



Universidad Nacional Autónoma de México

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Efecto citoprotector de la morina contra el
daño por cisplatino en las células LLC-PK1.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Claudia Bello Alvarez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Pedraza Chaverri: Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas: Facultad de Odontología

Dr. José de Jesús García Valdés: Facultad de Química

Ciudad Universitaria. Cd. Mx. Junio, 2017



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.

Agradecimientos

El curso de mis estudios de Maestría me convirtió en una persona más completa, a nivel profesional y personal. Por esta razón quiero agradecer a todas las personas e instituciones que de alguna manera contribuyeron a este resultado.

A la Facultad de Química de la UNAM, entidad académica que me recibió y donde pude desarrollar mi trabajo.

A Conacyt por brindarme el apoyo económico.

A mis colegas del laboratorio por la compañía y los consejos.

A Angela, una gran amiga que me brindó su apoyo en todo momento y con su actitud me ayudó a seguir adelante en los momentos de mayor desaliento.

A mi asesor José Pedraza Chaverri por recibirme en su laboratorio.

A Omar Medina Campos por todos los conocimientos que adquirí con sus pláticas y demostraciones.

A mis tíos, Raúl y Annia, son muchas las cosas que tendría que escribir, pero ellos saben que no tengo como pagarles lo geniales que han sido conmigo.

A mi madre, mi eterna amiga, gracias por tanto amor y apoyarme en todos mis sueños.

A Juan Pablo, porque aunque muy lejos físicamente hemos hecho este viaje juntos.

Resumen

El cisplatino es un fármaco antineoplásico ampliamente utilizado en el tratamiento de tumores sólidos. Los pacientes bajo su régimen desarrollan diversos efectos adversos, siendo la nefrotoxicidad, el de mayor incidencia y peligro para la salud. La nefrotoxicidad por cisplatino se asocia con el estrés oxidante, la inflamación y la apoptosis. Hasta el momento, no existe un tratamiento totalmente efectivo para prevenir la toxicidad por cisplatino en el riñón. Por otra parte, la actividad antioxidante de los flavonoides, compuestos naturales presentes en las plantas, ha cobrado importancia en los últimos años. Se ha visto que la morina, una pentahidroxi flavona, posee actividad citoprotectora frente a diversos daños en modelos *in vitro* e *in vivo*. Esta protección se asocia con efectos antioxidantes, anti-inflamatorios y anti-apoptóticos. Es por esto que su uso podría contrarrestar los efectos nefrotóxicos causados por el cisplatino a través de la regulación del sistema antioxidante y la modulación negativa de elementos de la vía de apoptosis. El principal objetivo de esta investigación fue **determinar y caracterizar el efecto de la morina contra el daño causado por cisplatino en la línea celular LLC-PK1, así como la interferencia con este antineoplásico en la toxicidad sobre la línea tumoral HTB-4.** Para llevarlo a cabo se determinó la viabilidad celular por las técnicas de MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) y FDA (diacetato de fluoresceína), así como la expresión de proteínas, por la metodología de Western blot. En este trabajo se encontró: que la morina captura H_2O_2 en condiciones libre de células; atenúa el daño por cisplatino y eleva la expresión de HO-1 (hemo oxigenasa 1) en las células LLC-PK1. Además se observó que la utilización de un inhibidor de HO-1 revirtió la atenuación del daño por cisplatino. Por otra parte, se encontró que la morina disminuye la viabilidad de las células tumorales HTB-4 y que de alguna manera interfiere con la toxicidad del cisplatino. Concluyendo de esta manera: que la morina ejerce un moderado efecto citoprotector contra el daño por cisplatino en las células LLC-PK1, de una manera tiempo y concentración dependiente; que la HO-1 media el efecto citoprotector de la morina frente al daño por cisplatino en las células LLC-PK1 y que la morina interfiere con la toxicidad del cisplatino en las células HTB-4.

Glosario de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIF: factor de inducción de apoptosis.

AP-1 y 2: proteínas activadoras 1 y 2.

Apaf-1: proteasa activadora de la apoptosis, factor 1.

ARN: ácido ribonucleico

ATP: trifosfato de adenosine.

Casp-12: caspasa 12

Casp-3: caspasa 3

Casp-9: caspasa 9

CO: monóxido de carbono

CO₂: dióxido de carbono

ctr1: transportador de cobre 1

CYP: citocromo P450.

DHE: dihidroetidio.

DMEN: medio Eagle modificado de dubelco.

DPI: difenileneiodonio

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

ERKs: cinasas reguladas por señales extracelulares.

EROs: especies reactivas del oxígeno.

FasR: receptor Fas.

FDA: diacetato de fluoresceína.

GGT: gamma-glutamyl transpeptidasa

GPx: glutatión peroxidasa.

GSH: glutatión reducido.

GSSG: glutatión oxidado.

GST: glutatión-S-transferasa.

GSTP: glutatión-S-transferasa *pi*.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

HO-1: hemo oxigenasa 1.

HRP: peroxidasa de rábano.

IFN- γ : interferón gamma

IL-10: interleucina 10.

IL-1 β : interleucina 1 beta.

IL-6: interleucina 6.

Keap1: proteína 1 asociada a Kelch y parecida a ECH.

LPH: lactosa-floricina hidrolasa

MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos

MATE1: transportador de extrusión multidroga 1

MTT: bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Nf- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NOS: sintasa de óxido nítrico.

NOX: NADPH oxidasa

Nrf2: factor nuclear derivado de eritroide 2.

OCT 1 y 2: transportador de cationes orgánicos 1 y 2

PBS: tampón fosfato salino

PKC: proteína cinasa C

pro-casp 8: pro-caspasa 8

SFB: suero fetal bovino.

sGC: guanilato ciclasa soluble.

SGLT1: transportador de glucosa glut 1.

siRNA: RNA pequeño de interferencia.

SNC: sistema nervioso central.

SnM321: mesoporfirina de estaño.

SOD: superóxido dismutase.

TNFR 1 y 2: receptor del factor de necrosis tumoral 1 y 2.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

Contenido	
1. Introducción	9
2. Marco teórico	12
2.1 Cisplatino, historia y uso	12
2.2 Nefrotoxicidad por cisplatino	12
2.2.1 Características clínicas de la nefrotoxicidad por cisplatino	12
2.3 Transporte y metabolismo del cisplatino en la célula	13
2.4 Blancos moleculares del cisplatino	15
2.5 Mecanismos de inducción de toxicidad del cisplatino	17
2.5.1 Inducción de estrés oxidante	17
2.5.3 Cisplatino e inflamación	26
2.6 Avances y perspectivas en el desarrollo de estrategias nefroprotectoras contra el daño por cisplatino	27
2.7 Flavonoides	28
2.7.1 Absorción y biodisponibilidad de los flavonoides	30
2.7.2 Los flavonoides como pro-oxidantes en las células tumorales	32
3. Planteamiento del problema	33
3.1 Hipótesis	33
3.1.1 Objetivo	33
4. Materiales y métodos	35
4.1 Células y reactivos	35
4.2 Capacidad de captura de H₂O₂ por la morina	35
4.3 Viabilidad de las células LLC-PK1, pre-tratadas con morina y enfrentadas a cisplatino	36
4.4 Viabilidad de las células HTB-4 pre-tratadas con morina y enfrentadas a cisplatino	37
4.5 Fraccionamiento	37
4.6 Determinación de la expresión de proteínas en las células LLC-PK1	37
4.7 Estadística	38
5. Resultados	39
5.1 Capacidad de captura de H₂O₂ por la morina	39

5.2 La morina en su vehículo (metanol), no resulta tóxica para las células LLC-PK1 en las concentraciones estudiadas.....	40
5.3 El cisplatino disminuyó la viabilidad de las células LLC-PK1.....	40
5.4 Atenuación de la toxicidad inducida por cisplatino en las células LLC-PK1....	41
5.5 Expresión de la casp-3 en las células LLC-PK1 pre-tratadas con morina y enfrentadas cisplatino.	43
5.6 Expresión de las enzimas GST y HO-1 en las células LLC-PK1.....	44
5.7 El pre-tratamiento con morina mantiene la expresión de la HO-1 después de la administración de cisplatino.....	45
5.8 La morina no induce el aumento de expresión del factor de transcripción Nrf2 en el núcleo.....	46
5.9 El inhibidor SnM321, revirtió la atenuación contra el daño por cisplatino, ejercido por la morina.....	47
5.10 La morina disminuye la viabilidad de las células HTB-4 a 200 µM y afecta la toxicidad por cisplatino.....	48
6. Discusión.....	49
7. Conclusiones	55
8. Bibliografía	56

1. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Los pacientes sometidos a quimioterapia, sufren una variedad de efectos adversos, que entre otras causas, son provocados por la elevación de EROs (especies reactivas del oxígeno) que generan los fármacos antineoplásicos. El aumento en la peroxidación lipídica, la reducción de la capacidad total de captura de radicales y una marcada reducción en los niveles de glutatión, en plasma, son evidencias que así lo demuestran. Entre los agentes antineoplásicos que mayores niveles de EROs generan se encuentran las antraciclinas, como la doxorubicina, las epipodofilotoxinas como el etopósido, las camptotecinas como el topotecán y los agentes alquilantes como el cisplatino¹.

El cisplatino es un fármaco quimioterapéutico que se ha utilizado hace ya más de cuatro décadas, cuando fue accidentalmente descubierto. Se prescribe preferencialmente en el tratamiento de tumores en cabeza y cuello, pulmones, ovarios, cuello del útero, vejiga y testículos¹¹. Según la base de datos ClinicalTrials.gov existen más de 500 tratamientos activos que incluyen a este fármaco.

La actividad antineoplásica del cisplatino es potente, más del 90% de los cánceres testiculares son resueltos con este tratamiento, sin embargo, su uso está limitado por dos factores fundamentales: desarrollo de resistencia en algunos tumores y los severos efectos colaterales². Las náuseas y vómitos, ototoxicidad, neurotoxicidad y nefrotoxicidad están entre los principales efectos adversos del cisplatino. En el caso de la nefrotoxicidad, la prevalencia es alta, uno de cada tres pacientes tratados con cisplatino la padece¹. La nefrotoxicidad por cisplatino puede presentarse como daño agudo al riñón, hipomagnesemia, síndrome de Fanconi, hipocalcemia, acidosis renal del túbulo distal, e hiperuricemia. El daño agudo al riñón es el más importante para la salud y de mayor prevalencia, entre un 20 y 30% de los pacientes lo desarrollan³. La recuperación de la función renal ocurre en un período de dos a cuatro semanas, sin embargo, ciclos de tratamiento con cisplatino pueden resultar en nefrotoxicidad permanente⁴.

A lo largo de las investigaciones sobre la nefrotoxicidad por cisplatino, una gran cantidad de estudios genéticos, moleculares y farmacológicos han sido conducidos en el intento de encontrar terapias para la nefroprotección. Estas estrategias terapéuticas se han clasificado

con base en los blancos a los que están dirigidas. Se ha intentado disminuir la captura del cisplatino por las células renales, interferir con la bioactivación metabólica del cisplatino, bloquear las vías de muerte celular y más recientemente se ha comenzado a estudiar la relevancia de antioxidantes en la prevención o atenuación del daño por cisplatino¹².

Cuando se busca una estrategia terapéutica contra la toxicidad de un agente antineoplásico, es muy importante considerar su efecto sobre la actividad anticarcinogénica. Desafortunadamente, muchos de los estudios dirigidos a la nefroprotección se han conducido sólo en células renales o en animales libres de tumores. Por esta razón, se hace necesario continuar en la búsqueda de tratamientos efectivos, prestando especial atención al aspecto antes mencionado.

Existen varios trabajos que refieren la capacidad de diversos antioxidantes para atenuar el daño por cisplatino en modelos *in vitro* e *in vivo*. El pre-tratamiento con hesperidina y rutina, dos abundantes flavonoides, disminuyó el daño por cisplatino en ratas macho, lo que se hizo evidente por la restauración de la función renal y la disminución de marcadores de estrés oxidante³. Las células derivadas de túbulo proximal de riñón de cerdo (LLC-PK1) tratadas con tetra-hidrocurcumina presentaron menor disminución de la viabilidad con respecto a las que solo recibieron cisplatino⁵.

La morina (3, 5, 7, 2',4'-pentahidroxiflavona) es un pigmento de color amarillo, miembro de la familia de los flavonoides. Se encuentra en varias frutas y plantas, entre estas, la almendra (*Prunus dulcis*), higo (*Chlorophora tinctoria*) y más extensivamente en las plantas de la familia Moraceae⁶. Su uso como citoprotector frente a diferentes modelos de daños se ha informado ampliamente. La morina atenuó daños inducidos por tetracloruro de carbono en modelos de fibrosis hepática⁷, protegió a la mucosa gástrica contra el daño por indometacina⁸, e indujo la expresión de enzimas anti-oxidantes en células epiteliales del lente ocular, enfrentadas a H₂O₂⁹, entre otros. Sin embargo, sobre su actividad frente a la toxicidad inducida por cisplatino en células renales existe poca información. Por otra parte, aunque existen evidencias de la actividad antineoplásica de la morina¹⁰ no hay estudios en los cuales se combine la investigación de sus propiedades citoprotectoras y anti-neoplásicas.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente discutidos, en esta investigación se pretende encontrar elementos que contribuyan al conocimiento sobre la posibilidad de utilizar la morina en el control de la nefrotoxicidad por cisplatino.

2. Marco teórico.

2. 1 Cisplatino, historia y uso.

La historia de los complejos metálicos como terapia contra el cáncer, comenzó a finales de la década de 1960, con la observación de las propiedades antineoplásicas del complejo cisplatino. La alta eficiencia del cisplatino pero su elevada toxicidad, dio impulso al estudio y desarrollo de fármacos de nueva generación como el carbaplatino, el nedaplatino y el oxaliplatino¹¹. Sin embargo, aunque generando severos efectos adversos, el cisplatino continúa siendo el más utilizado en las terapias antineoplásicas. Su uso está especialmente dirigido al tratamiento de tumores en cabeza y cuello, pulmones, ovarios, cuello del útero, vejiga y testículos. Los pacientes bajo su régimen pueden padecer de náuseas y vómitos; ototoxicidad; neurotoxicidad y nefrotoxicidad¹².

2. 2 Nefrotoxicidad por cisplatino.

La primera evidencia de nefrotoxicidad por cisplatino surgió en un estudio en animales en 1971 y se describió desde los primeros ensayos clínicos de quimioterapia¹³. Actualmente, ya es reconocido que la prevalencia de nefrotoxicidad por cisplatino es alta, se presenta en uno de cada tres pacientes bajo tratamiento¹².

2.2.1 Características clínicas de la nefrotoxicidad por cisplatino.

Clínicamente, la nefrotoxicidad por cisplatino comienza a evidenciarse diez días después de iniciado el tratamiento y se manifiesta en una disminución de la tasa de filtración glomerular, vasoconstricción renal, incremento de creatinina así como reducción de los niveles de potasio y magnesio en suero¹⁴. Los efectos a largo plazo del tratamiento con cisplatino, no se conocen totalmente, pero se cree que la función renal puede quedar disminuida permanentemente¹⁵. Aun cuando la nefrotoxicidad puede ser controlada por diuréticos y una adecuada hidratación de los pacientes, la prevalencia continua siendo alta¹⁶. Se han identificado un grupo de factores de riesgo que aumenta la probabilidad de sufrir nefrotoxicidad como las altas dosis y la frecuente administración. Se ha encontrado que disminuyendo la dosis de 50 mg/m² a 20 mg/m² se evita la disminución de la tasa de filtración glomerular y las concentraciones de magnesio en suero. Otras variables incluyen: el sexo femenino, la edad avanzada, el tabaquismo y la hipoalbuminemia⁴.

2.3 Transporte y metabolismo del cisplatino en la célula.

El cisplatino es eliminado en el riñón mediante filtración glomerular y secreción tubular. La concentración de cisplatino en el riñón excede a la que se encuentra en la sangre, lo que sugiere una activa acumulación de esta droga en las células del parénquima renal. Estudios en láminas de riñón¹⁷, células epiteliales cultivadas¹⁸ y segmentos de túbulo proximal aislados¹⁹, han proporcionado evidencia de que el transporte de cisplatino ocurre de la cara basolateral a la apical. El cisplatino penetra en la célula, por difusión pasiva o transportadores específicos²⁰. En los últimos años se han identificado dos transportadores fundamentales para la entrada de cisplatino a las células renales, Ctr1 (transportador de cobre 1) y OCT2 (transportador de cationes orgánicos 2). Ctr1 es un transportador de cobre capaz de mediar el transporte de cisplatino en células de mamíferos. La disminución de la expresión de Ctr1 en células de riñón cultivadas provocó la disminución de la captura de cisplatino así como la toxicidad. Sin embargo, su papel en la nefrotoxicidad en modelos *in vivo* aún no se ha investigado²¹. El OCT2 es un transportador de cationes orgánicos. Los transportadores OCT se expresan de manera diferente en dependencia de la especie o subtipo. El transportador OCT2 humano tiene una expresión elevada en la membrana basolateral de los túbulos renales proximales, mientras que el OCT1 (transportador de cationes orgánicos 1) se localiza en la membrana sinusoidal de los hepatocitos²². Contrariamente, en roedores, tanto OCT1 como OCT2 presentan un alto nivel de expresión en la membrana basolateral de los túbulos proximales. En un estudio funcional, Ciarimboli y cols²³ suprimieron los genes OCT1 y OCT2 y encontraron que los ratones con ausencia de estos transportadores, desarrollaban una nefrotoxicidad por cisplatino mucho menor que los ratones de fenotipo silvestre²³. También existen transportadores para la extrusión del cisplatino de la célula, como el transportador MATE1 (transportador de extrusión multidroga 1)²⁴. En la Figura 1 se presenta un esquema de lo anteriormente descrito.

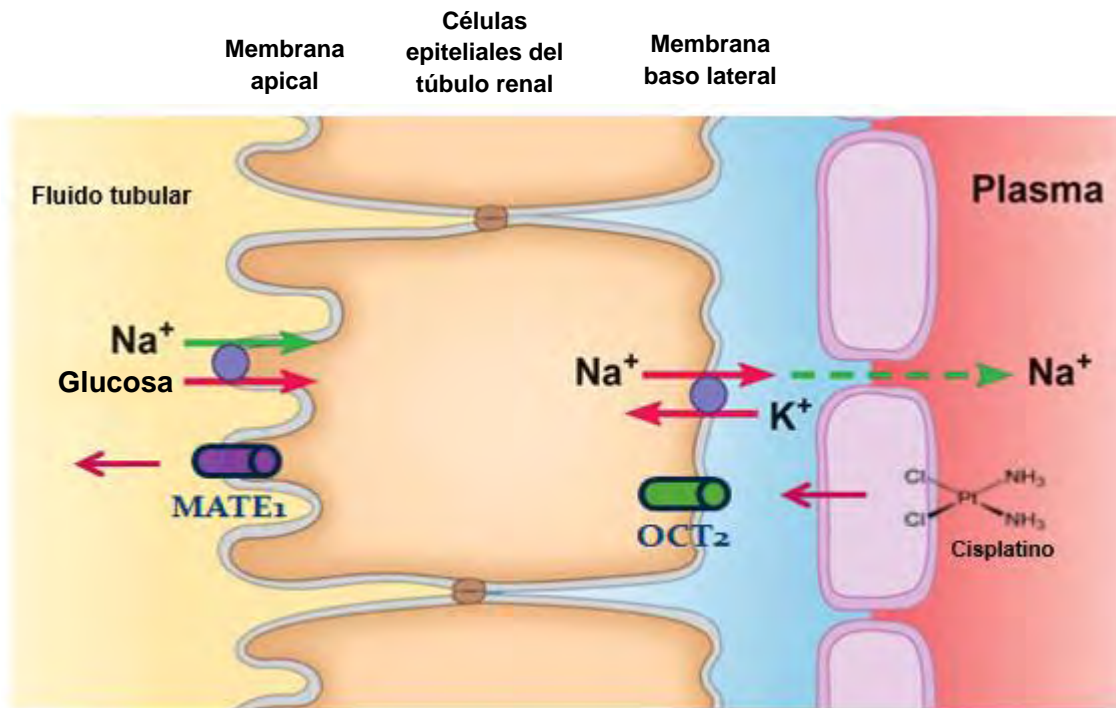


Fig.1 Transporte de cisplatino. Na⁺: sodio, K⁺: potasio MATE1: transportador de extrusión multidroga 1, OCT2: transportador de cationes orgánicos 2. Tomado de Pearson Education Inc 2011.

Una vez que las moléculas de cisplatino son transportadas al interior celular, interactúan con varias enzimas y se metabolizan a tioles altamente reactivos. Se ha sugerido que la nefrotoxicidad por cisplatino en el riñón depende de la activación de las enzimas GSTP (Glutation-S-transferasa *pI*) y GGT (gamma-glutamil transpeptidasa). Este proceso comienza con la formación de conjugados de glutatión, mediado por la GSTP²⁵. Posteriormente, los conjugados son escindidos por la enzima GGT, formándose conjugados cisteína-glicina, los cuales son entonces metabolizados por aminopeptidasas a conjugados de cisteína y finalmente son transportados a las células del túbulo proximal en donde se convierten en tioles, por la enzima beta liasa cisteína-S-conjugada^{26 y 27} (Figura 2).

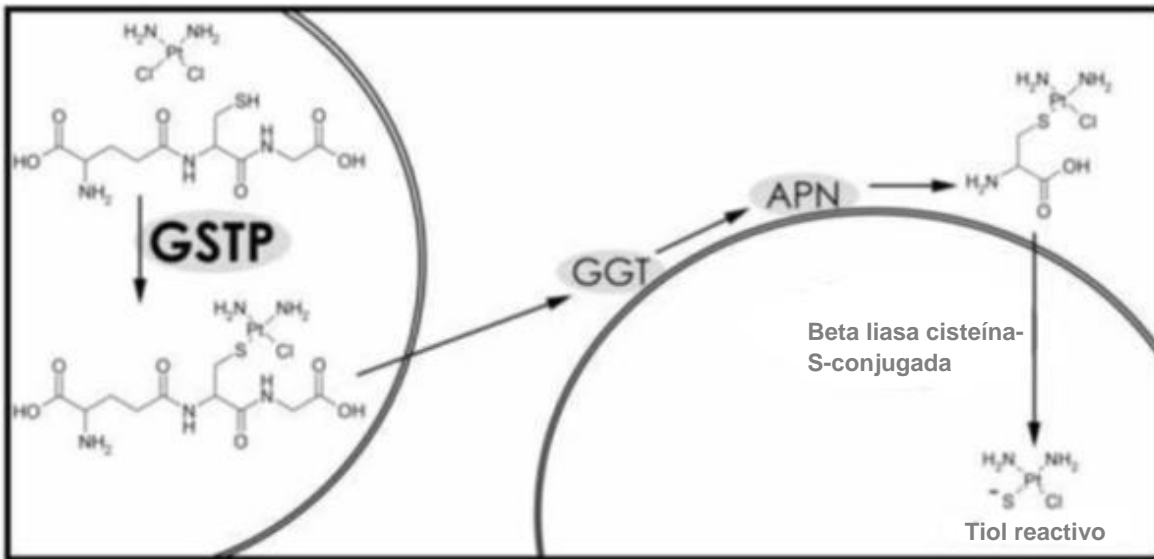


Fig.2 Metabolización del cisplatino. GSTP: glutatión-S-transferasa π , GGT: gamma glutamil transpeptidasa, APN: aminopeptidasa. Tomado de Townsend²⁵ et al. 2009.

La inhibición de las enzimas GGT o la beta liasa cisteína-S-conjugada, ha provocado la disminución de la nefrotoxicidad por cisplatino en ratones²⁸. Por otra parte, la sobre expresión de la enzima GGT aumentó la resistencia a cisplatino en un modelo xenográfico de cáncer de próstata²⁹. Estos hallazgos sugieren que la inhibición de la enzima GGT podría ser una estrategia eficiente para disminuir la nefrotoxicidad por cisplatino y aumentar su actividad anti neoplásica.

2.4 Blancos moleculares del cisplatino.

En un ambiente acuoso, los ligandos de cloro del cisplatino son reemplazados por moléculas de agua generándose electrófilos cargados positivamente que reaccionan con sitios nucleofílicos de moléculas intracelulares para formar aductos de ADN (ácido desoxirribonucleico), ARN (ácido ribonucleico) y proteínas³⁰. Los efectos antitumorales del cisplatino se han asociado a su interacción con el ADN nuclear. El cisplatino induce la formación de entrecruzamientos intra e inter catenarios inhibiendo la síntesis y replicación del ADN, afectando principalmente a células con alta tasa de proliferación³¹. Sin embargo, el papel principal del daño al ADN nuclear, como causa de la muerte celular, se ha ido modificando. Actualmente, se conoce que menos del 1% del cisplatino que penetra en las células forma aductos con el ADN nuclear³². Mandic y cols³³, utilizando células sin núcleo demostraron que las señales apoptóticas pueden inducirse independiente a la interacción entre el cisplatino y el ADN nuclear³³.

Existen varias evidencias que sugieren que el ADN mitocondrial u otros blancos mitocondriales, quizás son más importantes que el daño al ADN nuclear, en la mediación de la muerte celular inducida por cisplatino³⁴. El ADN mitocondrial no cuenta con el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos, por lo tanto es más sensible a la interacción con cisplatino que el ADN nuclear. El ADN mitocondrial es una molécula circular que codifica para 13 proteínas esenciales en la cadena de transporte electrónico, entre ellas las proteínas 1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6, del complejo I, citocromo b del complejo III y citocromo c oxidasa 1, 2 y 3 del complejo IV, así como las sintasas de ATP (trifosfato de adenosine) 6 y 8³⁵. El cisplatino puede incrementar la rigidez de la membrana mitocondrial, a través de la interacción con lípidos y proteínas. Una membrana que ha perdido su fluidez sufrirá cambios en su permeabilidad, deficiencias en los mecanismos de transporte y disminución de la actividad enzimática³⁶. Las enzimas citocromo c oxidasa y NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) deshidrogenasa, se inactivan a causa de la rigidez mitocondrial, en corazones de ratones tratados con adriamicina³⁷. También se ha visto reducción de la actividad de los complejos del I al IV y disminución de los niveles de ATP en riñones extraídos de cerdos tratados con cisplatino³⁸. Se ha encontrado que el tratamiento con cisplatino en ratas Wistar macho, disminuye el contenido de cardiolipina en extractos mitocondriales de hepatocitos, posiblemente debido a la peroxidación lipídica³⁶. La cardiolipina es un fosfolípido aniónico mitocondrial que confiere estabilidad y fluidez a la membrana mitocondrial³⁹. Su principal función es como soporte de la cadena de transporte electrónico ya que posibilita el anclaje de los complejos III y IV⁴⁰, lo cual explica una de las posibles causas por las que disminuye la actividad de los complejos de la cadena respiratoria en modelos tratados con cisplatino. La oxidación de la cardiolipina se ha asociado a la liberación de citocromo c de la mitocondria, unos de los primeros eventos en la cascada apoptótica mitocondrial³⁹. El cisplatino induce un aumento en la actividad y la expresión de la casp-3 (caspasa 3) en diferentes modelos⁴¹. La disminución del cociente GSH/GSSG (glutati6n reducido/ glutati6n oxidado) y los niveles de NADPH en extractos mitocondriales son otros de los efectos ocasionados por el cisplatino³⁴, lo cual provoca un fuerte desequilibrio en la homeostasis redox celular.

2.5 Mecanismos de inducción de toxicidad del cisplatino.

2.5.1 Inducción de estrés oxidante.

Durante mucho tiempo, las EROs eran simplemente compuestos intermediarios en la química orgánica e inorgánica. Por su gran reactividad y corta vida media, su presencia en los sistemas biológicos no se consideraba. Sólo hasta 1954, fue descrita su importancia en los organismos vivos, asociada a su capacidad para provocar daños en la estructura y funcionamiento celular⁴²

Las EROs son compuestos que se derivan de la molécula de O_2 , por reducción química parcial. Su clasificación las divide en dos grupos, las radicales y las no radicales. El grupo de radicales incluye a compuestos como el radical de óxido nítrico (NO^{\bullet}), el ion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), el radical peróxido (ROO^{\bullet}), el radical alcoxi (RO^{\bullet}) y una de las formas del oxígeno singlete (1O_2). Estas especies se definen por ser capaces de existir independientemente y contener uno o más electrones desapareados. El segundo grupo, está compuesto por sustancias extremadamente reactivas aunque no entran en la definición de radicales. Entre estos compuestos podemos mencionar al ácido hipocloroso ($HClO$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), peróxidos orgánicos, aldehídos, ozono (O_3)⁴³.

Durante la respiración mitocondrial, los electrones son transferidos del complejo I (NADH deshidrogenasa) y el complejo II (succinato deshidrogenasa) a la coenzima Q10 y posteriormente al complejo III que los transfiere al citocromo c que los cede al complejo IV. Finalmente, cuatro electrones son transferidos al oxígeno con la correspondiente formación de H_2O . El acoplamiento del transporte de electrones a la fosforilación oxidativa resulta en la generación de ATP. A pesar de que este proceso es muy eficiente, alrededor del 2% de los electrones escapan de la cadena de transporte y reaccionan con el oxígeno molecular, reduciéndolo parcialmente y formando $O_2^{\bullet-}$. Aunque el $O_2^{\bullet-}$ no es altamente tóxico, las SODs (superóxido dismutasas) mitocondriales generan H_2O_2 y en presencia de hierro o cobre reducido, forman el altamente tóxico OH^{\bullet} por la reacción de Fenton y la de Harber Weiss⁴⁴.

Las EROs son esenciales para la vida por su participación en procesos tan importantes como la transducción de señales o la actividad bactericida de los fagocitos. La célula cuenta con un sistema antioxidante que le permite mantener su estado redox en equilibrio, sin

embargo, bajo determinadas circunstancias, como la administración de algunos fármacos, el sistema de defensa es insuficiente y se desarrolla el estrés oxidante⁴³.

Por más de una década, el estrés oxidante se ha reconocido como un importante factor en la nefrotoxicidad desarrollada por cisplatino⁴⁵. Tres mecanismos se han propuesto para describir la generación de estrés oxidante en las células renales por cisplatino. Una vez en la célula, el cisplatino interacciona con moléculas de H₂O, convirtiéndose en una forma más reactiva, que puede reaccionar muy rápidamente con moléculas que contengan grupos tioles, entre ellos el GSH⁴⁶ uno de los antioxidantes de bajo peso molecular más importantes para la célula. La disminución o inactivación del GSH causa un cambio en el estado redox celular, provocando la acumulación de EROs y estrés oxidante. El segundo mecanismo ocurre a través de la desestabilización de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, lo cual provoca un incremento de EROs, como se explicó en la sección anterior³⁹. En tercer lugar, el cisplatino puede inducir la formación de EROs a través de los CYP (citocromo P450)⁴⁷. Los CYP son miembros de una súper familia de hemoproteínas que participan en la detoxificación de la célula a través de la eliminación de compuestos xenobióticos. En su estructura cristalina se observa un grupo hemo, en el cual el hierro se encuentra unido al grupo tiol de una cisteína y a una molécula de H₂O⁴⁸. El hierro participa en la generación de metabolitos del oxígeno como el OH[•], a través de la reacción de Harber Weiss y en la generación de complejos hierro-oxígeno, altamente reactivos⁴⁹. Se ha comprobado que el motivo hemo de los CYP representa una gran fuente de hierro catalítico en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. Experimentos en células LLC-PK1 y riñones de ratas, revelaron que los niveles de hierro catalítico aumentaron de manera significativa en respuesta al tratamiento con cisplatino. Sin embargo, la exposición a quelantes de hierro o a atrapadores de OH[•], atenuó la toxicidad en el sistema *in vitro* así como la falla renal. Estos datos, sugieren el papel principal del hierro en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino⁴⁷.

Independiente a estos tres mecanismos, algunos autores han atribuido el estrés oxidante generado por cisplatino a la sobre expresión de las NOX (NADPH oxidasa). La NOX es una enzima constituida por varias subunidades que cataliza la producción de O₂^{-•} a través de la reducción de O₂ por medio de un electrón proveniente de una molécula de NADPH o NADH. En células LLC-PK1 la generación de EROs por cisplatino ha disminuido de manera significativa con el uso de DPI (difenileneiodonio), un inhibidor de NOX⁵⁰. Por otra parte, en

células HEI-OC1, derivadas de la cóclea, el tratamiento con cisplatino aumenta la expresión de las isoformas NOX 1 y 4 acompañado del aumento de EROs⁵¹.

2.5.1 a. Defensa antioxidante: HO-1.

El sistema antioxidante está dividido en dos grandes grupos. Las enzimas antioxidantes y los antioxidantes de bajo peso molecular. Entre las enzimas antioxidantes se encuentra la SOD. Las proteínas en esta familia difieren en su estructura y cofactores. Esta enzima cataliza la dismutación de dos radicales de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 ⁵². Este último compuesto, puede ser removido por la actividad de la enzima catalasa y miembros de la familia de las peroxidasas incluyendo a la GPx (glutación peroxidasa)⁵³. Sin embargo, en la protección contra la nefrotoxicidad inducida por cisplatino una de las enzimas más estudiadas es la HO-1.

En estudios recientes estudios se ha demostrado que en estados de elevado estrés oxidante, la HO-1 se induce como respuesta protectora en células enfrentadas a diversos estímulos tóxicos. La HO-1 es una enzima microsomal de 32 kDa que cataliza la reacción inicial y limitante en el catabolismo del grupo hemo. Los productos de esta reacción son cantidades equimolares de biliverdina, CO (monóxido de carbono) y hierro. La biliverdina es posteriormente transformada a bilirrubina por acción de la enzima biliverdina reductasa (Figura 3)⁵⁴.

Hasta el momento se han descrito las isoformas HO-1, 2 y 3. La HO-1 es inducible mientras que la HO-2 se expresa constitutivamente. La HO-3 tiene propiedades muy similares a la HO-2 pero el conocimiento sobre ella es más limitado por ser la última identificada. La HO-1 es inducida por el grupo hemo y una variedad de estímulos entre los que se incluyen, metales pesados, H_2O_2 , NO^{\cdot} , endotoxinas, radiaciones ultravioletas, estados de hiperoxia y lipoproteínas oxidadas de bajo peso molecular, los cuales tienen en común la capacidad de alterar el estado redox celular. No obstante, la inducción de la HO-1 es un proceso complejo que depende de los estímulos aplicados, el tipo de tejido y la especie del cual estos provienen^{55 y 56}. En la región promotora del gen para la HO-1 se han encontrado secuencias de unión para los factores de transcripción Nrf2 (factor nuclear derivado de eritroide 2), Nf- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), AP-1, AP-2 (proteínas activadoras 1 y 2), IL- 6, entre otros⁵⁷.

El sistema Nrf2/ Keap1 (proteína 1 asociada a Kelch y parecida a ECH) ha sido identificado como un sensor crucial ante el incremento de EROs en el citoplasma. Bajo estas condiciones, Nrf2 se separa de Keap1, que promueve su degradación por el proteosoma cuando no hay señales de estrés oxidante, y se transloca al núcleo donde induce la transcripción de un grupo de genes citoprotectores como la HO-1⁵⁸.

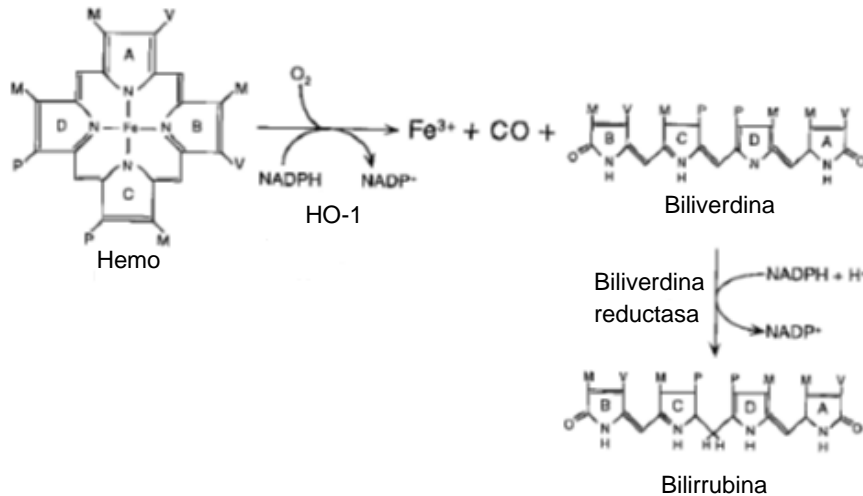


Fig. 3 Metabolismo del grupo hemo por la HO-1. HO-1: hemo oxigenasa 1, Fe³⁺: hierro oxidado, CO: monóxido de carbono, NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato. Tomado de Agarwal y Nick⁵⁴. 2000.

En condiciones de trasplantes, nefropatías humanas y modelos animales de enfermedad renal, se observa una fuerte inducción de la HO-1, principalmente en las células epiteliales renales. En la proteinuria, la HO-1 se induce en el epitelio de las células tubulares, siendo más evidente en el túbulo distal que en el proximal, pero no se detecta en las células glomerulares^{59 y60}. La sobre expresión de la HO-1 en células tubulares con respecto a las glomerulares se debe a la mayor sensibilidad de las primeras frente al estrés oxidante⁶¹.

La reacción metabólica catalizada por la HO-1 se considera un elemento crítico en el mecanismo de defensa celular. En primer lugar, se remueve el grupo hemo, uno de los más potentes oxidantes en la célula. Por otra parte, el incremento en los niveles de bilirrubina y CO permite la protección frente a diferentes formas de estrés celular. El hierro liberado, es rápidamente capturado por la ferritina y como se explicará más adelante, de esta forma se regula la homeostasis intracelular del hierro⁶².

Funciones biológicas de la biliverdina y bilirrubina.

La biliverdina producida por el catabolismo de la HO-1 es rápidamente convertida a bilirrubina, la cual a altas concentraciones resulta tóxica en el SNC (Sistema Nervioso Central) de los recién nacidos. Sin embargo, a concentraciones normales, en los mamíferos, la bilirrubina no conjugada es considerada como un eficiente atrapador de oxígeno singulete y un agente reductor para ciertas peroxidasas en presencia de H₂O₂ e hidroperóxidos orgánicos⁶³. Las acciones biológicas de la bilirrubina son especialmente relevantes en la prevención de la muerte celular mediada por estrés oxidante⁶⁴.

Se ha demostrado que la biliverdina presenta actividad citoprotectora frente a diferentes modelos de daño. La administración de biliverdina en un modelo de shock, generado por LPS, atenuó el daño pulmonar en ratas⁶⁵. Además, la terapia con biliverdina contrarresta el daño generado por isquemia-reperfusión en hígados de ratas⁶⁶. La utilización de siRNA (ARN pequeño de interferencia) para el silenciamiento de la biliverdina reductasa humana pero no para la HO-1, no ha interferido con la disminución del daño por arsenito en las células renales 293A⁶⁷. Esta fue la primera evidencia de que la biliverdina por si sola puede ejercer un efecto citoprotector.

Es importante tener en cuenta que la biliverdina es rápidamente convertida en bilirrubina, por lo que tiene una vida media corta, no obstante, la bilirrubina también presenta actividad protectora. Se ha visto por ejemplo, que protege a las células contra el estrés generado por H₂O₂^{68 y 69} y se ha relacionado con la inhibición de la actividad de las proteínas NOX y PKC, enzimas que están asociadas al daño vascular mediado por angiotensina II^{70 y 71}. La inhibición de PKC (proteína cinasa C) y NOX mediada por bilirrubina, puede ser uno de los mecanismos por los cuales la HO-1 atenúa la generación de oxidantes en la diabetes⁷².

Papel del hierro y la ferritina en la protección por HO-1.

El hierro plasmático se une a la transferrina, la cual lo transporta a través de las células endoteliales vía receptores de unión a superficie celular. En el interior de la célula, la ferritina es la proteína responsable de la unión de la mayor cantidad de hierro y su síntesis es rápidamente regulada cuando existe hierro libre⁷³.

La mayor fuente de hierro en las células proviene de los grupos hemo, de donde se libera durante el metabolismo por acción de la HO⁷⁴. Este metal de transición es esencial para

numerosos procesos biológicos, sin embargo, puede ser extremadamente tóxico si las concentraciones intracelulares no son estrechamente reguladas. El hierro puede integrarse en las bicapas lipídicas y oxidar componentes de la membrana celular^{75 y76}. En la reacción de Fenton se genera el OH· a partir de hierro (II) y H₂O₂, moléculas altamente reactivas que oxidan numerosos componentes celulares.

Se cree que el incremento de las concentraciones de hierro producido por la actividad de la HO puede ser la causa del incremento en la expresión de la ferritina, lo cual a su vez permite la captura de hierro, manteniendo así un equilibrio en los niveles de este potente oxidante en las células⁷⁷.

Además del control por parte de la ferritina, se ha visto que la inducción de la HO-1 está asociada a la síntesis de proteínas exportadoras de hierro⁷⁸. De esta forma, la célula queda protegida de la toxicidad que pudiera generar el hierro liberado por el metabolismo del grupo hemo. En la Figura 4 se resumen las funciones de la HO-1 en la célula.

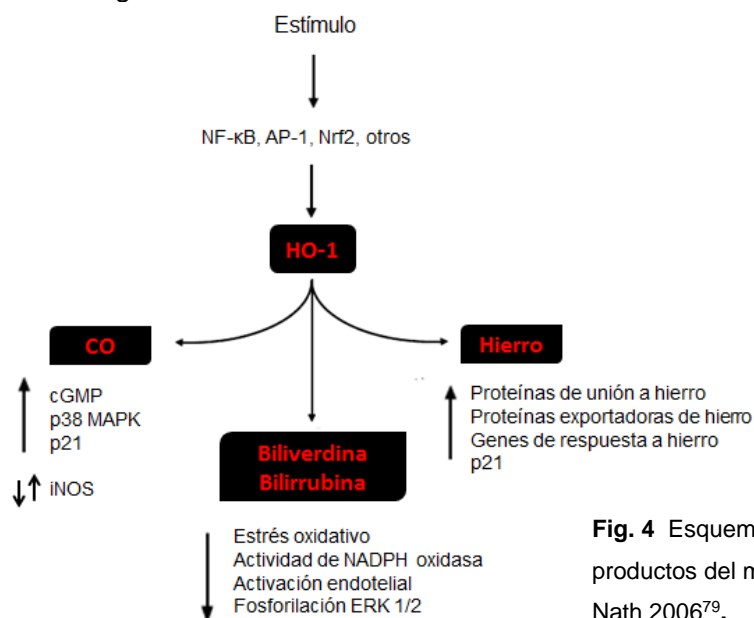


Fig. 4 Esquema de las funciones biológicas de los productos del metabolismo de la HO-1. Tomado de Nath 2006⁷⁹.

Son varios los informes de la actividad citoprotectora de la HO-1 frente al daño por cisplatino y otros agentes nefrotóxicos. La primera evidencia *in vivo* sobre el efecto antioxidante y citoprotector de la inducción de la HO-1, acoplada a la síntesis de ferritina, se encontró en 1992 por Nath y cols. Estos investigadores demostraron que un inhibidor de la HO-1 aumenta la mortalidad en un modelo de nefrectomía derecha y oclusión de la arteria izquierda en ratas macho⁷⁹.

Se ha demostrado que la HO-1 participa en la atenuación de daño en diferentes modelos biológicos, algunos de estos ejemplos se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Resumen del efecto protector de la HO-1. Tomado de Nath. 2006

Modelo de daño

Cisplatino

Inhibición de la HO-1 aumenta el daño renal⁸⁰.

Ratones HO-1^{-/-} presentaron daños renales más agudos y apoptosis severa⁵⁷.

La sobre expresión de HO-1 protege contra la toxicidad *in vitro*⁵⁷.

La inhibición de la actividad de la HO-1 aumenta la toxicidad celular *in vitro*⁸¹.

Ciclosporina

La inducción de HO-1 reduce el daño renal⁸².

Cloruro de mercurio

La inducción previa de HO-1 no protege contra el daño renal inducido por altas dosis⁸³.

La inducción previa de HO-1 protege contra el daño renal inducido por bajas dosis⁸⁴.

Nefropatía por maleato

La inhibición de la HO-1 aumenta la proteinuria, el daño histológico y la apoptosis⁸⁵.

Dicromato de potasio

La inducción de la HO-1 protege contra el daño renal⁸⁶.

2.5.1 Inducción de apoptosis.

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada, evolucionado y conservado que ocurre durante varios procesos fisiológicos y patológicos. Se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos específicos que la distinguen de otros tipos de muerte celular. Una célula apoptótica se reconoce porque presenta condensación de la cromatina y fragmentación nuclear; redondeamiento celular, reducción del volumen y retracción de pseudópodos. Estas alteraciones morfológicas son consecuencia de tres eventos bioquímicos principales: cambios en la membrana celular que permiten el reconocimiento por las células fagocíticas, activación de caspasas y degradación de proteínas y ADN⁸⁷. Las caspasas inician y ejecutan la apoptosis, por tanto son el elemento principal de esta cascada. Existen tres vías por las cuales las caspasas pueden ser activadas. Las dos más estudiadas son la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca o de receptor de muerte. Ambas cascadas convergen generalmente en la fase ejecutora de la apoptosis. Existe una tercera vía, que depende del retículo endoplasmático y la casp-12 (caspasa 12), pero es menos conocida⁸⁸.

La vía de señalización extrínseca, comienza fuera de la célula cuando las condiciones del ambiente extracelular determinan que la célula debe morir. El primer evento es la interacción ligando-receptor de muerte. Estos receptores de muerte tienen un dominio intracelular que reclutan proteínas adaptadoras. Una vez que los ligandos se han unido a los receptores de muerte se forma un sitio para la unión de la proteína adaptadora. El complejo ligando-receptor-proteína adaptadora es conocido como complejo señalizador inductor de muerte. Este complejo, entonces inicia la activación de la pro-casp 8 (pro-caspasa 8), la forma activa de esta enzima es una caspasa iniciadora que desencadena la apoptosis a través de la activación de caspasas ejecutoras 3 y 7⁸⁹.

Como su nombre lo indica, la vía intrínseca comienza en el interior de la célula por daños genéticos irreparables. Independiente del estímulo, esta vía es el resultado del incremento de la permeabilidad mitocondrial y la liberación de moléculas pro-apoptóticas en el citoplasma como el citocromo c. Los reguladores de la vía mitocondrial son un grupo de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2. Esta familia de proteínas se divide en dos grandes grupos, las pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim) y las anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1). Mientras que las proteínas anti-apoptóticas

bloquean la liberación de citocromo c, las pro-apoptóticas promueven su salida. El balance entre estos grupos determina la iniciación de la apoptosis por esta vía^{90 y91}.

El daño del tejido renal, donde se observa la muerte de las células tubulares, es una característica histopatológica común en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. Se ha identificado a la apoptosis y a la necrosis como mecanismos de muerte celular en este tejido. La dosis de cisplatino puede ser determinante para el tipo de muerte que sufrirá la célula. La muerte celular por necrosis se observa principalmente con altas concentraciones (milimolar), mientras que la apoptosis, a bajas concentraciones (micromolar)¹².

Actualmente se conoce que la vía extrínseca mediada por receptores, la vía mitocondrial o intrínseca, así como la que involucra al retículo endoplasmático (Figura 5) son posibles mecanismos de muerte por apoptosis, en la toxicidad inducida por cisplatino¹².

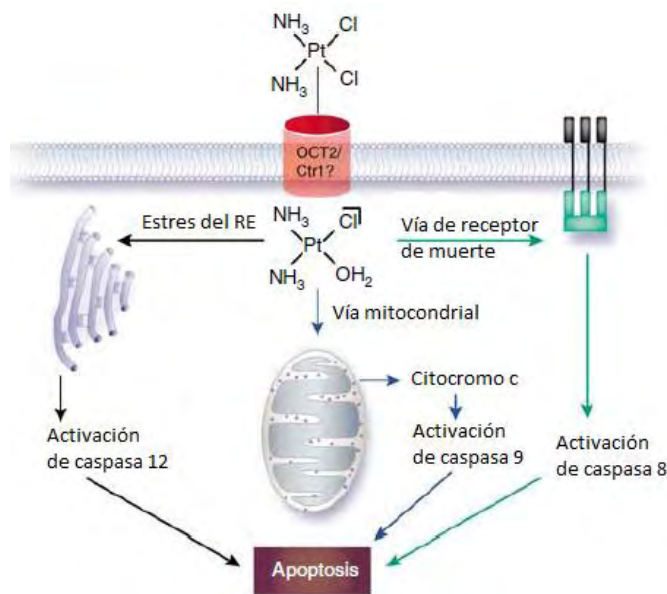


Fig. 5 Vías de señalización apoptóticas inducidas por cisplatino. Tomada de Pabla y Dong. 2008¹².

Los principales receptores de muerte son FasR (receptor FAS) y TNFR 1 (receptor del factor de necrosis tumoral 1). Se ha relacionado la sobre expresión de FasR y el ligando Fas con la administración de cisplatino⁹², sin embargo no existe una evidencia definitiva del papel de este receptor en la apoptosis inducida por cisplatino. Por otra parte, una menor inducción de la apoptosis, se ha visto en células y ratones deficientes de TNFR 1⁹³, lo que sugiere la posible implicación de este receptor en la activación de la vía extrínseca.

La vía mitocondrial se considera como la principal vía apoptótica en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. En la vía intrínseca, el estrés celular promueve la activación de la familia de proteínas pro-apoptóticas, Bax y Bak, las cuales inducen un aumento en la permeabilización de la membrana externa mitocondrial a través de la formación de poros. Es entonces cuando son liberados de la mitocondria los factores apoptogénicos como el citocromo c, AIF (factor de inducción de apoptosis), Smac, entre otros. Una vez en el citosol, el citocromo c induce cambios conformacionales en la proteína adaptadora Apaf-1 (proteasa activadora de la apoptosis, factor 1), provocando el secuestro y la activación de la casp-9 (caspasa 9), la cual a su vez activa a la casp-3 para la ejecución de la apoptosis⁸⁸.

La participación de esta vía apoptótica en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino fue inicialmente sugerida al observar la acumulación de Bax en la mitocondria y la liberación de citocromo c en células de riñón cultivadas y tratadas con cisplatino⁹⁴. Una clara evidencia de la importancia de la vía mitocondrial en la apoptosis inducida por cisplatino, es la resistencia a la apoptosis en ratones deficientes de Bax con respecto a los de fenotipo silvestre⁹⁵.

2.5.2 a. HO-1 y apoptosis.

Se ha visto que la HO-1 puede ser translocada a núcleo y una vez allí ejerce un efecto anti-apoptótico a través de la activación de Bcl-2 y la inhibición de la salida de citocromo c de la mitocondria⁹⁶.

2.5.3 Cisplatino e inflamación.

En el caso de la nefrotoxicidad por cisplatino, se inducen una gran cantidad de citocinas pro-inflamatorias. La inflamación contribuye al daño del tejido renal y por consiguiente a la falla de órgano. Esta inferencia surgió por el papel de la citocina anti inflamatoria IL-10 (interleucina 10), en la atenuación de la muerte celular inducida por cisplatino⁹⁷.

En la respuesta inflamatoria dirigida por cisplatino, el TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) se reconoce como el principal regulador e iniciador del evento. Inhibidores farmacológicos, así como anticuerpos contra TNF- α , suprimen la inducción de otras citocinas y atenuación de la nefrotoxicidad por cisplatino⁹⁸. El TNF- α interacciona en la superficie de los receptores TNFR1 y 2, para inducir una variedad de respuestas celulares desde la inflamación hasta la muerte celular. No es claro cuál de los dos receptores tiene mayor importancia en la

respuesta desencadenada por el TNF- α , ya que en algunos casos la deficiencia de TNFR1 provoca mayor resistencia a la muerte celular mientras que en otros es la ausencia de TNFR2⁹⁹. No obstante a la discrepancia entre estos estudios, ambos demuestran el papel crítico de TNF- α en la inducción de factores pro-inflamatorios, que a su vez reclutan a las células inflamatorias. Un importante hallazgo en el mecanismo del TNF- α durante la nefrotoxicidad por cisplatino es el tipo de célula donde se produce esta citocina. Al contrario de lo que se pudiera suponer, son las propias células tubulares del riñón y no las inflamatorias infiltradas las que producen el TNF- α ¹⁰⁰. Aunque la producción de TNF- α , se da principalmente en las propias células renales, otras cumplen funciones reguladoras o colaborativas. Esta idea es soportada por la disminución de la producción de citocinas pro-inflamatorias, como el TNF- α , en ratones deficientes de células T¹⁰¹.

2.6 Avances y perspectivas en el desarrollo de estrategias nefroprotectoras contra el daño por cisplatino.

Una hidratación con sales y administración simultánea de manitol, antes, durante y después del tratamiento con cisplatino, reduce significativamente la nefrotoxicidad y es la estrategia que ha sido aceptada para la reducción de los efectos colaterales producidos por la terapia con cisplatino¹⁰². Sin embargo, este régimen puede interferir con la actividad antineoplásica¹².

A lo largo de las investigaciones sobre la nefrotoxicidad por cisplatino, han surgido una gran variedad de posibles alternativas nefroprotectoras. Su clasificación se basa en los blancos primarios a las que están dirigidas. Entre ellas, cabe mencionar, aquellas que se enfocan en la inactivación de los transportadores de cationes orgánicos, principalmente el OCT2 humano. Sin embargo, no está clara la importancia de la inhibición de este transportador en el efecto antitumoral del cisplatino¹⁰³. También se ha propuesto la inhibición de enzimas que participan en el metabolismo y bioactivación del cisplatino, como la GGT y la cisteina-S-conjugada B-liasa. En este caso, existen informes de que la inactivación de estas enzimas puede atenuar la nefrotoxicidad por cisplatino y a su vez potenciar su actividad antineoplásica¹⁰⁴. El bloqueo directo de elementos de las vías de señalización de muerte se encuentra entre las estrategias estudiadas, pero también existe la posibilidad de comprometer la actividad antitumoral del cisplatino¹⁰⁵. La utilización de antioxidantes, entre ellos compuestos naturales como los flavonoides, se ha propuesto como alternativa para restablecer la homeostasis redox celular¹⁰⁶ y ³, sin embargo, los resultados de ensayos

clínicos son contradictorios y poco concluyentes. En el caso de la inflamación se podría considerar el empleo de la IL-10 para la supresión del TNF- α ⁹⁸. Son varias las alternativas planteadas para atenuar la nefrotoxicidad por cisplatino, sin embargo, la mayoría de las pruebas se han conducido en cultivos celulares, ratas o ratones. De esta forma, el efecto de estas terapias en los pacientes es desconocido y los escasos resultados que existen no son concluyentes¹².

Un aspecto importante a considerar, en la búsqueda de una alternativa eficiente contra la toxicidad por cisplatino, son los múltiples blancos que tiene esta molécula. Bloquear uno de ellos solo ofrecerá una protección parcial.

Finalmente y uno de los elementos más importantes a tener en cuenta, es la interacción de la terapia nefroprotectora con la actividad antitumoral del cisplatino. Desafortunadamente, la totalidad de los estudios realizados se han conducido en células renales o animales libres de tumores. Es imprescindible incluir modelos de malignidad en las investigaciones futuras¹².

2.7 Flavonoides.

Los flavonoides son un subgrupo de la familia de los polifenoles. En esta se incluye a flavonoles monoméricos, flavononas, antocianidinas y flavonas. Los flavonoles y en menor extensión las flavonas se encuentran en la mayoría de las plantas^{107 y 108}. Existen más de 5000 flavonoides identificados. Su estructura está compuesta por dos anillos bencénicos enlazados por un anillo pirano, lo que se conoce como esqueleto difenilpropano (C₆C₃C₆)¹⁰⁹. Las diferencias individuales de cada grupo resultan de la variación en el número y ubicación de los grupos hidroxilos así como en la naturaleza y extensión de la alquilación y/o glicosilación de estos grupos. Lo más común es encontrar la hidroxilación en los grupos 3' y 4', del anillo B¹¹⁰.

Los flavonoides poseen una gran actividad anti radical y atrapadora de metales de transición. Estas propiedades se deben a características de su estructura como: la presencia de un grupo catecol en el anillo B; un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, conjugado a un grupo ceto en la posición 4 y la presencia de un grupo hidroxilo como sustituyente en la posición 3 del anillo C o en el carbono 5 del anillo A. La quercetina es un claro ejemplo de esta estructura. No obstante otros flavonoides como la morina

comparten características muy similares con algunas variaciones como se muestra en la Figura 6¹¹¹ y ¹¹².

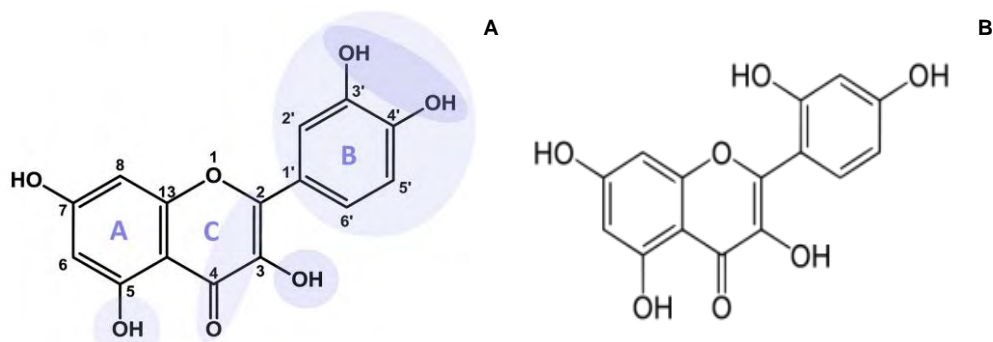


Fig. 6 Estructura de la quercetina (A) y morina (B).

La inducción de enzimas de fase dos por los flavonoides, a través de la activación de Nrf2, es otro de los mecanismos antioxidantes propuestos para estas moléculas. La expresión de estas enzimas es regulada por los elementos de respuesta antioxidante localizados en la región promotora de los genes correspondientes. Una de las enzimas más estudiadas de fase dos es la HO-1, la cual ha sido reconocida como un importante mediador de la recuperación en eventos isquémicos y en la mejor recuperación de la función contráctil del miocardio¹¹³.

La actividad anti-inflamatoria es otra de las propiedades citoprotectoras asociadas a los flavonoides. Se ha demostrado que los flavonoides tienen capacidad para inhibir enzimas de la vía de los eicosanoides, incluyendo a la fosfolipasa A2, ciclooxigenasas y lipooxigenasas, previniendo de esta forma la generación de mediadores de la inflamación como las prostaglandinas. Los flavonoides también pueden inhibir citocinas pro-inflamatorias como TNF α , IL-1 β (interleucina 1 beta), IL-6 (interleucina 6) e IFN- γ (interferón gamma)¹¹⁴. También se ha encontrado que los efectos anti-inflamatorios de los flavonoides son mediados por el bloqueo de enzimas involucradas en las cascadas de señalización de las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos), por la inhibición del factor de transcripción NF- κ B y la proteína activadora AP-1¹¹⁵ y ¹¹⁶.

2.7.1 Absorción y biodisponibilidad de los flavonoides.

La mayor parte de los flavonoides, excepto las catequinas, están presentes en las plantas unidos a azúcares en forma de β -glicósidos. Esta característica estructural, determina si los flavonoides serán absorbidos en el intestino delgado o en el colon. Generalmente, aunque se han encontrado algunas excepciones, los glucósidos son absorbidos en el intestino delgado. Después de la absorción, los flavonoides pueden ser conjugados con ácido glucurónico, sulfatos o sufrir o-metilaciones. Como consecuencia, no se encuentran agliconas libres en el plasma o en la orina. La concentración plasmática de flavonoides provenientes de la dieta es menor a $1 \mu\text{M}$ ¹¹⁷.

Uno de los flavonoides más ampliamente estudiados es la quercetina. Se ha propuesto que este polifenol es principalmente absorbido en el intestino delgado¹¹⁸. El mecanismo más aceptado que explica el proceso de absorción, implica la participación de la hidrolasa LPH (lactosa-floricina hidrolasa). Una vez que la quercetina queda en su forma de aglicona puede ser absorbida. En experimentos *in vitro*, se ha descrito la participación de transportadores que varían en dependencia de la célula y/o el flavonoide¹¹⁹. Por ejemplo, en las células Caco-2 y CHO-G6D3, el transportador SGLT1 (transportador de glucosa glut 1), media la entrada de quercetina-4'- β -glucósido¹²⁰.

Un ejemplo claro de la biodisponibilidad de los flavonoides está dado por la quercetina. Después de la ingestión de 150 mg (325 μmol) de quercetina-3-glucósido pura, se detecta en plasma una concentración de $5 \mu\text{M}$ ¹²¹. Como se puede apreciar, la disponibilidad de estos polifenoles es muy baja, por lo que es un elemento importante a tener en cuenta durante las investigaciones.

2.7.1 a. La morina y su actividad citoprotectora.

La morina (3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona) es un pigmento de color amarillo, miembro de la familia de los flavonoides. Se encuentra en varias frutas y plantas, entre estas, la almendra (*Prunus dulcis*), el higo (*Chlorophora tinctoria*) y más extensivamente en las plantas de la familia *Moraceae*⁶. También se ha aislado de la planta de la guayaba, a la cual se le han atribuido propiedades antioxidantes y efectivas en el tratamiento de la diabetes¹²².

En células humanas como los miocitos, hepatocitos, eritrocitos y células endoteliales, el tratamiento con morina previene el daño por estrés oxidante¹²³. Efectos anti-

inflamatorios¹²⁴, cardioprotectores¹²⁵ y antineoplásicos¹²⁶ se han observado en presencia de morina.

Las altas concentraciones de glucosa en cultivos primarios de hepatocitos incrementaron los niveles de EROs, donde el pre, co y post-tratamiento con morina revirtió este efecto¹²⁷. Varios autores han encontrado una alta capacidad de captura de radicales por la morina, utilizando el ensayo DPPH^{128,129,130}.

La actividad anti-inflamatoria de la morina ha sido evidenciada en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Kim y cols¹³¹ demostraron la inhibición de la cascada de NF-kB, por la morina, a través de la modulación de vías de señalización activadas por ERKs (quinasas reguladas por señales extracelulares) y p38, en células endoteliales¹³¹. Más recientemente, ratas con fibrosis hepática, inducida con tetracloruro de carbono, respondieron al tratamiento con morina, que atenuó la respuesta inflamatoria, lo cual se evidenció por la disminución en los niveles de TNF- α , de la NOS (sintasa de óxido nítrico) inducible y de NF-kB¹³².

También se ha demostrado que la morina modula algunas enzimas antioxidantes. Experimentos en células epiteliales humanas del lente ocular, revelaron que este flavonoide puede proteger contra la citotoxicidad inducida por H₂O₂. En este contexto, la morina incrementó los niveles de proteína del factor de transcripción Nrf2, lo cual a su vez aumentó la expresión de la enzima antioxidante HO-1. En este experimento la adición de un inhibidor de ERKs atenuó el aumento de Nrf2 y HO-1, lo que sugiere que estos efectos están mediados además, por la activación de ERKs⁹.

Otro importante hallazgo sobre la capacidad antioxidante de la morina es la modulación de los niveles de GSH y la enzima SOD. La administración de morina a ratas Wistar, que habían recibido previamente un tratamiento con ciclofosfamida, aumentó significativamente los niveles de GSH y SOD con respecto a las que solo habían recibido ciclofosfamida¹³³.

Efectos sobre mediadores de la apoptosis también se han identificados como parte de los efectos citoprotectores de la morina. La expresión génica para las proteínas Bax, casp-3 y 9, que modulan positivamente la muerte celular, disminuye significativamente en hepatocitos tratados con morina, con respecto a los que solo recibieron elevados niveles de glucosa. De manera inversa, la expresión génica para la proteína Bcl2, un potente

inhibidor de la apoptosis, aumenta en las células tratadas con morina con respecto a las que solo recibieron glucosa¹²⁷.

2.7.2 Los flavonoides como pro-oxidantes en las células tumorales.

En los últimos años ha crecido el interés por los pro-oxidantes como estrategia contra el cáncer. Se ha observado que la utilización de drogas y algunos elementos de la dieta que generan H_2O_2 como el paclitaxel, el resveratrol y la curcumina, eliminan células tumorales sin afectar a las normales¹³⁴.

Una de las teorías para explicar la selectividad de ciertos pro-oxidantes por las células tumorales es la elevada concentración de H_2O_2 ¹³⁵, de Cu y de otros metales de transición que estas presentan con respecto a las células normales¹³⁶. Bajo determinadas condiciones, como altas concentraciones, altos pH y la presencia de metales de transición activos, los compuestos fenólicos pueden actuar como pro-oxidantes¹³⁷. En las células tumorales, la presencia de metales de transición es más elevada debido a la sobre expresión de la transferrina y al *ctr1*. Frente a altas concentraciones de estos metales, los compuestos fenólicos pueden reducir iones metálicos promoviendo la formación de OH^\bullet a través de la reacción de Fenton¹³⁸. Otra hipótesis asociada al papel de los metales de transición en la toxicidad de los polifenoles sobre las células tumorales, explica que a causa del efecto Warburg, las células tumorales favorecen a la glicólisis, provocando una acidificación del pH que afecta la estructura del ADN y expone los enlaces de cobre-cromatina al ataque de los compuestos fenólicos¹³⁹. No obstante a la gran cantidad de evidencias sobre la capacidad de los polifenoles para inducir toxicidad en líneas tumorales e inhibir la tumorigénesis en modelos animales, el papel de las EROs en esta actividad se comprende muy poco.

En el caso particular de la morina, se ha evidenciado que puede inhibir el crecimiento de cultivos derivados de carcinomas de células escamosas orales¹⁰ y de líneas celulares de leucemia como U937 y HL-60^{140 y 141}.

3. Planteamiento del problema

El cisplatino es un agente antineoplásico ampliamente utilizado en el tratamiento de tumores sólidos. Sin embargo, los diversos efectos adversos que provoca, siendo la nefrotoxicidad el de mayor incidencia, limitan su uso. Hasta el momento una hidratación con sales y administración de manitol es la estrategia utilizada para disminuir la toxicidad sobre el riñón. No obstante, este régimen puede influir con la actividad antineoplásica del cisplatino. Se hace necesario la búsqueda de nuevas estrategias nefroprotectoras que atenúen la toxicidad por cisplatino en las células renales sin interferir con la actividad antineoplásica. Teniendo en cuenta que la morina ha demostrado tener un efecto citoprotector en células normales y citotóxico en algunas líneas tumorales, en esta investigación nos propusimos determinar su eficacia para atenuar el daño por cisplatino en una línea celular derivada de túbulo proximal de riñón de cerdo (LLC-PK1) así como su interferencia con la actividad antineoplásica en una línea celular derivada de carcinoma de vejiga humano (HTB4).

3. 1 Hipótesis.

En la línea celular LLC-PK1, la morina puede actuar como agente citoprotector contra el daño por cisplatino, a través de la regulación del sistema redox y la modulación negativa de la vía de apoptosis, mientras que en la línea tumoral HTB-4 no interferirá con la toxicidad de este antineoplásico.

3.1.1 Objetivo.

Determinar y caracterizar el efecto de la morina contra el daño causado por cisplatino, en la línea celular LLC-PK1, así como la interferencia con este antineoplásico, en la toxicidad sobre la línea tumoral HTB-4.

3.1.1. a. Objetivos específicos.

1. Evaluar la capacidad de la morina para atrapar H_2O_2 .
2. Determinar la capacidad de la morina para interferir con la toxicidad del cisplatino en las células LLC-PK1.
3. Determinar la capacidad de la morina para inducir enzimas del sistema de defensa antioxidante o disminuir la expresión de proteínas ejecutoras de la apoptosis.
4. Evaluar la actividad citotóxica de la morina en las células HTB-4.
5. Evaluar la interferencia de la morina con la actividad citotóxica del cisplatino en las células HTB-4.

Para lograr el cumplimiento de estos objetivos se ha diseñado una metodología que comprende ensayos libres de células, en el caso de la determinación de la capacidad de captura de EROs como el H_2O_2 y ensayos en las líneas celulares LLC-PK1, derivada de túbulo proximal de riñón de cerdo y HTB-4, obtenida de carcinoma de vejiga humano, para el resto de las determinaciones.

La capacidad de captura de H_2O_2 se llevará a cabo utilizando el ensayo Amplex red. Los objetivos dos, cuatro y cinco se llevarán a cabo evaluando la viabilidad de las células LLC-PK1 y HTB-4 tratadas con morina y/o cisplatino por las metodologías de MTT y FDA. La evaluación de la capacidad citoprotectora, se llevará a cabo con pre-tratamientos de morina, lo que significa que el medio con este polifenol será retirado completamente antes de la adición de cisplatino. Se escogió utilizar pre-tratamientos de morina para eliminar posibles interacciones entre este polifenol y el cisplatino y asegurar que los efectos que se observen se deban únicamente a la acción de los compuestos originales.

La expresión de las proteínas citadas en el objetivo número tres, se llevará a cabo utilizando la metodología de western blot.

4. Materiales y métodos.

4.1 Células y reactivos.

Las células HTB-4, derivadas de carcinoma humano de vejiga y las LLC-PK1, derivadas de túbulo proximal de riñón de cerdo se obtuvieron de la Colección de Cultivos Americana (ATCC) (Manassas, EUA). El anticuerpo anti-tubulina de ratón, el anti-GST (glutación-S-transferasa) de conejo G7781, el cisplatino P4394 (cis-Diamminedichloroplatinum II), la morina (3, 5,7,2',4'-pentahidroxi flavona), el FDA y el MTT se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). El DMEM (Medio Eagle Modificado de Dubelco), el SFB (suero fetal bovino), la tripsina al 0.25% EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM y la penicilina/estreptomicina se obtuvieron de GIBCO (EUA). El anticuerpo de anti HO-1 de conejo spp-730 y el anticuerpo anti Nrf2 sc-722 se obtuvieron de Enzo Life Sciences, Inc (Farmingdale, NY, EUA) y Santa Cruz Biotech, Inc. (Dallas, TX, EUA), respectivamente. Los anticuerpos secundarios fluorescentes anti-conejo 800CW y anti-ratón 680RD se obtuvieron de LI-COR (Lincoln, NE, EUA). El alcohol isopropílico se obtuvo J.T. Baker (Xalostoc, Edo. Mex, México). El inhibidor de HO-1 SnM321, LY09-1701 se obtuvo de Frontier Sci (Logan, Utah. EUA).

4.2 Capacidad de captura de H₂O₂ por la morina.

La capacidad de la morina para capturar el H₂O₂ se determinó utilizando el reactivo Amplex Red. En una reacción con una estequiometría 1:1, el Amplex Red reacciona con H₂O₂ en presencia de peroxidasa para producir resorufina, un compuesto altamente fluorescente. Por tanto, en presencia de un compuesto con la capacidad de capturar el H₂O₂, la fluorescencia irá disminuyendo ya que la producción de resorufina es inhibida. En este ensayo se utilizaron diluciones del compuesto de interés (morina), que corresponden con concentraciones de 50, 75, 100, 200 y 300 µM. Se añadieron 25 µL de la muestra y 25 µL de H₂O₂ a una concentración de 50 µM. Se incubó durante 20 min. Posteriormente, se añadieron 50 µL de una mezcla compuesta por Amplex red a 0.1 mM, HRP (peroxidasa de rábano) 0.2 u/mL y amortiguador de fosfato 50 mM a pH 7.4 y se incubó durante 30 min en la oscuridad. La intensidad de la fluorescencia se determinó a 570 nm, utilizando el lector de placas Synergy™ HTX.

4.3 Viabilidad de las células LLC-PK1, pre-tratadas con morina y enfrentadas a cisplatino.

Existen varios métodos para determinar la viabilidad celular. En este trabajo se utilizaron los métodos de MTT y FDA. El primero se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por enzimas principalmente mitocondriales a un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. El segundo utiliza la capacidad del FDA para penetrar en las células, una vez allí es sustrato de las esterasas celulares, que lo hidrolizan para convertirlo en un compuesto fluorescente. De esta manera, la intensidad de la fluorescencia es una medida de la integridad de la actividad enzimática.

Para la determinación de la viabilidad celular, en ambos casos, las células se sembraron en placas de 48 pozos, a una densidad de 3×10^4 , en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y penicilina/estreptomicina al 1% a 37°C con 5% de CO₂ (dióxido de carbono). Se dejaron crecer por 24 h y posteriormente se aplicaron los tratamientos con morina en sus diferentes variantes (concentraciones y tiempos). El tratamiento con cisplatino, se aplicó por 24h a la concentración de 45 µM. Las células control se mantuvieron en DMEM sin SFB.

Para el método de MTT, se utilizó una dilución 1/3 a partir de una solución a 1 mg/mL. Se adicionaron 300 µL por pozo y se incubó por 2.5 h. Después de este tiempo la solución se retiró y las sales de formazan se solubilizaron con alcohol isopropílico. La intensidad del color se midió a 570 nm utilizando el lector de placas Synergy™ HTX.

Para el método FDA, a partir de una solución a 13.5 mM, se adicionaron 200 µL por pozo a una concentración de 12 µM y se incubó por 5 min. Después de este tiempo, la solución fue retirada y cada pozo se lavó con PBS (tampón fosfato salino). Para la lectura de la fluorescencia se adicionaron 200 µL de PBS y se utilizó el lector de placas Synergy™ HTX.

4.4 Viabilidad de las células HTB-4 pre-tratadas con morina y enfrentadas a cisplatino.

Dentro de los experimentos de viabilidad celular también se determinó la viabilidad de las células HTB-4, derivadas de carcinoma de vejiga, pre-tratadas con morina y enfrentadas a cisplatino. Este experimento se realizó con el objetivo de analizar el efecto de la morina sobre la citotoxicidad del cisplatino en estas células tumorales. El cultivo de las células HTB-4 se llevó a cabo de la misma manera que para las células LLC-PK1 y la viabilidad se determinó bajo las mismas condiciones por el método de FDA.

4.5 Fraccionamiento.

Para la determinación de la expresión del factor de transcripción Nrf2 las células fueron tratadas con 200 μ M de morina por 6 y 8 h y se separó la fracción citoplasmática de la nuclear. Por cada condición, incluyendo al control, se utilizaron tres cajas de 100 X 20 mm a una confluencia del 90 %. Las células se recolectaron y se centrifugaron durante 10 min a 1000 rpm, se descartó el sobrenadante y se añadió el amortiguador de homogenización 1, conteniendo: 10 mM de HEPES, 1.5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de KCl y 0.5 % de tritón, e inhibidor de proteasas. Posteriormente se utilizó un homogeneizador de tejidos de cristal, se incubaron las muestras por 15 min, se adicionó NP40 al 10 % y se centrifugaron a 800 g por 10 min a 4 °C. Un volumen de 250 μ L del sobrenadante se centrifugó a 12 000 g por 5 min, guardando como fracción citoplasmática, el sobrenadante de este último paso. El botón de la primera centrifugación se lavó con el amortiguador de homogenización 1 y después de centrifugar a 800 g por 10 min se descartó el sobrenadante y se adicionó una mezcla del amortiguador de homogenización 1 y 2 (1 M NaCl, 0.2 mM de EDTA, 20% de Glicol y 0,5 mM DTT (ditiotreitól)). Después de vortex por 15 s e incubación por 15 min, se centrifugó a 12000 g por 5 min y el sobrenadante se almacenó como fracción nuclear.

4.6 Determinación de la expresión de proteínas en las células LLC-PK1.

Para la determinación de la expresión de las proteínas GST, HO-1 y Casp-3 se utilizó la técnica de Western Blot. Las células LLC-PK1 fueron sembradas en cajas de 100 X 20 mm, a un 90% de confluencia, en medio DMEN suplementado con SFB al 10% y penicilina/estreptomicina al 1% a 37 °C con 5% de CO_2 . Se dejaron crecer por 24 h y posteriormente se aplicaron los tratamientos con morina, cisplatino o ambos, en un diseño de pre-tratamiento con morina. El lisado de las células se realizó con tampón RIPA. Las células se lavaron con PBS y la mezcla para la lisis se preparó añadiendo inhibidor de

proteasas y fosfatasas. Las muestras se incubaron a 4°C toda la noche en agitación por inmersión. Posteriormente se centrifugaron durante 5 min a 14 000 rpm, se recolectó el sobrenadante y se desechó el botón. Durante todo el proceso, las muestras y los reactivos se mantuvieron en hielo. La cuantificación de las proteínas se realizó por el método de Bradford. Para la curva estándar se utilizó albumina sérica bovina a una dilución 1/10 a partir de una solución a 1mg/mL. Los valores de absorbancia se determinaron en el lector de placas Synergy™ HTX.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida del 10 y 12 %, en dependencia del peso molecular de las proteínas de interés. Se cargaron 30 µg de proteínas, aplicando en los pozos los volúmenes correspondientes según la cuantificación. Para el control de carga se utilizaron las proteínas tubulina y lamina para los extractos citoplasmáticos y nucleares respectivamente. La transferencia se realizó con membranas de nitrocelulosa durante una 1 h y 30 min a 100 V. Las bandas de proteínas se detectaron por fluorescencia utilizando el programa Image Studio™ de Lite Software LI-COR Odyssey.

4.7 Estadística.

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos se realizaron en el programa GraphPad Prism versión 5.03. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido del test de Bonferroni de múltiple comparación. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

5. Resultados

5.1 Capacidad de captura de H₂O₂ por la morina.

En este trabajo se utilizó el reactivo Amplex Red para determinar la capacidad de captura del H₂O₂ por la morina. El Amplex Red reacciona con H₂O₂, en presencia de peroxidasa para producir resorufina, un compuesto fluorescente. Teniendo en cuenta este principio, una caída en la señal de la fluorescencia significa la disminución de H₂O₂. En la Figura 1 se observa la disminución de los valores de fluorescencia a medida que se aumenta la concentración de morina. La IC₅₀ que se calculó en el programa estadístico GraphPad, arrojó un valor de 30.86 $\mu\text{M} \pm 14.56$. Para estos ensayos la morina fue disuelta en metanol y este vehículo no interfiere en el atrapamiento del H₂O₂.

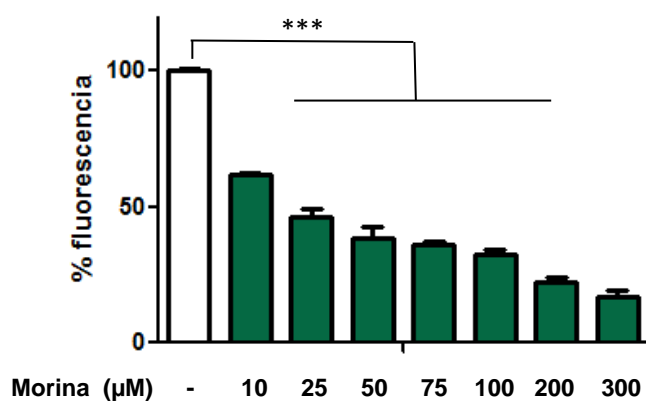


Fig. 1. Capacidad de captura de H₂O₂ por la morina, graficada como disminución de la fluorescencia. N=3. *** $p \leq 0.001$

5.2 La morina en su vehículo (metanol), no resulta tóxica para las células LLC-PK1 en las concentraciones estudiadas.

Antes de evaluar la capacidad de la morina para atenuar el daño por cisplatino, se determinó la toxicidad de este polifenol sobre las células LLC-PK1, a las concentraciones de 50, 75, 100 y 200 μM . Además se verificó la toxicidad del cisplatino sobre las células LLC-PK1 en las condiciones de esta investigación. Como se presenta en la Figura 2, la morina disuelta en metanol, no induce una disminución de la viabilidad celular, al menos en las concentraciones administradas. En la Figura 3 se observa que el cisplatino disminuye la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración.

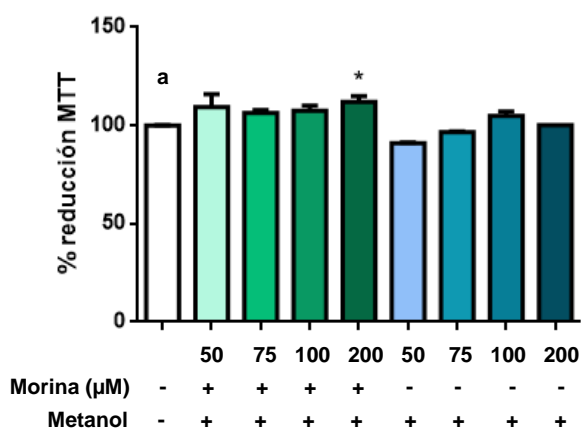


Fig. 2. Evaluación de la toxicidad de la morina y su vehículo (metanol), sobre las células LLC-PK1. En el gráfico se muestra la viabilidad de las células al ser sometidas a tratamientos de 50 a 200 μM de morina y su equivalente para el metanol. * vs a. $N=3$. $p \leq 0.05$.

5.3 El cisplatino disminuyó la viabilidad de las células LLC-PK1.

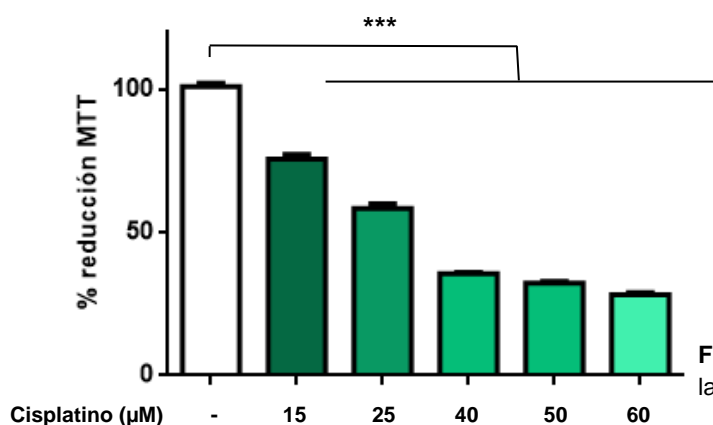


Fig. 3. Evaluación de la toxicidad del cisplatino sobre las células LLC-PK1. $N=3$. $p \leq 0.001$.

5.4 Atenuación de la toxicidad inducida por cisplatino en las células LLC-PK1.

La toxicidad de compuestos sobre líneas celulares se mide a través de ensayos de viabilidad. Existen varios métodos, que permiten estimar la funcionalidad de una célula después de un estímulo nocivo. En este trabajo se evaluó la viabilidad de las células LLC-PK1 a las 3, 6 y 24 h de pre-tratamiento con morina a diferentes concentraciones y posterior tratamiento con cisplatino por 24 h. Se escogió la concentración de 45 μM pues se quería asegurar un severo daño a las células. Una protección contra el daño por cisplatino se observa desde las 6 h de pre-tratamiento a 200 μM de morina, Figura 4 B. El pre-tratamiento por 24 h, ofreció la mejor protección contra la toxicidad por cisplatino por lo que en este caso la viabilidad se determinó por los métodos de MTT y FDA. Como se observa en la Figura 5 A y B, a medida que aumentó la concentración de morina, aumentó el número de células viables con respecto a aquellas que solo recibieron cisplatino. Esta discreta protección contra la toxicidad por cisplatino se hace significativa a partir de la concentración de 100 y 200 μM por los métodos de MTT y FDA respectivamente. En la Figura 5 C se presenta la correlación entre ambos métodos. A partir de aquí, todos los datos de viabilidad que se presentarán se realizaron por la metodología de FDA.

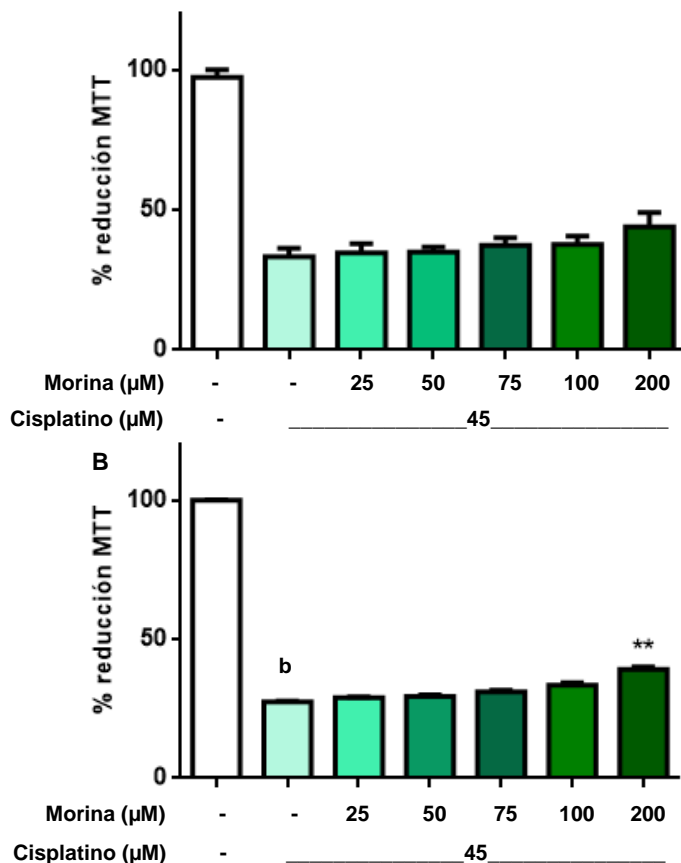


Fig. 4. Viabilidad de las células LLC-PK1 pre-tratadas con 25, 50, 75, 100 y 200 μM de morina por 3 y 6 h, **A** y **B** respectivamente y posteriormente enfrentadas a cisplatino por 24 h. **** vs b. N=3. P \leq 0.01.**

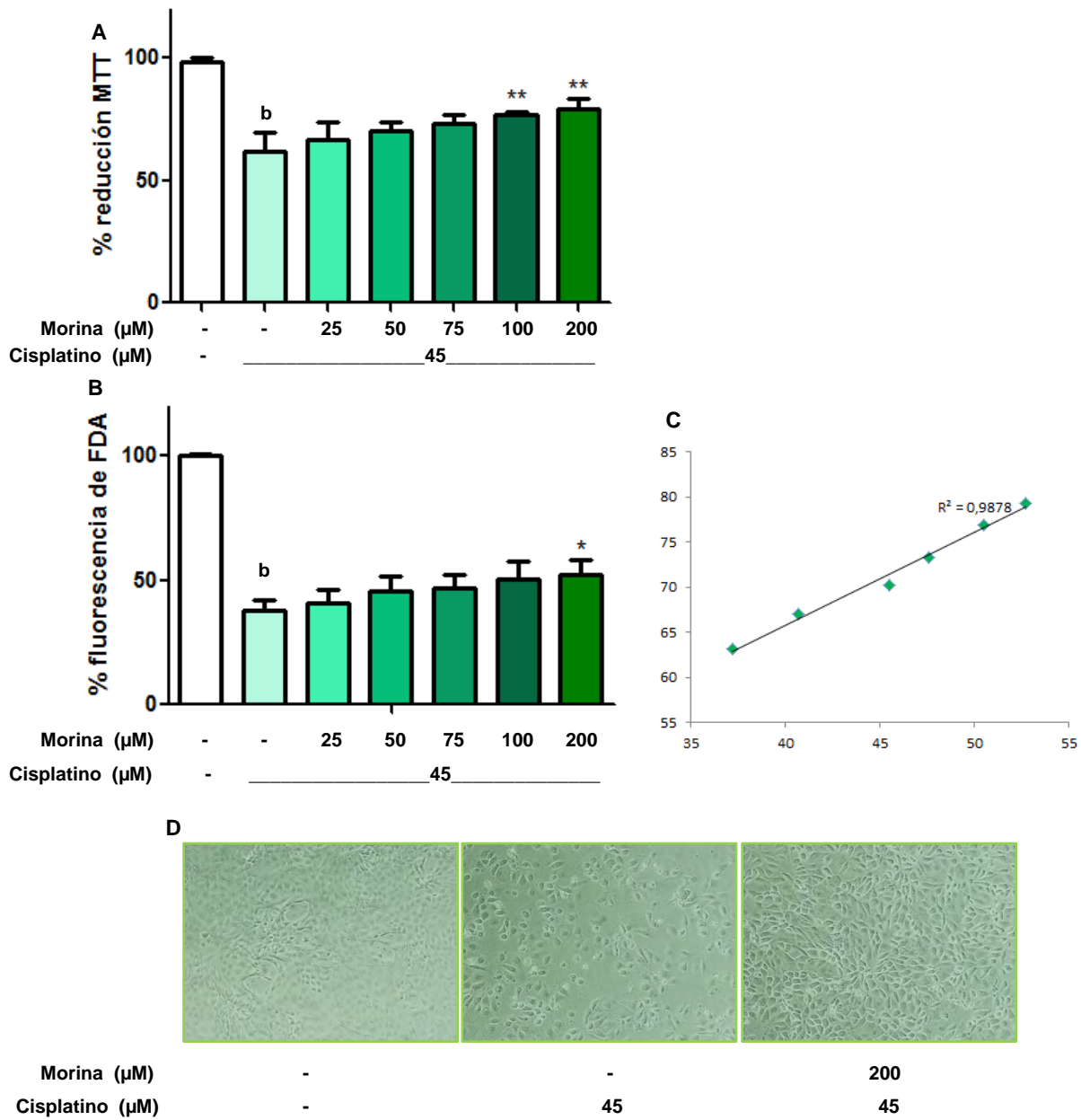


Fig. 5. Viabilidad de las células LLC-PK1 pre-tratadas con 25, 50, 75, 100 y 200 μM de morina por 24h y posteriormente enfrentadas a cisplatino por otras 24 h. **A:** metodología por MTT. **B:** metodología por FDA. **C:** correlación entre ambos métodos. **D:** imágenes que corresponden a las células control, las tratadas únicamente con cisplatino y aquellas que recibieron el pre-tratamiento con morina y posteriormente con cisplatino. * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.01$ vs b. **N=3**

5.5 Expresión de la casp-3 en las células LLC-PK1 pre-tratadas con morina y enfrentadas cisplatino.

Una vez concluidos los experimentos de viabilidad en las células LLC-PK1, se procedió a determinar si había un cambio en la expresión de la forma activa de casp-3, proteína ejecutora de la apoptosis que conecta a las vías intrínseca y extrínseca. El anticuerpo primario contra casp-3 utilizado solo reconoce a la forma activa (escindida) de la proteína. Para este experimento escogimos la concentración de 35 μM ya que con 45 μM no se obtenía un buen rendimiento en la concentración de proteínas debido a la muerte celular. Aunque se realizaron tres experimentos independientes solo se graficaron los resultados de dos de ellos ya que el tercero incrementaba mucho más la desviación estándar. En este caso la morina no parece ejercer una disminución en la expresión de la casp-3.

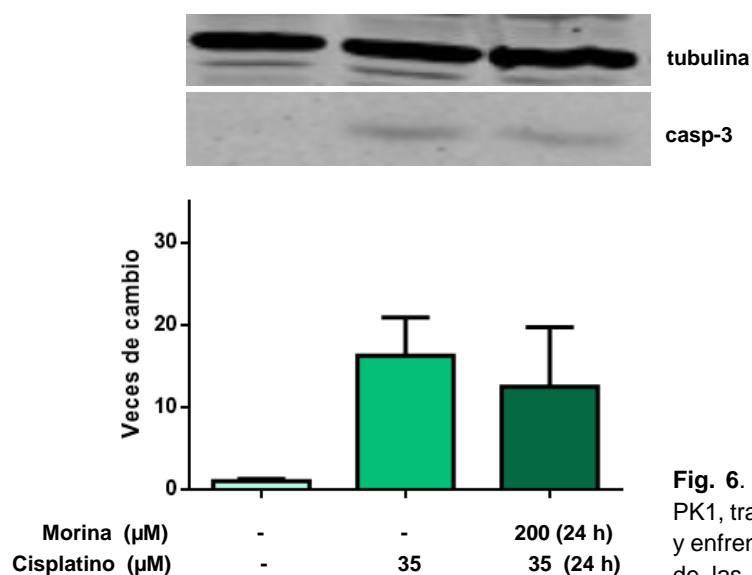


Fig. 6. Expresión de la casp-3, en las células LLC-PK1, tratadas con cisplatino o pre-tratadas con morina y enfrentadas a cisplatino. **A:** imágenes de las bandas de las proteínas tubulina y casp-3, detectadas por fluorescencia. **B:** cuantificación de la intensidad de las bandas. **N=2**

5.6 Expresión de las enzimas GST y HO-1 en las células LLC-PK1.

Con el objetivo de asociar la protección observada a la actividad antioxidante de la morina, se determinó la expresión en el tiempo, de las enzimas GST y HO-1, en las células LLC-PK1, tratadas con 200 μM de morina. Como se observa en la Figura 8 A y B, el tratamiento con morina, aumenta la expresión de HO-1 con respecto al control, con valores significativos, a partir de las 6 h. En el caso de la GST, no se observan cambios significativos, Figura 7 A y B.

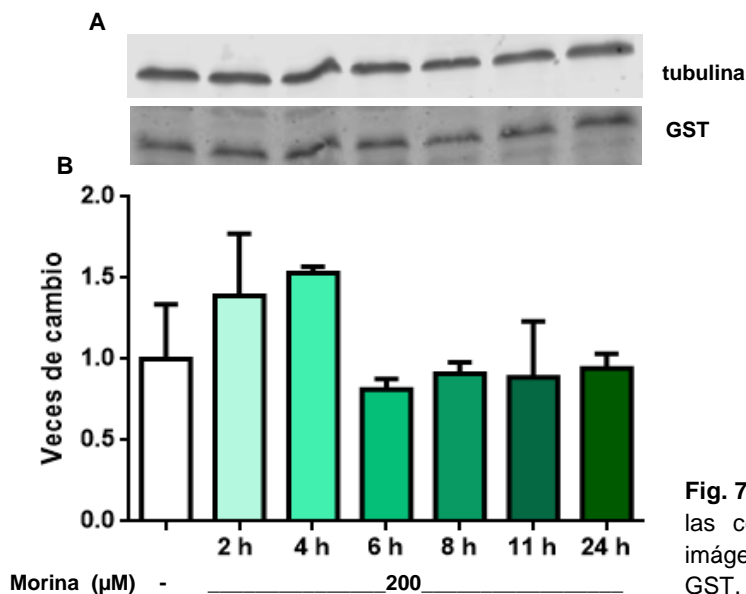


Fig. 7. Expresión de la enzima GST en el tiempo, en las células LLC-PK1, tratadas con 200 μM . **A:** imágenes de las bandas de las proteínas tubulina y GST, detectadas por fluorescencia. **B:** cuantificación de la intensidad de las bandas. **N=2**

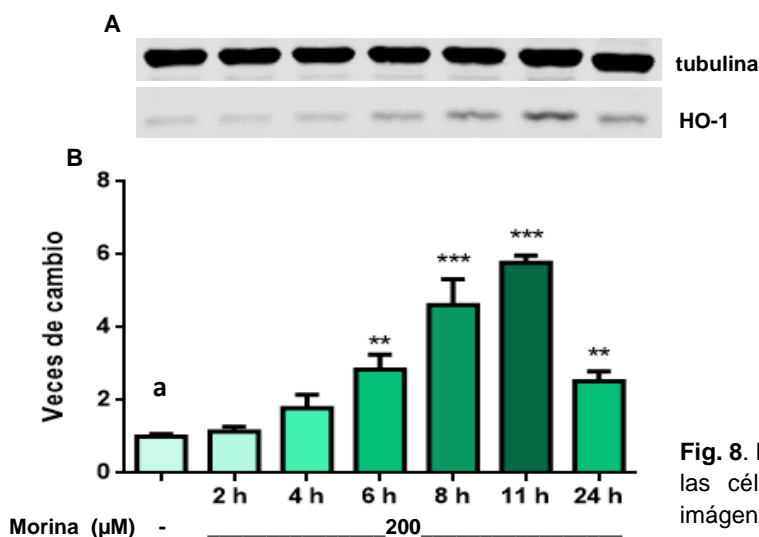


Fig. 8. Expresión de la enzima HO-1 en el tiempo, en las células LLC-PK1, tratadas con 200 μM . **A:** imágenes de las bandas de las proteínas tubulina y HO-1, detectadas por fluorescencia. **B:** cuantificación de la intensidad de las bandas. ****** $p \leq 0.01$ y ******* $p \leq 0.001$ vs a. **N=3**.

5.7 El pre-tratamiento con morina mantiene la expresión de la HO-1 después de la administración de cisplatino.

Al pre-tratar las células LLC-PK1 con 200 μM de morina por 12 h y posterior administración de cisplatino por 8 h, se observó que en las células pre-tratadas, la expresión de HO-1 aumentó de manera significativa con respecto a aquellas que solo recibieron el tratamiento con cisplatino. Figura 9 A y B.

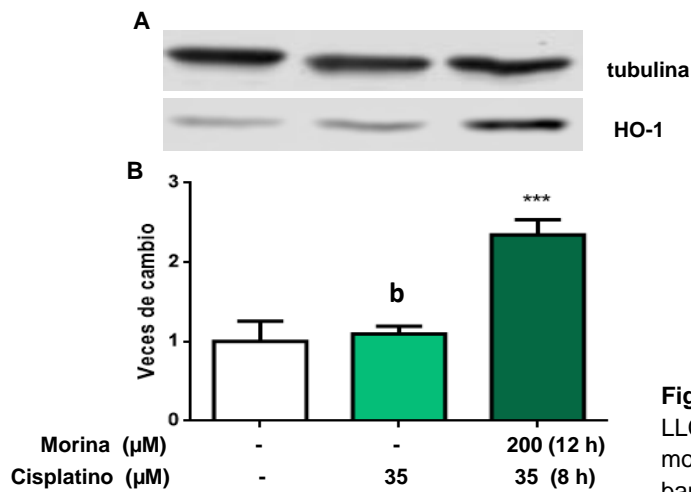


Fig. 9. Expresión de la enzima HO-1, en las células LLC-PK1, tratadas con cisplatino o pre-tratadas con morina y enfrentadas a cisplatino. **A:** imágenes de las bandas de las proteínas tubulina y HO-1, detectadas por fluorescencia. **B:** cuantificación de la intensidad de las bandas. *** $p \leq 0.001$ vs b. N=3.

5.8 La morina no induce el aumento de expresión del factor de transcripción Nrf2 en el núcleo.

Con el objetivo de esclarecer el mecanismo por el cual la morina induce un aumento en la expresión de la HO-1, se midió la expresión del factor de transcripción Nrf2 en el núcleo de las células LLC-PK1. Los resultados indican que no hay un aumento significativo en el tratamiento con morina respecto a las células control. Figura 10 A y B.

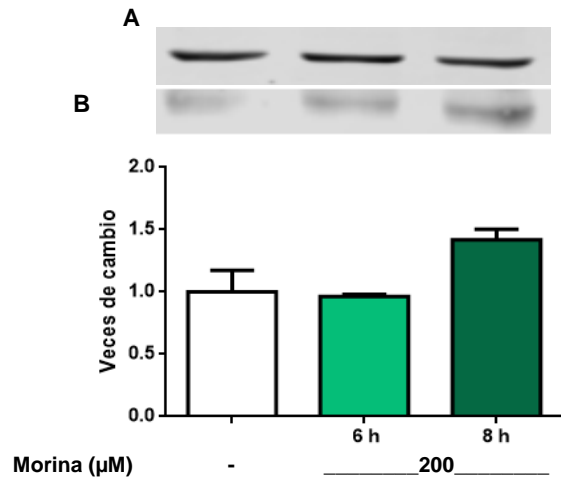


Fig. 10. Expresión del factor de transcripción Nrf2 a las 6 y 8 h, en el núcleo de las células LLC-PK1, tratadas con 200 μM de morina. **A:** imágenes de las bandas de las proteínas lámina y Nrf2, detectadas por fluorescencia. **B:** cuantificación de la intensidad de las bandas. **C:** eficiencia del fraccionamiento. **N=3**

5.9 El inhibidor SnM321, revirtió la atenuación contra el daño por cisplatino, ejercido por la morina.

Para determinar si el efecto citoprotector de la morina fue mediado por la HO-1 se utilizó el inhibidor SnM321 que interfiere con la actividad enzimática de esta proteína. Al combinar los pre-tratamientos de morina con diferentes concentraciones del inhibidor SnM321, se observó que la atenuación de la toxicidad por cisplatino que ofrece el pre-tratamiento de 200 μM de morina, se previno por el inhibidor SnM321, haciéndose estadísticamente significativa a una concentración de 15 μM , Figura 11. Este resultado sugiere que la atenuación de la toxicidad por cisplatino en las células LLC-PK1 esta mediada por la activación de la HO-1.

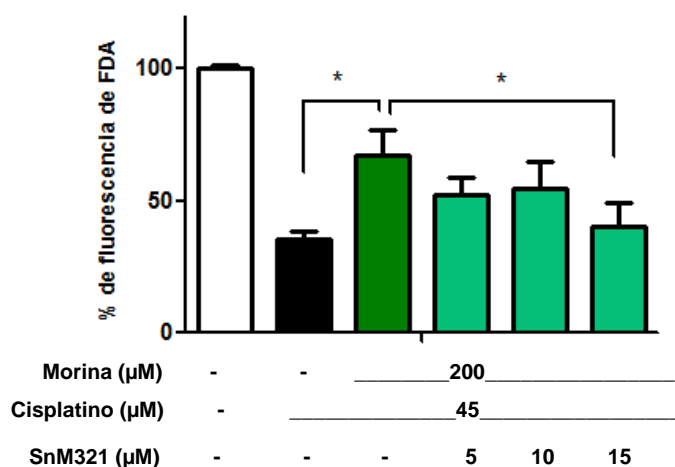


Fig. 11. Viabilidad de las células LLC-PK1 pre-tratadas con 200 μM de morina o en combinación con el inhibidor SnM321, por 24h y posteriormente enfrentadas a cisplatino por otra 24 h. **N=3.** * $p \leq 0.05$.

5.10 La morina disminuye la viabilidad de las células HTB-4 a 200 μM y afecta la toxicidad por cisplatino.

Con el objetivo de determinar el efecto de la morina sobre línea tumoral HTB-4 se midió la viabilidad, enfrentando a las células con diferentes concentraciones de morina (75, 100 y 200 μM) por 24 h, Figura 12 A. Para conocer la interferencia de la morina con la toxicidad inducida por cisplatino en las HTB-4, se administraron pre-tratamientos con las mismas concentraciones de morina y posteriormente se aplicó el tratamiento con cisplatino, Figura 12 A. El solo tratamiento con morina disminuye la viabilidad de las células HTB-4 a una concentración de 200 μM , Figura 12 A y B. El pre-tratamiento con morina disminuye la viabilidad de las células HTB-4 y de alguna manera, interfiere con la toxicidad del cisplatino, ya que no se observa un efecto aditivo cuando se combinan los dos tratamientos.

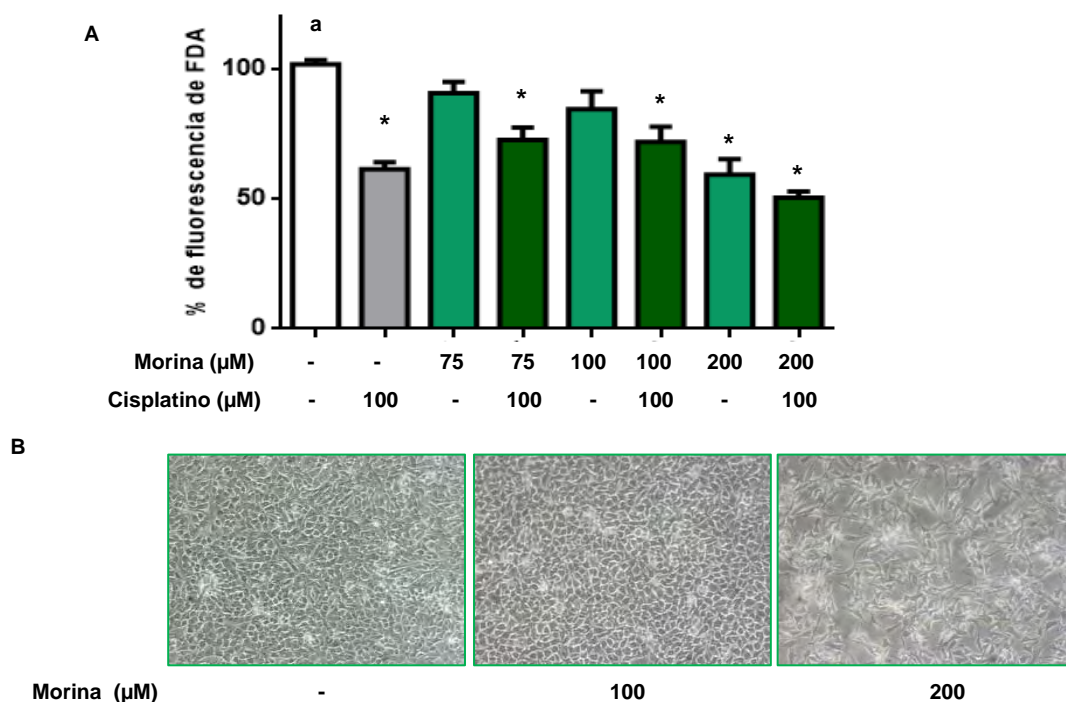


Fig. 12. A Viabilidad de las células HTB-4 tratadas con morina a diferentes concentraciones o pre-tratadas con morina a las mismas concentraciones y enfrentadas a cisplatino. Todos los tratamientos fueron por 24 h. * $p \leq 0.05$ vs a. $N = 3$. Ninguno de los tratamientos con morina o morina y cisplatino resultó significativo contra el tratamiento solo con cisplatino. **B:** imágenes de las células HTB-4 no tratadas (control) y tratadas con 100 y 200 μM de morina.

6. Discusión

El cisplatino es un agente antineoplásico, ampliamente utilizado en el tratamiento de tumores sólidos. Sin embargo, los pacientes que reciben esta quimioterapia desarrollan una variedad de efectos adversos, siendo uno de los más comunes y frecuentes, la nefrotoxicidad¹². A pesar de los grandes esfuerzos en el desarrollo de terapias nefroprotectoras, la mejor alternativa hasta el momento es la hidratación con sales y administración simultánea de manitol. Esta estrategia reduce de manera significativa la nefrotoxicidad, pero también puede interferir con la actividad antineoplásica¹². La utilización de antioxidantes naturales se ha venido considerando, como una opción más eficiente para aminorar los efectos indeseables del cisplatino³. A la morina, un polifenol derivado del metabolismo secundario de varias plantas, se le han atribuido diferentes actividades citoprotectoras. Estudios *in vitro* han demostrado los efectos anti-oxidantes, anti-inflamatorios y cardioprotectores^{124, 8 y 125} de este flavonoide. También existen reportes en modelos *in vivo* de la atenuación de la nefrotoxicidad por cisplatino. En estos últimos se ha observado una recuperación de la actividad de enzimas como catalasa y SOD, de los niveles de glutatión, así como la disminución de marcadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 en los animales tratados con morina con respecto a los que solo recibieron cisplatino^{142, 143, 144}. Aunque estos resultados demuestran la potencialidad de la morina en la nefroprotección contra cisplatino, aún existe información por determinar sobre los efectos a nivel molecular que podría inducir este polifenol en su actividad citoprotectora.

Antes de comenzar los ensayos biológicos, se determinó la captura de H₂O₂ por la morina en un ensayo *in vitro* sin la presencia de células. Aunque son varias las EROs que se han asociado a la generación de estrés oxidante por el cisplatino, el H₂O₂ se considera uno de los blancos más efectivos para atenuar la toxicidad inducida por este fármaco. Existen estudios sobre el papel de la catalasa en la atenuación de la toxicidad por cisplatino^{145 y 146}. Si bien es cierto que el O²⁻ es inicialmente formado, este se transforma rápidamente en H₂O₂ de manera espontánea o enzimáticamente y este último posee una vida media más larga¹⁴⁶. Como se observa en la Figura 1 a la concentración de 200 μ M la morina disminuye la fluorescencia de un 100 a un 22 % y el análisis estadístico arrojó un valor de IC₅₀ igual a 30.86 \pm 14.56 μ M. En este ensayo la morina se enfrentó a una concentración igual a 50 μ M de H₂O₂. Para el piruvato, uno de los atrapadores de H₂O₂ más utilizados y citados en la literatura, se ha reportado un valor de IC₅₀ igual a 446 \pm 49 μ M en un ensayo no enzimático

frente a concentraciones de H₂O₂ de 200 μM¹⁴⁷. Comparando estos resultados podríamos asumir que la morina tiene una eficiente capacidad de captura de H₂O₂.

Antes de evaluar el papel de la morina en la atenuación de la citotoxicidad por cisplatino, se verificó que las concentraciones de trabajo (25, 50, 75, 100 y 200 μM, disueltas en metanol) no resultaran tóxicas para las células. En la Figura 2 se puede observar que ninguna de las concentraciones escogidas disminuyó la viabilidad celular. En el caso del cisplatino se escogió una concentración de 45 μM, que correspondió con la muerte de un número de células superior a la IC₅₀ (Figura 3). Una vez establecidos estos parámetros se determinó la viabilidad de las células LLC-PK1 en un diseño experimental que incluyó pre-tratamientos con morina por 3, 6 y 24 h y posteriormente con cisplatino por 24 h en los tres casos. Como se observa en la Figura 4 A, el pre-tratamiento por tres horas no ofreció protección contra el daño por cisplatino, a ninguna de las concentraciones probadas. Este resultado sugiere, que a pesar de la eficiente captura de H₂O₂ por la morina, este polifenol en el ambiente celular, actúa principalmente a través de eventos moleculares más tardados como pudiera ser la inducción de proteínas. Con seis horas de pre-tratamiento (Figura 4 B) se observa una discreta atenuación de la toxicidad a 200 μM, la cual se hace mayor a las 24 h (Figura 5 A, B y D). Para este último tiempo el nivel de protección se corresponde con un 20% en el aumento de la viabilidad celular. Estos resultados son comparables a otras investigaciones donde se ha evaluado la capacidad citoprotectora contra cisplatino de diferentes anti-oxidantes. Los tratamientos con sulforafano¹⁴⁸, tetra-hidrocurcumina⁵ y schizandrin¹⁴⁹, indujeron un aumento en la viabilidad celular muy similares. La citotoxicidad por cisplatino abarca muchos procesos celulares. Una vez en la célula, inhibe la replicación del ADN, induce la generación de EROs lo que conlleva a un estado de estrés oxidante, activa señales pro-inflamatorias y finalmente desencadena apoptosis¹², entonces, resulta lógico pensar que los discretos aumentos en la viabilidad celular se deben a la incapacidad de estos compuestos, incluida la morina, para atacar todos los blancos de la toxicidad por cisplatino. Debido a que el método de MTT no ofrece una medida directa de la viabilidad, los ensayos con 24 h de pre-tratamiento, también se llevaron a cabo por la metodología de FDA. En la Figura 5 C, se presenta la correlación entre ambos métodos lo cual ofrece mayor confiabilidad a los resultados.

Al comprobar un aumento en la viabilidad de las células que son pre-tratadas con morina con respecto a las que solo reciben cisplatino, resulta lógico asociar este hecho con la disminución de la casp-3, proteína que vincula la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis y desencadena la muerte celular. Sin embargo, una vez medida la expresión de esta proteasa (Figura 6) no se observa el cambio esperado de una manera significativa. Es posible que para el tiempo escogido, 24 h, ya no sea posible ver cambios significativos.

A lo largo de las investigaciones sobre la nefrotoxicidad, se han identificado diversos blancos, que una vez bloqueados contribuyen a la detoxificación y recuperación de las células renales. La activación de enzimas antioxidantes, ha resultado una de las alternativas a tomar en consideración. La GST es una enzima detoxificadora de fase II, que cataliza la adición nucleofílica del GSH a una gran variedad de electrófilos, como las EROs y algunos fármacos¹⁵⁰. La resistencia a cisplatino se ha asociado con la presencia de altos niveles de GSH, lo que sugiere que la inactivación de este fármaco ocurre por su conjugación al GSH¹⁵¹. En este trabajo no se observó ningún cambio en la expresión de esta enzima, pero no se debe descartar la modificación de su actividad por la morina, Figura 7 A y B

La HO-1 se encuentra entre las enzimas que con mayor frecuencia se asocia a la protección contra la toxicidad renal. Ratones HO-1^{-/-} presentaron daños renales más agudos y apoptosis severa frente al tratamiento con cisplatino, con respecto a los de fenotipo silvestre⁵⁷. En estudios *in vitro*, la sobre expresión⁵⁷ o la inhibición de la actividad⁸¹ de la HO-1 protege contra o aumenta la toxicidad por cisplatino respectivamente. En la nefrotoxicidad por ciclosporina⁸², cloruro de mercurio⁸³ y maleato⁸⁵, también se ha visto la importancia de la HO-1 en el restablecimiento de la homeostasis celular. Aunque existen datos sobre la capacidad protectora de la morina frente al daño por cisplatino^{142, 143 y 144}, no se ha informado aun el papel de la HO-1 en la protección ofrecida por este polifenol. En este trabajo se demuestra que la morina aumenta la expresión de la HO-1 en el tiempo. Como se observa en la Figura 8, el aumento de la expresión de esta enzima comienza a ser significativo a partir de las 6 h. Teniendo en cuenta estos resultados se procedió a determinar si aun después del tratamiento con cisplatino, la morina podía mantener la expresión de la HO-1. Como se observa en la Figura 9, después de 12 h de pre-tratamiento con morina, más 8 h de tratamiento con cisplatino, las células pre-tratadas tienen una mayor expresión de HO-1 con respecto a las que solo recibieron cisplatino. Estos resultados sugieren que la HO-1 tiene gran relevancia en la atenuación de la toxicidad por cisplatino

en las células LLC-PK1. Para corroborar esta hipótesis se determinó la viabilidad enfrentando a las células a un pre-tratamiento con una combinación de morina y el inhibidor SnM321. Como se presenta en la Figura 11, las células pre-tratadas con la combinación de SnM321 y morina, disminuyen la viabilidad celular con respecto a las que recibieron morina sin inhibidor, lo que significa que la protección ofrecida por la morina disminuyó al combinarse con el inhibidor. Si bien es cierto que las metaloporfirinas no son inhibidores específicos de la HO-1, ya que pueden ejercer su efecto sobre la NOS y la sGC (guanilato ciclasa soluble)^{152 y 153}, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la HO-1 desempeña un papel fundamental en la atenuación del daño por cisplatino en este modelo.

Una vez comprobado el papel de la HO-1 en la atenuación de la toxicidad por cisplatino, surgió la pregunta sobre qué elemento, río arriba de esta cascada, era responsable del aumento de expresión de esta proteína. Uno de los factores de transcripción asociados a la inducción de HO-1 es Nrf2. En la Figura 10 se presenta la expresión de Nrf2 en el núcleo de las células LLC-PK1 después de 6 y 8 h de tratamiento con morina. Aunque numéricamente se ve una tendencia al aumento, no se obtuvieron resultados significativos para ninguno de los tiempos estudiados. Los polifenoles, específicamente los flavonoides hidroxilados en la posición 3 del anillo C, como es el caso de la morina, se han identificado como inductores de Nrf2¹⁵⁴. La inducción del factor de transcripción Nrf2, por parte de los polifenoles se puede explicar por su capacidad para actuar como pro-oxidantes leves¹⁵⁵ y el efecto de hormesis que esto puede desencadenar. La mayoría de los polifenoles inducen toxicidad celular a altas concentraciones mientras que a bajas dosis promueven un ligero estrés químico que activa el fenómeno de hormesis, el cual se caracteriza por el mejoramiento de las funciones celulares en respuesta a ligeros niveles de estrés¹⁵⁶. El factor de transcripción Nrf2 es regulado por la proteína Keap1 que promueve su degradación vía proteosoma en condiciones normales y su translocación a núcleo cuando es oxidada bajo condiciones de estrés. Estructuralmente se ha asociado la hidroxilación en la posición 3, como el elemento que le confiere a los flavonoides la capacidad de donar electrones. Una de las teorías que explica la inducción de elementos de respuesta a electrófilos por parte de los flavonoides es que estas moléculas pueden oxidar directamente los residuos de cisteína de la proteína Keap1, con lo cual Nrf2 queda libre, se transloca al núcleo e inicia la transcripción de un grupo de enzimas antioxidantes¹⁵⁷. No obstante, existen otros factores de transcripción asociados a la inducción de la HO-1 como son NfκB, AP-1, AP-2, que en este caso podrían estar ejerciendo un mayor efecto que Nrf2.

En la búsqueda de una terapia protectora contra los efectos de un fármaco quimioterapéutico, es muy importante tener en cuenta la interacción del agente protector con la actividad antineoplásica. En esta investigación se analizó el efecto de la morina por si sola y su interacción con el cisplatino en una línea de células derivadas de carcinoma de vejiga. El carcinoma de vejiga es uno de los tumores para los que se prescribe cisplatino como primera opción de quimioterapia. Como se observa en la Figura 12, el tratamiento solo con morina, disminuye la viabilidad de las células HTB-4 de manera inversamente proporcional a la concentración, haciéndose significativo a 200 μM , que corresponde con la concentración a la que se observa la mayor protección contra el daño por cisplatino en las células LLC-PK1. Al analizar las barras que representan la combinación del pre-tratamiento con morina y posterior adición de cisplatino, se puede apreciar que el pre-tratamiento, de alguna manera interfiere con la toxicidad por cisplatino ya que no se observa un efecto aditivo, es decir, en las células con morina y cisplatino no se disminuye la viabilidad de manera significativa con respecto a las que solo recibieron cisplatino. Lo que se interpreta de este resultado es que la morina induce la muerte de un número de células, pero al adicionar cisplatino, no parece haber un efecto de este último sobre las células restantes. La diferencia en la toxicidad de la morina en las células HTB-4 con respecto a las LLC-PK1 se puede explicar a través de la vía PI3K/Akt. Para las células tumorales, esta vía de señalización es fundamental, ya que puede reprimir la expresión de proteínas pro-apoptóticas como FasL y Bim y activar otras anti-apoptóticas como Mdm2 y Bcl-2, permitiendo a la célula evitar la muerte celular y proliferar indefinidamente. Como habíamos mencionado antes, los polifenoles pueden actuar como pro-oxidantes. Bajo condiciones normales, las células tumorales tienen niveles de EROs que le permiten mantener activa la vía PI3K/Akt a través de la inhibición de la fosfatasa PTEN, sin embargo, la adición de polifenoles podrían romper este equilibrio ya que al actuar como pro-oxidantes, elevan aún más las EROs, que a su vez pueden inactivar a la proteína Akt¹⁵⁸. Existen reportes de la selectividad de la morina para inducir una mayor toxicidad en células escamosas de carcinoma oral humano con respecto a las células normales de la mucosa oral. Según los resultados de estos investigadores, la selectividad se debe a la inactivación de Akt en las células de carcinoma con respecto a las células normales¹⁰.

Como habíamos comentado anteriormente, la adición de cisplatino en células pre-tratadas con morina, no disminuye la viabilidad celular con respecto al efecto del cisplatino, Figura

12. Se ha demostrado que la morina induce apoptosis y arresto del ciclo celular en las células de leucemia HL-60. El arresto en la fase G2/M fue asociado a un incremento de p21 y disminución de Cdc25c y el complejo de clinas A y B1¹⁴¹. Es posible que al momento de la adición de cisplatino, las células HTB-4 se encuentren bajo arresto del ciclo celular y por tanto sean menos susceptibles a la toxicidad por cisplatino.

Con los resultados obtenidos en esta investigación se podría sugerir que la morina, más que ser utilizada como agente nefroprotector contra la toxicidad por cisplatino podría implementarse en el tratamiento de tumores de vejiga en sustitución del cisplatino. Para poder confirmar este planteamiento sería necesario la investigación en un modelo animal donde se pueda evaluar simultáneamente la capacidad citoprotectora de la morina contra el daño renal así como su influencia en la actividad antineoplásica del cisplatino.

7. Conclusiones

En esta investigación podemos concluir que la morina puede atrapar eficientemente al H_2O_2 en condiciones *in vitro* libre de células. Además se demostró que atenúa la toxicidad del cisplatino en las células LLC-PK1 de una manera tiempo y concentración dependiente, siendo 200 μM y 24 h la concentración y tiempo más efectivos. Este efecto protector fue mediado por la enzima antioxidante HO-1. Por otra parte, la morina por si sola demostró tener actividad citotóxica en las células tumorales HTB-4 a una concentración de 200 μM , que coincide con la concentración que ejerce la máxima protección en las células LLC-PK1. Sin embargo la morina no potenció la toxicidad del cisplatino en las células HTB-4.

8. Bibliografía

¹ **Beyer J, Rick O, Weinknecht S, et al.** Nephrotoxicity after high-dose carboplatin, etoposide and ifosfamide in germ-cell tumors: incidence and implications for hematologic recovery and clinical outcome. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20 (10): 813-819.

² **Siddik ZH.** Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22 (47): 7265-7279.

³ **Kamel KM, Abd El-Raouf OM, Metwally SA, Abd El-Latif HA y El-sayed ME.** Hesperidin and Rutin, Antioxidant Citrus Flavonoids, Attenuate Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *J Biochem Molecular Toxicology* 2014; 28 (7): 312-319

⁴ **Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS.** Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contributions to Nephrology* 2005; 148: 107-121.

⁵ **Song KI, Park JY, Lee S, Lee D, Jang HJ, Kim SN, Ko H, Kim HY, Lee JW, Hwang GS, Kang KS, Yamabe N.** Protective Effect of Tetrahydrocurcumin against Cisplatin-Induced Renal Damage: In Vitro and In Vivo Studies. *Planta Medica* 2015; 81 (4): 286-291

⁶ **Ricardo KFS, Toledo de Oliveira T, Nagem TJ, Pinto AS, Oliveira MGA.** Effect of Flavonoids Morin; Quercetin and Nicotinic Acid on Lipid Metabolism of Rats experimentally Fed with Triton. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2001; 44 (3): 263-267

⁷ **Heeba GH y Mahmoud ME.** Therapeutic potential of morin against liver fibrosis in rats: Modulation of oxidative stress, cytokine production and nuclear factor kappa B. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2014; 37 (2): 662-671

⁸ **Sinha K, Sadhukhan P, Saha S, Pal PB, Sil PC.** Morin protects gastric mucosa from nonsteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin induced inflammatory damage and apoptosis by modulating NF-κB pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015; 1850 (4): 769-783

-
- ⁹ **Park JY, Kang KA, Kim KC, Cha JW, Kim EH, Hyun JW.** Morin Induces Heme Oxygenase-1 via ERK-Nrf2 Signaling Pathway. *Journal of Cancer Prevention* 2013; 18(3): 249-256.
- ¹⁰ **Brown J, O'Prey J, Harrison PR.** Enhanced sensitivity of human oral tumours to the flavonol, morin, during cancer progression: involvement of the Akt and stress kinase pathways. *Carcinogenesis* 2003; 24 (2): 171-177.
- ¹¹ **Ali I, Wani WA, Saleem K, Haque A.** Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2013; 13 (2): 296-306.
- ¹² **Pabla N and Dong Z.** Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International* 2008; 73 (9): 994-1007.
- ¹³ **Hill JM, Speer RJ.** Organo-platinum complexes as antitumor agents. *Anticancer Research* 1982; 2 (3): 173-186.
- ¹⁴ **Gomez Campdera FJ, Gonzalez P, Carrillo A, Estelles MC, Rengel M.** Cisplatin nephrotoxicity: symptomatic hypomagnesemia and renal failure. *The International Journal of Pediatric Nephrology* 1986; 7 (3): 151-152.
- ¹⁵ **Brillet G, Deray G, Jacquiaud C, Mignot L, Bunker D, Meillet D, Raymond F, Jacobs C.** Long-term renal effect of cisplatin in man. *American Journal of Nephrology* 1994; 14 (2): 81- 84.
- ¹⁶ **Oh GS, Kim HJ, Shen A, Lee SB, Khadka D, Pandit A, So HS.** Cisplatin-induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies. *Electrolyte Blood Press* 2014; 12 (2): 55-65.
- ¹⁷ **Safirstein R, Miller P, Guttenplan JB.** Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney International* 1984; 25 (5): 753-758.
- ¹⁸ **Endo T, Kimura O, Sakata M.** Carrier-mediated uptake of cisplatin by the OK renal epithelial cell line. *Toxicology* 2000; 146 (2-3): 187-195.

-
- ¹⁹ **Kolb RJ, Ghazi AM, Barfuss DW.** Inhibition of basolateral transport and cellular accumulation of cDDP and *N*-acetyl-L-cysteine-cDDP by TEA and PAH in the renal proximal tubule. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2003; 51 (2): 132-138.
- ²⁰ **Gately DP, Howell SB.** Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *British Journal of Cancer* 1993; 67(6): 1171-1176.
- ²¹ **Pabla N, Murphy RF, Liu K, Dong Z.** The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 2009; 296 (3): 505 -511.
- ²² **Ciarimboli G.** Organic cation transporters. *Xenobiotica* 2008; 38 (7-8): 936-71.
- ²³ **Ciarimboli G, Deuster D, Knief A, Sperling M, Holtkamp M, Edemir B, Pavenstädt H, Lanvers-Kaminsky C, am Zehnhoff-Dinnesen A, Schinkel AH, Koepsell H, Jürgens H, Schlatter E.** Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *The American Journal of Pathology* 2010; 176 (3):1169- 1180.
- ²⁴ **Ciarimboli G.** Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. *Anticancer Research* 2014; 34 (1): 547-50.
- ²⁵ **Townsend DM, Tew KD, He L, King JB, Hanigan MH.** Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2009; 63 (2): 79-85.
- ²⁶ **Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lapus MG, Hanigan MH.** Metabolism of Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003; 14 (1): 1-10.
- ²⁷ **Townsend DM, Hanigan MH.** Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate beta-lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 300 (1): 142-148.

²⁸ **Hanigan MH, Lykissa ED, Townsend DM, Ou CN, Barrios R, Lieberman MW.** Gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice are resistant to the nephrotoxic effects of cisplatin. *American Journal of Pathology* 2001; 159 (5): 1889-1894.

²⁹ **Hanigan MH, Gallagher BC, Townsend DM, Gabarra V.** Gamma-glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin *in vivo*. *Carcinogenesis* 1999; 20 (4): 553-559.

³⁰ **Pascoe JM, Roberts JJ.** Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. I. DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds. *Biochemical Pharmacology* 1974; 23 (9) 1359-1365.

³¹ **Wang D, Lippard SJ.** Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005; 4 (4): 307-320.

³² **Burger H, Nooter K, Boersma AWM, Kortland CJ, Stoter G.** Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *International Journal of Cancer* 1997; 73 (4): 592-599.

³³ **Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC.** Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278 (11): 9100-9106.

³⁴ **Cullen KJ, Yang Z, Schumaker L, Guo Z.** Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2007; 39 (1): 43-50.

³⁵ **Podratz JL, Knight AM, Ta LE, Staff NP, Gass JM, Genelin K, Schlattau A, Lathroum L, Windebank AJ.** Cisplatin induced Mitochondrial DNA Damage In Dorsal Root Ganglion Neurons. *Neurobiology of Disease* 2011; 41(3): 661-668.

³⁶ **Martins NM, Santos NA, Curti C, Bianchi ML, Santos AC.** Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *Journal of Applied Toxicology* 2008; 28 (3): 337-344.

-
- ³⁷ **Praet M, Laghmiche M, Pollakis G, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM.** In vivo and in vitro modifications of the mitochondrial membrane induced by 4' epi-adriamycin. *Biochemical Pharmacology* 1986; 35 (17): 2923-2928.
- ³⁸ **Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF.** Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Porcine Proximal Tubular Cells: Mitochondrial Dysfunction by Inhibition of Complexes I to IV of the Respiratory Chain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997; 280(2): 638-649.
- ³⁹ **Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B.** Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular Interventions* 2005; 5(2): 94-111.
- ⁴⁰ **Hauff KD, Hatch GM.** Cardiolipin metabolism and Barth syndrome. *Progress in Lipid Research* 2006 45 (2): 91-101.
- ⁴¹ **Ryu HG, Jeong SJ, Kwon HY, Lee HJ, Lee EO, Lee MH, Choi SH, Ahn KS, Kim SH.** Penta-O-galloyl-b-D-glucose attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity via reactive oxygen species reduction in renal epithelial cells and enhances antitumor activity in Caki-2 renal cancer cells. *Toxicology in Vitro* 2012; 26 (2): 206-214.
- ⁴² **Gilbert DL.** Perspective on the history of oxygen and life. In: *Oxygen and the Living Process: An Inter-disciplinary Approach.* Springer Verlag 1981: 1-43.
- ⁴³ **Kohen R, Nyska A.** Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology* 2002; 30 (6): 620-650.
- ⁴⁴ **Conklin KA.** Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. *Integrative Cancer Therapies* 2004; 3(4): 294-300.
- ⁴⁵ **Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV.** Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metabolism Reviews* 1999; 31 (4): 971-997.

-
- ⁴⁶ **Arany I, Safirstein RL.** Cisplatin nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology* 2003; 23 (5): 60-64.
- ⁴⁷ **Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV.** Role of cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney International* 1988; 54 (5): 1562-1569.
- ⁴⁸ Serie Ciencias Biomédicas. Aspectos fundamentales del Citocromo P450. Colección Docencia Universitaria. Editor de la Colección Docencia Universitaria: Fernando Bandrés Moya, coordinadora de la Monografía: Eva Arribas Arbiol.
- ⁴⁹ **Halliwell B, Gutteridge JM.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. An overview. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 1-85.
- ⁵⁰ **Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M.** Relationship of Intracellular Calcium and Oxygen Radicals to Cisplatin-Related Renal Cell Injury. *Journal of Pharmacological Sciences* 2006. 100 (1): 65 -72.
- ⁵¹ **Kim HJ, Lee JH, Kim SJ, Oh GS, Moon HD, Kwon KB, Park C, Park BH, Lee HK, Chung SY, Park R, So HS.** Roles of NADPH Oxidases in Cisplatin-Induced Reactive Oxygen Species Generation and Ototoxicity. *The Journal of Neuroscience* 2010; 30 (11): 3933-3946.
- ⁵² **McCord JM, Fridovich I.** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 1969; 244 (22): 6049–6055.
- ⁵³ **Chance B, Sies H, Boveris A.** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 1979; 59(3): 527-605.
- ⁵⁴ **Agarwal A, Nick HS.** Renal Response to Tissue Injury: Lessons from Heme Oxygenase-1 Gene Ablation and Expression. *Journal of the American Society of Nephrology* 2000; 11(5): 965-973.

-
- ⁵⁵ **Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A.** The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *American Journal of Physiology* 2004; 286 (3): 425-444.
- ⁵⁶ **Alam J, Igarashi K, Immenschuh S, Shibahara S, Tyrrell RM.** Regulation of heme oxygenase-1 gene transcription: recent advances and highlights from the International Conference (Uppsala, 2003) on Heme Oxygenase. *Antioxidants & Redox Signaling* 2004; 6 (5): 924-933.
- ⁵⁷ **Shiraishi F¹, Curtis LM, Truong L, Poss K, Visner GA, Madsen K, Nick HS, Agarwal A.** Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *American Journal of Physiology* 2000; 278 (5): 726-736.
- ⁵⁸ **Wang XJ, Wu JG, Tang XW.** Down-regulation of Nrf2-ARE signaling pathway. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010; 39 (1): 1-5.
- ⁵⁹ **Morimoto K, Ohta K, Yachie A, Yang Y, Shimizu M, Goto C, Toma T, Kasahara Y, Yokoyama H, Miyata T, Seki H, Koizumi S.** Cytoprotective role of heme oxygenase (HO)-1 in human kidney with various renal diseases. *Kidney International* 2001; 60 (5): 1858-1866.
- ⁶⁰ **Shimizu M, Ohta K, Yang Y, Nakai A, Toma T, Saikawa Y, Kasahara Y, Yachie A, Yokoyama H, Seki H, Koizumi S.** Glomerular proteinuria induces heme oxygenase-1 gene expression within renal epithelial cells. *Pediatric Research* 2005; 58 (4): 666-671.
- ⁶¹ **Yang Y, Ohta K, Shimizu M, Morimoto K, Goto C, Nakai A, Toma T, Kasahara Y, Yachie A, Seki H, Koizumi S.** Selective protection of renal tubular epithelial cells by heme oxygenase (HO)-1 during stress-induced injury. *Kidney International* 2003; 64 (4): 1302-1309.
- ⁶² **Abraham NG, Kappas A.** Pharmacological and Clinical Aspects of Heme Oxygenase. *Pharmacological Reviews* 2008; 60 (1): 79-127.

⁶³ **Kappas A.** A method for interdicting the development of severe jaundice in newborns by inhibiting the production of bilirubin. *Pediatrics*. 2004: 113 (1 Pt 1): 119-23.

⁶⁴ **Kushida T, LiVolti G, Goodman AI, Abraham NG.** TNF-alpha-mediated cell death is attenuated by retrovirus delivery of human heme oxygenase-gene into human microvessel endothelial cells. *Transplantation Proceedings* 2002: 34 (7): 2973-2978.

⁶⁵ **Sarady-Andrews JK, Liu F, Gallo D, Nakao A, Overhaus M, Ollinger R, Choi AM, Otterbein LE.** Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *American Journal of Physiology* 2005: 289 (6): 1131-1137.

⁶⁶ **Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S, Yamashita K, Csizmadia E, Lassman C, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW, Bach FH.** Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* 2004: 40 (6): 1333-1341.

⁶⁷ **Miralem T, Hu Z, Torno MD, Lelli KM, Maines MD.** Small interference RNA-mediated gene silencing of human biliverdin reductase, but not that of heme oxygenase-1, attenuates arsenite-mediated induction of the oxygenase and increases apoptosis in 293A kidney cells. *Journal of Biological Chemistry* 2005: 280 (17): 17084-17092.

⁶⁸ **Baranano DE, Rao M, Ferris CD, and Snyder SH.** Biliverdin reductase a major physiologic cytoprotectant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002: 99 (25): 16093-16098.

⁶⁹ **Schwartzman ML, Martasek P, Rios AR, Levere RD, Solangi K, Goodman AI, Abraham NG.** Cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolism in human kidney. *Kidney International* 1990: 37 (1): 94-99.

⁷⁰ **Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG.** Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *Journal of Clinical Investigation* 1996: 97(8): 1916-1923.

-
- ⁷¹ **Ishizaka N, Aizawa T, Mori I, Taguchi J, Yazaki Y, Nagai R, Ohno M.** Heme oxygenase-1 is upregulated in the rat heart in response to chronic administration of angiotensin II. *American Journal of Physiology* 2000; 279 (2): 672-678.
- ⁷² **Milstien S, Katusic Z.** Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999 263 (3): 681-684.
- ⁷³ **Eisenstein RS, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Munro HN.** Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88 (3): 688-692.
- ⁷⁴ **Nagababu E, Rifkind JM.** Heme degradation by reactive oxygen species. *Antioxidants & Redox Signaling* 2004; 6 (6): 967-978.
- ⁷⁵ **Balla G, Vercellotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS.** Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Laboratory Investigation* 1991; 64 (5): 648-654.
- ⁷⁶ **Valko M, Morris H, Cronin MT.** Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 12 (10): 1161-1208.
- ⁷⁷ **Paller MS, Jacob HS.** Cytochrome P-450 mediates tissue-damaging hydroxyl radical formation during reoxygenation of the kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91 (15): 7002-7006.
- ⁷⁸ **Barañano DE, Wolosker H, Bae BI, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD.** A mammalian iron ATPase induced by iron. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275 (20): 15166-15173.
- ⁷⁹ **Nath KA, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM, Levitt M, Rosenberg ME.** Induction of heme oxygenase is a rapid protective response in rhabdomyolysis in the rat. *Journal of Clinical Investigation* 1992; 90 (1): 267-270.

-
- ⁸⁰ **Agarwal A, Balla J, Alam J, Croatt AJ, Nath KA.** Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney International* 1995; 48 (4): 1298-1307.
- ⁸¹ **Schaaf GJ, Maas RF, de Groene EM, Fink-Gremmels J.** Management of oxidative stress by heme oxygenase-1 in cisplatin-induced toxicity in renal tubular cells. *Free Radical Research* 2002; 36 (8): 835-843.
- ⁸² **Rezzani R, Rodella L, Buffoli B, Goodman AA, Abraham NG, Lianos EA, Bianchi R.** Change in renal heme oxygenase expression in cyclosporine A-induced injury. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2005; 53 (1): 105-112.
- ⁸³ **Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D.** Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney International* 1996; 50 (3): 1032-1043.
- ⁸⁴ **Yoneya R, Ozasa H, Nagashima Y, Koike Y, Teraoka H, Hagiwara K, Horikawa S.** Hemin pretreatment ameliorates aspects of the nephropathy induced by mercuric chloride in the rat. *Toxicology Letters* 2000; 116 (3): 223-229.
- ⁸⁵ **Pedraza-Chaverri J, Murali NS, Croatt AJ, Alam J, Grande JP, Nath KA.** 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* 2006; 290 (1): 196-204.
- ⁸⁶ **Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J.** HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by K₂Cr₂O₇. *Free Radical Biology and Medicine* 2003; 34 (11): 1390-1398.
- ⁸⁷ **Wong RS.** Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011; 30: 87.

-
- ⁸⁸ **O'Brien MA, Kirby R.** Apoptosis: a review of pro-apoptotic and antiapoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2008; 18(6): 572-585.
- ⁸⁹ **Schneider P, Tschopp J.** Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 2000; 74 (2-3): 281-286.
- ⁹⁰ **Danial NN, Korsmeyer SJ.** Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 16(2): 205-219.
- ⁹¹ **Reed JC:** Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in haematologic malignancies. *Seminars in Hematology* 1997; 34 (4): 9-19
- ⁹² **Razzaque MS, Koji T, Kumatori A, Taguchi T.** Cisplatin-induced apoptosis in human proximal tubular epithelial cells is associated with the activation of the Fas/Fas ligand system. *Histochemistry and Cell Biology* 1999; 111 (5): 359-365.
- ⁹³ **Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Kishihara K, Hirakata H, Iida M.** Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney International* 2003; 63 (1): 72-82.
- ⁹⁴ **Lee RH, Song JM, Park MY, Kang SK, Kim YK, Jung JS.** Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. *Biochemical Pharmacology* 2001; 62 (8): 1013-1023.
- ⁹⁵ **Wei Q, Dong G, Franklin J, Dong Z.** The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney International* 2007; 72 (1): 53-62.
- ⁹⁶ **Olszanecki R, Rezzani R, Omura S, Stec DE, Rodella L, Botros FT, Goodman AI, Drummond G, Abraham NG.** Genetic suppression of HO-1 exacerbates renal damage: reversed by an increase in the antiapoptotic signaling pathway. *American Journal of Physiology* 2007; 292 (1): 148-157.

-
- ⁹⁷ **Deng J, Kohda Y, Chiao H, Wang Y, Hu X, Hewitt SM, Miyaji T, McLeroy P, Nibhanupudy B, Li S, Star RA.** Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney International* 2001; 60 (6): 2118-2128
- ⁹⁸ **Ramesh G, Reeves WB.** TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *Journal of Clinical Investigation* 2002; 110 (6): 835-42.
- ⁹⁹ **Ramesh G, Reeves WB.** TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 2003; 285 (4): 610-618.
- ¹⁰⁰ **Zhang B, Ramesh G, Norbury CC, Reeves WB.** Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells. *Kidney International* 2007; 72 (1): 37-44.
- ¹⁰¹ **Liu M, Chien CC, Burne-Taney M, Molls RR, Racusen LC, Colvin RB, Rabb H.** A pathophysiologic role for T lymphocytes in murine acute cisplatin nephrotoxicity. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006; 17 (3): 765-774.
- ¹⁰² **Cornelison TL, Reed E.** Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin, and ormaplatin. *Gynecologic Oncology*. 1993; 50 (2): 147-58.
- ¹⁰³ **Yonezawa A, Masuda S, Nishihara K, Yano I, Katsura T, Inui K.** Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochemical Pharmacology* 2005; 70 (12): 1823-1831.
- ¹⁰⁴ **Hanigan MH, Gallagher BC, Taylor PT Jr, Large MK.** Inhibition of gammaglutamyl transpeptidase activity by acivicin in vivo protects the kidney from cisplatin-induced toxicity. *Cancer Research* 1994; 54 (22): 5925-5929.
- ¹⁰⁵ **Faubel S, Ljubanovic D, Reznikov L, Somerset H, Dinarello CA, Edelstein CL.** Caspase-1-deficient mice are protected against cisplatin-induced apoptosis and acute tubular necrosis. *Kidney International* 2004; 66 (6): 2202-2213.

-
- ¹⁰⁶ **Jiang M, Wei Q, Pabla N, Dong G, Wang CY, Yang T, Smith SB, Dong Z.** Effects of hydroxyl radical scavenging on cisplatin-induced p53 activation, tubular cell apoptosis and nephrotoxicity. *Biochemical Pharmacology* 2007; 73 (9): 1499-1510.
- ¹⁰⁷ **Harborne J B, Mabry T J, Mabry H.** *The Flavonoids: Advances in Research.* 1975. London: Chapman and Hall
- ¹⁰⁸ **Kuhnau, J.** The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics* 1976; 24: 117-191.
- ¹⁰⁹ **Ross JA, Kasum CM.** Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition* 2002; 22: 19-34.
- ¹¹⁰ **Henmann K.** Occurrence and content of hydroxycinnamic acid and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1989. 28 (4): 315-347.
- ¹¹¹ **Rice-Evans C.** Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* 2001; 8(7): 797-807.
- ¹¹² **Schroeter H, Boyd C, Spencer JP, Williams RJ, Cadenas E, Rice-Evans C.** MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging* 2002; 23 (5): 861-880.
- ¹¹³ **Jaiswal AK.** Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 36 (10): 1199-207.
- ¹¹⁴ **Marfella R, Cacciapuoti F, Siniscalchi M, Sasso FC, Marchese F, Cinone F, Musacchio E, Marfella MA, Ruggiero L, Chiorazzo G, Liberti D, Chiorazzo G, Nicoletti GF, Saron C, D'Andrea F, Ammendola C, Verza M, Coppola L.** Effect of moderate red wine intake on cardiac prognosis after recent acute myocardial infarction of subjects with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 2006; 23 (9): 974-81.

-
- ¹¹⁵ **Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS.** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* 2004; 96 (3): 229-45.
- ¹¹⁶ **Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R.** Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita* 2007; 43 (4): 394-405.
- ¹¹⁷ **Hollman PC.** Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 2004; 42: 74-83
- ¹¹⁸ **Hollman PC, van Trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB.** Relative bioavailability of the antioxidant quercetin from various foods in man. *FEBS Letters* 1997; 418 (1-2): 152–156.
- ¹¹⁹ **Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MA, Williamson G.** Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters* 2000; 468 (2-3): 166-170.
- ¹²⁰ **Walgren RA, Lin JT, Kinne RKH, Walle T.** Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2000; 294 (3): 837-43.
- ¹²¹ **Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D.** Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutrition and Cancer* 1993; 20 (1): 21-29.
- ¹²² **Rattanachaiakunsopon P, Phumkhachorn P.** Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010; 4 (5): 393-396.
- ¹²³ **Kitagawa S, Sakamoto H, Tano H.** Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effects on hemoglobin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2004; 52 (8): 999-1001.

-
- ¹²⁴ **Zhang R, Kang, K A, Kang S S, Park J W, Hyun J W. 2011.** Morin (2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone) protected cells against γ -radiation-induced oxidative stress. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2011: 108 (1): 63-72.
- ¹²⁵ **Al-Numair KS, Chandramohan G, Alsaif MA.** Pretreatment with morin, a flavonoid, ameliorates adenosinetriphosphatases and glycoproteins in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Journal of Natural Medicines* 2012: 66 (1): 95-101
- ¹²⁶ **Sivaramakrishnan V, Devaraj SN.** Morin fosters apoptosis in experimental hepatocellular carcinogenesis model. *Chemico-Biological Interactions* 2010: 183 (2): 284-292.
- ¹²⁷ **Kapoor R, Kakkar P.** Protective Role of Morin, a Flavonoid, against High Glucose Induced Oxidative Stress Mediated Apoptosis in Primary Rat Hepatocytes. *Plos One* 2012: 7 (8): e41663.
- ¹²⁸ **Dimitrić Marković JM¹, Marković ZS, Pašti IA, Brdarić TP, Popović-Bijelić A, Mojović M.** A joint application of spectroscopic, electrochemical and theoretical approaches in evaluation of the radical scavenging activity of 3-OH flavones and their iron complexes towards different radical species. *Dalton Transactions* 2012: 41 (24): 7295-7303.
- ¹²⁹ **De Martino L¹, Mencherini T, Mancini E, Aquino RP, De Almeida LF, De Feo V.** *In Vitro* Phytotoxicity and Antioxidant Activity of Selected Flavonoids. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012: 13 (5): 5406-5419.
- ¹³⁰ **Nantitanon W, Okonogi S.** Comparison of antioxidant activity of compounds isolated from guava leaves and a stability study of the most active compound. *Drug Discoveries & Therapeutics* 2012: 6(1): 38-43.
- ¹³¹ **Kim JM, Lee EK, Park G, Kim MK, Yokozawa T, Yu BP, Chung HY.** Morin modulates the oxidative stress-induced NF- κ B pathway through its anti-oxidant activity. *Free Radical Research* 2010: 44(4): 454-461.

-
- ¹³² **Heeba GH, Mahmoud ME.** Therapeutic potential of morin against liver fibrosis in rats: Modulation of oxidative stress, cytokine production and nuclear factor kappa B. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2014; 37 (2): 662-671.
- ¹³³ **Yu Z, Fong WP, Cheng CH.** The Dual Actions of Morin (3,5,7,2',4'-Pentahydroxyflavone) as a Hypouricemic Agent: Uricosuric Effect and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006; 316 (1): 169-175.
- ¹³⁴ **Fang J, Seki T, Maeda H.** Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009; 61 (4): 290-302.
- ¹³⁵ **Szatrowski TP, Nathan CF.** Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research* 1991; 51 (3): 794-798.
- ¹³⁶ **Gupte A, Mumper RJ.** Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews* 2009; 35 (1): 32-46.
- ¹³⁷ **Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N.** Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 2011; 82 (4): 513-523.
- ¹³⁸ **Hadi SM, Bhat SH, Azmi AS, Hanif S, Shamim U, Ullah MF.** Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. *Seminars in Cancer Biology* 2007; 17 (5): 370-376.
- ¹³⁹ **Shamim U, Hanif S, Albanyan A, Beck FW, Bao B, Wang Z, Banerjee S, Sarkar FH, Mohammad RM, Hadi SM, Azmi AS.** Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in low pH environments associated with cancer. *Journal of Cellular Physiology* 2012; 227 (4): 1493-1500.
- ¹⁴⁰ **Park C, Lee WS, Go SI, Nagappan A, Han MH, Hong SH, Kim GS, Kim GY, Kwon TK, Ryu CH, Shin SC, Choi YH.** Morin, a Flavonoid from Moraceae, Induces Apoptosis by Induction of BAD Protein in Human Leukemic Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16 (1): 645-659.

-
- ¹⁴¹ **Kuo HM, Chang LS, Lin YL, Lu HF, Yang JS, Lee JH, Chung JG.** Morin Inhibits the Growth of Human Leukemia HL-60 Cells *via* Cell Cycle Arrest and Induction of Apoptosis through Mitochondria Dependent Pathway. *Anticancer Research* 2007: 27 (1A): 395-406.
- ¹⁴² **K V A, Madhana RM, Kasala ER, Samudrala PK, Lahkar M, Gogoi R.** Morin Hydrate Mitigates Cisplatin-Induced Renal and Hepatic Injury by Impeding Oxidative/Nitrosative Stress and Inflammation in Mice. *Journal Biochemical Molecular Toxicology* 2016: 30 (12): 571-579.
- ¹⁴³ **Wei Z, He X, Kou J, Wang J, Chen L, Yao M, Zhou E, Fu Y, Guo C, Yang Z.** Renoprotective mechanisms of morin in cisplatin-induced kidney injury *International Immunopharmacology* 2015: 28 (1): 500-506.
- ¹⁴⁴ **Kaltalioglu K, Coskun-Cevher S.** Potential of morin and hesperidin in the prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Renal Failure* 2016: 38 (8): 1291-9.
- ¹⁴⁵ **Tsutsumishita Y, Onda T, Okada K, Takeda M, Endou H, Futaki S, Niwa M.** Involvement of H₂O₂ production in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998: 242(2): 310-2.
- ¹⁴⁶ **Ma SF, Nishikawa M, Hyoudou K, Takahashi R, Ikemura M, Kobayashi Y, Yamashita F, Hashida M.** Combining cisplatin with cationized catalase decreases nephrotoxicity while improving antitumor activity. *Kidney International* 2007: 72 (12): 1474-1482
- ¹⁴⁷ **Ribeiro JP, Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL.** Hydrogen peroxide, antioxidant compounds and biological targets: An in vitro approach for determination of scavenging capacity using fluorimetric multisyringe flow injection analysis. *Talanta* 2010: 81 (4-5): 1840-1846
- ¹⁴⁸ **Kim T, Kim YJ, Han IH, Lee D, Ham J, Kang KS, Lee JW.** The synthesis of sulforaphane analogues and their protection effect against cisplatin induced cytotoxicity in kidney cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2015: 25 (1): 62-6.

-
- ¹⁴⁹ **Bunel V, Antoine MH, Nortier J, Duez P, Stévigny C.** Protective effects of schizandrin and schizandrin B towards cisplatin nephrotoxicity in vitro. *Journal of Applied Toxicology* 2014; 34 (12): 1311-1319
- ¹⁵⁰ **Morimitsu Y, Nakagawa Y, Hayashi K, Fujii H, Kumagai T, Nakamura Y, Osawa T, Horio F, Itoh K, Iida K, Yamamoto M, Uchida K.** A Sulforaphane Analogue That Potently Activates the Nrf2-dependent Detoxification Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277 (5): 3456-3463.
- ¹⁵¹ **Peklak-Scott C, Smitherman PK, Townsend AJ, Morrow CS.** The role of glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) in the cellular detoxification of cisplatin. *Molecular Cancer Therapeutics* 2008; 7(10): 3247-3255.
- ¹⁵² **Meffert MK, Haley JE, Schuman EM, Schulman H, Madison DV.** Inhibition of hippocampal heme oxygenase, nitric oxide synthase, and long-term potentiation by metalloporphyrins. *Neuron* 1994; 13 (5): 1225-1233.
- ¹⁵³ **Luo D, Vincent SR.** Metalloporphyrins inhibit nitric oxide-dependent cGMP formation in vivo. *European Journal of Pharmacology* 1994; 267 (3): 263-267.
- ¹⁵⁴ **Lee-Hilz YY, Boerboom AM, Westphal AH, Berkel WJ, Aarts JM, Rietjens IM.** Rietjens, Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chemical Research in Toxicology* 2006; 19 (11): 1499-1505.
- ¹⁵⁵ **Awad HM, Boersma MG, Boeren S, van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IM.** Structure-activity study on the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids. *Chemical Research in Toxicology* 2001; 14 (4): 398-408.
- ¹⁵⁶ **Rattan SI, Fernandes RA, Demirovic D, Dymek B, Lima CF.** Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: effects on aging, wound healing, angiogenesis, and differentiation. *Dose Response* 2009; 7(1): 90-103

¹⁵⁷ **Lee-Hilz YY, Boerboom AM, Westphal AH, Berkel WJ, Aarts JM, Rietjens IM.** Pro-Oxidant Activity of Flavonoids Induces EpRE-Mediated Gene Expression. *Chemical Research in Toxicology* 2006; 19 (11): 1499-1505.

¹⁵⁸ **Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P.** Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling* 2008; 10 (8): 1343-1374.