



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

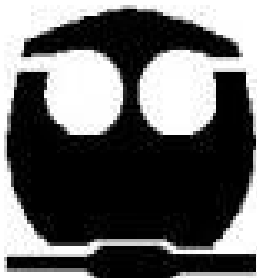
FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO PROTECTOR DEL MANGOSTÁN
EN DAÑO RENAL OCASIONADO POR
CICLOFOSFAMIDA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ROCIO DEL CARMEN ALVAREZ NAVARRETE



MÉXICO, D.F. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: Raúl Genaro Aguilar Caballero
VOCAL	Profesora: Perla Deyanira Maldonado Jiménez
SECRETARIO	Profesora: Diana Barrera Oviedo
1° SUPLENTE	Profesora: María Elena Bravo Gómez
2° SUPLENTE	Profesora: Luz María del Rocío Valdez Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 5, 6° piso,
Departamento de Farmacología, Torre de Investigación, Facultad de
Medicina, UNAM.

FINANCIAMIENTO: Este trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT
IN205310

ASESOR DEL TEMA: Dra. Diana Barrera Oviedo _____

SUSTENTANTE: Rocio del Carmen Alvarez Navarrerte _____

AGRADECIMIENTOS

A ustedes padres que siempre me brindaron el apoyo necesario para impulsarme y poder llegar hasta donde estoy, gracias por sus consejos, puntos de vista y si también a sus llamadas de atención, ya que me enseñaron a elegir el mejor camino, que para mi así lo es y se los agradezco de corazón, GRACIAS PAPAS.

A ti gusana por todos tus consejos, el tiempo dedicado para ayudarme a todo lo que te pedí durante mi carrera, en verdad te lo agradezco, aprendí mucho de ti y todos los conocimientos brindados, GRACIAS.

A ti Diana te quiero agradecer por ser el principal pilar para poder llevar a cabo este proyecto ya que me brindaste un apoyo incondicional, así como el entendimiento que tuvimos y esos consejos dados, la amistad que me brindaste y sobre todo el conocimiento que me diste y la capacidad de ver mas allá que una simple definición, EN VERDAD Y SINCERAMENTE GRACIAS.

A ti amix de corazón y sinceramente gracias por todos esos momentos que hemos vivido juntas, altibajos y muchas otras cosas y la verdad sobretodo por aguantarme, pero principalmente por todo lo que vivimos juntas durante la elaboración de esto, todo el apoyo brindado y espero que esta linda amistad nos dure mucho, GRACIAS AMIX TQM.

A ti amoshito por todos esos momentos tan difíciles en los que estuviste para apoyarme, darme esas palabras de aliento que necesitaba escuchar así como impulsarme cada día mas para ser una mejor persona, hija, hermana y sobre todo profesionalista, GRACIAS, TE AMO.

A ti Marisela quiero agradecerte todos esos momentos que pasamos juntas durante el proyecto ya que fuiste un pilar importante para poder lograr este proyecto por que sin un buen entendimiento entre nosotras no hubiéramos podido lograr lo que esperábamos, GRACIAS.

A ti Jose Luis, si a ti aunque no lo creas, quiero agradecerte el apoyo que me haz brindado durante mi carrera, los conocimientos y toda la amistad que me brindaste, la verdad te lo agradezco muchísimo, eres un muy buen amigo, GRACIAS.

A ustedes chicas lindas con su adoración, si a ti Maru, Liz y David, quiero agradecerles todas esas palabras que me brindaron para poder salir adelante en mi carrera y por ser unos muy buenos oídos en ciertos momentos que necesitaba desahogarme, y por impulsarme siempre para ser mejor día a día, GRACIAS LOS QUIERO.

A ti Oscar quiero agradecerte todos esos momentos vividos durante la carrera, la verdad me enseñaste muchísimas cosas y tu siempre serás mi verdadero amigo el cual siempre recordare y siempre serás una personita muy pero muy especial en mi vida, por todos esos momentos tan bonitos que llegamos a pasar juntos y también esos corajes, la verdad me enseñó el valor de una verdadera amistad, GRACIAS.

ÍNDICE

I. Introducción	1
1. Riñón	1
1.1. Nefrona	2
1.2. Sistema tubular de la nefrona	3
1.2.1. Tubulo proximal	3
1.2.1.1. Tubulo contorneado proximal	4
1.2.1.2. Tubulo proximal recto	5
1.2.2. Segmento delgado del asa de henle	5
1.2.3. Túbulo distal	5
2. Insuficiencia Renal Aguda	5
3. Estrés oxidativo	8
3.1. Producción de especies reactivas	9
3.1.1. Anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$)	10
3.1.2. Peroxido de hidrógeno (H_2O_2)	10
3.1.3. Radical hidroxilo (OH^{\bullet})	11
3.1.4. Singulete de oxígeno (1O_2)	11
3.1.5. Peroxinitrito ($ONOO^-$)	12
3.2. Antioxidantes en los sistemas biológicos	13
3.2.1. Sistema Antioxidante No Enzimático	13
3.2.2. Sistema Antioxidante Enzimático	14
II. Antecedentes	18
1. Ciclofosfamida	18
2. Mangostán	19
III. Justificación	24
IV. Hipótesis	25
V. Objetivo General	25
VI. Objetivos Particulares	25
VII. Materiales y Métodos	26

1. Reactivos	26
2. Fármaco y antioxidante	26
3. Animales	26
4. Diseño Experimental	27
5. Muestras	28
6. Evaluación del daño renal	29
6.2. Función glomerular	29
6.2.1. Creatinina en suero	29
6.2.2. Depuración de creatinina	29
6.2.3. Nitrógeno de la urea en el suero sanguíneo (BUN)	30
7. Actividad de enzimas antioxidantes en el riñón	31
7.1. Evaluación del estrés oxidativo	31
7.1.1. Actividad de la catalasa (CAT)	31
7.1.2. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)	31
7.1.3. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)	32
total	
7.2. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	32
8. Análisis Estadístico	33
VIII. Resultados y Discusión	34
1. Curso temporal de la insuficiencia renal aguda (IRA) producida por ciclofosfamida	34
1.1. Efecto en el peso corporal y volumen urinario	34
1.2. Función glomerular	36
2. Efecto protector del Mangostán en la IRA	38
2.1. Efecto en el peso corporal y volumen urinario	38
2.2. Función glomerular	39
3. Evaluación de estrés oxidativo	41
3.1. Evaluación de la expresión de las enzimas antioxidantes en el riñón	41
3.2. TBARS en el riñón	43
IX. Resumen de Resultados	45
X. Conclusión	45

XI. Bibliografía	46
XII. Definiciones	54

Introducción

1. Riñón

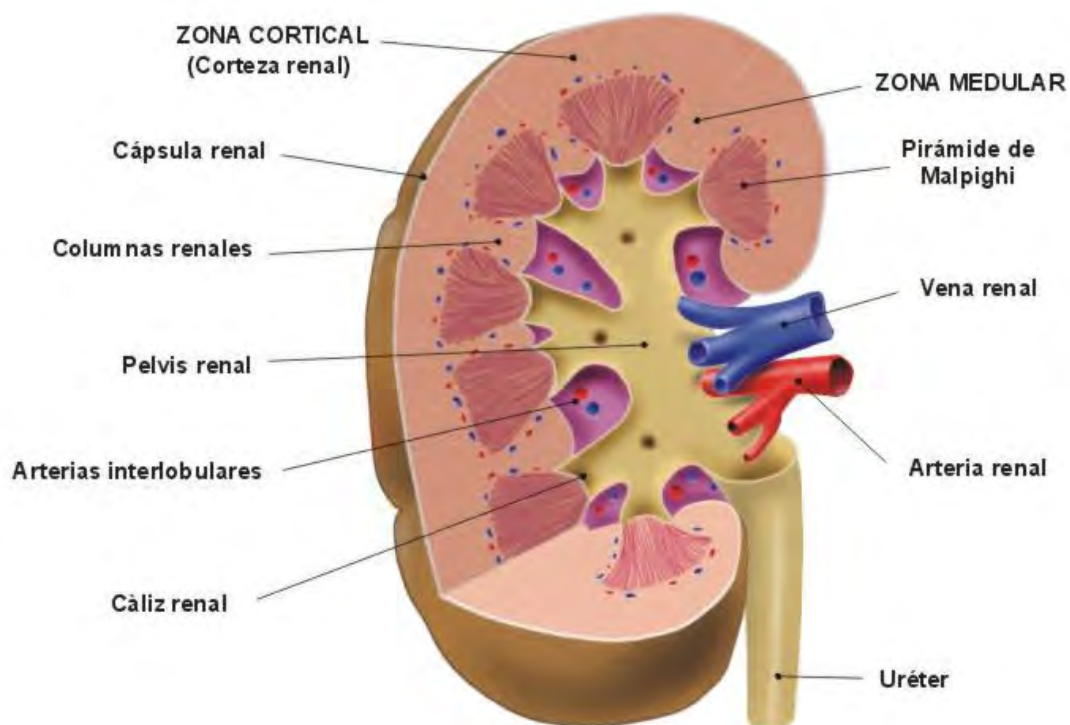
El riñón es un órgano par y se encuentran situados en la parte posterior del abdomen, a ambos lados de la columna vertebral. El peso de cada uno de ellos oscila entre 125 y 170 g en el varón adulto, y entre 115 y 155 g en la mujer (*Madsen y Tisher, 2000*).

Es el encargado de remover del cuerpo muchos de los productos terminales del metabolismo de las células, tales como urea, ácido úrico, creatinina, etc. Por otro lado tiene la capacidad de regular la presión sanguínea y de retener sustancias que son esenciales para la supervivencia de los individuos como agua, azúcares, proteínas, aminoácidos y electrolitos (sodio, potasio y cloro) (*Heinz, 1983*).

Cada riñón tiene dos caras, anterior y posterior, un borde convexo y uno interno cóncavo. El borde interno presenta una hendidura, llamada hilio, por la que pasan el seno renal de la pelvis renal, la arteria y la vena renal, los vasos linfáticos y un plexo nervioso. El órgano está rodeado por una cápsula fibrosa resistente, que es lisa y fácil de retirar en condiciones normales (*Madsen y Tisher, 2000*).

Después de cortar un riñón longitudinalmente, para obtener dos mitades del mismo espesor, se observa que el parénquima está compuesto por una corteza y una médula (Esquema 1). La corteza presenta un aspecto rojo oscuro, granuloso. Rodea por completo la médula y envía prolongaciones, las columnas renales, a través de toda la profundidad de la médula. La médula tiene casi el doble de espesor de la corteza y se compone de estructuras más claras, las pirámides renales o de Malpighi, separadas por columnas renales (Esquema 1). Las bases de las pirámides están orientadas hacia la corteza, mientras que las papilas renales se ubican cada una en un cáliz menor, con forma de embudo, la cantidad de pirámides

suele ser de 8 y las papilas muestran de 10 a 25 pequeños orificios que corresponden a los conductos de Bellini (**Geneser, 2000**).



Esquema 1. Diagrama de un riñón diseccionado longitudinalmente. Estructuras anatómicas principales.

En el ser humano, al igual que en la mayoría de los mamíferos, cada riñón está irrigado habitualmente por una única arteria renal, aunque es frecuente la presencia de uno o más vasos accesorios (**Madsen y Tisher, 2000**).

1.1 Nefrona

Conocida como la unidad funcional del riñón. Los componentes esenciales de la nefrona son el corpúsculo renal o de Malpighi (el glomérulo y la cápsula de Bowman), el túbulo proximal, las ramas delgadas, el túbulo distal y segmento o túbulo conector.

En el riñón se pueden identificar dos poblaciones fundamentales de nefronas, las que poseen un asa de Henle corta y las que tienen un asa larga. El asa de Henle está compuesta por la porción recta del túbulo proximal, los segmentos de la rama delgada y la porción recta del túbulo distal (rama gruesa ascendente).

La médula renal puede dividirse en una zona interna y otra externa. La zona externa a su vez puede dividirse en una banda interna y otra externa. La médula interna contiene las ramas delgadas descendente y ascendente y los tubos colectores grandes, incluido los conductos de Bellini. En la banda interna de la médula externa están las ramas delgadas descendentes y gruesas ascendentes, además de los tubos colectores. La banda externa de la médula externa alberga los segmentos terminales de la porción recta del túbulo proximal, las ramas gruesas ascendentes y los tubos colectores.

La división del riñón en sus zonas cortical y medular, así como la subdivisión posterior de la médula en sus zonas interna y externa, sirven para relacionar la estructura renal con la capacidad que posee un animal de producir una orina a máxima concentración. La capacidad de un animal de concentrar al máximo la orina debería ser directamente proporcional a la longitud relativa de su médula renal (*Madsen y Tisher, 2000*).

1.2 SISTEMA TUBULAR DE LA NEFRONA

1.2.1 TUBULO PROXIMAL

El túbulo proximal tiene un largo de aproximadamente 8 mm en el riñón de rata y de 14 mm en el humano (*Nyengaard y Bendtsen, 1992*).

Se han distinguido dos porciones tubulares: la inicial o túbulo contorneado proximal y la parte recta o segmento grueso de la rama descendente del asa de Henle (*Rhodin, 1971*).

1.2.1.1 TUBULO CONTORNEADO PROXIMAL

Las células epiteliales que constituyen el túbulo contorneado proximal tienen una forma compleja. Su superficie luminal tiene dos características fundamentales: gran riqueza de microvellosidades y un sistema de túbulos apicales.

Las microvellosidades están constituidas por proyecciones cilíndricas de la membrana celular de la superficie luminal, se disponen de modo seriado, en paralelo y en su interior se distingue de 4 a 7 filamentos longitudinales que con frecuencia se distinguen en la región apical del citoplasma celular. Esta modificación de la membrana celular forma el borde de cepillo observable con microscopia óptica y se calcula que incrementa la superficie luminal 40 veces, aumentando con ello la capacidad de reabsorción tubular (**Welling y Welling, 1975**). Es en esta sección de la nefrona donde se lleva a cabo la reabsorción de la mayoría de las moléculas indispensables para el organismo (glucosa, aminoácidos, agua, proteínas de bajo peso molecular, iones como Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , etc.) (**Heinz, 1983; Brenner, 2000**).

Por otro lado, la reabsorción de metabolitos de bajo peso molecular está acoplado al transporte activo del sodio por parte de las ATPasas de Na^+ / K^+ y ATPasa de Na^+ las cuales se encuentran en la parte basolateral de las células (**Staehelin, 1974**).

Una función importante del túbulo contorneado proximal y en menor grado de la parte recta, es la reabsorción y degradación de diversas macromoléculas incluyendo la albúmina y proteínas plasmáticas de bajo peso molecular del filtrado glomerular, además se ha comprobado que la absorción de proteínas por el túbulo proximal es un proceso selectivo determinado por la carga neta de la proteína y posiblemente por la existencia de sitios de endocitosis preferentes para ciertas proteínas (**Christensen et al., 1983; Sumpio y Macck, 1982**).

1.2.1.2 TÚBULO PROXIMAL RECTO

La parte recta es el segmento grueso de la rama descendente del asa de Henle. El epitelio tubular de la parte recta es cúbico, la cantidad y altura de microvellosidades disminuye (*Tisher et al., 1966*). Esta parte es casi impermeable al agua, pero en ella se reabsorbe NaCl y otros. (*Finn, 2000*).

1.2.2 SEGMENTO DELGADO DEL ASA DE HENLE

Es de longitud variable, desde prácticamente inexistente hasta 10 mm de longitud. Su diámetro es de 15 μm y representa el segmento más estrecho de la nefrona. Este segmento está tapizado por células aplanadas morfológicamente semejantes a las endoteliales, lo que condiciona una luz amplia a pesar del escaso diámetro total del segmento. Esta parte es muy permeable al agua y no hay reabsorción de iones Na^+ (*Tisher et al., 1966*).

1.2.3 TÚBULO DISTAL

Se distinguen tres partes en el túbulo distal: el segmento grueso de la rama ascendente del asa de Henle (parte recta), la mácula densa y el túbulo contorneado. En total mide unos 14-16 mm, y su diámetro oscila entre 20 y 50 mm.

Desde el punto de vista ultraestructural existe una transición brusca entre el segmento delgado del asa de Henle y la parte contorneada del túbulo distal. Las superficies laterales son rectas, y la membrana celular basal forma múltiples repliegues de gran longitud semejantes a los del túbulo proximal. El túbulo distal es casi impermeable al agua por la carencia de canales de agua, mientras que hay reabsorción de NaCl y de iones (*Madsen y Tisher, 2000*).

2. Insuficiencia Renal Aguda (IRA)

La IRA se caracteriza frecuentemente por la oliguria, ya que se produce una rápida disminución de la filtración glomerular y por consiguiente la acumulación de productos finales del metabolismo, como por ejemplo la

urea y la creatinina. La IRA generalmente es asintomática y se diagnostica en individuos al realizarles un perfil bioquímico, detectándose un incremento en los niveles de creatinina y nitrógeno de urea en el plasma (BUN) **(Danovitch et al., 1979)**.

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

1. IRA prerenal. También conocida como azotemia prerenal y es una enfermedad caracterizada por una hipoperfusión renal en la cual la integridad del tejido renal es preservada. La filtración glomerular es corregida rápidamente una vez restaurada la perfusión renal y la presión de ultrafiltración.
2. IRA intrínseca. También conocida como azotemia intrínseca y es una enfermedad donde se ve comprometido el tejido renal. Desde el punto de vista clínico-patológico se clasifica en:
Enfermedades que involucran vasos renales grandes, enfermedades de la microvasculatura y el glomérulo, necrosis tubular aguda (NTA) isquémica y nefrotóxica y otros procesos que involucran al intersticio (Tabla 1).
3. IRA postrenal. También conocida como azotemia postrenal, es una enfermedad asociada con una obstrucción aguda del flujo urinario entre la uretra y el cuello de la vejiga o una obstrucción bilateral de los uréteres.

Tabla 1. Causas frecuentes de IRA intrínseca.

Enfermedades de:	Causas:
Vasos renales	Arterial renales: trombosis, ateroembolismo, disección, vasculitis.
Microvasculatura y glomérulo	Inflamación: glomerulonefritis aguda, vasculitis, radiación. Vasos renales: hipertensión maligna, toxemia en el embarazo, hypercalcemia, fármacos, radiocontrastes. Hematológicas: síndrome urémico hemolítico, trombocitopenia púrpura, coagulación intravascular diseminada.
Túbulos renales (NTA)	Isquemia por hipoperfusión Toxinas exógenas: antibióticos, venenos, radiocontrastes, anticancerígenos.
Túbulo intersticio	Toxinas endógenas: mioglobina, hemoglobina, ácido úrico. Nefritis intersticial alérgica: antibióticos, anti- inflamatorios no esteroideos. Infecciones: viral, bacteriana, fúngica. Infiltración: linfoma, leucemia, sarcoma.

La IRA se divide en tres fases:

- a. Fase de iniciación u oligúrica: Periodo donde el daño al parénquima renal empieza a evolucionar y puede durar horas o días. El término "oligúrica" hace referencia a la disminución del volumen en la micción (<400 mL/día), aumento de (BUN) y creatinina en suero (CS). Además se presenta acidosis metabólica, por la disminución en la excreción de los productos finales de los ácidos. Edema por retención de líquidos e hiperpotasemia debido a la disminución de la excreción de K⁺.

- b. Fase de mantenimiento o poliúrica: El daño al parénquima renal está ya establecido, en este periodo hay aumento del volumen en la

micción (>2 L/día), debido a la recuperación de las nefronas. A pesar de la diuresis, el riñón aún no es capaz de excretar los productos de desecho, por lo que se produce uremia, es decir síndrome debido a un exceso de sustancias nitrogenadas en la sangre.

- c. Fase de recuperación: Se recobra la función renal a través de procesos de reparación y regeneración del tejido renal, se concentra y diluye la orina nuevamente según las necesidades del organismo, los electrolitos y productos nitrogenados vuelven a sus valores normales. Esta fase puede durar varios meses, entre 3 y 12, durante los cuales suele presentarse una disminución residual de la función renal.

La IRA intrínseca ocasionada por nefrotóxicos es frecuentemente llamada NTA, esta se caracteriza por la generación de una serie de alteraciones estructurales y moleculares de las células tubulares, como la aparición de especies reactivas de oxígeno (**Baud y Ardaillou, 1993; Rovin et al., 1990**), disminución o desaparición de los procesos de absorción y excreción, incremento de Ca^{2+} citosólico, descenso en los niveles de ATP y ADP, acidosis intracelular y abultamiento de las células epiteliales, que junto con restos necróticos de estas células, contribuyen a la obstrucción tubular (**Brenner, 2000; Sánchez, 1993**).

3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y las defensas antioxidantes (**Betteridge, 2000**). Ante tal situación se genera un deterioro en las macromoléculas por el rompimiento o la modificación de su estructura, estas especies reactivas pueden causar un daño celular por peroxidación de lípidos, inactivación de enzimas con grupos sulfhidrilo, entrecruzamiento y oxidación de proteínas, y

alteración del ADN (*Rhun et al., 1998*), produciendo una alteración en la función celular o incluso la muerte.

El oxígeno molecular (O₂) o dióxígeno es uno de los gases más importantes de la tierra: constituye el 21% de la atmósfera, 89% del agua de mar y al menos el 47% de la corteza terrestre.

El oxígeno molecular es indispensable para la vida de los organismos aerobios pues es el último aceptor de los electrones en la cadena respiratoria, proceso indispensable en la producción de ATP. El sistema enzimático de la citocromo oxidasa mitocondrial reduce de manera tetravalente al oxígeno en agua (*Eberhardt, 2001*). A altas concentraciones o bajo ciertas condiciones el oxígeno llega a ser tóxico. La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de las ERO dentro de las cuales están los radicales libres. Estas especies son más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete (*Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2005*).

3.1 Producción de especies reactivas

Un radical libre (RL) es una especie química, ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente, posee uno o más electrones desapareados que ocupan por sí mismos un orbital molecular o atómico. Los RL se forman por la ganancia o la pérdida de un electrón de un no radical o por la ruptura homolítica de una molécula.

Es importante mencionar que los RL existen como derivados de muchos elementos o moléculas químicas. Los más importantes desde el punto de vista biológico son los derivados del oxígeno y del nitrógeno principalmente, aunque también destacan los derivados de hidrógeno y del carbono, así como los formados por metales de transición como el hierro y el cobre, entre otros.

Una vez que se forma un radical pueden reaccionar con otro radical o con otra molécula por varias interacciones. La velocidad y la selectividad se lleva a cabo esta reacción, depende de la concentración del radical, de la deslocalización del electrón y de la ausencia de enlaces débiles con otras moléculas presentes junto al radical que pueden interaccionar.

Por otro lado, una especie reactiva es aquella que tiene la energía suficiente para reaccionar con otras moléculas y ceder parcial o totalmente parte de esa energía. A continuación se describen las especies reactivas y radicales libres de mayor importancia a nivel biológico (**Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2005; Aruoma, 1996**).

3.1.1 Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

Es un RL producido por un gran número de sistemas enzimáticos como la xantina oxidasa (XO), la NADPH oxidasa (**Yap et al., 2007**), también se produce el óxido nítrico sintasa, la lipooxigenasa, la P₄₅₀ oxidasa y el citocromo b5; a través de la salida de la cadena respiratoria; por reacciones de autooxidación y por vías no enzimáticas en diversos sitios celulares debido a la reducción incompleta del oxígeno molecular cuando se adiciona un electrón (**Schnackenberg, 2002**). El $O_2^{\bullet-}$ juega un papel central como un intermediario de las especies reactivas que son formadas subsecuentemente, debido a que puede oxidar al ácido ascórbico, reducir a los complejos de hierro tal como la citocromo c y el ácido férrico-etilendiamino-tetraácetico (Fe^{3+}), dando como resultado la formación de otras especies reactivas como el H_2O_2 (**Arouma, 1996; Diplock et al., 1998; Xiong et al., 2007**).

3.1.2 Peroxido de hidrógeno (H_2O_2)

Es una especie oxidante formada *in vivo* cuando el $O_2^{\bullet-}$ reacciona con otra molécula de $O_2^{\bullet-}$, a pH neutro. Esta reacción puede ser acelerada catalíticamente por la superóxido dismutasa (SOD) (**Yap et al., 2007**). El H_2O_2 a bajos niveles es poco reactivo, sin embargo a niveles altos puede atacar a

varios sistemas de producción de energía debido a su gran facilidad de difusión entre las células, por ejemplo, desacopla la glicólisis al inhibir a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

El H_2O_2 puede también formar $\cdot\text{OH}$ en presencia de metales de transición y el $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede facilitar la reacción. El H_2O_2 es eficientemente convertido a agua por diferentes peroxidases (CAT, GPx, etc.), proceso que es el que determina el tiempo de vida media de éste (**Diplock et al., 1998; Arouma, 1996**).

3.1.3 Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

Es un RL con mayor reactividad que los demás RL de oxígeno y nitrógeno, tiene una vida media estimada de 10^{-9} s (**Arouma, 1996**), se forma *in vivo* por altas irradiaciones de energía (rayos X), por rompimiento homolítico del agua o en forma endógena partiendo del H_2O_2 y un metal que cataliza la reacción Fenton (**M'bemba et al., 2007**). La alta reactividad de este radical implica inmediatamente su reacción con cualquier molécula, en el lugar en donde es formado (**Arouma., 1996; Diplock et al., 1998**).

3.1.4 Singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$)

Esta especie química no posee electrones desapareados; se forma por la inversión en el espín (invierte su rotación de giro) de uno de sus electrones en los orbitales moleculares externos, al recibir una cierta cantidad de energía. De los dos tipos de $^1\text{O}_2$ (forma $^1\Delta\text{O}_2$ y $^1\Sigma\text{O}_2$), el singulete de oxígeno delta ($^1\Delta\text{O}_2$, 22.4 kcal/mol) tiene mayor importancia biológica que el singulete en forma sigma ($^1\Sigma\text{O}_2$, 37.5 kcal/mol) (**Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2005; Arouma, 1996**). En sistemas biológicos es producido por una gama de reacciones químicas, dentro de las que se encuentran la reacción entre el ácido hipocloroso y el peróxido de hidrógeno; reacciones catalizadas por enzimas como la mieloperoxidasa y la lactoperoxidasa, y por exposición de los tejidos a la luz. El tiempo vida media total del $^1\text{O}_2$ es de 10^{-6} s dependiendo de la matriz que se encuentre a su alrededor (**Arouma,**

1996), por lo que puede interaccionar con otras moléculas transfiriendo esta energía excitatoria o por combinación química.

Los blancos preferenciales del $^1\text{O}_2$ para reaccionar químicamente son compuestos con dobles ligaduras, ácidos grasos poliinsaturados o bases de DNA como la guanina (**Diplock et al., 1998**).

3.1.5 Peroxinitrito (ONOO^-)

Se puede producir *in vivo* por la interacción del $\text{O}_2^{\bullet-}$ y del óxido nítrico (NO^\bullet). Es un potente oxidante que induce la nitración de la tirosina, lipoperoxidación y citotoxicidad (**Cárdenas-Rodríguez & Pedraza-Chaverri, 2005**). El anión peroxinitrito participa fisiológicamente como defensa en contra de la invasión de microorganismos, aunque una sobreproducción de esta especie puede provocar muerte celular y destrucción del tejido (**Zou et al., 2002**).

Además, los productos de descomposición del ONOO^- son radicales libres. Estos productos son formados por dos mecanismos. El primer mecanismo implica la protonación del ONOO^- para formar al ácido peroxinitroso (ONOOH), el cual experimenta una descomposición homolítica y genera al radical dióxido de nitrógeno ($^\bullet\text{NO}_2$) que es altamente reactivo y al $^\bullet\text{OH}$. El segundo mecanismo es la reacción entre el ONOO^- y el dióxido de carbono (CO_2) para formar nitrosoperoxocarbonato (ONOOCO_2^-), el cual se puede descomponer y dar origen al $^\bullet\text{NO}_2$ y al radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) (**Xiong et al., 2007; Pacher et al., 2007**).

Los radicales derivados del ONOO^- ($^\bullet\text{NO}_2$, $^\bullet\text{OH}$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$) pueden iniciar la lipoperoxidación celular por el ataque a ácidos grasos insaturados o causar reacciones de carbonilación en proteínas, por la susceptibilidad de sus aminoácidos. Los tioles pueden ser oxidados también por estos radicales formados, generando radicales til (RS^\bullet) y radicales tiil (RSH^\bullet) que pueden reaccionar con el oxígeno y promover el estrés oxidativo a través de la

propagación de reacciones de radicales libres, o reaccionar con $\bullet\text{NO}$ y formar nitrosotioles (*Xiong et al., 2007; Pacher et al., 2007*).

3.2 Antioxidantes en los sistemas biológicos

Las células poseen sistemas defensivos que les permiten controlar la concentración de las ERO. Estos sistemas son de dos tipos: sistemas antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos.

3.2.1 Sistemas Antioxidantes No Enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos se conocen como aquellos compuestos que poseen la capacidad de interaccionar directamente con las especies reactivas de oxígeno, los más comunes son:

a. α -tocoferol: Mejor conocido como vitamina E y es considerado como el antioxidante más distribuido en los seres vivos, se encuentra en las membranas biológicas por su propiedad hidrofóbica y tiene la capacidad de interrumpir la lipoperoxidación en su fase de propagación reaccionando con los radicales lipoperoxilos y los alcoxilos (*Halliwell y Gutteridge, 2001; Burton et al., 1982; Ross y Moldeus, 1991*).

La interacción con lipoperoxidos genera un radical α -tocoferilo ($\alpha\text{-Toc}^\bullet$) el cual es reciclado a α -tocoferol ($\alpha\text{-TocH}$) al interaccionar con el ácido ascórbico. El α -tocoferol tiene la capacidad de interaccionar con el singulete de oxígeno y en menor grado con el radical superóxido, por lo que se piensa que puede proteger a las membranas de la acción oxidativa de estas EROs (*Halliwell y Gutteridge, 2001*).

b. Ácido Ascórbico: Conocido como vitamina C, es un compuesto hidrosoluble que se localiza en el citosol de las células y en fluidos extracelulares, se caracteriza por la capacidad que tiene de aceptar electrones, puede reaccionar directamente con el anión superóxido y el radical hidroxil (*Sauer et al., 2001; Frei et al., 1990*), dando como resultado la formación del radical ascorbilo, el cual es reciclado a ácido ascórbico por

medio del sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (**Buettner, 1993; May et al., 1998**).

c. β - caroteno: Mejor conocido como Vitamina A. Es un compuesto liposoluble el cual se encuentra en las membranas lipídicas. Su función antioxidante consiste en impedir la lipoperoxidación el reaccionar principalmente con el O_2^\bullet - (**Krinsky y Deneke, 1982**) y el radical hidroxilo generando al radical carotenilo (Car^\bullet), el cual, puede ser reciclado al interaccionar con el ácido ascórbico y/o α - tocoferol (**Halliwell y Gutteridge, 2001**).

d. Glutatión: El glutatión reducido es considerado como un compuesto antioxidante ya que protege los grupos -SH de las proteínas de la acción oxidante de los radicales libres, tiene la capacidad de reaccionar con una amplia gama de compuestos electrofílicos y oxidantes tales como H_2O_2 , O_2^\bullet -, OH^\bullet . El glutatión reducido neutraliza a los radicales libres al transferirles un átomo de hidrógeno (**Halliwell y Gutteridge, 2001; Hamdi et al., 1998**). Participa en el transporte de aminoácidos y es sustrato de la glutatión peroxidasa y de glutatión S transferasa durante la detoxificación de peróxidos orgánicos y en el metabolismo de xenobióticos.

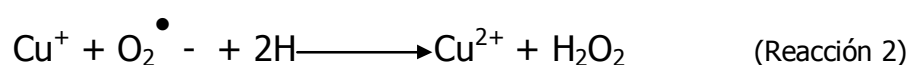
e. Ácido úrico: Es un producto final del metabolismo de las purinas en humanos, pero también se le conocen propiedades antioxidantes, aunque se desconoce el proceso mediante el cual ejerce su acción protectora. Algunos reportes sugieren que el ácido úrico forma complejos con metales de transición tales como el hierro y el cobre cuando interacciona con el ascorbato (**Davies et al., 1986; Sevanian et al., 1985**).

3.2.2 Sistemas Antioxidantes Enzimáticos

Existen varias enzimas destinadas a convertir al anión superóxido y al peróxido de hidrógeno en moléculas inocuas, antes de que estas generen moléculas más reactivas que son capaces de reaccionar y dañar las

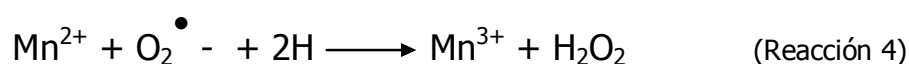
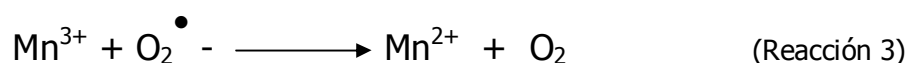
estructuras celulares. Las enzimas antioxidantes que ayudan a evitar esto son:

i. Superóxido dismutasa (SOD): Metaloenzima que lleva a cabo la reacción de dismutación del anión superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno. La SOD es pH independiente, tiene alta afinidad por su sustrato y es resistente al calor o a compuestos desnaturizantes como la urea. En los mamíferos podemos encontrar tres isoformas, las cuales se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos (**Weisiger y Fridovich, 1973**). Dos de estas isoformas poseen en su sitio activo Cu y Zn; una de estas isoformas Cu/Zn SOD es un homodímero de 32 kDa, se localiza en el citosol, el núcleo y en menor cantidad en el espacio intermembranal de la mitocondria (**Marklund, 1982; Oury et al., 1996**). Su mecanismo catalítico se basa en el ciclo redox del catión cobre (**Murphy et al., 1997; Banci et al., 1998**) (Reacciones 1 y 2).



La otra isoforma de Cu y Zn es un homotetramero de 135 kDa, se localiza extracelularmente en los fluidos como el plasma y el líquido sinovial (**Marklund, 1982; Oury et al., 1996**).

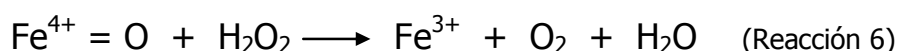
La tercera isoforma tiene en su sitio activo Mn-SOD, es homotetramérica de 80 kDa, localizada en la matriz mitocondrial (**Weisiger y Fridovich, 1973**). Su mecanismo catalítico se basa en el ciclo redox del catión manganeso (**Fridovich, 1998; Hsieh et al., 1998**) (Reacciones 3 y 4).



La SOD no es propiamente una enzima detoxificante, por que el producto de su actividad es el H₂O₂ el cual causa daño celular, pero esto es solo el primer paso de la cascada enzimática para la inactivación de las ERO.

Se ha sugerido que la función de la enzima superóxido dismutasa es la de evitar la formación del singulete de oxígeno (**Corey et al., 1987**), mientras que otros autores indican que la actividad de esta enzima está encaminada a impedir la inhibición de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa por parte del anión superóxido (**Blum y Fridovich, 1985**).

ii. Catalasa (CAT): Hemoproteína tetramérica que cataliza la descomposición del H₂O₂ en agua y oxígeno molecular (**Cheng et al., 1981**), se localiza principalmente en los peroxisomas, pero también en el citoplasma y las mitocondrias (**Aebi, 1982**). Su papel antioxidante consiste en disminuir la formación del radical hidroxilo por la interacción del peróxido de hidrógeno con metales de transición vía reacción de Fenton (**Fridovich, 1999; Halliwell, 1999**), cuando hay altas concentraciones del peróxido la enzima es más eficiente. Su mecanismo catalítico consiste en dos fases: en la primera se lleva a cabo el rompimiento de una molécula de peróxido de hidrógeno generándose en el grupo hemo la especie oxiferrilo con la formación de una molécula de agua (Reacción 5); la segunda fase se caracteriza por la reacción de la especie oxoferrilo con otra molécula de peróxido de hidrógeno (Reacción 6) (**Putnam et al., 2000**).



iii. Glutatión peroxidasa (GPx): Proteína tetramérica que cataliza la reducción del H₂O₂ y de hidroperóxidos protegiendo a los compuestos celulares del daño que pudieran generar estos compuestos oxidantes (Reacción 7). Se han identificado cuatro isoformas que requieren de la presencia de glutatión reducido para poder llevar a cabo su función catalítica: la citosólica, la plasmática, la gastrointestinal y la de fosfolípidos (**Yu, 1994**).

La citosólica (cGPx) tiene actividad antioxidante en casos de incremento de H₂O₂ y de hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol (**Burk, 1991**).

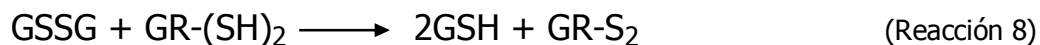
La plasmática (pGPx) se sintetiza principalmente en los túbulos proximales del riñón (**Avissar et al., 1994a; b; Yoshimura et al., 1991**) y se considera un marcador del daño al túbulo proximal, su actividad plasmática disminuye durante la necrosis tubular.

La gastrointestinal (giGPx) tiene alta afinidad por hidroperóxidos orgánicos (**Chu et al., 1993**), por lo que se piensa que su función metabólica consiste en proteger al organismo de estos (**Brigelius-Flohe et al., 1994**).

La de fosfolípidos (plGPx) tiene una menor afinidad por el glutatión reducido, su mecanismo catalítico requiere de la presencia de dos moléculas de glutatión para poder reducir una molécula del hidroperóxido (**Ren et al., 1997**).



iv. Glutatión Reductasa: Enzima que cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) y requiere de NADPH (Reacción 8 y 9).



GR-(SH)₂ es la forma reducida (ditiol) y GR-S₂ es la forma oxidada (disulfuro) de la glutatión reductasa. Esta enzima es esencial para el ciclo redox del GSH que mantiene los niveles adecuados de glutatión reducido (**Harris, 1992**).

II. Antecedentes

1. Ciclofosfamida

La ciclofosfamida es un antineoplásico indicado en el tratamiento de diversas neoplasias, también se utiliza para tratar la enfermedad de Hodgkin, micosis fungoides, síndrome nefrótico, lupus eritematoso, artritis reumatoide grave y vasculitis reumatoide. Forma parte del régimen de acondicionamiento para el trasplante de médula ósea.

Es un pro-fármaco que necesita ser activado por el sistema de enzimas microsomales hepáticas para ser citotóxico. Estas enzimas hepáticas convierten la ciclofosfamida en primer lugar a aldofosfamida, 4-hidroxiciclofosfamida y luego a acroleína y fosforamida, dos potentes sustancias alquilantes del ADN. La ciclofosfamida interfiere en la función normal del ADN por alquilación, impidiendo la división celular mediante la formación de enlaces cruzados entre las cadenas de ADN, lo cual desequilibra el crecimiento intracelular y da por resultado la muerte celular, cruza la placenta y es encontrado en la leche materna. También se une a proteínas y sus metabolitos

Los metabolitos producidos son eliminados por vía renal. Con objeto de minimizar la exposición de los riñones a estos productos, se recomienda no administrar la ciclofosfamida por la noche, para evitar la acumulación de los metabolitos en la vejiga. Es importante que la hidratación sea adecuada y abundante, así como favorecer la micción frecuente para facilitar la eliminación de ácido úrico y evitar la cistitis hemorrágica. Sin embargo es frecuente que se presenten efectos tóxicos graves como la insuficiencia renal aguda.

La ciclofosfamida puede producir pérdida de apetito, caída del cabello, erupciones en la piel, náuseas, vómito, dolor abdominal e inflamación de la vejiga causando hemorragia. La toxicidad hematológica es la principal

reacción adversa de la ciclofosfamida, se manifiesta como pancitopenia con leucopenia, neutropenia, anemia y/o trombocitopenia.

Se llega a recomendar el empleo de anticonceptivos en personas en edad reproductora mientras se esta administrando la ciclofosfamida y durante cuatro meses después, por la capacidad carcinógena y teratógena que llega a tener.

2. Mangostán

2.1 Características morfológicas

El mangostán (*Garcinia mangostana* Linn) es un miembro de la familia *Clusiaceae* y es un árbol tropical de lento crecimiento que alcanza una altura de 6 a 25 m. Este árbol tiene frutos redondos con diámetro entre 6 y 7 cm de un color púrpura oscuro a rojizo, con cáscara (pericarpio) de 7 mm de espesor (Esquema 2). La porción comestible es blanca, suave, jugosa y con un sabor ligeramente ácido y dulce, tiene un agradable aroma y está dividida en varios segmentos (de cinco a ocho) (**Jung et al., 2006; Marcason, 2006**).



a



b

Esquema 2. a) Rama del árbol del mangostán y b) Fruto del mangostán.

Este árbol se distribuye predominantemente en Indonesia, Malasia, Sri Lanka, Myanmar, Filipinas y Tailandia. Los habitantes de estas áreas han utilizado el pericarpio del fruto de mangostán como parte de su medicina

tradicional para tratar heridas e infecciones de la piel (**Mahabusarakam, 1987; Pierce Salguero, 2003**), la disentería amebiana (**Garnet y Sturton, 1932; Chopra et al., 1956; Sen et al., 1980**), el cólera, infecciones bacterianas (**Moongkarndi et al., 2004**), inflamación crónica y diarrea (**Balasubramanian y Rajagopalan, 1988**).

Además se ha informado en diversas publicaciones que el mangostán presenta un amplio espectro de efectos biológicos:

- (a) antibacteriano: inhibe el crecimiento de *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* implicadas en el desarrollo de acné (**Chomnawang et al., 2005; Ee et al., 2006**), *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (**Linuma et al., 1996**), *Mycobacterium tuberculosis* (**Suksamrarn et al., 2003**).
- (b) fungicida: inhibe el crecimiento de *Oxysporum vasinfectum*, *Alternaria tenuis* y *Dreschlera oryzae* (**Gopalakrishnan et al., 1997**).
- (c) antimalárico: inhibe a *Plasmodium falciparum* (**Riscoe et al., 2005**), *Plasmodium berghei* (**Fotie, et al. 2003**).
- (d) antitumoral: disminuye la proliferación de células de cáncer de colon DLD-1 (**Matsumoto et al., 2005**).
- (e) muestra actividad antiproliferativa contra líneas celulares SKBR3 de adenocarcinoma de humano de mama.
- (f) antileucémico en líneas celulares Humanas HL60 (**Matsumoto et al., 2003**).
- (g) anti-ulceroso (**Moongkarndi et al., 2004**).
- (h) actúa como quelante de metales (**Pinto et al., 2005**).
- (i) antiinflamatorio (**Pinto et al., 2005**).
- (j) anti-trombótico (**Lin et al., 1996**).
- (k) es bloqueador de receptores de histamina y serotonina (**Woo et al., 2007**).
- (l) presenta propiedades antioxidantes (**Williams et al., 1995; Mahabusarakam et al., 2000**).

2.2 Composición química

El mangostán contiene una variedad de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran xantonas preniladas y oxigenadas (**Gopalakrishnan et al., 1980; Peres et al., 2000**), antocianinas glicosiladas, benzofenonas glicosiladas y derivados (**Jinsart et al., 1992; Huang et al., 2001**), peptinas, taninos, resinas y látex (**Garrity et al., 2004**) los cuales se han aislado principalmente del pericarpio y en menor cantidad de la fruta completa, del tronco del árbol y de las hojas. Además en la semilla del mangostán se acumulan niveles significativos de ácidos grasos saturados, específicamente el 46% en peso corresponde a estearatos y el 8% a palmitatos (**Hawkins y Kridl, 1998**).

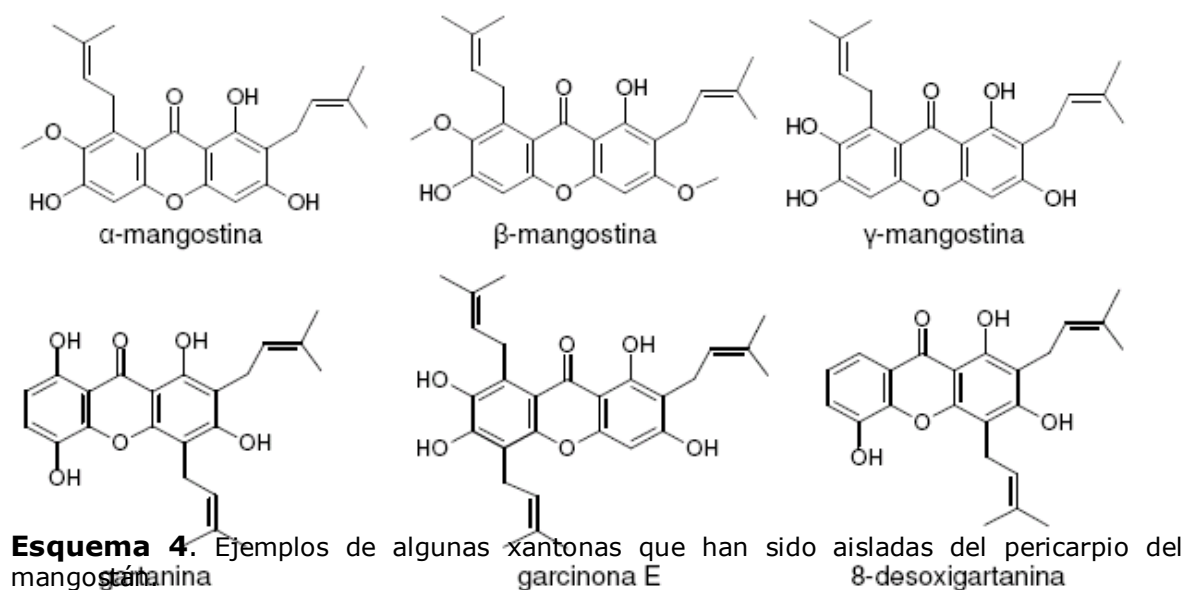
En las plantas las xantonas se derivan biosintéticamente de la combinación de la ruta del acetato-malonato y sikimato (**Jinsart et al., 1992**) y constituyen los productos más estudiados del metabolismo secundario en el mangostán.

Dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes dentro del anillo xantónico se subdividen en 5 grupos: xantonas oxigenadas simples, glicósidos de xantonas, xantonas preniladas y sus derivados, xantonolignoides y xantonas misceláneas (**Pinto et al., 2005**).



Esquema 3. Estructuras del anillo base del núcleo xantónico, presenta dos grupos bencenos unido por una gama pirona, presentando sistemas conjugados, con una configuración plana y sin movimiento.

Todas las xantonas presentan un núcleo base, conocido como 9H-xanten-9-ona o dibenzo γ pirona el cual es simétrico (Esquema 3) y está sustituido en diferentes posiciones dando lugar a una gran variedad de estructuras químicas (Esquema 4). Las xantonas aisladas del mangostán que más se han estudiado desde el punto de vista biológico son: la γ mangostina, la β mangostina y la α -mangostina (**Vieira y Kijjoa, 2005; Pinto et al., 2005; Jiang et al., 2003**) (Esquema 4).



El mangostán ha sido usado como ingrediente en varias preparaciones comerciales como cápsulas, suplementos nutricionales y bebidas suplementadas. Algunos ejemplos de estos productos son: XanGo™, Mangoxan y Vemma, los cuales pueden ser adquiridos vía internet y en tiendas naturistas (**Lozoya, 1993**).

2.3 XanGo™

El XanGo™ es un suplemento alimenticio, compuesto del puré de la fruta entera de mangostán y una combinación de otros jugos de fruta como jugo de manzana, uva, pera, arándano, frambuesa, fresa, arándano agrio y cereza. También contiene ácido cítrico, sabores naturales, pectina, goma

xantana y benzoato de sodio. La información nutricional se presenta en la Tabla 2 (Los datos se obtuvieron del envase primario del XanGo™ y de Marcason, 2006).

Tabla 2. Información nutricional del XanGo™ (Cantidad por 30 mL).

Contenido energético	51 KJ 12 kcal
Proteína	0 g
Grasas (Lípidos)	0 g
Sodio	0 mg
Potasio	70 mg
Carbohidratos totales	3 g
Azúcares	2 g

Este producto se comercializa actualmente en diversos países mediante un sistema de comercialización de redes de mercadeo (multinivel). Diversos usuarios del producto han descrito algunos de los siguientes beneficios: un sistema inmune en óptimas condiciones, disminución de alergias y de inflamación, aunque también se ha postulado que puede tener un papel preventivo en diversas enfermedades como el cáncer. Estos beneficios no han sido evaluados aún en ensayos clínicos, así sus efectos en humanos solamente se presentan como testimonio de personas que lo han usado. No se ha asociado ningún efecto secundario adverso a la fruta, al jugo, o a los extractos enteros del mangostán (*Ji et al., 2007; Marcason, 2006*).

III. Justificación

El estrés oxidativo esta presente en nuestra vida cotidiana, ya sea por factores endógenos o exógenos, que favorecen la aparición de EROs y por consiguiente una oxidación celular. A pesar de que en nuestro organismo hay defensas antioxidantes naturales, no llegan a ser suficientes para poder contrarrestar el daño producido por agentes externos, por lo que es deseable conocer productos naturales con actividad antioxidante para poder ayudar a nuestro organismo a eliminar o disminuir el daño ocasionado.

En este caso nuestro órgano de interés es el riñón, el cuál realiza funciones fisiológicas y bioquímicas importantes para la homeostasis del organismo. Se sabe que la administración del antineoplásico ciclofosfamida puede producir IRA por efecto del estrés oxidativo producido. Este fármaco es usado cada vez más en la población, por la presencia y aumento de las enfermedades cancerígenas. A pesar de que la IRA es reversible tenemos que tener en cuenta que esta reversibilidad ocurre cuando se suspende el tratamiento, pero en estos casos el uso es continuo hasta producir una IRA crónica, la cuál es irreversible.

También por eso es importante poder conocer antioxidantes de origen natural, para poder ayudar a la defensa antioxidante de nuestro organismo para contrarrestar el daño oxidativo. En este trabajo se utiliza mangostán ya que se tienen algunas evidencias acerca de su actividad antioxidante, atrapando oxígeno singulete y anión superóxido. Al determinar su efecto protector, podemos llegar a diseñar nuevas estrategias encaminadas a disminuir la insuficiencia renal aguda intrínseca inducida por la ciclofosfamida.

IV. Hipótesis

Se sabe que el mangostán cuenta con propiedades antioxidantes y que la ciclofosfamida causa nefrotoxicidad con estrés oxidativo por tanto es posible que la administración de mangostán disminuya el daño renal ocasionado por la administración de la ciclofosfamida en ratas macho Wistar.

V. Objetivo General

Investigar si el mangostán tiene un efecto protector ante el daño renal ocasionado por la administración de ciclofosfamida en rata.

VI. Objetivos Particulares

- 1.- Establecer el modelo de IRA en ratas utilizando ciclofosfamida.
- 2.- Evaluar el efecto protector del mangostán en la nefrotoxicidad causada por ciclofosfamida.
- 3.- Evaluar el estrés oxidativo generado durante la nefrotoxicidad con ciclofosfamida en presencia o ausencia de mangostán.

VII. Materiales y Métodos

1. Reactivos

Para las determinaciones del nitrógeno de urea y la creatinina se emplearán estuches comerciales de la marca SPINREACT de LAB CENTER DE MÉXICO. El ácido tiobarbitúrico, el tetrametoxipropano, el mesilato de deferoxamina, el nitroazul de tetrazolio, el NADPH, el azul de tetrazolio (BHT), la glutatión reductasa, el glutatión reducido, la albúmina sérica bovina, el reactivo de Folin, el carbonato sódico, el p-nitrofenol-N-acetil-β-D-glucosaminido, la xantina y la xantina oxidasa fueron de SIGMA CHEMICAL. El etanol, el fosfato de potasio monobásico, el fosfato de sodio dibásico, el butanol, la piridina, el ácido clorhídrico, el ácido tricloroacético, el tartrato sódico potásico, el peróxido de hidrógeno, el sulfato de amonio y la sal disódica del ácido etileno diamino tetraacético fueron de JT BAKER. El sulfato cúprico y el carbonato de sodio fueron de MALLINCKRODT. El cloruro de cobre fue de RIEDEL-DE HAËN.

2. Fármaco y antioxidante

La solución de CF (HIDROFOSMIN®, de LABORATORIOS SANFER, S.A. de C.V.) se preparó el mismo día de su uso. Se pesó la cantidad requerida en cada protocolo y se disolvió en agua destilada hasta obtener una concentración final de 20 mg/mL. La dosis administrada de CF fue de 100 mg/kg. El mangostán (jugo XanGo™) se administró a una dosis de 3 mL/Kg.

3. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250 – 300 g de peso. Se mantuvieron bajo condiciones estándar de temperatura a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ en cajas metabólicas (NALGE COMPANY) con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y con libre acceso a alimento (RODENT LABORATORY CHOW) y agua.

4. Diseño Experimental

Los protocolos estuvieron formados por grupos con 2-4 animales, los cuales fueron pesados diariamente. Se colocaron en cajas metabólicas para la recolección de la orina de cada 24h y los animales se sacrificaron por decapitación, para obtener la sangre y los riñones. Se midieron urea en suero y creatinina en suero y orina. En riñón se determinaron las actividades de las enzimas CAT, SOD y GPx. Además se midió el nivel de lipoperoxidación mediante las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

a) Curso temporal de la IRA inducida por ciclofosfamida.

Grupos:

- 1.-Control
- 2.- Ciclofosfamida 50mg/Kg/24h por 5 días
- 3.- Ciclofosfamida 75mg/Kg/24h por 5 días
- 4.- Ciclofosfamida 100 mg/Kg/24h por 5 días

La IRA fue inducida mediante la administración diaria de CF por vía intraperitoneal (i.p.) con la dosis respectiva para cada grupo. Los sujetos experimentales fueron pesados antes, durante y al final del protocolo, cuya duración fue de 5 días. Al término del mismo, se sacrificó a los sujetos experimentales por decapitación y se recolectaron muestras de orina y de sangre para las determinaciones de creatinina en suero (CS), depuración de creatinina (DC), nitrógeno de urea en sangre (BUN).

b) Efecto protector del Mangostán en la IRA

Grupos:

- 1.- Control - SSI = 3 mL/Kg/24h por 5 días.
- 2.- Ciclofosfamida = 100mg/Kg/24h por 3 días.
- 3.- Ciclofosfamida + Mangostán = 100mg/Kg+3mL/Kg/24h por 3 días.
- 4.- Mangostán = 3 mL/Kg/24h por 5 días.

El mangostán se administró 48 h antes de la primera administración de la ciclofosfamida, la CF se administró en el tiempo 0 y el sacrificio de las ratas se realizó 48 h después de la administración de la ciclofosfamida. Durante los días que no se administro CF las ratas se trataron como a las controles, es decir se les administro SSI. Los riñones de los sujetos experimentales fueron extraídos para su posterior estudio.

5. Muestras

5.1 Orina. La orina se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente en una centrifuga EBA20, HETTICH. Se hicieron alícuotas de 1 mL en tubos de 1.5 mL y se congelaron a -20° C para su uso posterior.

5.2 Suero. Al momento del sacrificio, la sangre de las ratas se colectó de manera individual en tubos de vidrio, después de haber coagulado se separó el coagulo. Se centrifugaron las muestras a 3,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, se hicieron alícuotas del suero colocando en tubos de 1.5 mL y se congelaron a -20° C hasta su uso.

5.3 Riñón. Los riñones de cada una de las ratas fueron obtenidos y se colocó en papel aluminio para guardarse inmediatamente a -20° C.

5.4 Homogenado. Se preparó el homogenado de un corte transversal del riñón en amortiguador de fosfatos 50mM, pH 7.4, tritón 10%. Se utilizó una dilución de tejido: en amortiguador de 1:4 (p/v). Se empleó un homogenador tipo politrón Brinkman durante 10 seg. Los homogenados se centrifugaron en una microcentrífuga Beckman a 15,300 rpm durante 1h a 4° C.

5.5 Cuantificación de proteínas. Esta determinación se realizó por el método colorimétrico de Lowry y colaboradores (1951).

6. Evaluación del daño renal

6.2 Función glomerular

6.2.1 Creatinina en suero. La creatinina es el resultado de la degradación de la creatina, componente de los músculos. Se elimina a través del riñón. En una insuficiencia renal progresiva hay una retención en sangre de urea, creatinina y ácido úrico. Niveles altos de creatinina son indicativos de patología renal.

La creatinina presente en el suero se determinó con un método colorimétrico-cinético mediante la reacción de Jaffé, basado en la generación de un complejo anaranjado al reaccionar la creatinina con el ácido pícrico en solución alcalina. El producto formado absorbe a 492 nm y su absorbencia es directamente proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra.

Antes de leer las muestras se ajustó la lectura a cero con un blanco de agua, posteriormente se leyó el estándar de creatinina de 2 mg/dL a los tiempos antes mencionados. En una celda se adicionaron 50 μ L del suero y 500 μ L de la mezcla de reacción (ácido pícrico 17.5mM e hidróxido de sodio 0.29M, 1:1), se leyó en el espectro a los 0, 30, 60 y 90 seg. La cantidad de creatinina presente en las muestras se obtuvo calculando el cociente de las diferencias de densidad óptica de la muestra (la lectura de 90 seg menos la de 30 seg) entre el estándar por la concentración del estándar. Se calcularon los mg de creatinina/dL y los datos se normalizaron con respecto al control.

6.2.2 Depuración de creatinina. La depuración de creatinina se emplea como marcador para poder evaluar la función renal, ya que es una manera de medir la velocidad de filtración glomerular (Pedraza-Chaverrí et al., 1999).

Para esta medición fue necesario cuantificar la concentración de creatinina en orina y suero. Se calculó la depuración de la creatinina usando la siguiente fórmula:

$$\text{Depuración de creatinina} = (\text{UCREA} * \text{VU}) / (\text{PCREA} * 1440).$$

Donde UCREA se refiere a la concentración de creatinina en la orina expresada en mg/dL; VU se refiere al volumen urinario de 24 h expresado en mL; PCREA es la concentración de creatinina en el plasma sanguíneo, expresada en mg/dL y 1440 son los minutos que hay en las 24 h. La depuración de creatinina se calculó en mL/min y los datos se normalizaron con respecto al control.

6.2.3 Nitrógeno de la urea en el suero sanguíneo (BUN). La urea es el resultado final del metabolismo de las proteínas. La concentración de urea en sangre, aumenta como consecuencia de dietas con exceso de proteínas, enfermedades renales, insuficiencia cardiaca, hemorragias gástricas e hipovolemia.

La concentración de la urea se determinó por un método colorimétrico, el cual se basa en la reacción de la urea con el ortoftalaldehído en medio ácido, desarrollando un producto colorido que muestra un máximo de absorbencia a 510 nm. Para poder llevar a cabo la medición de las muestras se realizó un ajuste de la lectura a cero usando agua como blanco. En una celda se adicionaron 5 μ L del suero o estándar (50 mg/dL) y 500 μ L de la mezcla de reacción (4:1), se leyó en el espectro a los 0, 30, 60 y 90 seg. La cantidad de urea presente en las muestras se obtuvo calculando el cociente de las diferencias de densidad óptica de la muestra (la lectura de 90 seg menos la de 30 seg) entre las diferencias de densidad óptica del estándar por la concentración del estándar. La cantidad de nitrógeno de urea se calculó dividiendo la concentración de urea entre 2.14, ya que este factor nos indica el número de átomos de nitrógeno en una molécula de urea. Luego de calcular los resultados en mg/dL, se normalizaron con respecto al grupo control.

7. Actividad de enzimas antioxidantes en el riñón.

7.1. Evaluación del estrés oxidativo

7.1.1. Actividad de la catalasa (CAT).

Para llevar a cabo esta determinación se utilizó el método de Aebi (1982). En una celdilla de cuarzo se adicionaron 12.5 µl del homogenado diluido 1:100 en amortiguador de fosfato 10 mM pH 7.0. Se mezcló con 362.5 µl de una mezcla de peróxido de hidrogeno 7 mM en amortiguador de fosfato 10 mM pH 7.0. Se midió el cambio de absorbencia a 240 nm cada 15 seg durante 30 seg, ya que es el periodo en el que la descomposición del H₂O₂ sigue una cinética de primer orden (Aebi, 1982). De acuerdo a Aebi, se usó la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la catalasa, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula:

$k = (1/t)(2.3 \times \log A_1/(A_2))$ donde t= intervalo de tiempo medido, A₁ y A₂ son las absorbencias del H₂O₂ en los tiempos t₁ y t₂. Finalmente los datos se normalizaron con respecto al control.

7.1.2. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx).

Se empleó el método de Lawrence y Burk (1976). El homogenado se diluyó 1:10 con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. De esta dilución de tomaron 50 ul y se mezclaron con 400 ul la solución siguiente: fosfato de potasio 50 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, 1 unidad de glutatión reductasa/ml y glutatión reducido 1 mM. Se preparó un blanco con la mezcla de reacción la cual en lugar del homogenado se le adiciona agua destilada. Después de 5 min de incubación de la muestra con el amortiguador a temperatura ambiente, se agregaron 500 µl de H₂O₂ 0.25 mM a cada muestra e inmediatamente después se leyó la absorbencia a 340 nm cada minuto durante 3 min. Los datos se calcularon como U/mg de proteína. Una unidad se define como los µmoles de NADPH oxidado en un minuto. Finalmente los datos se normalizaron con respecto al grupo control.

7.1.3. Actividad de la enzima superóxido dismutasa total (SOD)

La actividad de esta enzima se determinó por la reacción del anión superóxido con el azul de nitrotetrazolio (NBT) (**Oberley & Spitz, 1984**). Para ello se preparó una solución de xantina oxidasa con una concentración de 168 U/L y una mezcla de reacción que contenía en concentración final: xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 μ M, ASB 0.006% y carbonato de sodio 49 mM. Se colocaron 2.45 mL de la mezcla de reacción en dos tubos de ensayo que se mantuvieron a 27°C. Posteriormente se agregó 0.5 mL del homogenado renal diluido 1:100 con agua destilada, la reacción se inició inmediatamente agregando 50 μ L de la solución de xantina oxidasa. Se realizó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos pero sustituyendo la xantina oxidasa por agua. Simultáneamente se preparó un blanco de comparación el cual contenía xantina oxidasa pero sin homogenado. Los tubos se incubaron por 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó 1 mL de cloruro cúprico 0.8 mM y se leyeron a 560 nm. Los datos se calcularon como U de SOD/ mg de proteína. Donde 1U= cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT. Finalmente los datos se normalizaron con respecto al control.

7.2. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

En este método se mide la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA), entre las cuales se encuentra el malondialdehído. Este es uno de los productos finales de la lipoperoxidación, que se produce como consecuencia del estrés oxidativo. La reacción con el TBA se lleva a cabo a altas temperaturas y a pH bajo formando un cromógeno rosa (**Yagi, 1998; Armstrong et al., 1994; Lef'evre, 1998; Janero, 1998**). A los homogenados previamente preparados, se les midió el contenido de proteínas por el método de Lowry (1951). Se colocó lo equivalente a 0.5 mg de proteína de cada muestra en tubos de 1.5 mL, y se ajustaron a 100 μ L con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Se preparó una curva estándar con malondialdehído (MDA). Se añadieron 500 μ L de solución de TBA/HCl/TCA/DFO (ácido tiobarbitúrico/ácido clorhídrico/ácido

tricloroacético/mesilato de deferoxamina) a cada uno de los tubos de la curva y de las muestras. Los tubos se agitaron en el vórtex (VORTEX-GENE 2, G-560) y se colocaron en un baño de agua hirviendo por 10 min. Después se añadió 0.5 mL de butanol/piridina (15:1 v/v) a cada tubo de las muestras. Se volvieron a agitar vigorosamente en el vórtex por 1 min y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se obtuvo la fase superior de cada tubo y las muestras se leyeron a 532 nm. Los datos obtenidos se interpolaron en la curva patrón de MDA. Los resultados se calcularon como nmol MDA/mg proteína y después se normalizaron con respecto al control.

8. Análisis Estadístico.

Los datos se presentaron como la media \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Los datos se analizaron con el programa Prism 2.01 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) mediante ANOVA de 1 y 2 vías y comparaciones múltiples de DUNNET. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

VIII. Resultados y Discusión

1. Curso temporal de la insuficiencia renal aguda (IRA) producida por la ciclofosfamida

Se caracterizó la insuficiencia renal aguda producida por la ciclofosfamida en ratas macho Wistar de 250-300 g de peso corporal. La IRA se indujo inyectando intraperitonealmente la ciclofosfamida a una dosis de 50, 75 o 100 mg/Kg. Se evaluó el peso corporal, el volumen urinario, la creatinina en suero (CS), la depuración de creatinina (DC) y el nitrógeno de urea en sangre (BUN).

Los resultados de todos los protocolos se presentan de manera normalizada, excepto peso corporal y volumen urinario. La normalización consiste en relacionar cada dato obtenido con el promedio del grupo CT, esto se realizó ya que se llega a presentar variaciones en las mediciones obtenidas de los parámetros entre un protocolo y otro, a pesar de que los reactivos se mantuvieron bajo las condiciones que indica el fabricante.

1.1. Efecto en el peso corporal y el volumen urinario

El peso corporal de los animales del grupo CT mantuvieron su peso a lo largo del protocolo, así como el grupo de la dosis de 75 mg/Kg, los grupos con las dosis de 50 y 100mg/Kg de CF presentaron una tendencia a disminuir a medida que transcurrió el tiempo (Figura 1).

Esto nos indica que el tratamiento con la ciclofosfamida disminuye el mantenimiento de la masa corporal normal en las ratas en un tratamiento al menos de 5 días.

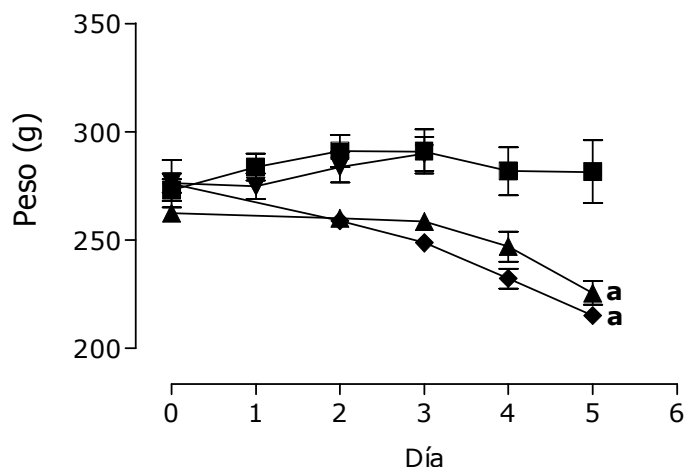


Figura 1. Curso temporal del peso corporal durante la IRA por ciclofosfamida en rata.
 CT (■), 75 mg/Kg (▼), 50 mg/Kg (▲), 100 mg/Kg (◆). Promedio \pm EEM, n= 2-4, a: P<0.05 vs CT.

Con respecto al volumen urinario los animales del grupo CT mantienen constante el volumen a lo largo del experimento (Figura 2). El volumen urinario de los animales tratados con ciclofosfamida, presenta una tendencia a aumentar en los primeros días con la dosis de 100 mg/kg y en el último día con las dosis de 50 y 75 mg/Kg. Sin embargo no es significativo ninguno de estos cambios.

El volumen de orina no es un parámetro que nos indique, al menos en los primeros 5 días, la presencia y/o la progresión de la IRA por ciclofosfamida.

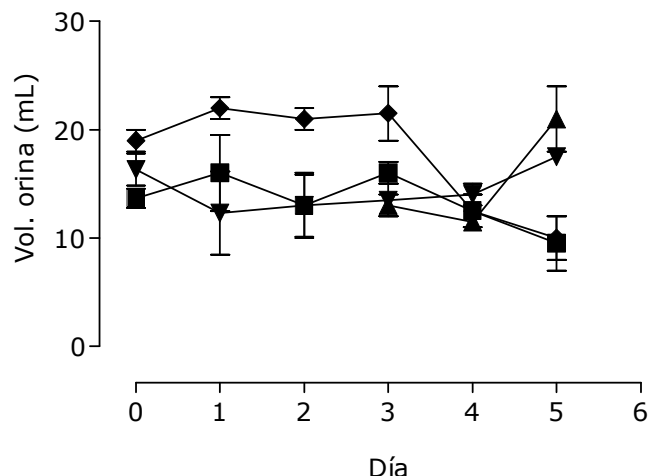


Figura 2. Curso temporal del volumen urinario durante la producción de IRA en ratas.

CT (■), 75 mg/Kg (▼), 50 mg/Kg (▲), 100 mg/Kg (◆). Promedio \pm EEM, n= 2-4, a: P<0.05 vs CT.

1.2 Función glomerular

Se determinaron como marcadores de daño glomerular BUN, creatinina en suero y depuración de creatinina. No se evaluaron marcadores tubulares debido a que previamente se determinó en el laboratorio que estos no se ven afectados en la IRA por CF.

Con respecto a creatinina en suero se observa que los tres grupos tratados con el antineoplásico a diferentes dosis tienen valores mayores que el grupo CT, siendo el grupo de 100 mg/Kg el que presenta una menor dispersión (Figura 3A).

Con respecto a BUN, podemos observar un ligero aumento en los tres grupos, sin embargo no es significativo con respecto al grupo CT (Figura 3B).

De forma concordante a la creatinina en suero, que aumenta, la depuración de creatinina disminuye en los grupos tratados con la CF. Siendo más evidente el grupo tratado con la dosis de 100mg/Kg (Figura 3C).

Los datos de CS obtenidos en nuestros experimentos coinciden con la literatura, es decir, el aumento de su valor en la presencia del daño renal (**Senthilkumar, et al., 2006**). No hay datos de depuración reportados.

Estos datos obtenidos, nos permitieron decidir que la dosis de ciclofosfamida que utilizaríamos en el siguiente protocolo sería 100 mg/Kg. Esta dosis permite observar daño renal, evaluado por creatinina en suero y depuración de creatinina. A pesar de no haber observado cambio significativo en el nivel de BUN, si hubo una tendencia a aumentar, lo que sugiere que empieza la disfuncionalidad al filtrar BUN. Por otro lado, es importante resaltar que estos parámetros fueron medidos en el día 5 y es probable que en los días anteriores se encuentre el pico de daño. Por tanto también decidimos evaluar los primeros días con la dosis de 100 mg/Kg.

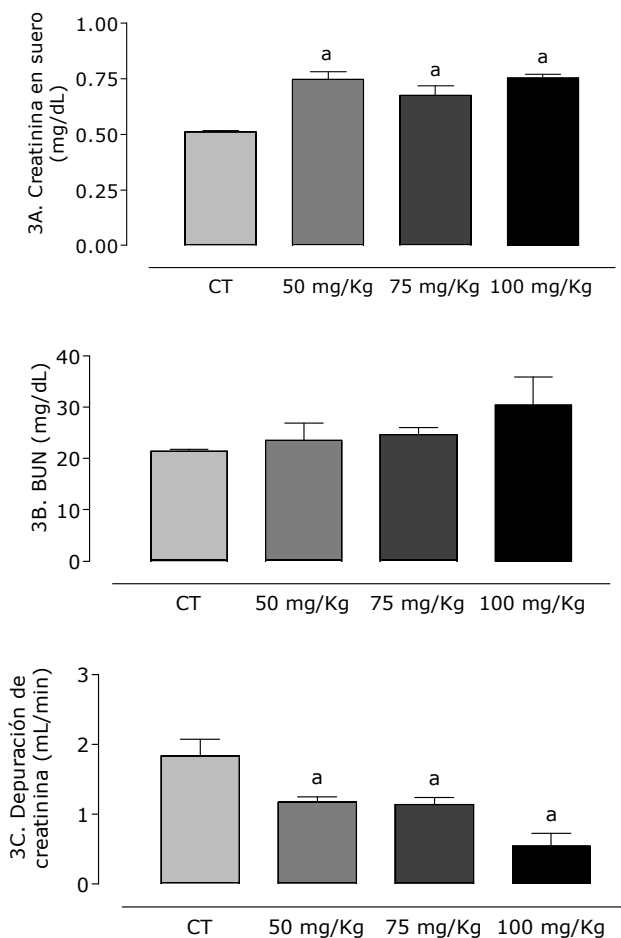


Figura 3. IRA por ciclofosfamida. Marcadores de daño glomerular (Día 5).

3A. Creatinina en suero; 3B. BUN; 3C. Depuración de creatinina.

Promedio \pm EEM, n= 2-4, a: P<0.05 vs CT

2. Efecto protector del Mangostán en la IRA

Se utilizó la dosis de 100 mg/Kg de CF para evaluar el posible efecto protector del Mangostán. La CF se administró a las 0 y 24h, a las ratas se les sacrificaron a las 48h. Utilizamos una dosis de 3mL/Kg de mangostan y administramos cada 24h por 4 días, comenzando 2 días antes de administrar la ciclofosfamida.

2.1. Efecto en el peso corporal y el volumen urinario

El peso corporal de los animales control y tratados solo con mangostán son parecidos y se mantuvieron constantes en ambos tiempos. El peso corporal de los grupos con CF y CF+M son menores que el control en ambos tiempos, pero el grupo de CF es el que presentó valores más pequeños (Figura 4).

La disminución del peso corporal es indicativo no solo del posible daño renal, sino del daño generalizado en los animales. Por tanto este parámetro no es útil por si solo para diagnosticar la IRA, solo se puede complementar a los parámetros de función renal.

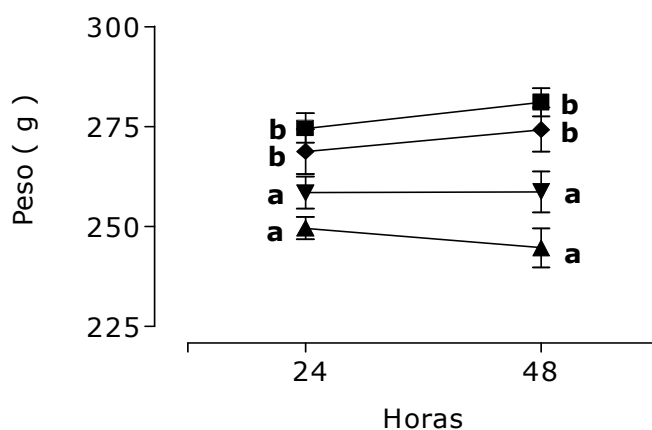


Figura 4. Curso temporal del peso durante la evaluación del efecto protector del mangostán. CT (■), CF (▲), CF + M (▼), M (◆).

Promedio \pm EEM, n= 2-4, a: P<0.05 vs CT, b: P<0.05 vs CF

Con respecto al volumen urinario podemos ver que los grupos CT y M mantuvieron constante los volúmenes de orina a lo largo del experimento. Por otro lado, el grupo tratado con CF presentó una tendencia a aumentar a las 24h, pero solo en el grupo de CF + M aumentó significativamente el volumen urinario (Figura5).

La tendencia al aumento del volumen de orina en los animales tratados con CF indica que se encuentran en la fase de mantenimiento o poliúrica de la IRA. Mientras que a las 48h se inicia la fase de recuperación. En el grupo de CF + M el proceso es más evidente ya que a las 24h es el grupo con el volumen mas alto.

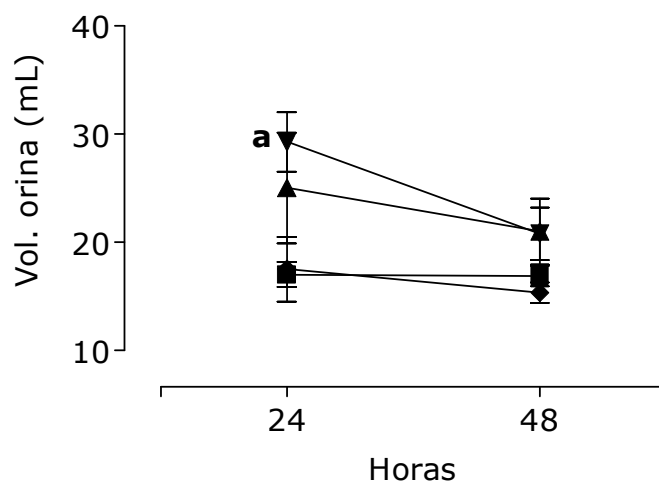


Figura 5. Curso temporal del vol. urinario durante la evaluación del efecto protector del mangostán. CT (■), CF (▲), CF + M (▼), M (◆).

Promedio \pm EEM, n= 2-4, a: P<0.05 vs CT

2.2. Función glomerular

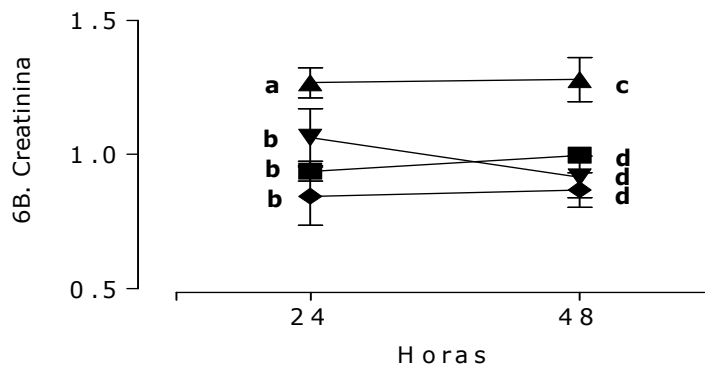
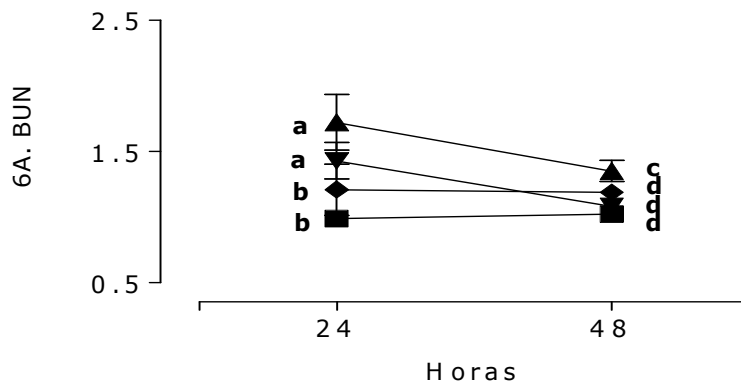
Se determinaron los marcadores de daño glomerular BUN, creatinina en suero y depuración de creatinina.

Se observa que los valores de BUN de los grupos CT y M son semejantes entre ellos y en ambos tiempos evaluados. El grupo de ciclofosfamida aumenta en ambos tiempos pero es mayor a las 24 h. El

grupo de CF + M tiene un comportamiento semejante al grupo de ciclofosfamida pero en menor proporción. Sin embargo solo a las 48 h se observa una protección significativa (Figura 6A).

Con respecto a la creatinina en suero se observa que los grupos CT, M y CF + M son semejantes en ambos tiempos estudiados. El grupo de ciclofosfamida aumenta desde las 24 h y se mantiene a las 48 h. Por tanto, se observa protección en ambos tiempos estudiados, pero esta protección es mayor y total a las 48 h (Figura 6B).

La depuración de creatinina es normal e igual en los grupos CT, M y CF + M en ambos tiempos estudiados. La depuración en el grupo de ciclofosfamida disminuye en ambos días pero es más baja a las 24 horas. En ambos tiempos se puede observar que hay protección total del daño funcional ocasionado por la ciclofosfamida (Figura 6C).



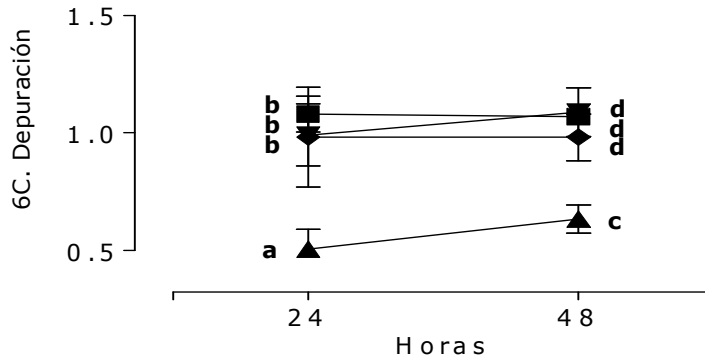


Figura 6. Marcadores de daño glomerular.

6A. BUN; **6B.** Creatinina en suero; **6C.** Depuración de creatinina.

CT (■), CF (▲), CF + M (▼), M (◆). Promedio \pm EEM, n= 2-4

a: $P < 0.05$ vs CT 24h; b: $P < 0.05$ vs CF 24h; c: $P < 0.05$ vs CT 48h; d: $P < 0.05$ vs CF 48h

Los tres parámetros concuerdan e indican daño renal glomerular por la ciclofosfamida. Como lo habíamos planteado, a las 24 y 48h observamos mayor daño glomerular renal y en estos días si se vio aumento de BUN. La protección sobre este parámetro no es sobresaliente, sin embargo la creatinina en suero y la depuración de creatinina si muestran una protección total. Estos últimos parámetros son los mejores en todos los tipos de insuficiencia renal y también son los más utilizados clínicamente.

3. Evaluación de estrés oxidativo

3.1. Evaluación de la expresión de las enzimas antioxidantes en el riñón

La actividad de las enzimas CAT, SOD y GPx presentaron valores normales en las ratas CT y en las tratadas solo con M (Figura 7).

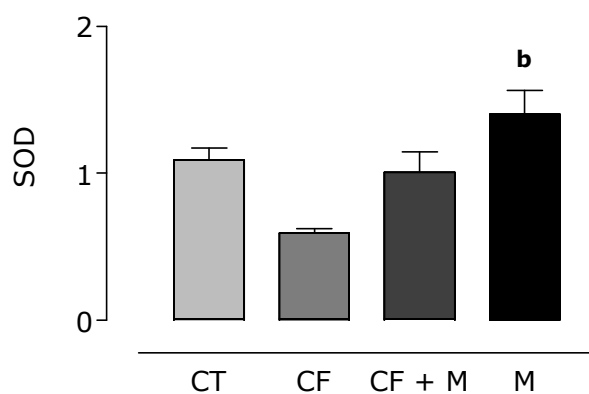
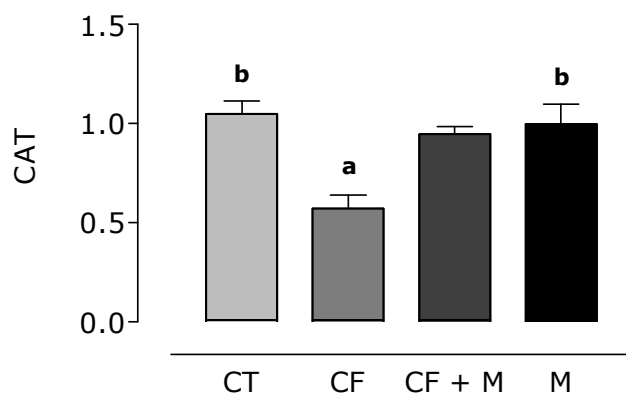
Se observa que la actividad de CAT disminuye en el grupo tratado con CF, pero no disminuye en el grupo CF+M.

La actividad de SOD presenta una tendencia a disminuir en el grupo de CF y esta tendencia no se observa en el grupo de CF+M.

Para la enzima GPx no se observan cambios en ninguno de los grupos estudiados.

La función de estas enzimas antioxidantes es reaccionar directamente con las ERO, con lo cual contribuyen a disminuir o prevenir el daño generado por las mismas. En este modelo podemos observar que la administración de la CF ocasiona una tendencia a disminuir la actividad de CAT y SOD. Esto nos sugiere que son formados anión superóxido y peróxido de hidrógeno, los cuales son combatidos por estas enzimas. Sin embargo estas ERO sobrepasan la capacidad de las enzimas y son afectadas, disminuyendo su actividad.

Por otro lado, la administración del mangostán fue capaz de prevenir la inactivación funcional de las enzimas CAT y SOD ocasionado en el riñón por la ciclofosfamida, ya que los valores de los grupos tratados con el antioxidante son similares o más altos que los del grupo control.



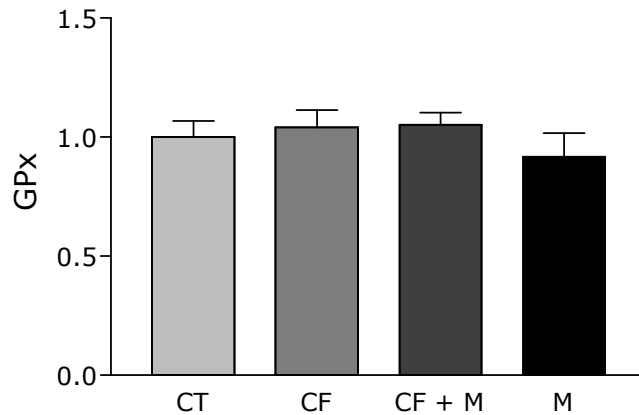


Figura 7. Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes en el riñón.

Resultados de las actividades de CAT, SOD y GPx.
Promedio \pm EEM. a. $P < 0.05$ vs CT ; b. $P < 0.05$ vs CF.

3.2. TBARS en riñón

Se evaluó al malondialdehído (MDA) el cual es un producto formado por la interacción de radicales libres, como el radical hidroxilo con los lípidos. Este proceso es conocido como lipoperoxidación. El MDA se hace reaccionar con ácido tiobarbitúrico, como la reacción no es 100% específica se denota como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico o TBARS.

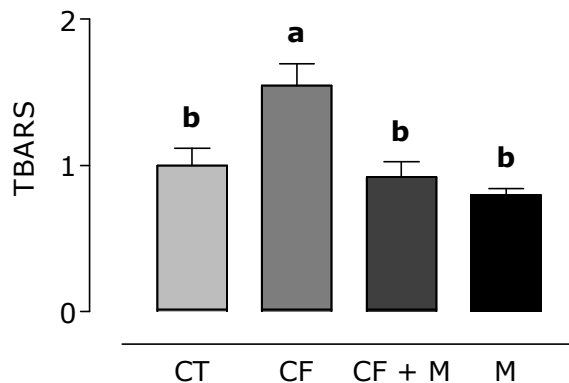


Figura 8. Marcador de estrés oxidativo. Determinación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico. Promedio \pm EEM. a. $P < 0.05$ vs CT ; b. $P < 0.05$ vs CF.

En los grupos CT, CF+M y M se observan valores similares, al contrario del grupo tratado con CF que esta casi al doble del grupo CT, esto se esperaba ya que en el desarrollo de la IRA hay producción de ERO. Por tanto podemos decir que la oxidación lipídica se pudo prevenir por la administración del mangostán y que la protección es total.

IX. Resumen de Resultados

- Se logró establecer un modelo de IRA en ratas macho Wistar (200-250 g), utilizando ciclofosfamida (100 mg/Kg/cada 24 h por 2 días).
- La IRA por ciclofosfamida se caracterizó por el aumento de la creatinina en suero y el BUN; y por la disminución de la depuración de creatinina.
- En la IRA por ciclofosfamida se determinó la presencia de estrés oxidativo, caracterizado por la disminución de la actividad de las enzimas CAT y SOD; y por el aumento de las TBARS.
- El mangostán fue capaz de prevenir totalmente los cambios observados en creatinina en suero y depuración de creatinina, actividad de CAT, actividad de SOD y TBARS. Además fue capaz de prevenir parcialmente los cambios observados en BUN.

X. Conclusión

El mangostán tiene un efecto protector parcial ante el daño renal funcional y el estrés oxidativo ocasionados por la ciclofosfamida.

XI. Bibliografía

1. Aebi HE. (1982). Catalase, In: Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weimheim.
2. Aruoma OI. (1996). Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radic Biol Med* 20:675-705.
3. Avissar N, Kerl EA, Baker SS, Cohen HJ. (1994). Extracellular glutathione peroxidase mRNA and protein in human cell lines. *Arch Biochem Biophys* 309:239-246. a
4. Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. (1994). Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 266:C365-C367. b
5. Balasubramanian K, Rajagopalan K. (1988). Xanthenes from *Garcinia mangostana*, structures of BR-xanthone-A and BR-xanthone-B. *Phytochemistry* 27:1552-1554.
6. Banci L, Benedetto M, Bertini I, Del Conte R, Piccioli M, Viezzoli MS. (1998). Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochem* 37:11780-11791.
7. Baud, L., & Ardaillou, R. (1993). Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull* 49:621-629
8. Betteridge DJ. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49:3-8.
9. Blum J, Fridovich I. (1985). Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 240:500-508.
10. Brenner BM. (2000). The kidney. WB Saunders Company. 6a ed. USA.
11. Brigelius-Flohe R, Aumen KD, Blocker H, Gross G, Kiess M, Kloppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Usani F, Wingender E, Flohé L. (1994). Phospholipidhydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA and reduced amino acid sequence. *J Biol Chem* 269:7342-7348.
12. Buettner GR. (1993). The pecking order of the free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300:535-543.
13. Burk RF. (1991). Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J* 5:2274-2279.

14. Burton GW, Yoyce A, Ingold KU. (1982). First proof that vitamin E is major lipidsoluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 2:327-329.
15. Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverrí J. (2005). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17:164-173.
16. Cheng L, Kellogg EW, & Packer L. (1981). Photoinactivation of catalase. *Photochem Photobiol* 34:125-129.
17. Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. (2005). Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J Ethnopharmacol* 101:330-333.
18. Chopra RN, Nayar SL, Chopra IC. (1956). Glossary of Indian medicinal plants. *The National Institute of Science Communication and Information resources*. Nueva Dehli 123.
19. Christensen EI, Rennke HG, Carone FA.(1983). Renal tubular uptake of protein: effect of molecular charge. *Am J Physiol* 224:F436-F441.
20. Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. (1993). Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 268:2571-2576.
21. Corey EJ, Mehrotra MM, Khan AU. (1987). Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen. *Bioch Biophys Res Commun* 145:842-846.
22. Danovitch G, Carvounis C, Weinstein E, Levenson S. (1979). Non-oliguric acute renal failure. *J Med Sci* 15:5-8.
23. Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. (1986). Uric acid-iron complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 235:747-754.
24. Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr* 80:77-112
25. Eberhardt M K. (2001). Reactive oxygen metabolites, chemistry and medical consequences. *Crc Florida USA* 10-149.
26. Ee GC, Daud S, Taufiq-Yap YH, Ismail NH, Rahmani M. (2006). Xanthones from *Garcinia mangostana* (Guttiferae). *Nat Prod Res* 20:1067-1073.

27. Fotie J, Nkengfack AE, Rukunga G, Tolo F, Peter MG, Heydenreich M, Fomum ZT. (2003). In-vivo antimalarial activity of some oxygenated xanthenes. *Ann Trop Med Parasitol* 97:683-688.
28. Frei B, Stocker R, England L, Ames B. (1990). Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 264:155-163.
29. Fridovich I. (1975). Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44:147-159.
30. Fridovich I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201:1203-1209.
31. Fridovich I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 893:13-18.
32. Garrity AR, Morton GA, Morton JC. Mayo 4, (2004). Nutraceutical mangosteen composition. *United States Patent*, US 6,730,333 B1.
33. Garnett M, Sturton SD. (1932). Garcinia Mangostana in the treatment of amoebic dysentery. *Chin Med J* 46:969-973.
34. Geneser Finn, (2000). Histología. Editorial Panamericana. Pp 555-578.
35. Gibson, D., Hawrylko, J., & McCay, B. (1985). GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: properties of a potent cytosolic system which protects cell membranes. *Lipids* 20:704-711
36. Gopalakrishnan C, Shankaranarayanan D, Kameswaran L, Nazimudeen SK. (1980). Effect of mangostin, a xanthone from Garcinia mangostana Linn. in immunopathological & inflammatory reactions. *Indian J Exp Biol* 8:843-846.
37. Gopalakrishnan G, Banumathi B, Suresh G. (1997). Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from Garcinia mangostana and their synthetic derivatives. *J Nat Prod* 60:519-524.
38. Halliwell B, Gutteridge JM. (2001). Free radicals in biology and medicine. 3a edición. *Oxford University Press USA*. 36-104.
39. Halliwell B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 31:261-272.
40. Hamdi IÖ, Balk M, Askoy Y, Müftüoglu M, Özer N. (1998). The effects of oxidative stress on the redox system of the human erythrocyte In: Free radicals, oxidative stress, and antioxidants. Özben T ed. *Plenum press*. USA. 25-49.

41. Harris D.E. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 6:2675-2683.
42. Hawkins DJ, Kridl JC. (1998). Characterization of acyl-ACP thioesterases of mangosteen (*Garcinia mangostana*) seed and high levels of stearate production in transgenic canola. *Plant J* 13:743-52.
43. Heinz, V. (1983). *Renal function: Mechanism Preserving Fluid and Solute Balance in Health*. USA: Little Brown and Company
44. Hsieh Y, Tu C, Bratt PJ, Angerhofer A, Lepock JR, Hickey MJ, Tainer JA, Nicks HS, Silverman DN. (1998). Probing the active site of human manganese superoxide dismutase: the role of glutamine 143. *Biochemistry* 37:4731-4739.
45. Huang YL, Chen CC, Chen YJ, Huang RL, Shieh BJ. (2001). Three xanthenes and a benzophenone from *Garcinia mangostana*. *J Nat Prod* 64:903-906.
46. Ji X, Avula B, Khan IA. (2007). Quantitative and qualitative determination of six xanthenes in *Garcinia mangostana* L. by LC-PDA and LC-ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal* 43:1270-1276.
47. Jiang DJ, Hu GY, Jiang JL, Xiang HL, Deng HW, Li YJ. (2003). Relationship between protective effect of xanthone on endothelial cells and endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 11:5171-5177.
48. Jinsart W, Ternai B, Buddhasukh D, Polya GM. (1992). Inhibition of wheat embryo calcium-dependent protein kinase and other kinases by mangostin and gamma-mangostin. *Phytochemistry* 31:3711-3713.
49. Jung HA, Su BN, Keller WJ, Mehta RG, Kinghorn AD. (2006). Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J Agric Food Chem* 54:2077-2082.
50. Krinsky, NI., & Deneke, SM. (1982). Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoid. *J Natl Cancer Inst* 69:205-209
51. Lin CN, Hsieh HK, Liou SJ, Ko HH, Lin HC, Chung MI, Ko FN, Liu HW, Teng CM. (1996). Synthesis and antithrombotic effect of xanthone derivatives *J Pharm Pharmacol* 9:887-890.
52. Linuma M, Tosa H, Tanaka T, Asai F, Kobayashi Y, Shimano R, Miyauchi K. (1996). Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol* 48:861-865.

53. Lozoya X. (1993). Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. En: la investigación de la herbolaria Medicinal Mexicana. *Secretaría de Salud México*. 255-270.
54. Madsen KM, Tisher CC. (2000). Anatomy of the kidney. In the kidney. Brenner BM and Rector FC Jr. Brenner Ed. *Saunders Co., Philadelphia*. 3-67.
55. Mahabusarakam W & Wiriyaichitra P. 1987. Chemical constituents of *Garcinia Mangostana*. *Journal of Natural Products* 50:474-478.
56. Mahabusarakam W, Proudfoot J, Taylor W, Croft K. (2000). Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthenes derived from mangostin. *Free Radic Res* 33:643-659.
57. Marcason W. (2006). What are the facts and myths about mangosteen? *J Am Diet Assoc* 106:986.
58. Marklund SL. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci* 79:7634-7638.
59. Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. (2003). Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines. *J Nat Prod* 8:1124-1127.
60. Matsumoto K, Akao Y, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. (2005). Xanthenes induce cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer DLD-1 cells. *Bioorg Med Chem* 13:6064-6069.
61. May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. (1998). Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by the thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 273:233039-23045.
62. M'bemba-Meka P, Lemieux N, Chakrabarti SK. (2007). Role of oxidative stress and intracellular calcium in nickel carbonate hydroxide-induced sister-chromatid exchange, and alterations in replication index and mitotic index in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol* 81:89-99.
63. Moongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N. (2004). Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia* 75:375-377.
64. Murphy LM, Strange RW, Hasnain S. (1997). A critical assessment of the evidence from XAFS and crystallography for the breakage of the imidazolate bridge during catalysis in CuZn superoxide dismutase. *Structure* 5:371-379.

65. Nyengaard JR, Bendtsen TF. (1992). Glomerular number and size in relation to age, kidney weight and body surface in moral man. *Anat Rec* 232:194-201.
66. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. (1996). Extracellular superoxide dismutasa: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 75:617-636.
67. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424.
68. Peres V, Nagem TJ, de Oliveira FF. (2000). Tetraoxygenated naturally occurring xanthones. *Phytochem* 55:683-710.
69. Pierce Salguero C. (2003). A Thai herbal, Tradicional recipes for health and harmony. *Findhorn Press. Scotland, Finland* 118.
70. Pinto MM, Sousa ME, Nascimento MS. (2005). Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Curr Med Chem* 12:2517-2538.
71. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. (2000). Active and inhibited human catalasa structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296:295-309.
72. Ren B, Huang W, Akesson B, Ladenstein R. (1997). The crystal structure of seleno-glutathione peroxidasa from human plasma at 2.9Å resolution. *J Mol Biol* 268:869-885.
73. Rhodin JAG. (1971). Structure of the kidney. In Diseases of the kidney, 2a ed. *MB Strauss y LG Welt. Little Brown and Co., Boston* 35-80.
74. Rhun LY, Kirkland JB, Shah GM. (1998). Cellular responses to DNA damage in the absence of poly (ADP-ribose) polymerase. *Biochemical and Bioph Res Comm* 245(1):1-10.
75. Riscoe M, Kelly JX, Winter R. (2005). Xanthones as antimalarial agents: discovery, mode of action, and optimization. *Curr Med Chem* 12:2539-2549.
76. Ross D, Moldeus P. (1991). Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: Membrane Lipid Oxidation. Vigo-Pelfrey C. (ed). Boca Raton, *Fl:CRC*, vol 2. 151-70.
77. Rovin BH, Wurst E, Kohan DE. (1990). Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in culture. *Kidney Int* 37:1509-1514.
78. Sánchez, L. (1993). Insuficiencia renal aguda. Aspectos clínicos. España: *Ediciones Norma* 548-588.

79. Sauer, H., Wartenberg, M., & Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11:173-186
80. Schnackenberg CG. (2002). Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:335-342.
81. Sen AK, Uusvuori R, Hase TA, Benerji N, Sarkar KK, Mazumder PC. (1980). A xanthone from *Garcinia mangostana*. *Phytochem* 19:2223-2225.
82. Sevanian A, Davies KJ, Hochstein P. (1985). Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *Free Radic Biol Med* 1:117-124.
83. Staehelin LA. (1974). Structure and function of intercellular junctions. *Int. Rev. Cytol.* 39:191-283.
84. Suksamrarn S, Suwannapoch N, Phakhodee W, Thanuhiranlert J, Ratananukul P, Chimnoi N, Suksamrarn A. (2003). Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull* 51:857-859.
85. Sumpio BE, Maack T. (1982). Kinetics, competition and selectivity of tubular absorption of proteins. *Am J Physiol* 243: F379-92.
86. Tisher CC, Bulger RE, Trump BF. (1966). Human renal ultrastructure. I. Proximal tubule of healthy individuals. *Lab Invest* 15:1357-1394.
87. Vieira LM, Kijjoa A. (2005). Naturally-occurring xanthenes: recent developments. *Curr Med Chem* 12:2413-2446.
88. Weisiger RA, Fridovich I. (1973). Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 248:4793-4796.
89. Welling LW, Welling DJ. (1975). Surface areas of brush border and lateral cell walls in the rabbit proximal nephron. *Kidney Int* 8:343-348.
90. Williams P, Ongsakul M, Proudfoot J, Croft K, Beilin L. (1995). Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. *Free Radic Res* 23:175-184.
91. Woo S, Jung J, Lee C, Kwon Y, Na Y. (2007). Synthesis of new xanthone analogues and their biological activity test cytotoxicity, topoisomerase II inhibition, and DNA cross-linking study. *Bioorg Med Chem Lett* 17:1163-1166.

92. Xiong Y, Rabchevsky AG, Hall ED. (2007). Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J Neurochem* 100:639-649.
93. Yap YW, Whiteman M, Cheung NS. (2007). Chlorinative stress: an under appreciated mediator of neurodegeneration? *Cell Signal* 19:219-228.
94. Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T. (1991). Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J. Biochem.* 109:918-923.
95. Yu, BP. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 74, 139-162
96. Zou Y, Kim AR, Kim JE, Choi JS, Chung HY. (2002). Peroxynitrite scavenging activity of sinapic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) isolated from *Brassica juncea*. *J Agric and Food Chem* 50(21):5884-5890.

XII. Definiciones

Na⁺ - Ion sodio.

Cl⁻ - Ion cloro.

K⁺ - Ion potasio.

Ca²⁺ - Ion calcio.

NaCl - Cloruro de sodio.

ATP - Adenosin tri fosfato.

ADP - Adenosin di fosfato.

ERO - Especies reactivas de oxígeno.

BUN - Nitrógeno de urea en sangre.

CS - Creatinina en suero.

DC - Depuración de creatinina.

CAT - Catalasa.

GPx - Glutación Peroxidasa.

CT - Control.

CF - Ciclofosfamida.

M - Mangostan.

CF + M - Ciclofosfamida y mangostan administrados.

TBARS - Acido tiobarbiturico.

EEM - Error estándar de la muestra.

P - Promedio.

n - Tamaño de la muestra.