinar la actividad de otras enzimas citoprotectoras como GPx, GR, GST, HO-1 y CAT. En nuestro caso se midió la actividad de la SOD total, pero podría medirse la actividad de cada isoenzima.

Para dar seguimiento a este estudio, también se sugiere realizar la medición de ATP ya que es un marcador muy importante en las tubulopatías.

Sería de importancia medir más moléculas que evidencien el daño tubular proximal como la KIM-1 (Molécula de lesión renal 1) y un estudio para detectar DNA fragmentado como el TUNEL.

Sería de interés determinar el grado de riesgo asociado a la exposición de maleato en el sector público en torno a sustancias que contengan dicha molécula (industrias de pintura automotriz, barnices, resinas, fertilizantes y en la industria

farmacéutica). Un estudio retrospectivo de la incidencia de falla renal en este grupo expuesto a maleato sería de apoyo para dicho propósito.

10. Referencias.

- **Ahmad M.** 2013. Protective effects of curcumin against lithium-pilocarpine induced status epilepticus, cognitive dysfunction and oxidative stress in young rats. *Saudi journal of biological sciences* 20(2):155-162.
- **Alrawaiq NS,** Abdullah A. 2014. A Review of Antioxidant Polyphenol Curcumin and its Role in Detoxification. *International Journal of PharmTech Research* 6(1):280-289.
- **Aziza SAH.** Azab MES. El-Shall CK. 2014. Protective Effect of Curcumin on Antioxidant Defense System and Oxidative Stress in Liver Tissue of Iron Overloading Rats. *Asian Journal of Clinical Nutrition* 6(1): 1-17.
- **Basile DP,** Anderson MD, Sutton TA. 2012a. Pathophysiology of acute kidney injury. *Comprehensive physiology* 2(2):1303-1353.
- **Basile DP,** Leonard EC, Beal AG, Schuleuter D, Friedrich J. 2012b. Persistent oxidative stress following renal ischemia-reperfusion injury increases ANG II hemodynamic and fibrotic activity. *American journal of physiology. Renal physiology* 302(11): F1494-1502.
- **Bengmark S.** 2006. Curcumin: an atoxic antioxidant and natural NFkappaB, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *Journal of parenteral and enteral nutrition* 30 (1): 45-51.
- **Berlett BS,** Stadtman ER. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 272 (1): 20313-20316.
- **Blokhina O,** Virolainen E, Fagersted KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany* 91 (2): 179-194.

- **Burnett JC**, Granger JP, Opgenorth TJ. 1984. Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and renin release; *American journal of physiology* 247 (5 Pt 2): F863-866.
- **Carey F**. 2006. Química Orgánica; 6° ed.; Editorial McGraw-Hill Interamericana; México; cap.19.
- **Carl H**, Chandni A, Neha K, Trishna S, Vani R. 2014. Curcumin as a modulator of oxidative stress during storage: A study on plasma. *Transfusion and apheresis science* S1473-0502(13):375-383.
- **Cekmen M**, Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Somay A, Ersoz C. 2009. Curcumin prevent oxidative renal damage induced by acetaminophen in rats. *Food and chemical toxicology* 47(7):1480-1484.
- **Chattopadhyay I**, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. 2004. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Current science* 87(1): 44-53.
- **Christensen EI**, Maunsbach AB. 1980. Proteinuria induced by sodium maleate in rats: Effects on ultrastructure and protein handling in renal proximal tubule. *Kidney international* 17(6): 771-787.
- **Coor C**, Salmon RF, Quigley R, Marver D, Baum M. 1997. Role of adenosine triphosphate (ATP) and NaK ATPase in the inhibition of proximal tubule transport with intracellular cystine loading. *The Journal of clinical investigation* 87(3): 955–961.
- **Davidson WD**, Sackner MA. 1963. Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *Journal of laboratory & clinical medicine* 62(1): 351-356.
- **Davies KJ**. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *International union of biochemistry and molecular biology life* 50(4-5): 279–289.
- **Devarajan P**. 2010. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomarkers in medicine* 4(2):265-280.
- **Díaz de León PM**. 2005. Aristondo MG, Briones GJ. Medicina crítica: Diagnóstico y terapéutica. 2°ed. Editorial Patria. México.

- **Díaz-Portillo J**, Fernández-del Barrio MT, Paredes-Salcido F. 1997. Aspectos básicos de bioquímica clínica. 1°ed. Editorial Díaz de Santos. España; pp.34
- **Dinkova-Kostova AT**, Talalay P. 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Molecular nutrition and food research* 52(1): S128-S138.
- **Eiam-ong S**, Spohn M, Kurtzman NA, Sabatini S. 1995. Insights into the biochemical mechanism of maleic acid-induced Fanconi syndrome. *Kidney international* 48(5):1542-1548.
- **Espinoza-Sevilla A**, Amezcua-Macías I, Ruiz-Palacios P, Rodríguez-Weber F, Díaz-Greene E. 2013. Nuevos marcadores de lesión renal aguda en el enfermo grave. *Medicina interna de México* 29(5):513-517.
- **Fadel PJ**, Farias IM, Gallagher KM, Wang Z, Thomas GD. 2012. Oxidative stress and enhanced sympathetic vasoconstriction in contracting muscles of nitrate-tolerant rats and humans. *The Journal of physiology* 590(Pt2): 395-407.
- **Farombi EO**, Shrotriya S, Na HK, Kim SH, Surh YJ. 2008. Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1. *Food and chemical toxicology* 46(4): 1279–1287.
- **Felthouse TR**, Burnett JC, Horrell B, Mummey MJ, Kuo YJ. 2001. Maleic anhydride, maleic acid, and fumaric acid. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Consultado en: <http://www.southalabama.edu/chemistry/barletta/felthouse.pdf>.
- **Geller RG**, Margolius HS, Pisano JJ, Keiser HR. 1972. Effects of mineralocorticoids, altered sodium intake, and adrenalectomy on urinary kallikrein in rats. *Circulation research* 31(6):857-861.
- **Gupta SC**, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. 2012. Discovery of curcumin, a component of the golden spice, and its miraculous biological activities. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 39(3): 283-299.
- **Guyton A**, Hall J; 2001 Tratado de Fisiología Médica; 10° ed.; México; McGraw-Hill Interamericana; Cap. 26.

- **Hammad FT**, Al-Salam S, Lubbad L. 2012. Curcumin provides incomplete protection of the kidney in ischemia reperfusion injury. *Physiological research* 61(5):503-511.
- **He JC**, Chuang PY, Ma'ayan A, Iyengar R. 2012. Systems biology of kidney diseases. *Kidney international* 81(1): 22–39.
- **Herget-Rosenthal S**, Marggraf G, Hüsing J, Göring F, Pietruck F, Janssen O, Philipp T, Kribben A. 2004. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney international* 66(3):1115–1122.
- **Himmelfarb J**, McMonagle E, Freedman S, Klenzak J, McMenamin E, Le P, Pupim LB, Ikizler TA, the PICARD group. 2004. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* 15(9): 2449–2456.
- **Horak E**, Hopfer SM, Sunderman FW Jr. 1981. Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity. *Clinical chemistry* 27(7):1180-1185.
- **Houglum K**, Filip M, Witztum JL, Chojkier M. 1990. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts in plasma and liver of rats with iron overload. *The Journal of clinical investigation*. 86(6):1991-1998.
- **Hsu RK**, Hsu CY. 2011. Proteinuria and reduced glomerular filtration rate as risk factors for acute kidney injury. *Current opinion in nephrology and hypertension* 20(3): 211–217.
- **Husdan H**, Rapoport A. 1968. Estimation of creatinine by the Jaffe reaction. A comparison of three methods. *Clinical chemistry* 14(3):222-238.
- **Izzedine H**, Launay-Vacher V, Isnard-Bagnis C, Deray G. 2003. Drug-induced Fanconi's syndrome. *American journal of kidney diseases* 41(2): 292-309.
- **Jacob R**. 2003. Acute renal failure. *Indian journal of anaesthesia* 47(5) 367-372.
- **Koumantakis G**, Wyndham LE. 1989. An evaluation of osmolality measurement by freezing point depression using micro-amounts of sample. *Journal of automated methods & management in chemistry* 11(2):80-83.

- **Lameire N**, Van Bisen W, Vanholer R. 2006. The Rise of prevalence and the fall of mortality of patients with acute renal failure: what the analysis of two databases does and does not tell us. *Journal of the American Society of Nephrology* 17(4):923-925.
- **Levine RL**, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods enzymology* 186(1):464-78.
- **Levy EM**, Viscoli CM and Horwitz RI. 1996. The effect of acute renal failure on mortality: a cohort analysis. *the journal of American Medical Association* 275(19):1489-1494.
- **Li PK**, Burdmann EA, Mehta RL. 2013. Acute kidney injury: global health alert. *Kidney international* 2(2):90–97.
- **Liangos O**, Perianayagam MC, Vaidya VS, Han WK, Wald R, Tighiouart H, MacKinnon RW, Li L, Balakrishnan VS, Pereira BJ, Bonventre JV, Jaber BL. 2007. Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *Journal of American Society of Nephrology* 18(3):904-912.
- **Limón-Pacheco J**, Gonsebatt ME. 2008. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation research* 674(1-2):137–147.
- **Lott JA**, Stephan VA, Pritchard KA Jr. 1983. Evaluation of the Coomassie Brilliant Blue G-250 method for urinary protein. *Clinical chemistry* 29(11):1946-1950.
- **Mannervik B**. 2012. Five decades with glutathione and the GSTome. *The Journal of biological chemistry* 287(9):6072-6083.
- **Marnett L**. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21(3): 361-370.
- **Melo V**, Cuamatzi O. 2006. Bioquímica de los procesos metabólicos; Editorial Reverté; México; pp. 125.
- **Meloche VW**. 1956. Flame photometry. *Analytical chemistry* 28(12):1844–1847.

- **Mishra J**, Mori K, Ma Q, Kelly C, Yang J, Mitsnefes M, Barasch J, Devarajan P. 2004. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Journal of American Society of Nephrology* 15(12):3073-3082.
- **Mori K**, Nakao K. 2007. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney international* 71(10):967-70.
- **Nandi A**, Chatterjee IB. 1988. Assay of superoxide dismutase activity in animal tissues. *Journal of biosciences* 13(3):305-315.
- **Nath KA**, Hernández MC, Croatt AJ, Katusic ZS, Juncos LA. 2010. Heme oxygenase activity as a determinant of the renal hemodynamic response to low-dose ANG II. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 299(5): R1183-1191.
- **Nelson D**, Cox M. 2009. Lehninger: Principios de Bioquímica; 5° ed. Editorial Omega. España. pp. 15e. y cap. 19.
- **Nissim I**, Weinberg JM. 1996. Glycine attenuates Fanconi syndrome induced by maleate or ifosfamide in rats. *Kidney international* 49(3):684-695.
- **Nguyen T**, Huang HC, Yang CS, Pickett CB. 2003. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *The Journal of biological chemistry* 278(7):4536-4541.
- **Noiri E**, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, Brodsky S, Goligorsky MS. 2001. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *American journal of physiology. Renal physiology* 281(5): F948–F957.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- **Okada K**, Wangpoengtrakul C, Tanaka T, Toyokuni S, Uchida K, Osawa T. 2001. Curcumin and especially tetrahydrocurcumin ameliorate oxidative stress-induced renal injury in mice. *The Journal of nutrition* 131(8):2090-2095.
- **Pacanis A**, Strzelecki T, Rogulski J. 1981. Effects of maleate on the content of CoA and its derivatives in rat kidney mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 256(24):13035-13038.

- **Paller MS**, Hoidal JR, Ferris TF. 1984. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *The Journal of clinical investigation* 74(4):1156-1164.
- **Pedraza-Chaverri J**, Cárdenas-Rodríguez N. 2005. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes, aspectos básicos. *Educación química* 17(2).
- **Pedraza-Chaverri J**, Murali NS, Croatt AJ, Alam J, Grande JP, Nath KA. , 2006. Proteinuria as a determinant of renal expression of heme oxygenase-1: studies in models of glomerular and tubular proteinuria in the rat. *American journal of physiology. Renal physiology* 290(1):F196-F204.
- **Rahman K**. 2007 .Studies on free radicals, antioxidants, and co-factor. *Clinical interventions in aging* 2(2):219-236.
- **Reddy AC**. Lokesh BR. 1992. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Molecular and cellular biochemistry* 111(1-2):117-124.
- **Rodríguez J**. 1996. Biología molecular de las tubulopatías hereditarias: Del fenotipo al gen. *Revista de nefrología* 16(3):208-219.
- **Roth KS**, Foreman JW, Segal S. 1981. The Fanconi syndrome and mechanisms of tubular transport dysfunction. *Kidney international* 20(6):705-716.
- **Sawas-Dimopoulou C**, Sigalas I, Margaritis L. 1996. Induction of an experimental Fanconi syndrome in mice: Its effect on the glomerular filtration function studied by ^{99m}Tc-DTPA. *Nuclear medicine and biology* 23(6):807-812.
- **Schrier RW**, Wang W, Poole B, Mitra A. 2004. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *The Journal of clinical investigation* 114(1):5–14.
- **Shoskes D**. 1998. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation* 66(2):147-152.
- **Sung CC**, Hsu YC, Chen CC, Lin YF, Wu CC. 2013. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013:301982.

- **Tapia E**, Zatrain-Barrón ZL, Hernández-Pando R, Zarco-Márquez G, Molina-Jijón E, Cristóbal-García M, Santamaria J, Pedraza-Chaverri J. 2013. Curcumin reverses glomerular hemodynamic alterations and oxidant stress in 5/6 nephrectomized rats. *Phytomedicine* 20(3-4):359–366.
- **Thomas GD**, Zhang W, Victor RG. 2001. Impaired modulation of sympathetic vasoconstriction in contracting skeletal muscle of rats with chronic myocardial infarctions, role of oxidative stress. *Circulation research* 88(8): 816-823.
- **Tirkey N**, Kaur G, Vij G, Chopra K. 2005. Curcumin, a diferuloylmethane, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rat kidneys. *BioMedCentral Pharmacology* 5(1):15.
- **Toto RD**. 1995. Conventional measurement of renal function utilizing serum creatinine, creatinine clearance, inulin and para-aminohippuric acid clearance. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 4(6):505-509.
- **Trujillo J**, Chirino Y, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. 2013. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox biology* 1(1): 448-456.
- **Vaziri ND**, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. 2003. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney international* 63(1):179–185
- **Ware LB**, Johnson AC, Zager RA. 2011. Renal cortical albumin gene induction and urinary albumin excretion in response to acute kidney injury. *American journal of physiology. Renal physiology* 300(3): F628–F638.
- **Xiang C**, Werner BL, Christensen EM, Oliver DJ. 2001. The Biological functions of glutathione revisited in arabidopsis transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant physiology* 126 (2): 564-574.
- **Zager RA**, Johnson AC, Naito M, Bomsztyk K. 2008. Maleate nephrotoxicity: mechanisms of injury and correlates with ischemic/hypoxic tubular cell death. *American journal of physiology. Renal physiology* 294(1): F187–F197.