



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**EFFECTO PROTECTOR DEL  
SULFORAFANO CONTRA EL ESTRÉS  
OXIDANTE, DAÑO MITOCONDRIAL,  
INFLAMACIÓN Y MUERTE CELULAR  
INDUCIDOS POR CISPLATINO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A:**

**M. en C. CARLOS ENRIQUE GUERRERO BELTRÁN**

Tutor: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ



MÉXICO, D. F.

ENERO 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

# **“EFECTO PROTECTOR DEL SULFORAFANO CONTRA EL ESTRÉS OXIDANTE, DAÑO MITOCONDRIAL, INFLAMACIÓN Y MUERTE CELULAR INDUCIDOS POR CISPLATINO”**

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

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

Dr. José Pedraza Chaverrí  
Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta  
Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz

Se reconoce al Técnico Académico, M. en C. Omar Noel Medina Campos, por su valiosa asesoría técnica.

Se reconoce a la Biól. Nallely Cabrera González y a la Dra. Rosalía Lira Carmona por su asesoría técnica.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto 129838 y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN201910. Durante los estudios de doctorado y el desarrollo del presente trabajo el tesista recibió una beca otorgada por el CONACYT.

El jurado de examen de grado estuvo formado por:

PRESIDENTE	Dra. Marta Menjívar Iraheta
VOCAL	Dr. Emilio Rojas del Castillo
SECRETARIO	Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
SUPLENTE	Dr. Armando Tovar Palacio
SUPLENTE	Dra. Marina Macías Silva

## **DEDICATORIA**

**Dedico esta tesis con todo mi AMOR a mi FAMILIA que tanto me ha apoyado:**

**CARLOS GUERRERO MONTENEGRO**

**EDDY BELTRÁN MEDINA**

**ARTURO GUERRERO BELTRÁN**

**ANTONIO CALDERÓN ADEL**

**GUADALUPE MEDINA ÁLVAREZ**

**CECY CASTILLO BARRAZA- *In memoriam***

***"Perfeccionad vos la obra con nuestro amor infinito,  
para que el fin de su vida no desdiga del principio"***

**Sor Juana Inés de la Cruz (1651-1695)**

## **AGRADECIMIENTOS**

A los **Animales** que dieron su vida para lograr este avance científico. **Muchas Gracias.**

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Química**, por permitirme crecer académicamente y vivir muchas experiencias dentro de esta, mi segunda casa.

Al **CONACyT** y a la **DGEP**, por el apoyo económico brindado sin el cual nada de esto hubiera sido posible

Al **Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”** por permitirme realizar parte de mi proyecto en sus instalaciones.

A **The National Institutes of Health (NIH)** (Maryland, USA), por dejarme ser uno de los privilegiados en formar parte de su equipo y hacerme ver la ciencia desde otra muy distinta perspectiva.

Al **Dr. José Pedraza Chaverrí** por todo el apoyo y la confianza brindada durante este viaje por la ciencia. También por sus enseñanzas que me formaron y enriquecieron tanto a nivel profesional como personal.

A mi comité tutorial, **Dra. Marta Menjívar** y **Dr. Rolando Hernández** por asesorar, criticar e impulsar este proyecto tan enriquecedor para mí.

A la **Dra. Edilia Tapia**, por las enseñanzas y valiosos consejos científicos.

A la **Dra. Cecilia Zazueta**, por ser una excelente asesora e investigadora.

Al **Dr. Pál Pacher**, por recibirme en su laboratorio y por su generosidad al compartir sus conocimientos, experiencia y atinada visión de la ciencia.

Al **Dr. Partha Mukhopadhyay**, por las enseñanzas, las pláticas y sobre todo el apoyo académicos durante mi estancia en NIH.

A **Leticia García**, por su excelentísimo trabajo, por su apoyo desinteresado, las innumerables facilidades académicas y personales en todo momento y sobretodo por su amistad.

A **Adelina González**, también por su excelentísimo trabajo, todo el apoyo académico, personal y por su amistad.

A mis **Amigos** del laboratorio 209 de Química “F”, en especial a **Jazmín, Laura, Susana** y **Omar**, y de **Cardiología**, con quienes compartí durante todo este viaje.

Y por último, pero no menos importante a **MIS AMIGOS** de la **VIDA** quienes han escuchado, compartido y vivido mi alegría, mi tristeza, mis logros y mis decepciones. **Gracias** por todos sus consejos y por estar ahí incondicionalmente.

# ÍNDICE

I.	Abreviaturas	viii
II.	Resumen	x
III.	Abstract	xii
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	Sulforafano	1
1.1.1	Generalidades	1
1.1.2	Propiedades físico-químicas	2
1.1.3	Un breve historia del sulforafano	2
1.1.4	Concentración de sulforafano en el brócoli y métodos de preparación que influyen en el contenido en el mismo	2
1.1.5	Farmacocinética: absorción, distribución, metabolismo y excreción del sulforafano	4
1.2	Estrés oxidante y agentes antioxidantes	5
1.3	Vía Keap1/Nrf2/ARE	18
1.4	Riñón	20
1.4.1	Generalidades	20
1.5	Cisplatino	25
1.5.1	Mecanismo de acción	26
1.5.2	La nefrotoxicidad y el estrés oxidante inducidos por el cisplatino	27
1.6	Mitocondria y cadena respiratoria mitocondrial	28
1.6.1	Estrés oxidante mitocondrial y daño mitocondrial inducido por cisplatino	31
1.7	Muerte celular y algunas proteínas relacionadas	33
1.7.1	Caspasas	34
1.7.2	Familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)	35
1.7.3	p53	36
1.7.4	Muerte celular inducida por cisplatino	37
1.8	Inflamación y algunas proteínas relacionadas	38
1.8.1	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )	39
1.8.2	Factor nuclear kappa de células B activadas (NF- $\kappa$ B)	40
1.8.3	Otros marcadores de inflamación	41
1.8.4	Inflamación inducida por cisplatino	42
<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>43</b>
2.1	Evidencias del sulforafano como antioxidante en distintos modelos de estrés oxidante	43
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>45</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>46</b>
5.1	General	46
5.2	Particulares	46

<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	47
6.1	Materiales	47
6.2	Diseño experimental	48
6.3	Métodos analíticos: Creatinina, BUN, NAG, proteinuria, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y GSH	49
6.4	Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos	54
6.5	Contenido de proteínas carboniladas y 4-hidroxi-2-nonenal	56
6.6	Enzimas antioxidantes	57
6.7	Cultivo celular y localización inmunocitoquímica de Nrf2	58
6.8	Aislamiento de mitocondrias renales	59
6.9	Actividad de la aconitasa	60
6.10	Consumo de oxígeno mitocondrial	60
6.11	Contenido de ATP mitocondrial	61
6.12	Porcentaje de transición mitocondrial inducido por calcio	61
6.13	Liberación de citocromo c mitocondrial	62
6.14	Análisis proteico por Western blot	62
6.15	Detección de apoptosis por TUNEL, fragmentación del ADN y actividad de caspasas 3/7	63
6.16	Tinción para mieloperoxidasa (MPO) e Inmunodetección de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1)	64
6.17	Cuantificación de proteínas	65
6.18	Análisis estadístico	65
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b>	66
7.1	El sulforafano protege contra la nefrotoxicidad inducida por cisplatino	66
7.1.1	Efecto del sulforafano en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino	66
7.1.2	Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos	67
7.1.3	Marcadores de estrés oxidante/nitrante	68
7.1.4	Enzimas antioxidantes	69
7.1.5	Efecto del sulforafano en la traslocación nuclear de Nrf2	71
7.2	Efecto protector del sulforafano contra las alteraciones mitocondriales inducidas por cisplatino	72
7.2.1	El sulforafano previene la depleción de glutatión mitocondrial	72
7.2.2	El sulforafano previene la disminución en la actividad de la aconitasa	72
7.2.3	Efecto del sulforafano en la respiración mitocondrial	73
7.2.4	El sulforafano previene la disminución del ATP mitocondrial inducido por cisplatino	75
7.2.5	Efecto del sulforafano en la retención de calcio mitocondrial	75
7.2.6	El sulforafano previene la liberación de citocromo c	76
7.3	El sulforafano previene la muerte celular e inflamación inducidas por cisplatino	79
7.3.1	El sulforafano previene la muerte celular inducida por cisplatino	79
7.3.2	El sulforafano previene el aumento de p38- $\alpha$ y la disminución de p38- $\beta$ MAPK mediado por cisplatino	81

7.3.3	La inducción de MAPK por cisplatino es atenuado por sulforafano	82
7.3.4	El tratamiento con sulforafano previene la respuesta inflamatoria	83
7.3.5	El tratamiento con sulforafano previene la expresión de moléculas de adhesión y la infiltración de células inflamatorias renales	84
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>87</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>95</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>96</b>
<b>11.</b>	<b>ARTÍCULOS GENERADOS</b>	<b>111</b>



## ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Singulete de oxígeno
3-NT	3-nitrotirosina
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
ARE	Elemento de respuesta a antioxidantes
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
BUN	Nitrógeno de urea en sangre
CAT	Catalasa
CCCP	Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona
CDNB	Cloro-2,4-dinitrobenceno
CIS	Cisplatino
CR	Control respiratorio
CSA	Ciclosporina A
CT	Control
Cu, Zn-SOD	Superóxido dismutasa citosólica
Cu, Zn-SOD ext	Superóxido dismutasa extracelular
Cul3	Culina-3
Cit c	Citocromo c
DMEM	Medio Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNPH	2,4,-dinitrofenil hidrazina
EEM	Error estándar de la media
ERK	Cinasas de regulación extracelular
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO o ROS	Especies reactivas de oxígeno
$\text{Fe}^{2+}$	Ión ferroso
$\text{Fe}^{3+}$	Ión férrico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FOX	$\text{Fe}^{3+}$ -Orange Xilenol, Hierro $^{3+}$ -naranja de xilenol
GPx	Glutación peroxidasa
GPx-c	Glutación peroxidasa intracelular
GPx-gi	Glutación peroxidasa gastrointestinal
GPx-p	Glutación peroxidasa plasmática
GPx-PH	Glutación peroxidasa de fosfolípidos
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S-transferasa
H&E	Hematoxilina y eosina

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HOCl	Ácido hipocloroso
i.p	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular-1
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
kDa	Kilodaltones
Keap1	Proteína 1 asociada a Kelch y parecida a ECH
LLC-PK1	Células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo
L-OOH, ROOH	Lipoperóxido
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
Mn-SOD	Superóxido dismutasa mitocondrial
MPO	Mieloperoxidasa
mPTP	Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido)
NAG	N-acetil-β-D-glucosaminidasa
NBT	Azul de tetrazolio
NF-κB	Factor nuclear kappa de células B activadas
NO•	Radical óxido nítrico
NQO1	NAD(P)H: quinona óxido-reductasa
Nrf2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2
O	Oxígeno atómico
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular, dióxígeno, oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anión superóxido
O <sub>3</sub>	Ozono
OH <sup>-</sup>	Ión hidroxilo
OH•	Radical hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	Anión peroxinitrito
PAS	Periodic Acid-Schiff
PBS	Amortiguador de fosfatos salino neutro
Prom	Promedio
RL	Radicales libres
e <sup>-</sup>	Electrones
H <sup>+</sup>	Protones
SFB	Suero fetal bovino
SFN	Sulforafano
-SH	Grupo sulfhidrilo
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ácido tricloroacético
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated uridine triphosphate (dUTP) nick-end labeling
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
XO	Sistema xantina/xantina oxidasa

# RESUMEN

## INTRODUCCIÓN

El cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino II, CIS), es un agente quimioterapéutico que induce nefrotoxicidad asociada a estrés oxidante/nitrante. El sulforafano (SFN) es un isotiocianato producido por la acción enzimática de la mirosinasa sobre la glucorafanina, un glucosinolato presente en los vegetales de la familia *Cruciferae*. El SFN es capaz de inducir a enzimas citoprotectoras a través del factor de transcripción Nrf2.

## OBJETIVO

El propósito de este estudio fue evaluar si el SFN es capaz de prevenir la nefrotoxicidad, el daño mitocondrial así como la inflamación y la muerte celular inducidos por CIS.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

A ratas Wistar macho se les inyectó una dosis única de CIS 7.5 mg/Kg (vía intraperitoneal). El SFN (500 µg/Kg, vía intravenosa) se administró dos veces (24 h antes y 24 h después de la inyección con CIS). Los animales se sacrificaron tres días posteriores a la administración de CIS.

## RESULTADOS y CONCLUSIONES

En los ensayos realizados se observó que el SFN atenuó la disfunción renal, el daño estructural, el estrés oxidante/nitrante, la depleción de glutatión reducido, la excreción urinaria de peróxido de hidrógeno y la disminución de enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa) inducidos por CIS. El efecto renoprotector del SFN en la nefrotoxicidad inducida por CIS se asoció a la atenuación del estrés oxidante/nitrante y a la preservación de la actividad de las enzimas antioxidantes.

También se estudió en este proyecto el efecto del SFN en la disfunción mitocondrial inducida por CIS. Las alteraciones mitocondriales inducidas por CIS (disminución en el consume de oxígeno usando sustratos como succinato y malato/glutamato, la inhibición en la captación de calcio mitocondrial, la disminución de la actividad de la enzima aconitasa, la disminución del contenido de ATP y GSH), así como la liberación de citocromo *c*, se previnieron eficientemente por el tratamiento con SFN. Por lo que se concluyó que el SFN es capaz de prevenir las alteraciones mitocondriales inducidas por CIS.

Como parte final de este proyecto se estudió el papel de las vías de señalización: supervivencia, muerte celular e inflamación en este modelo de roedores usando CIS y explorando los efectos del SFN en estos procesos. El CIS disparó la activación marcada de las vías de señalización relacionadas con estrés oxidante (p53, JNK y p38- $\alpha$  MAPK) y promovió la muerte celular en riñón (con incremento en la fragmentación del ADN, actividad de caspasas-3/7) observada por TUNEL, asociado con la atenuación de varias vías de señalización de supervivencia (ERK y p38- $\beta$  MAPK). El CIS también indujo una marcada inflamación en el riñón (promoviendo la activación de NF- $\kappa$ B, el incremento en la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1, y permitió la elevación en los niveles de TNF- $\alpha$ ) y la infiltración de células inflamatorias. En este estudio se observó que estos efectos se previnieron y/o se atenuaron con el pretratamiento con SFN en las ratas Wistar, por lo que se concluyó que la nefropatía inducida por CIS asociada con la activación de varias vías de muerte celular y proinflamatorias (p53, JNK, p38- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  y NF- $\kappa$ B) y la disminución de mecanismos de supervivencia (ERK y p38- $\beta$ ) se previene con el tratamiento por SFN mediado por la modulación de estas vías de señalización proveyendo un nuevo enfoque en la prevención de esta devastadora complicación inducida por CIS en el tratamiento quimioterapéutico.

# **ABSTRACT**

## **INTRODUCTION**

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum II, CIS), is a chemotherapeutic agent that induces nephrotoxicity associated with oxidative/nitrosative stress. Sulforaphane (SFN) is an isothiocyanate produced by the enzymatic action of myrosinase on glucorophanin, a glucosinolate contained in cruciferous vegetables from the *Cruciferae* family. SFN is able to induce cytoprotective enzymes through the transcription factor Nrf2.

## **OBJECTIVE**

The purpose of this study was to evaluate whether SFN induces a cytoprotective effect, prevents mitochondrial dysfunction, inflammation and cellular death on the CIS-induced nephrotoxicity.

## **EXPERIMENTAL DESIGN**

CIS was given to Wistar rats as a sole intraperitoneal injection at a dose of 7.5 mg/Kg. SFN (500 µg/Kg, intravenous) was given two times (24 h before and 24 h after CIS-injection). Animals were killed three days after CIS-injection.

## **RESULTS and CONCLUSIONS**

SFN attenuated CIS-induced renal dysfunction, structural damage, oxidative/nitrosative stress, glutathione depletion, enhanced urinary hydrogen peroxide excretion and the decrease in antioxidant enzymes (catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase). The renoprotective effect of SFN on CIS-induced nephrotoxicity was associated with the attenuation in oxidative/nitrosative stress and the preservation in the activity of antioxidant enzymes.

The effect of SFN on the CIS-induced renal mitochondrial dysfunction was also studied in the present work. The mitochondrial alterations induced by CIS injection

(decreased oxygen consumption using succinate and malate/glutamate as substrates, inhibition of mitochondrial calcium uptake, decreased ATP and glutathione content, release of cytochrome c) were effectively prevented by SFN treatment. It is concluded that SFN prevents the CIS-induced renal mitochondrial alterations.

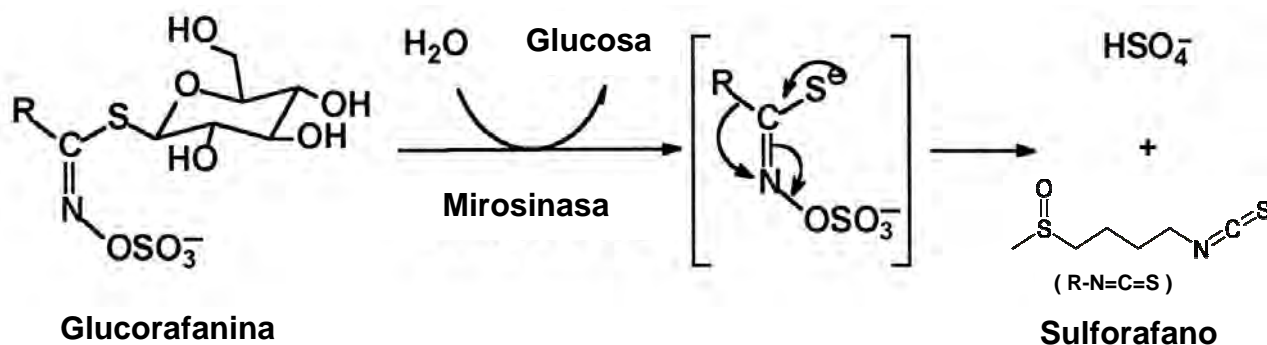
As a final part of this study, we have investigated the effects of SFN against CIS-induced cell death and inflammation. Cisplatin induced DNA fragmentation and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling staining (TUNEL), caspases-3/7 activity, activation of mitogen-activated protein kinase (MAPKs): extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Jun N-terminal kinase (JNK), p38- $\alpha$  and - $\beta$  MAPK isoforms, p53, and inflammation tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B), adhesion molecule expression and inflammatory cell infiltration in the kidneys of rats. Treatment of rats with SFN markedly prevented CIS-induced cellular death and inflammation markers. In summary, we demonstrated that CIS-induced renal cellular death and inflammation was prevented by SFN treatment. This is particularly exciting because SFN is a natural antioxidant inducer of common accessibility, low cost and proven efficacy in the reduction and prevention of different human illnesses.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sulforafano

### 1.1.1 Generalidades

El sulforafano [1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano, SFN], es un isotiocianato dietario que es sintetizado a partir de un precursor encontrado en los vegetales del orden *Brassicales* y de la familia *Cruciferae* como la coliflor, brócoli, col, coles de bruselas, mostaza, así como el rábano (*Raphanus* sp.) y la rúcula (*Eruca* sp.) (Fahey et al., 2001, Van Poppel et al., 1999). El 4-metilsulfinilbutil (**glucorafanina**) es el precursor del SFN. Los glucosinolatos son hidrolizados por la enzima  $\beta$ -tioglucosidasa (EC 3.2.3.1) también llamada **mirosinasa**, que entra en contacto con su sustrato cuando la planta se lesiona en procesos tales como ataque de patógenos, masticación, picado o preparación para el consumo humano y como consecuencia, la formación hidrolítica del SFN como el producto de la reacción principal (Fahey y Talalay, 1999; Shapiro et al., 2001). Sin embargo, dependiendo de las condiciones de reacción como el pH, la temperatura y la presencia de hierro, otros productos de reacción incluyendo tiocianatos y nitrilos también podrían formarse (Wittstock y Halkier, 2002; Hayes et al., 2008) como resultado de una reacción no enzimática, por reordenamientos intramoleculares (Fahey et al., 1999; Fahey et al., 2001) (Esquema 1).



**Esquema 1.** Reacción de hidrólisis de la glucorafanina por la mirosinasa para formar sulforafano.

### **1.1.2 Propiedades físico-químicas**

El SFN es un líquido ligeramente amarillento con un peso molecular de 177.29 g/mol y una densidad de 1.18 g/mL. Los isotiocianatos, como el SFN, son compuestos típicamente lipofílicos cuyas características los hacen altamente reactivos, volátiles, amargos y malolientes (Fenwick et al., 1983; Rosa et al., 1997).

### **1.1.3 Una breve historia de sulforafano**

En 1948 Schmid y Karrer sintetizaron por primera vez el SFN (Schmid y Karrer, 1948), pero se aisló a partir de extractos de brócoli (*Brassica oleracea var. itálica*) y se identificó como un agente potencial quimiopreventivo hasta 1992 por Zhang y sus colegas en la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins (Zhang et al., 1992). Ellos utilizaron un bioensayo de detección cuantitativa de extractos de plantas para la inducción de la NAD(P)H: quinona óxido-reductasa (NQO1) y glutatión S-transferasa (GST) en diversos tejidos de ratón. Un año más tarde, Kore y sus colegas (1992) informaron del aislamiento de SFN y compuestos relacionados por extracción con solventes en semillas desgrasadas por autólisis y la purificación por HPLC. Más tarde, Liang y colaboradores (2007) encontraron un nuevo método para producir grandes cantidades de SFN puro a partir del extracto con acetato de etilo de la harina de semillas de brócoli, por cromatografía en contracorriente de alta velocidad.

### **1.1.4 Concentración de sulforafano en el brócoli y métodos de preparación que influyen en el contenido en el mismo**

Se ha observado que la cantidad de SFN que se obtiene a partir del brócoli fresco varía por varios factores que afectan el contenido de glucosinolatos en el vegetal incluyendo factores genéticos, condiciones de cultivo, el medio ambiente, la estación y el almacenamiento post-cosecha (Murcia et al., 2000; Botero-Omary et al., 2002; Mosbah et al., 1999). Kushad y colaboradores (1999) obtuvieron una concentración de 0.8-21.7  $\mu\text{mol/g}$  de peso seco, mientras que Howard y colaboradores (1997) obtuvieron 43.1 mg/100 g, Matusheski y colaboradores



(2001) obtuvieron 33.5 mg/100 g de peso fresco, y Galgano y colaboradores (2007) obtuvieron 11.20 mg de SFN por cada 100 g de peso fresco de brócoli (Galgano et al., 2007). La concentración de SFN en germinado de brócoli (1,153 mg/100 g de peso seco) fue aproximadamente 10 veces mayor que en el del brócoli maduro (44-171 mg/100 g de peso seco) (Nakagawa et al., 2006). Otros estudios informaron que los brotes de brócoli de 3 días de edad presentaban de 10 a 100 veces más glucorafanina que las cabezas de brócoli maduros (Fahey et al., 1997). Los métodos de cocción y almacenamiento del brócoli también reducen o mantienen el contenido de glucosinolatos y SFN (Tabla 1), lo que puede ser secundario al hecho de que algunos glucosinolatos como la glucorafanina son compuestos solubles en agua y pueden ser lixiviados en el agua de cocción. Métodos de cocción, incluido vapor o microondas pueden reducir la pérdida de glucosinolatos (Higdon et al., 2007), sin embargo, algunas prácticas culinarias, incluyendo el hervido (Shapiro et al., 2001), vapor por largos períodos (Conaway et al., 2000) y microondas a alta potencia (850-900 W) (Rouzaud et al., 2004; Verkerk et al., 1997) pueden inactivar a la mirosinasa. Varios estudios en humanos han descubierto que la inactivación de la mirosinasa en los vegetales crucíferos disminuye sustancialmente la biodisponibilidad de los isotiocianatos (Conaway et al., 2000; Rouzaud et al., 2004; Shapiro et al., 2001).

**Tabla 1.** Efecto de los métodos de almacenamiento y cocción en la concentración de glucosinolatos

<b>Método de almacenamiento y cocción</b>	<b>Concentración</b>	<b>Referencia</b>
Hervido	Sulforafano no detectable	Galgano et al., 2007
	↓ 18-59% en el contenido total de glucosinolatos	McNaughton y Marks, 2003
	↓36% de glucorafanina en brócoli	Vallejo et al., 2002
	↓50% glucosinolatos totales en brócoli	Rosa et al., 1997
	↓90% de glucosinolatos en brócoli	Song y Thornalley, 2007
Refrigeración a 6°C y 95% de humedad relativa por 35 días	↓29% de sulforafano en brócoli	Galgano et al., 2007

Cocción al vapor	Sulforafano no detectable	Galgano et al., 2007
	Conservación de la mayoría de glucosinolatos en brócoli	Gliszczyńska-Swigło et al., 2006
Cocción al vapor y blanqueado	↓13% de sulforafano en brócoli	Galgano et al., 2007
	↓47% de sulforafano en brócoli	Howard et al., 1997
Presión/microondas	Sin pérdida significativa de sulforafano en brócoli	Galgano et al., 2007
Refrigeración (4°C)	↓39% de sulforafano en brócoli almacenado en bolsas perforadas de polietileno por 7 días	Howard et al., 1997
	↓55% de sulforafano en brócoli después de 21 días de almacenamiento	Howard et al., 1997
	↓9-26% de glucosinolatos en brócoli	Song y Thornalley, 2007
Microondas	↓39% de sulforafano en brócoli	Galgano et al., 2007
Cocción por presión	↓16.8% de sulforafano en brócoli	Galgano et al., 2007
Almacenado a 18°C	Contenido de sulforafano en brócoli en función del tiempo de almacenamiento	Galgano et al., 2007

### 1.1.5 Farmacocinética: absorción, distribución, metabolismo y excreción del sulforafano

El SFN es un compuesto prometedor en diferentes terapias citoprotectoras y contra el cáncer. En diversos experimentos tras la administración oral en ratas, se mostró que la concentración plasmática máxima de SFN se alcanzó cerca de una hora, lo que indica una rápida absorción (Hanlon et al., 2008). Resultados similares en los niveles máximos de SFN en plasma fueron reportados en voluntarios humanos (Al Janobi et al., 2006), así como sus aductos con el glutatión reducido (GSH) llamados ditiocarbamatos (Ye et al., 2002) después de una hora de la ingesta de brócoli (Al Janobi et al., 2006). El SFN muestra una biodisponibilidad absoluta del 82%. Se ha observado un comportamiento farmacocinético dosis-dependiente ya que los valores máximos de concentración no aumentan en forma proporcional a dosis máximas utilizadas (5 mg/Kg por vía oral en ratas), la tasa constante de absorción, la vida media y la distribución de volumen aparente disminuyó significativamente (Hanlon et al. 2008) y se mostró que un consumo repetido de SFN no conduce a una mayor concentración en plasma (Hanlon et al., 2009). Los datos cinéticos muestran una absorción más

rápida, una mayor biodisponibilidad y una mayor cantidad máxima de SFN plasmático en el consumo de brócoli crudo en comparación con el brócoli cocido (Vermeulen et al., 2008) ya que se encontró una mayor cantidad de SFN en la orina y la sangre cuando se comió brócoli crudo. La biodisponibilidad del SFN por el consumo de brócoli crudo fue alrededor del 37%, en contraste con el 3.4% cuando el brócoli se cocinaba en el microondas a 1000 W. La absorción de SFN se retrasó cuando el brócoli era cocinado (pico en plasma= 6 h), en contraste con el brócoli crudo (pico en plasma=1.6 h); sin embargo, la vida media, fue comparable en ambas preparaciones (2.6 y 2.4 h, respectivamente).

La principal vía metabólica del SFN en sistemas mamíferos implica la conjugación de GSH por parte de la GST, seguido por la transformación ulterior del conjugado con el ácido mercaptúrico por las enzimas  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa, cisteinilglicinasa y N-acetiltransferasa para formar un conjugado N-acetilcisteína-SFN (Fimognari et al., 2008) y posteriormente su excreción en la orina (Kassahun et al., 1997; Tang et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Además, experimentos con animales demostraron que el SFN, presenta cierta reducción del grupo sulfóxido para formar conjugados como erucina y N-acetilcisteína. En este sentido, la determinación cuantitativa de estos mercapturatos en la orina indican que aproximadamente el 60% y aproximadamente el 12% de una dosis única de SFN (50 mg/Kg, i.p) en ratas fue eliminado en 24 h, como conjugados N-acetilcisteína de SFN y erucina, respectivamente (Kassahun et al., 1997).

## 1.2 Estrés oxidante y agentes antioxidantes

El **oxígeno** (O), es un elemento químico gaseoso que se encuentra en un 99% en la atmósfera en forma diatómica (dioxígeno u oxígeno molecular, **O<sub>2</sub>**) ya que está unido covalentemente entre sí. El O<sub>2</sub> es un birradical ya que tiene dos electrones desapareados en su orbital externo, ambos con el mismo giro paralelo, lo que le dificulta tomar a la vez dos electrones libres con giro antiparalelo. Esta característica hace que el O<sub>2</sub> sólo pueda tomar a estos electrones de uno en uno,

haciéndolo intervenir casi exclusivamente en reacciones univalentes. Todo esto explica por que el O<sub>2</sub> reacciona muy poco en su estado basal y a temperatura ambiente.

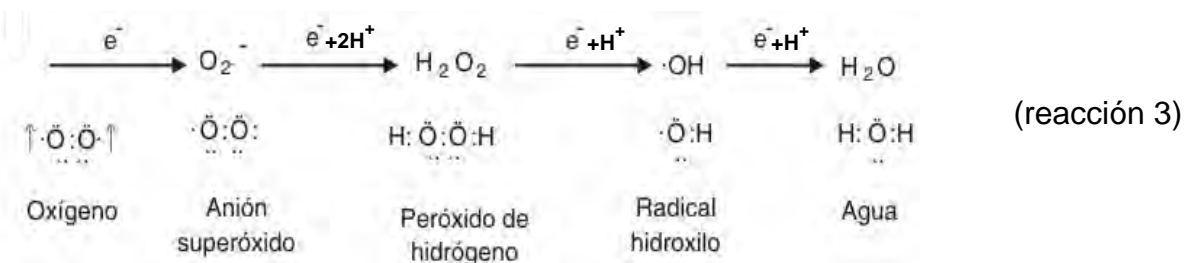
El O<sub>2</sub> atmosférico es producido por la oxidación del agua, proceso que es llevado a cabo por el fotosistema II de las células fotosintéticas durante la fase luminosa de la fotosíntesis (reacción 1) (Hansberg, 2002).



Por otro lado, en los organismos aerobios durante la respiración celular, el O<sub>2</sub> es el último aceptor de los electrones de la cadena respiratoria mitocondrial. El O<sub>2</sub> recibe cuatro electrones y cuatro protones por medio del complejo citocromo c oxidasa para reducirse en agua. Esta reacción es conocida como *reducción tetravalente del oxígeno*, ya que este complejo reduce completamente al O<sub>2</sub> y no libera especies parcialmente reducidas (reacción 2).



Sin embargo, en los sistemas biológicos también ocurren procesos en los que la reducción del O<sub>2</sub> se presenta de forma parcial o secuencialmente: el O<sub>2</sub> acepta de uno en uno los cuatro electrones produciéndose especies parcialmente reducidas del oxígeno, también llamadas **Especies Reactivas de Oxígeno** (ERO o ROS, por sus siglas en inglés Reactive Oxxygen Species). A esta reacción se le llama *reducción univalente del oxígeno* (reacción 3).



Los **radicales libres** (RL), son cualquier especie química (atómica o molecular) capaz de existir independientemente que contenga uno o más

electrones desapareados ocupando un orbital atómico o molecular por si solos, ya sea por pérdida o ganancia de un electrón, de un no radical o por la ruptura homolítica de una molécula (Hansberg, 2002). La presencia de uno o más electrones desapareados hace que los RL sean atraídos ligeramente a campos magnéticos haciéndolos a su vez altamente reactivos. Los RL sustraen electrones de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, generando así un nuevo radical a partir de la molécula estable que cedió su electrón, éste a su vez sustraerá electrones de otra molécula estable generándose así una reacción en cadena. Los RL derivados del oxígeno, las ERO y los del nitrógeno, especies reactivas de nitrógeno (ERN), son los más importantes desde el punto de vista biológico; aunque también podemos encontrar los derivados del hidrógeno y del carbono.

Los RL, en especial las ERO, son generados normalmente por el metabolismo celular para obtener la energía necesaria para sus procesos biológicos y éstos desempeñan un papel importante en la fisiología celular (Kovacic y Pozos, 2006); en procesos tales como la remoción de membranas, mitosis, sobrevivencia celular en etapas embrionarias, migración celular, síntesis y liberación de hormonas, transcripción de citocinas en procesos inflamatorios y mecanismos de segundos mensajeros (Chiarugi y Fiaschi, 2007; Stone y Yang, 2006; Bienert et al., 2006). Así como señalización celular, diferenciación y crecimiento celular, neurotransmisión, control del sistema inmune, fagocitosis, entre otros (Burdon y Rice-Evans, 1989; Sauer et al., 2001; Forman y Torres, 2001).

Paradójicamente, el oxígeno es esencial para la vida, pero también una de las moléculas más tóxicas conocidas por el hombre. A este hecho contrastante se le llama "Paradoja del oxígeno", ya que el oxígeno a altas concentraciones llega a ser tóxico, hecho que se puede explicar por la formación de las ERO. Estas ERO son más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete. Las principales ERO son: (1) las que se producen por la ruptura o la excitación del oxígeno [oxígeno atómico, (O); ozono, (O<sub>3</sub>) y singulete de oxígeno, (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)] y (B) las

parcialmente reducidas [anión superóxido, ( $O_2^{\bullet-}$ ); peróxido de hidrógeno, ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo, ( $OH^{\bullet}$ )].

A continuación se describen algunas ERs de interés para este trabajo:

- **Singulete de oxígeno ( $^1O_2$ )**

El  $^1O_2$  se produce cuando uno de los electrones desapareados del  $O_2$  absorbe energía e invierte su giro o rotación. De esta reacción se pueden formar dos formas distintas del  $^1O_2$ : la sigma ( $\Sigma$ ) y la delta ( $\Delta$ ). La forma  $\Sigma$  conserva los dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos  $2\pi^*$  como en el caso del  $O_2$ , pero diferenciándose de éste en que un electrón tiene un giro paralelo y el otro uno antiparalelo. La forma  $\Delta$  también posee dos electrones, pero estos se encuentran apareados en un solo orbital  $2\pi^*$ , por lo que no es un RL como tal ya que no posee ningún electrón desapareado.

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

El  $O_2^{\bullet-}$  se forma por la reducción univalente del  $O_2$  (ganancia de un electrón) y es la primera ERO que se forma durante esta reducción. En condiciones normales el  $O_2^{\bullet-}$  es producido por diversos sistemas enzimáticos tales como el sistema xantina/xantina oxidasa (XO) (reacción 4), la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, la óxido nítrico sintasa y el citocromo P450; siendo la cadena de transporte de electrones la fuente más importante de generación del  $O_2^{\bullet-}$ .



El  $O_2^{\bullet-}$  tiene una función importante *in vivo*, ya que participa en la descarga respiratoria de las células fagocíticas como monocitos y macrófagos (aumento en la producción de oxígeno) como mecanismo de defensa contra organismos extraños. Al activarse estas células, el complejo enzimático NADPH que está

localizado en la membrana citoplasmática, reduce parcialmente al oxígeno de la siguiente forma (reacción 5):



El  $\text{O}_2^{\bullet-}$  puede interactuar con otras moléculas como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de trazas de algún metal de transición y formar compuestos más potentes como el  $^1\text{O}_2$  y el  $\text{OH}^\bullet$ . A pesar de su nombre “súper”-óxido, es menos “radical” que el  $\text{O}_2$ , ya que sólo tiene un electrón desapareado.

- **Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es formado en el organismo principalmente por la dismutación del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD), pero también puede producirse durante las reacciones de oxidación de quinonas, la oxidación de compuestos que contienen grupos sulfhidrilos o la dismutación del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Freeman, 1984).

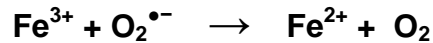
El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un no radical en sí ya que tiene todos sus electrones apareados y es un agente oxidante/reductor débil lo que lo hace poco reactivo; sin embargo, éste es capaz de difundir a través de las membranas ya que tiene una gran lipofilidad (Nath y Norby, 2000) y reaccionar con el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en presencia de metales de transición como el cobre y el hierro, y generar el radical  $\text{OH}^\bullet$  (reacción de Haber-Weiss, reacción 6). Biológicamente, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  participa en los procesos de señalización intracelulares (Nordberg y Arnér, 2001).



- **Radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ )**

El  $\text{OH}^\bullet$  es considerado una de las ERO más dañinas ya que tiene una vida media ( $10^{-9}$  s) y reacciona con casi todas las moléculas biológicas. Esta especie se puede formar por ruptura homolítica de la molécula de agua, por radiación de

alta energía (rayos X) al dividir al  $\text{H}_2\text{O}_2$  y producir dos moléculas de  $\text{OH}^\bullet$ , por la reacción de Haber-Weiss (reacción 6) o cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  acepta un electrón desapareado de un metal de transición formándose el  $\text{OH}^\bullet$  y el ión hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) (reacción de Fenton, reacción 7).

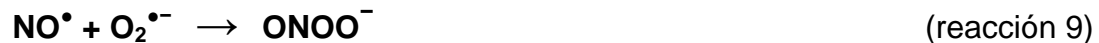


Las fuentes de metales de transición pueden ser las proteínas encargadas de transportar a estos metales como la ferritina o la metalotioneína y los centros hierro-azufre de algunas proteínas desnaturalizadas por la interacción con el  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . El  $\text{OH}^\bullet$  también se puede formar a partir de la reacción con el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) (reacción 8).



- **Anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )**

El  $\text{ONOO}^-$  es un potente oxidante que induce la nitración de tirosinas, lipoperoxidación y toxicidad celular. Este anión no es una ERO sino una ERN que puede formarse por la combinación del radical óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (reacción 9).



La toxicidad del oxígeno y las especies reactivas se presenta cuando se produce un exceso de estos RL en el organismo y por alguna razón la capacidad de la defensa antioxidante en el organismo es ineficiente, a esta condición de desequilibrio entre los agentes oxidantes y la defensa antioxidante se le denomina, **estrés oxidante** (Hansberg, 2002). Se ha observado que cuando se presenta el estrés oxidante, estas especies reactivas interactúan directamente con los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, dando como resultado la pérdida en la



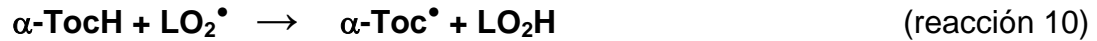
integridad membranal, cambios estructurales y/o funcionales en las proteínas y mutaciones genéticas desencadenando patologías tales como: Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple, cataratas, retinopatías del diabético, asma, cáncer pulmonar, aterosclerosis, infarto al miocardio, hipertensión, miocardiopatía, cirrosis hepática, diabetes, pancreatitis, cáncer de colon, insuficiencia renal, nefrotoxicidad por compuestos, isquemia y reperfusión renal, entre muchas otras (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009).

Para contrarrestar a estos compuestos dañinos, el cuerpo ha desarrollado muchos métodos de inactivación o disminución de los mismos antes de que generen un daño al sistema. Estos sistemas de defensa que las células han desarrollado se pueden catalogar dentro de dos tipos: sistemas antioxidantes no enzimáticos y los enzimáticos.

Un **antioxidante** es una molécula o sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones, en comparación con un sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). Es importante denotar que los antioxidantes pueden ser tomados de la dieta o ser sintetizados *in vivo*.

El **sistema antioxidante no enzimático**, incrementa la capacidad del organismo para defenderse de los efectos dañinos de las ERO. Los antioxidantes de este sistema tienen la capacidad de interactuar directamente con las ERO y atraparlas. Aquí podemos encontrar entre otros:

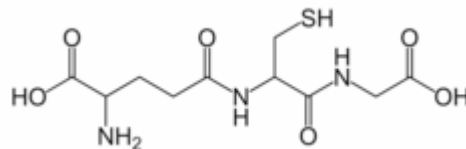
**Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol):** es considerado como el principal antioxidante liposoluble presente en los seres vivos. La vitamina E se encuentra en las membranas biológicas ya que su principal función es mantener la integridad de la membrana celular (Olinescu y Smith, 2002). Esta vitamina tiene la capacidad de interrumpir la lipoperoxidación en su fase de propagación reaccionando directamente con los lipoperóxidos y los alcoxilos (Burton et al., 1982; Cárdenas y Pedraza-Chaverri, 2006) (reacción 10). Se ha visto además que neutraliza el  $^1\text{O}_2$ , captura  $\text{OH}^\bullet$ , neutraliza  $\text{H}_2\text{O}_2$  y captura  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .



**Vitamina C (Ácido ascórbico):** es un antioxidante hidrosoluble que se localiza en el citosol así como en los fluidos extracelulares. La vitamina C se caracteriza por neutralizar  $^1\text{O}_2$ , captura  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , generando radical ascorbilo, el cual puede ser reciclado a ácido ascórbico por el sistema reductor tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (reacción 11). Este compuesto además restaura las propiedades antioxidantes de la vitamina E y del glutatión oxidado (GSSG).



**Glutatión reducido (GSH):** el GSH es el principal antioxidante de la célula. Es un tripéptido formado por ácido glutámico, glicina y cisteína, que tiene la capacidad de reaccionar con las ERO donándoles electrones e impidiendo así la oxidación de los grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas. La capacidad antioxidante del GSH se debe al grupo tiol de la cisteína que se encuentra expuesto (Esquema 2).



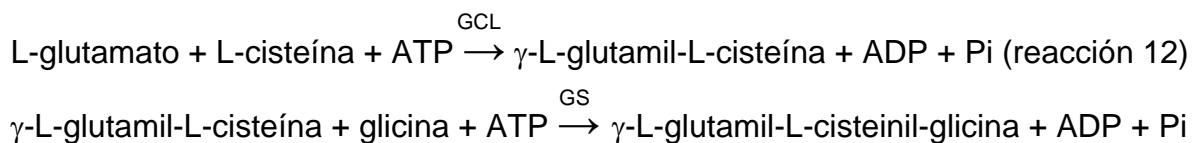
**Esquema 2.** Fórmula estructural del GSH.

Tras la donación de un electrón, el GSH por si mismo llega a ser reactivo, pero reacciona fácilmente con otro GSH reactivo para formar GSSG. Esta reacción es posible gracias a la concentración relativamente alta de GSH en las células (hasta 5 mM en el hígado). El glutatión puede ser regenerado a partir de GSSG mediante la enzima glutatión reductasa (GR). El GSH es un sustrato tanto en reacciones de conjugación como de reducción, catalizadas por enzimas glutatión S-transferasas en el citosol, los microsomas y las mitocondrias, y es un cofactor

para la enzima glutatión peroxidasa (GPx). También es capaz de participar en la conjugación no enzimática con algunos productos químicos, como peróxidos orgánicos y en el metabolismo de xenobióticos.

El **sistema antioxidante enzimático**, está formado por agentes antioxidantes de bajo peso molecular. Aquí encontramos varias enzimas que son capaces de convertir las ERO en moléculas inocuas o menos reactivas. A continuación se describen algunas enzimas de interés para este trabajo:

- **Glutamato cisteína ligasa (GCL) y glutatión sintasa (GS):** La CGL (EC 6.3.2.2) es una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad catalizadora (GCLC) y otra moduladora (GCLM). La GCLC lleva a cabo toda la actividad enzimática, mientras que la GCLM aumenta la eficiencia catalítica de la GCLC. Esta enzima cataliza el primer paso en la síntesis de glutatión; mientras que la GS (EC 6.3.2.3), cataliza el segundo paso en la síntesis del glutatión (reacción 12) (Forman y Dickinson, 2003).



- **Catalasa (CAT):** La CAT (peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno óxido-reductasa, EC 1.11.1.6), es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano, aunque su actividad varía dependiendo del tejido donde se encuentra; ésta resulta más elevada en el hígado y los riñones, más baja en el tejido conectivo y los epitelios, y prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol (Chance y Maehly, 1955). Esta enzima es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kDa. Consta de cuatro subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de

protoporfirina IX y el contenido protohémico y el de hierro representan un 1.1% y 0.09%, respectivamente del peso molecular total de la enzima (Hadju et al., 1977).

En algunas especies, la CAT contiene moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH) ligadas estrechamente a la enzima; así se ha demostrado que la CAT humana y la bovina están ligadas a cuatro moléculas de NADPH, uno en cada subunidad y que no existe interacción directa entre el grupo hemo y el NADPH (Fita y Rossman, 1985). El NADPH unido a la enzima no está involucrado en su actividad catalítica o peroxidativa. Esta molécula puede intervenir en la prevención y reversión parcial de la inactivación de la CAT por su propio sustrato tóxico y estabiliza a la enzima por tener un efecto alostérico sobre su conformación. Además, la CAT constituye un reservorio de NADPH, lo cual juega un papel importante durante el estrés oxidante (Kirkman y Gaetani, 1984).

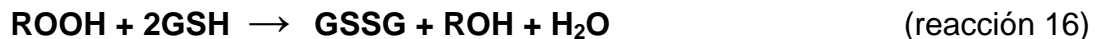
Esta enzima cataliza la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua (reacción 13), pero también tiene actividad de peroxidasa (reacción 14).



La reacción general produce la reducción del sustrato tomando los átomos de hidrógeno aportados por el donador, y los productos finales serían el sustrato reducido y el donador oxidado. En la función catalítica, el donador es otra molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta función sólo puede ser realizada por la enzima en su forma tetramérica (Srivastava y Ansari, 1980). En la reacción peroxidativa la enzima puede utilizar como donadores de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehído (Havir y McHale, 1989). Esta función se puede realizar con monómeros, dímeros y tetrámeros (Srivastava y Ansari, 1980).

- **Glutación peroxidasa (GPx):** La GPx (EC 1.11.1.9), es una enzima selenio (Se) dependiente que cataliza la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  o lipoperóxido (L-OOH,

ROOH), utilizando como agente reductor el GSH (reacciones 15 y 16, respectivamente). Se conoce que los L-OOH son tóxicos en los tejidos animales y que dan lugar a especies reactivas del oxígeno como los radicales peróxidos (L-OO<sup>\*</sup>), que son compuestos indeseables para los organismos vivos. La GPx, como parte del mecanismo de defensa antioxidante, evita la oxidación de los L-OOH, reduciéndolos en presencia de GSH. Esta reacción produce hidróxidos que son elementos potencialmente dañinos y que al oxidarse se convierten en radicales alcohólicos, para los que no se conoce enzima que los metabolice (Lam et al., 1993; Maiorino et al., 1991).



La GPx se puede localizar en la mitocondria, la membrana plasmática y el citosol, se ha encontrado ampliamente en las células hepáticas y renales, en el citosol de los eritrocitos formando complejos con la hemoglobina y en el lisosoma de neutrófilos, macrófagos y otras células fagocíticas del sistema inmune.

Existen al menos cuatro formas de GPx seleno dependientes: una forma intracelular o celular (GPx-c), una extracelular o plasmática (GPx-p), una gastrointestinal (GPx-gi) y otra con actividad específica para los fosfolipoperóxidos (GPx-PH) que por lo general está asociada a la membrana, y aunque su actividad es la misma, poseen diferencias estructurales (Maiorino et al., 1991; Zachara, 1991; Lam et al., 1993). La GPx-c y la GPx-p son enzimas tetraméricas; están compuestas por cuatro subunidades idénticas entre sí y cada una de éstas contiene un átomo de Se unido covalentemente a una molécula de cisteína. La secuencia de aminoácidos de las subunidades de la GPx-c es diferente a la secuencia de la GPx-p, esta última además es una proteína glicosilada y posee puentes disulfuros intramoleculares. La GPx-p se sintetiza principalmente en los túbulos proximales del riñón (Avissar et al., 1994), actualmente se le utiliza como un marcador de daño al túbulo proximal ya que su actividad plasmática disminuye durante eventos como la necrosis tubular aguda.

El peso molecular de la GPx-c es de 84 kDa, mientras que el de la GPx-p es de 100 kDa, con un total aproximado de 221 aminoácidos por subunidad. Las subunidades por separado no presentan actividad catalítica, sin embargo, la GPx-PH es una enzima monomérica que también posee un átomo de Se y presenta actividad catalítica; su peso molecular es de 18 kDa. La GPx-gi es un tetrámero de 75 kDa (Takahashi et al., 1990; Esworthy et al., 1991; Avissar et al., 1992; Nakano et al., 1992; Stepanik et al., 1993).

- **Glutación S-transferasa (GST):** Las glutación S-transferasas (EC 2.5.1.18), pertenecen a una familia de enzimas de gran importancia en mecanismos de desintoxicación celular, eliminando xenobióticos o sustancias nocivas para las células. Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del GSH sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas u orgánicas (RX) generando compuestos menos reactivos y más solubles, fácilmente eliminados de la célula a través de transportadores de membrana específicos (reacción 17).

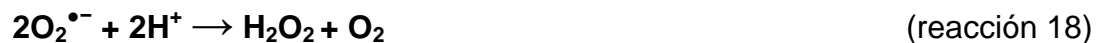


Se ha demostrado que las GST pueden reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de GPx independiente de selenio, además de que pueden detoxificar al 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (un producto de la lipoperoxidación).

Hasta el momento se han encontrado las isoformas citosólicas y las microsomales. En mamíferos, estas isoenzimas (GSTs) existen como homodímeros o como heterodímeros, tienen una masa molecular de aproximadamente 25 kDa por subunidad y un sitio activo por monómero. Se clasifican en GST citosólicas, divididas en cuatro familias principales:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  y  $\theta$ , y en cuatro familias minoritarias:  $\zeta$ ,  $\sigma$ ,  $\kappa$  y  $\omega$  que se diferencian tanto en su secuencia, propiedades inmunológicas y papel fisiológico (Wilce y Parker, 1994). Las GST citosólicas

están constituidas por dos subunidades protéicas mientras que las GST microsomales son trímeros.

- **Superóxido dismutasa (SOD):** La SOD (EC 1.15.1.1), cataliza la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  (reacción 18). Se han encontrado tres isoformas de esta enzima: (1) la SOD citosólica dependiente de cobre-zinc (Cu, Zn-SOD) distribuida en el citosol, (2) la SOD mitocondrial dependiente de manganeso (Mn-SOD) localizada sólo en las mitocondrias y (3) la SOD extracelular dependiente de cobre-zinc (Cu, Zn-SOD ext) localizada principalmente en la matriz extracelular de los tejidos y el plasma, el líquido sinovial y la linfa (Marklund, 1982).



- **Glutación reductasa (GR):** La GR (EC 1.6.4.2), es una flavoenzima dependiente del NADPH que cataliza la reducción del GSSG a GSH (regeneración de GSH) (reacción 19), el cual será utilizado por la GPx para la reducción del  $H_2O_2$  y de L-OOH, los cuales son elementos tóxicos.



Como hemos observado, las proteínas antes mencionadas entre muchas otras, son las responsables de la detoxificación de los compuestos electrofílicos generados por proteínas de fase I, durante procesos oxidación, reducción y/o hidrólisis que dan como resultado la adición de grupos funcionales a xenobióticos. A estas enzimas detoxificantes se les denomina proteínas o enzimas de fase II, o proteínas citoprotectoras o antioxidantes (Williams, 1967).

### 1.3 Vía Keap1/Nrf2/ARE

El regulador más importante de defensa celular contra el estrés químico y oxidante es el factor de transcripción nuclear, **factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2; Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2)** (Jaiswal, 2004). El Nrf2 se expresa en muchos tejidos (Moi et al., 1994), particularmente en aquellos asociados con la detoxificación (hígado y riñón) y aquellos que están expuestos al medioambiente externo (piel, pulmones y tracto gastrointestinal) (Motohashi et al., 2002). Así como otros miembros de la familia de los factores de transcripción cap 'n' collar (CNC) (Itoh et al., 1995), el Nrf2 que pertenece a una familia de proteínas básicas, tiene una estructura tipo “zipper” o cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal que facilita la dimerización y la unión al ácido desoxirribonucleico (ADN) (Moi et al., 1994), especialmente al **elemento de respuesta a antioxidantes (ARE)**, que es una región amplificadora o “enhancer” tipo *cis* con una secuencia definida como 5'-gagTcACaGTgAGtCggCAaaatt-3' (Nioi et al., 2003). Esta secuencia ARE se encuentra en la región 5' del gen de muchas de las enzimas detoxificantes, por lo que permite el control de la expresión basal e inducible de estos genes en respuesta a xenobióticos, antioxidantes, metales pesados y luz ultravioleta (Breimer, 1990).

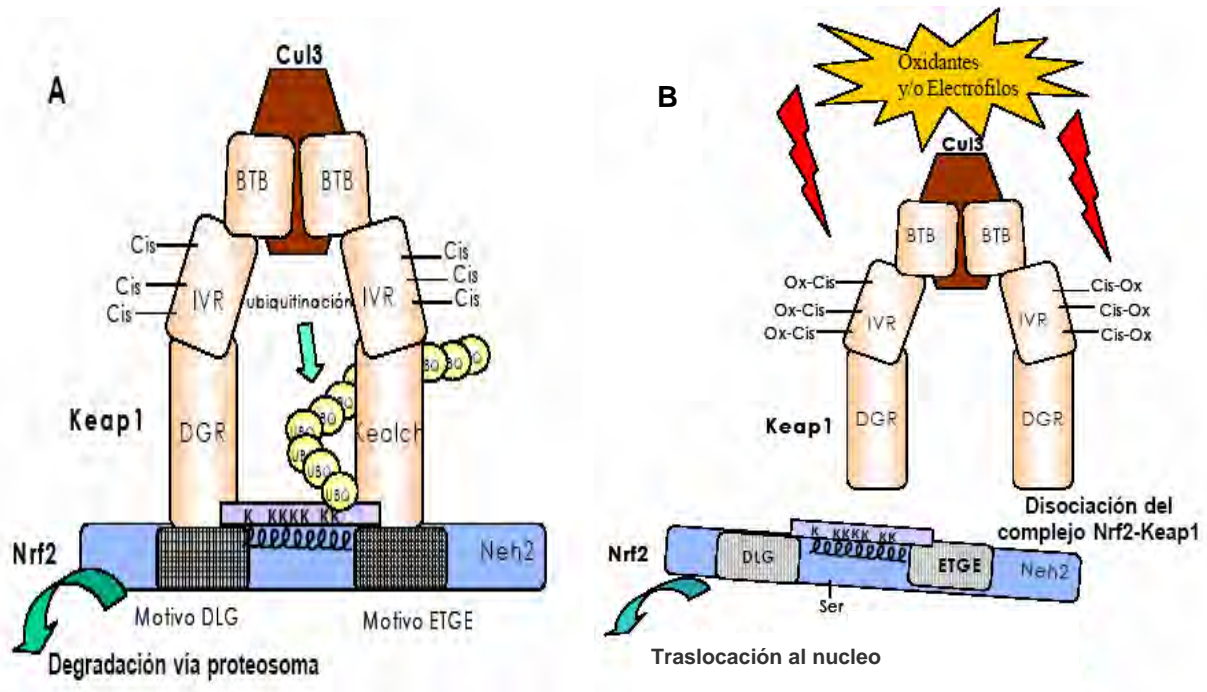
La unión de Nrf2 a la secuencia ARE, que requiere la heterodimerización de Nrf2 con proteínas pequeñas tipo bZip como las denominadas Maf (Itoh et al., 1997), estimulan la transcripción río abajo de estos genes, en parte por el reclutamiento de co-activadores transcripcionales (Lin et al., 2006), principalmente la proteína de unión-CREB (CBP) a través de los dominios Neh4 y Neh5 del factor de transcripción (Kato et al., 2001; Zhu y Fahl, 2001).

En ausencia de estrés celular, el Nrf2 está unido en el citosol con su pareja inhibitoria, la **proteína 1 asociada a Kelch y parecida a ECH (Keap1; Kelch-like erythroid cell-derived protein with CNC homology (ECH)-associated protein 1)**. Keap1 suprime hasta en un 80% la traslocación nuclear de Nrf2 y por lo tanto la actividad transcripcional de Nrf2. Este complejo Nrf2/Keap1 se asocia a la proteína culina-3 (Cul3) lo que permite la ubiquitinación de Nrf2 y la subsiguiente



degradación por vía del proteosoma, pero en presencia de un estímulo (como se mencionó anteriormente) se ocasionan cambios conformacionales provocando la disociación del complejo Nrf2/Keap1 permitiendo a Nrf2 migrar al núcleo celular y activar la transcripción de los genes citoprotectores (Esquema 3 A y B).

La proteína Keap1 murina está formada por 624 aminoácidos con un peso molecular de 69 kDa, y consta de cinco dominios, dos de los cuales se consideran como dominios canónicos. El primero de ellos es el dominio BTB/POZ (**B**ric-abrac, **T**ramtrack, **B**road-complex/**PO**xovirus **Z**inc finger) que es un motivo evolutivamente muy conservado para interacciones proteína-proteína y se encuentra presente en proteínas que unen a actina y en factores de transcripción con dedos de zinc. Además se sabe que forma complejos con otros dominios BTB. Todas estas observaciones indican que el complejo Nrf2/Keap1 se forma y se retiene en el citosol mediante interacciones con el citoesqueleto.



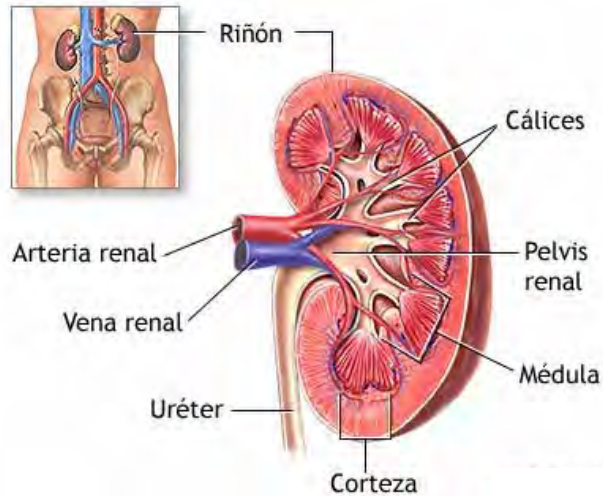
**Esquema 3.** (A) Degradación de Nrf2 por la vía del proteosoma. (B) Disociación del complejo Nrf2/Keap1 inducido por un estímulo oxidante/electrofilico.

## 1.4 Riñón

### 1.4.1 Generalidades

El riñón es un órgano par que está localizado a cada lado de la columna vertebral fuera de la cavidad peritoneal en contacto con la pared abdominal posterior. Desde el punto de vista funcional, los riñones son los órganos encargados de regular el equilibrio hídrico y electroquímico del cuerpo, ya que eliminan y retienen cantidades específicas de agua y solutos según las necesidades del organismo; llevan a cabo la excreción de sustancias exógenas y productos metabólicos de desechos tales como urea (derivadas de las proteínas), ácido úrico (de los ácidos nucleicos), creatinina (de la creatina muscular), productos finales del desdoblamiento de la hemoglobina y metabolitos de las hormonas; regulan la presión arterial, la cual depende del volumen sanguíneo relacionado directamente con el balance de agua y sodio regulados por el riñón; regulan la producción de eritrocitos, mediante la hormona peptídica eritropoyetina secretada por células renales; regulan la producción de vitamina D mediante transformaciones bioquímicas finales que generan la forma activa de la vitamina D (1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>), y en menor grado, la gluconeogénesis durante el ayuno prolongado.

Desde el punto de vista morfológico, los riñones tienen forma de frijol cuyas dimensiones en el humano adulto son de 12x6x3 cm y un peso aproximado de 150 g. Los riñones tienen dos superficies o caras bien definidas, donde la superficie convexa de cada riñón mira hacia el lado correspondiente del cuerpo dándose la cara mutuamente y la superficie cóncava o hilio que se dirige hacia la parte medial o línea media. El hilio, es el sitio por el que penetran la arteria y la vena renal, nervios, vasos linfáticos y la porción ensanchada del uréter, llamada pelvis renal. La pelvis de cada uréter está formada por cálices mayores, que a su vez están constituidos por cálices menores (Esquema 4).



**Esquema 4.** Ubicación y diagrama del riñón cortado longitudinalmente mostrando las principales estructuras anatómicas.

Si se divide al riñón mediante un corte sagital, se pueden observar claramente dos regiones principales: la corteza y la médula renal. La corteza rodea por completo a la médula y como su nombre lo indica, es la región más externa. La médula ocupa la porción central del riñón y se divide en dos zonas, la externa y la interna. La médula externa está formada por estructuras en forma de cono o embudo llamadas pirámides; la papila es la parte más interna de la médula interna y drena sobre los cálices renales.

La masa tisular funcional tanto de la corteza como de la médula está formada sobre todo por túbulos (nefronas y túbulos colectores) y vasos sanguíneos (capilares y vasos tipo capilar). Los túbulos y los vasos sanguíneos se encuentran entrelazados o en agrupamientos paralelos y en cualquiera de los casos siempre están muy cercanos entre sí. Entre los túbulos y los vasos sanguíneos se halla un intersticio, que comprende menos del 10% del volumen renal. El intersticio contiene células intersticiales diseminadas (fibroblastos y células de otras clases) que sintetizan una matriz extracelular de colágena, proteoglucanos y glucoproteínas (Vander, 2006).

La unidad funcional del riñón es la **nefrona**. En el riñón humano existen aproximadamente un millón y medio de nefronas, las cuales no pueden regenerarse después de ser dañadas. A grandes rasgos, la nefrona se divide en

dos partes: un componente filtrador esférico denominado corpúsculo renal y un túbulo que se extiende desde este último. El corpúsculo renal consiste en un mechón compacto de asas capilares interconectadas o capilares glomerulares, el **glomérulo**, rodeado por una cápsula hueca, la **cápsula de Bowman**; en esta sección se lleva a cabo la etapa inicial de la formación de la orina por medio del filtrado de líquidos. La sangre entra y sale de la cápsula de Bowman por arteriolas que penetran la superficie de la cápsula a nivel del polo vascular. Existe un espacio lleno de líquido (espacio urinario o de Bowman) en el interior de la cápsula y es a este espacio hacia el que se filtra el líquido. En el lado contrario al polo vascular, la cápsula de Bowman tiene una apertura que conduce hacia la primera porción del túbulo (Vander, 2006).

Los componentes principales del túbulo son: túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y túbulo colector. En toda su extensión, el túbulo está constituido por una capa sencilla de células epiteliales que descansan sobre una membrana basal, pero las características estructurales e inmunohistoquímicas de estas células epiteliales varían de un segmento del túbulo al otro. Es en los túbulos donde la mayor parte del filtrado glomerular es reabsorbido ya que éstos son muy selectivos a la sustancia o ión que reabsorben.

El **túbulo proximal**, consiste en un segmento enrollado denominado túbulo contorneado proximal, seguido por un segmento recto denominado túbulo recto proximal. A pesar de que en el humano sólo se distinguen claramente estos dos segmentos (S1 y S2), en conejo y rata se puede distinguir un tercer segmento (S3) (Tisher et al., 1966; Maunsbach, 1966; Kaissling y Kriz, 1979). Las células epiteliales de este segmento son células grandes y redondas que poseen un gran número de mitocondrias citoplasmáticas. Estas células presentan una morfología compleja, ya que cuentan con una membrana apical con borde en cepillo o microvellosidades, lo que les confiere una mayor superficie de contacto con la luz tubular, haciendo de este segmento el encargado de reabsorber alrededor de un 65-70% del filtrado glomerular. Este segmento, además de reabsorber el 100% de glucosa y aminoácidos, reabsorbe agua, proteínas de bajo peso molecular, iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , etc., asimismo secreta los fármacos para

ser eliminados en orina. La intensa reabsorción de este segmento del túbulo se debe también a la expresión abundante de las ATPasas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y ATPasa de  $\text{Na}^+$  que se encuentran en la membrana basolateral de las células, las cuales llevan a cabo un transporte activo del sodio.

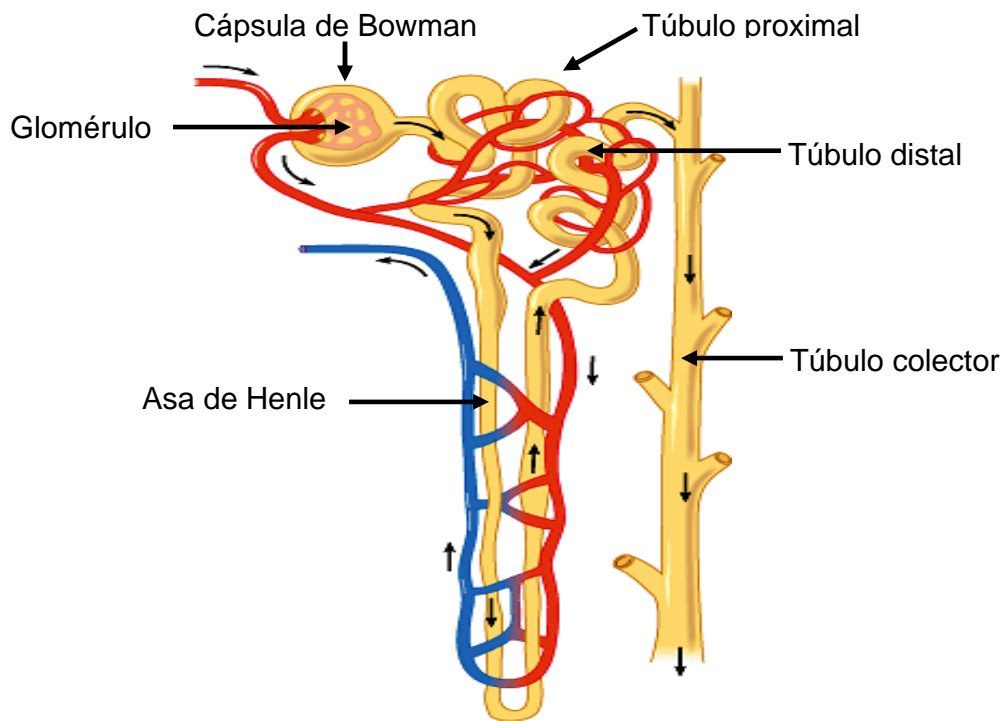
La siguiente sección del túbulo es el **asa de Henle**, la cual reabsorbe del 15-20% del filtrado glomerular. El asa de Henle se divide en tres regiones: asa descendente delgada, asa ascendente delgada y asa ascendente gruesa; y es ésta, donde se genera la hipertonicidad de la médula renal necesaria para la concentración de la orina final. En el asa de Henle delgada, se reabsorbe intensamente el agua debido a la abundante expresión de los canales de agua, acuaporina-1, mientras que el asa ascendente gruesa, impermeable al agua, es fundamental para la reabsorción de sal a través del cotransportador  $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ . Las células de este segmento son aplanadas, semejantes morfológicamente a las endoteliales, aunque a veces se presentan microvellosidades cortas. Las células tienen escaso citoplasma, mitocondrias pequeñas y esféricas y pocos organelos.

El **túbulo contorneado distal** está localizado entre la mácula densa (región del túbulo en contacto íntimo con las arteriolas aferente y eferente del glomérulo, y las células mesangiales: llamado en conjunto aparato juxtaglomerular) y el túbulo colector. Es en el túbulo distal donde se reabsorbe del 5-7% del filtrado glomerular, se continúa la reabsorción de sal a través del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ , se regula en forma fina la excreción urinaria de calcio y se lleva a cabo la mayor actividad de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Las células de este segmento forman un epitelio cuboidal alto y homogéneo, cuentan con una membrana basal extensa que forma pliegues con un gran número de mitocondrias cilíndricas de gran longitud arregladas verticalmente.

El **túbulo colector** es la parte final de la nefrona y se encarga de reabsorber alrededor del 3% del filtrado glomerular. Aquí se produce la regulación final de la excreción urinaria de sal, potasio, iones hidrógeno, bicarbonato, amonio, magnesio, cloruro, etc., así como la reabsorción de agua que en su conjunto determinan la osmolaridad de la orina final. El túbulo colector está formado por dos tipos de células: las células principales y las células intercaladas, siendo las

células principales el tipo celular predominante a través del túbulo colector. Éstas últimas, tienen un citoplasma de aspecto claro debido a que cuentan con un número reducido de organelos; contienen mitocondrias pequeñas y esféricas, y un núcleo central o mediobasal.

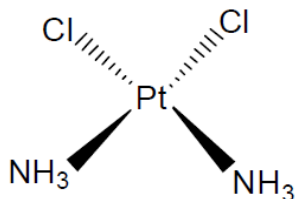
En el esquema 5 se muestran las distintas partes en las que se divide la nefrona.



**Esquema 5.** Esquema general de la nefrona.

## 1.5 Cisplatino

El cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino II, CIS), es una molécula formada por un átomo de platino rodeada por dos átomos de cloro y dos de amonio en posición *cis* (Esquema 6).



**Esquema 6.** Estructura química del cisplatino

En 1845, Michel Peryone sintetizó por primera vez el CIS y hasta 1893 Alfred Werger describió su estructura; sin embargo, no fue sino hasta 1965 cuando Barnett Rosenberg describió sus propiedades citotóxicas (Chirino y Pedraza, 2009); Rosenberg descubrió que los productos electrolíticos formados de un electrodo de platino en el medio inhibían la mitosis en *Escherichia coli*. Fue en el año de 1971 cuando el CIS se utilizó por primera vez en pacientes (Rosenberg, 1985). Investigadores de la Universidad del Estado de Michigan en Estados Unidos demostraron los efectos positivos del tratamiento con CIS en sarcomas implantados artificialmente en ratas (Lebwohl y Canetta, 1998). Finalmente, en 1978 la Administración Americana de Alimentos y Drogas (FDA) aprobó al CIS para su uso clínico en la terapia de una variedad de tumores sólidos, por ejemplo, cáncer de vejiga, testículo, ovario, cabeza y cuello, pulmón, entre otros (Lebwohl y Canetta, 1998). En la actualidad se considera al CIS como uno de los agentes quimioterapéuticos más potentes para el tratamiento del cáncer a nivel mundial, desafortunadamente, su uso como antineoplásico es limitado debido a que causa nefrotoxicidad (Pabla y Dong, 2008), ototoxicidad (Devarajan et al., 2002; Rybak, 2007), neurotoxicidad (Park et al., 2001; Sioka y Kyritsis, 2009) y hepatotoxicidad (Martins et al., 2008; Custódio et al., 2009).

La nefrotoxicidad es el efecto colateral más importante en la terapia antitumoral con CIS, se ha observado que el desarrollo de este daño renal es dosis-dependiente en un 30% de los pacientes (Pabla y Dong, 2008). Se ha demostrado que la nefrotoxicidad inducida por CIS en humanos es un evento secundario a su acumulación en las células epiteliales del segmento S3 de los túbulos proximales renales. Ciarimboli y colaboradores, demostraron que el CIS entra a la célula por transportadores de cationes orgánicos, específicamente por los hOCT2 que se encuentran en el túbulo proximal, lo que permitió explicar la toxicidad órgano-específica del CIS (Ciarimboli et al., 2005).

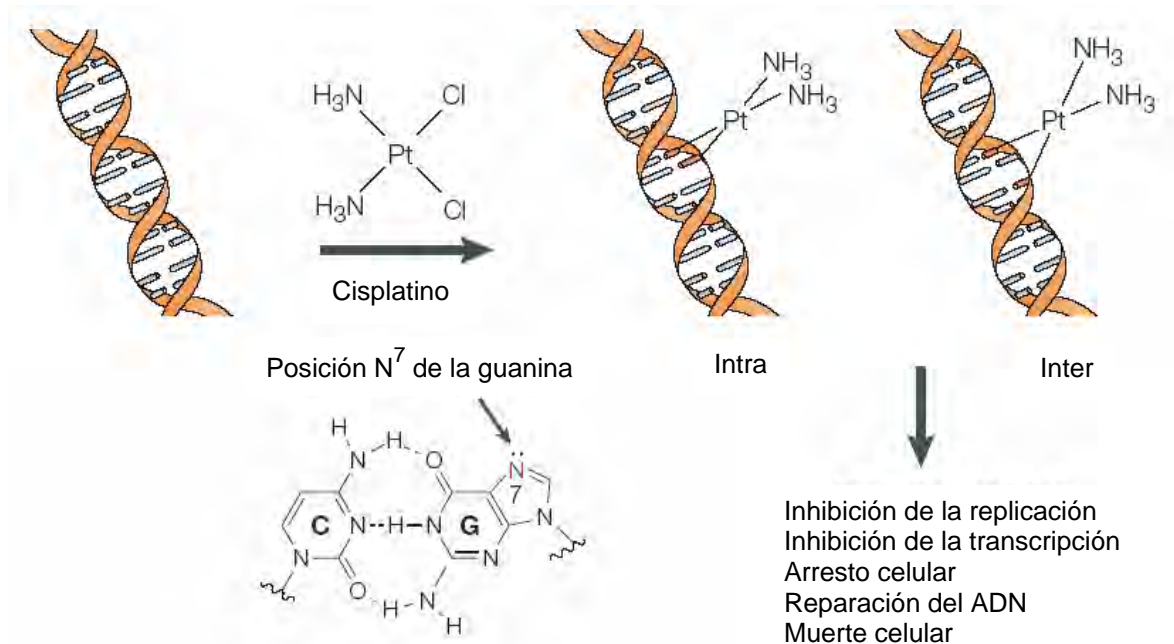
A nivel intracelular, las concentraciones máximas de CIS se han encontrado en las mitocondrias, núcleo, citosol y microsomas. Estudios farmacocinéticos en humanos indican que el CIS tiene una vida media de 25-49 min, seguido de una segunda vida media de 58-73 h y que la unión a proteínas ocurre rápidamente, arriba de un 90% en 2 h. Por otra parte, el CIS es excretado casi en su totalidad de los riñones; 27-47% del platino es excretado en los primeros 5 días y se ha informado que el 43% del platino se excreta por orina a los 50 días de su administración (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009).

### **1.5.1 Mecanismo de acción**

El CIS una vez dentro de la célula, incorpora dos moléculas integrales de agua a su estructura para formar  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$  y  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ , este proceso se denomina “acuación”, donde la baja concentración celular de iones cloruro facilita este proceso. La forma “acuada” del CIS es más reactiva con sus blancos celulares ya que el agua le confiere a la estructura una carga positiva. A pesar que muchos componentes celulares interactúan con el CIS, el ADN es el principal blanco biológico para esta droga. El átomo de platino del CIS forma enlaces covalentes con la posición N<sup>7</sup> de las purinas (guaninas) para formar entrecruzamientos primarios 1, 2- o 1, 3-intracatenarios y un número bajo de entrecruzamientos intercatenarios. La unión del CIS al ADN ocurre en la posición donde los grupos cloruro se encuentran en el compuesto original, dando como



resultado la inhibición de la replicación y la transcripción celular, arresto celular, entre otros eventos (Esquema 7) (Wang y Lippard, 2004).



**Esquema 7.** Formación de aductos intracatenarios (Intra) e intercatenarios (Inter) entre el CIS y el ADN.

### 1.5.2 La nefrotoxicidad y el estrés oxidante inducidos por cisplatino

La toxicidad por CIS en las células epiteliales del túbulo proximal se caracteriza por necrosis tubular, aumento de tamaño y número de lisosomas, ausencia de microvellosidades y vacuolización mitocondrial (Massry y Glassock, 1995; Kuhlman et al., 1997). El daño renal que se produce se define como una **insuficiencia renal aguda**, la cual es una pérdida reversible de la función renal, siendo la severidad y el grado de los cambios morfológicos dependientes de la dosis del CIS. La insuficiencia renal aguda en el ámbito de la clínica se caracteriza por un aumento en los niveles de creatinina y nitrógeno de urea (BUN) en sangre como consecuencia a una rápida disminución de la filtración glomerular (Brady et al., 2000).

La histología revela que en el daño celular ocasionado por CIS se observa que las microvellosidades de la membrana en borde en cepillo empiezan a

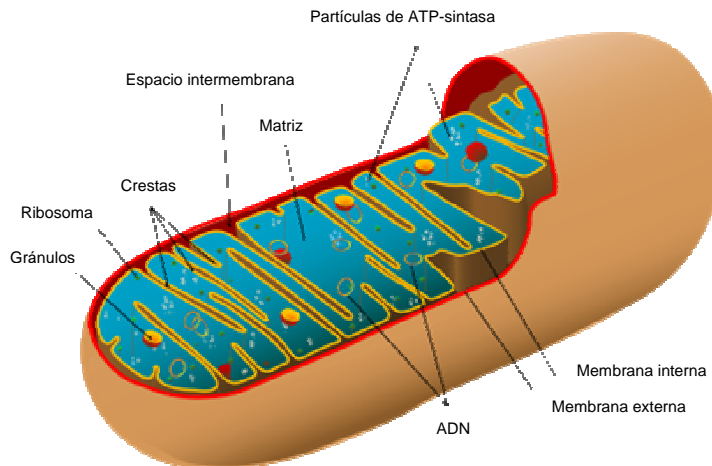
desaparecer y a acortarse, lo que implica que hay pérdida en la eficiencia de la reabsorción celular, también empiezan a surgir vacuolas y aplastamiento de los túbulos proximales así como la dilatación de éstos, siendo éstos más afectados que los distales (Montagna et al., 1998). Se activan las vías de inflamación, hay infiltración celular al nivel de la médula renal, además de que el lumen del túbulo puede encontrarse ocluido por células en apoptosis. La apoptosis es dependiente del consumo de las reservas de ATP, de modo que si esta reserva se conserva ocurre la apoptosis y si presenta un decremento drástico entonces se desencadena la necrosis (Brady et al., 2000; Racusen, 2001; Pabla y Dong, 2008).

Además de las alteraciones estructurales, la toxicidad por CIS está acompañada por otros factores como la disminución en la función mitocondrial, la reducción en la actividad de la ATPasa, la alteración del contenido celular de cationes y del transporte de solutos, pérdida de sodio, magnesio, potasio, calcio y agua, así como incremento en la lipoperoxidación, la oxidación de proteínas y la formación de ERO. El CIS también disminuye los niveles de GSH, NADPH y la actividad de enzimas antioxidantes como GPx, GR, CAT (Kuhlman et al., 1997; Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009). Lo anterior muestra que la nefrotoxicidad inducida por CIS está asociada con el estrés oxidante.

## **1.6 Mitocondria y cadena respiratoria mitocondrial**

La mitocondria es un organelo compartimentalizado esencial en el mantenimiento de la homeostasis de todas las células que utilizan oxígeno. La mitocondria utiliza al O<sub>2</sub> como último aceptor de electrones con lo cual se lleva a cabo la mayor síntesis de ATP en la célula, también es la encargada de mantener los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> dentro de los rangos adecuados para mediar la señalización celular y el buen funcionamiento de la misma. Las mitocondrias tienen una longitud aproximada de 1.5-10 µm y un diámetro de 0.5-1 µm y están formadas por una doble membrana: la membrana externa de apariencia lisa que cubre a toda la mitocondria, y la membrana interna que forma extensos plegamientos irregulares llamados crestas. Ambas membranas forman dos

compartimentos: el espacio intermembrana localizado entre ambas membranas y la matriz, contenida por la membrana interna y es rica en proteínas. La membrana interna está compartimentalizada en cisternas o túbulos que contienen proteínas especializadas que permiten el contacto con la membrana externa (Esquema 8) (Mannella, 2006).



**Esquema 8.** Estructura básica de la mitocondria

La **membrana externa** está formada en un 50% por una proteína de 30 kDa que forma canales iónicos de alta conductividad. Este canal es selectivo a cationes o aniones dependiendo de la apertura del mismo, la cual se genera ya que éste es dependiente de voltaje. Esta característica electrofisiológica le da el nombre de **canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC)** (Pavlov et al., 2005).

La **membrana interna** tiene una mayor área de superficie debido a la presencia de las crestas que forman segmentos estrechos parecidos a túbulos o cuellos, así como segmentos llamados uniones pediculares (Perkins et al., 1997). Estas crestas tienen una función importante al proporcionar una alta relación volumen/superficie en términos de la eficacia de la fosforilación oxidante y la respiración activa mitocondrial (Frey y Mannella, 2001).

La **cadena respiratoria mitocondrial** es un conjunto de más de veinte distintos transportadores de electrones asociados a un número indeterminado de péptidos estructurales localizados en la membrana interna. La cadena respiratoria es una cadena que bombea protones y transporta electrones en forma acoplada

desde el par  $\text{NAD}^+/\text{NADH}^+$  o  $\text{FAD}^+/\text{FADH}$  hasta el par  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ , proceso denominado **fosforilación oxidante**, a través de cuatro complejos enzimáticos fijos bien definidos: complejo I o NADH: ubiquinona óxido-reductasa, complejo II o succinato: ubiquinona óxido-reductasa, complejo III o citocromo *bc1* y el complejo IV o citocromo *c* oxidasa, la ATP-sintasa o complejo V y dos complejos móviles: la ubiquinona (coenzima Q) y el citocromo *c*.

**Complejo I (NADH: ubiquinona óxido-reductasa).** Este complejo cataliza la transferencia de dos electrones desde el NADH a la **ubiquinona (coenzima Q)**, que es un acarreador de electrones soluble en lípidos. El NADH se oxida en el lado interno de la membrana mitocondrial por medio de la NADH deshidrogenasa la cual tiene como grupo prostético a un flavín mononucleótido (FMN). Este complejo está relacionado con la formación del gradiente de protones transmembranal con una estequiometría  $4 \text{H}^+/2\text{e}^-$  (Brandt, 1997), y es considerado junto con el complejo III, como uno de los sitio principales en la formación de ERO a nivel celular (Raha y Robinson, 2000).

**Complejo II (succinato: ubiquinona óxido-reductasa).** Este complejo cataliza la oxidación (transferencia de electrones) del succinato al fumarato en la matriz mitocondrial por medio de la succinato deshidrogenasa. La oxidación del succinato está acoplada a la reducción de la ubiquinona a ubiquinol. En este complejo a diferencia del complejo I, la succinato deshidrogenasa no transfiere protones a través de la membrana mitocondrial por lo que no participa en la formación del gradiente electroquímico para la síntesis de ATP (Huo et al., 2007).

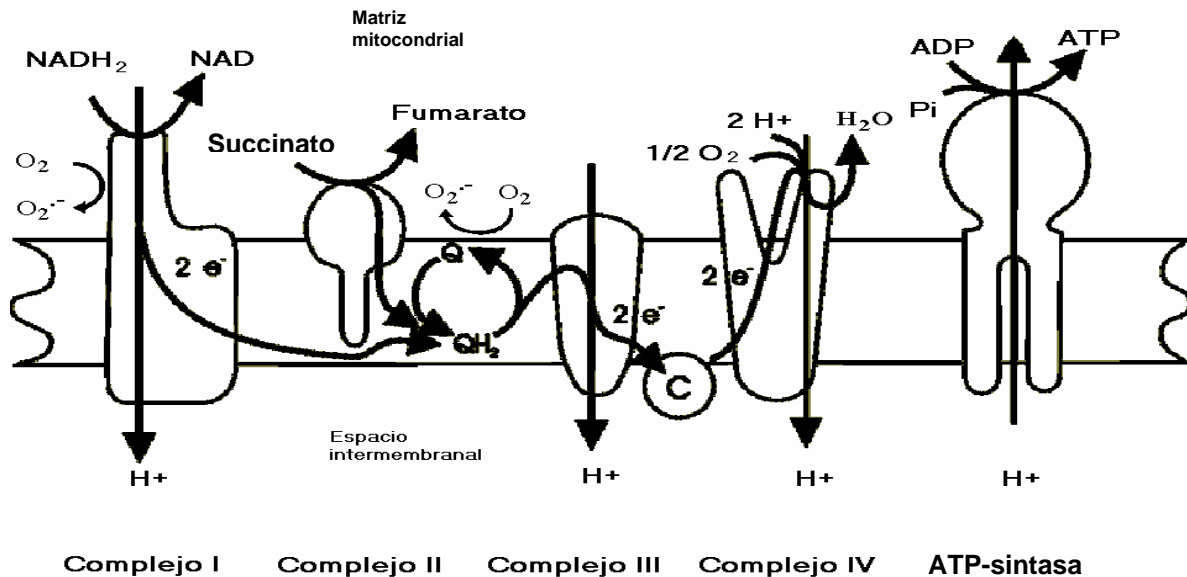
**Complejo III (citocromo *bc1*).** Este complejo es el componente más pequeño de la cadena respiratoria, y el papel que se le ha conferido es de bombear  $2\text{H}^+$  a la matriz mitocondrial y el de catalizar la transferencia de  $2\text{e}^-$  al citocromo *c* soluble.

El **citocromo *c*** es una proteína monomérica que se encuentra en el lado externo de la membrana interna mitocondrial (el lado positivo de la membrana). Éste es un transportador hidrosoluble de dos electrones entre los complejos III y IV, que contiene un grupo prostético constituido por una protoporfirina IX con un ion de hierro coordinado (hemo C).

**Complejo IV (citocromo c oxidasa).** La citocromo c oxidasa es el complejo final de la cadena respiratoria que cataliza la reducción del  $O_2$  hasta  $H_2O$ . Por cada electrón transferido al  $O_2$ , un protón es bombeado a través de la citocromo c oxidasa, por lo que se requieren  $4H^+$  tomado de la matriz y  $4e^-$  del citocromo c para reducir al  $O_2$  a  $H_2O$  (Bränden et al., 2006).

**ATP-sintasa (complejo V).** Su función es utilizar el gradiente electroquímico generado por los complejos I, III y IV para sintetizar ATP a través de sus subcomplejos:  $F_1$  o complejo hidrofílico catalítico y  $F_0$  o complejo hidrofóbico de membrana.

En el esquema 9, se muestran los componentes de la cadena respiratoria y el flujo de electrones entre los complejos.



**Esquema 9.** Componentes de la cadena respiratoria mostrando el flujo de electrones entre los complejos enzimáticos.

### 1.6.1 Estrés oxidante mitocondrial y daño mitocondrial inducido por cisplatino

A pesar de que el transporte de electrones a través de los complejos I-IV es un proceso sumamente eficiente, aproximadamente del 2-5% de los electrones se escapan de interactuar con el  $O_2$ , dando como resultado la producción de  $O_2^{\bullet-}$ .

La mitocondria es considerada como la fuente principal en la generación del  $O_2^{\bullet-}$ , produciendo alrededor del 85% del  $O_2^{\bullet-}$  total en la célula. Esta producción se presenta cuando la mitocondria incrementa su actividad o hay inhibición de la cadena respiratoria, dando como resultado una producción aguda o crónica de este radical favoreciendo el estado oxidante celular. Cabe mencionar que además de las mitocondrias, las enzimas xantina oxidasa y la NADPH oxidasa generan alrededor del 15% del  $O_2^{\bullet-}$  celular (Maia et al., 2007), así como la actividad microsomal de la citocromo P450 que cataliza el metabolismo de xenobióticos por reacciones óxido-reducción.

Aunque el complejo IV de la cadena mitocondrial reduce más del 90% del oxígeno en la célula, las enzimas mitocondriales SOD y GPx, y la CAT, son las encargadas de reaccionar con el  $O_2^{\bullet-}$  y el  $H_2O_2$  producidos (Davidson y Schiestl, 2001; Piña-Garza et al., 1996; Beal, 2005).

Se ha visto que el CIS inhibe la función mitocondrial y la actividad antioxidante, induce daño al ADN y depleción de GSH (Santos et al., 2007; Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009). La disfunción mitocondrial es un evento temprano en la insuficiencia renal inducida por el CIS (Gordon and Gattone 2nd, 1986). La exposición de células de túbulos proximales renales de cerdo recién aisladas en una suspensión con CIS induce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la inhibición de los complejos I al IV, desencadenando la muerte celular (Kruidering et al., 1994, 1997). También, la nefrotoxicidad inducida por CIS está asociada con una disminución importante en la síntesis de ATP por la inhibición de la fosforilación oxidante (Santos et al., 2007), así como la transición de la permeabilidad mitocondrial (mPT), un proceso de permeabilización inespecífico dependiente de  $Ca^{2+}$ , asociado directamente con la liberación de citocromo c - un sello de la activación de la vía apoptótica mitocondrial - que desencadena la muerte celular (Correa et al., 2008a).

El estrés oxidante/nitrante juega un papel importante en la nefrotoxicidad y la disfunción mitocondrial inducidas por CIS (Jung et al., 2009). En este contexto, se ha demostrado que atrapadores de RL y antioxidantes naturales o sintéticos disminuyen o previenen la disfunción mitocondrial inducida por CIS (Somani et al.,

2000; Chang et al., 2002; Santos et al., 2008; Tarladacalisir et al., 2008; Rodrigues et al., 2010).

## 1.7 Muerte celular y algunas proteínas relacionadas

La mitosis y la apoptosis son los procesos fisiológicos básicos que regulan el número de células en el organismo. En las células vivientes, la **apoptosis** es un proceso activo que desencadena en la muerte celular, el cual es mediado por vías de señalización programada que son activadas por una variedad de estímulos intracelulares y extracelulares, y que están relacionadas de alguna forma con receptores celulares, la mitocondria o el retículo endoplásmico. La apoptosis es un proceso que contribuye en la regulación de las células inflamatorias e inmunológicas, el número de fibroblastos y la homeostasis vascular. La apoptosis se diferencia de la **necrosis** por varias características morfológicas y funcionales en la célula. Entre ellas encontramos la necesidad de energía y proteínas proapoptóticas (en el caso de la apoptosis), pero cuando se presenta un insulto severo o la ausencia de energía celular (ATP) se presenta la necrosis celular. Además, las células apoptóticas no son fagocitadas por macrófagos (Kroemer et al., 2005). Otras características de las células apoptóticas son: disminución del citoplasma, compactación de la cromatina nuclear, fragmentación del ADN cromosómico y la formación de pequeñas vesículas (**cuerpos apoptóticos**).

Usualmente, la muerte celular se presenta en respuesta al microambiente celular (Riedl y Salvesen, 2007). El mantenimiento celular adecuado es el resultado entre el juego de factores de sobrevivencia que activan estas vías y mantienen atenuadas las vías de muerte, y la presencia de factores letales que activan a esta última desencadenando la apoptosis. Células adyacentes, mediadores solubles, factores nutricionales y la matriz extracelular regulan la sobrevivencia celular. En la actualidad ya se han descubierto las dos vías intracelulares principales que desencadenan en apoptosis: la ligada a los receptores de muerte en la membrana plasmática (**vía extrínseca**) y la ligada a la perturbación de la homeostasis intracelular (**vía intrínseca**).

En la vía extrínseca, la activación de los receptores de muerte dan como resultado a la formación de complejos multimoleculares los cuales incluyen proteínas adaptadoras como la proteína de dominio de muerte asociada a Fas (FADD) y la activación de caspasas (-8 y 10) (Thorburn, 2004). Estas caspasas son activadas por oligomerización y luego se unen a proteínas sustrato para activar río abajo a caspasas efectoras. Por otra parte, la vía intrínseca implica organelos intracelulares, donde el más importante es la mitocondria. Esta vía se inicia al haber cambios en la permeabilidad mitocondrial de la membrana externa (por la activación alostérica de Bax y/o Bak, que se oligomerizan en la mitocondria), permitiendo la liberación de factores proapoptóticos como el citocromo c, SMAC/DIABLO y el factor inductor de apoptosis (AIF), que promueven la apoptosis dependiente e independiente de caspasas. El citocromo c facilita la oligomerización de Apaf-1 y la caspasa-9 en el apoptosoma, dando como resultado la activación de la caspasa-9. Por su parte, la caspasa-9 se ancla y activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3 y la caspasa-7, dando como resultado a la proteólisis generalizada y el desenlace con la muerte celular (Sanz et al., 2008).

### 1.7.1 Caspasas

Las caspasas son proteasas caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. Estas proteasas son clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica. En la célula se encuentran como precursores inactivos (procaspasas) que necesitan ser cortados para iniciar su actividad. Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas **iniciadoras** y las **ejecutoras**. Las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son traslocadas a compartimientos específicos o mediante adaptadores/activadores, mientras que las caspasas ejecutoras son activadas mediante el corte específico mediado por las caspasas iniciadoras. Estas proteasas son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis. Entre éstos se encuentran proteínas de señal, de reparación de ADN, estructurales, factores de transcripción, de procesos



morfogenéticos del desarrollo embrionario, de procesos de maduración proteica y activación de proteínas proinflamatorias como las interleucinas-1 $\beta$  y 18, entre otros (Sanz et al., 2008).

Las caspasas contienen tres dominios: un prodominio N-terminal, una subunidad grande (p20) que contiene el centro activo con cisteína dentro de un motivo conservado QACXG, y una subunidad pequeña (p10) en el C-terminal. Las caspasas son unas de las proteasas más específicas con un requerimiento inusual y absoluto de cortar después de un residuo de ácido aspártico (Asp), de donde deriva su nombre: cisteinil-aspartato proteasas. El prodominio y la subunidad grande están separados por un lugar de corte con Asp, y la subunidad grande está separada de la pequeña por uno o dos motivos de este tipo. La presencia de Asp en los motivos de corte para la maduración es consistente con la habilidad de las caspasas de autoactivarse o de ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación.

### **1.7.2 Familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)**

Las proteínas de la familia de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) median varias vías de señalización intracelular, las cuales se inician con una variedad de estímulos extracelulares. Estas proteínas conducen una diversidad de actividades celulares entre las que podemos mencionar: proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Chang y Karin, 2001). La vía de señalización de las MAPK está formada por tres componentes: MAP cinasa cinasa cinasas (MAP3K), MAP cinasa cinasas (MAP2K) y las MAP cinasas (MAPK). Una MAP3K activada fosforila y estimula a la MAP2K, la cual a su vez estimula a la MAPK a través de fosforilación (Chang y Karin, 2001).

En la familia de las MAPK de mamíferos se incluyen tres subgrupos: las **cinasas de regulación extracelular (ERK)**, las **cinasas c-Jun N-terminal (JNK)**/proteínas cinasas activadas por estrés (SAPK), y las **p38 MAPK**. La vía de señalización de las ERK está relacionada en la transducción de señales en procesos de diferenciación y proliferación celular. La vía de señalización de las JNK/SAPK es estimulada por una variedad de estímulos de estrés entre los que

encontramos: estrés oxidante, genotóxico, metabólico, choque térmico y osmótico, así como por estímulos por citocinas proinflamatorias, como el **factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )** e interleucina 1- $\beta$ . Esta vía de señalización está relacionada en diversas actividades celulares, entre las que se encuentran: crecimiento, diferenciación y muerte celular. La activación persistente de la vía JNK/SAPK generalmente media la señalización celular que desencadena en muerte celular. La vía de señalización de la p38 MAPK está formada a su vez por las isoformas - $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ . Dos de las isoformas (- $\alpha$ , - $\beta$ ), parecen tener un papel regulatorio importante donde la p38- $\alpha$  potencia una señal de muerte y la p38- $\beta$  una de sobrevivencia (Das et al., 2006; Mukherjee et al., 2008). La vía de las p38 MAPK también es estimulada por estrés celular y citocinas proinflamatorias de la misma forma que con las JNK/SAPK. Cabe mencionar que las JNK/SAPK y las p38 MAPK fosforilan a muchas proteínas sustrato, como el factor de transcripción p53 (Sanz et al., 2008; Cuadrado y Nebreda, 2010).

### 1.7.3 p53

Luego de su descubrimiento en 1979, el p53 se ha establecido como supresor tumoral clave, un potente inductor de apoptosis y un marcador de cáncer. Se ha observado que p53 se encuentra mutado en un 50% en los tumores cancerosos, lo que enfatiza su papel central en la regulación del crecimiento celular y sobrevivencia (Soussi y Wiman, 2007).

p53 es un factor transcripcional que se acumula en respuesta a estrés celular, incluyendo daño al ADN y activación de oncogenes. Estos eventos disparan la transactivación transcripcional de los genes blancos de p53: p21, PUMA, Bax, entre otros conduciendo al arresto celular, senescencia y/o apoptosis. Se ha observado que la activación de p53 por estrés oncogénico sirve como un mecanismo para eliminar tumores celulares nacientes por apoptosis y/o senescencia, formando una barrera contra el desarrollo de tumores.

Una gran mayoría de las mutaciones de p53 en humano son mutaciones sencillas sin sentido que se agrupan en el dominio central de p53 (residuos 100-300) que reconocen los motivos de unión al ADN. En general, las proteínas p53

mutantes son deficientes para la unión específica al ADN, argumentando con esto que la unión al ADN y la regulación transcripcional de los genes blanco por p53 es crucial para la supresión tumoral mediada por p53 (Soussi y Wiman, 2007). Por otra parte, se está estableciendo que estas mutaciones generan en p53 una ganancia de funciones en diversas actividades, entre las cuales se pueden mencionar una mayor activación del **factor nuclear kappa de células B (NF-κB)** y la promoción de la invasión tumoral (Fanerbo et al., 2010).

#### **1.7.4 Muerte celular inducida por cisplatino**

La nefrotoxicidad inducida por CIS es un proceso extremadamente complejo (Pabla y Dong, 2008). Se ha descrito daño elevado al ADN (Ries y Klastersky, 1986; Mukhopadhyay et al., 2009), activación de las caspasas y muerte por necrosis y apoptosis (Cummings y Schnellmann, 2002; Ramesh y Reeves, 2002; Tsuruya et al., 2003; Liu y Baliga, 2005; Park et al., 2008; Pan et al., 2009).

La actividad celular apoptótica mediada por CIS puede demostrarse al observar un aumento en el nivel de proteínas y la actividad de las caspasas-3/7 y 9 (Park et al., 2002; Baek et al., 2003; Pan et al., 2009). Se ha demostrado que la activación de las caspasas está mediada por las vías de señalización de los miembros de las MAPK (Jiang et al., 2006; Pabla y Dong, 2008), ya que el uso de inhibidores específicos para estas proteínas evitan la disminución de la función y el daño renal inducido por el CIS (Ramesh y Reeves, 2005). p38, que forma parte de la familia MAPK, incluye también a la ERK y JNK activadas por el estrés extracelular, físico y químico, las cuales regulan la proliferación, diferenciación y sobrevivencia celular (Luo et al., 2008). p38- $\alpha$  y p38- $\beta$ , son dos de las cuatro isoformas de p38 MAPK, ambas isoformas parecen jugar un papel regulador en por lo menos el modelo de pre-acondicionamiento y la isquemia y reperfusión cardíaca, en donde p38- $\beta$  potencia una señal de sobrevivencia y p38- $\alpha$  potencia una señal de muerte (Das et al., 2006; Mukherjee et al., 2008). p53, uno de los más potentes supresores de genes tumorales en cáncer humano, también está regulando la muerte celular inducida por CIS mediante apoptosis en las células

cancerígenas (Shi et al., 2007), además se ha visto que p53 y fosfo p53 son inducidos por CIS en el tejido renal, lo que indica la activación de p53 bajo condiciones patológicas (Jiang et al., 2007).

## 1.8 Inflamación y algunas proteínas relacionadas

El proceso inflamatorio se debe definir como una consecuencia de eventos que ocurren en respuesta a agentes dañinos, trauma o infección. Estas respuestas son orquestadas por una interacción altamente moderada entre los mediadores de inflamación y las células inflamatorias (Sacca et al., 1997). Las **citocinas** representan un grupo de sustancias multifuncionales que están involucradas en muchos de los pasos de la respuesta inflamatoria. Hasta ahora, se han identificado más de cien miembros de la familia de las citocinas y sus receptores específicos (Barnes, 2001; Haddad, 2002; Hopkins, 2003). Generalmente, las citocinas pueden ser clasificadas como pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, dependiendo de la vía en la que influyen la inflamación. En una visión más simple, las **citocinas pro-inflamatorias** parecen estar implicadas en la iniciación y amplificación de los procesos inflamatorios (por ejemplo, TNF- $\alpha$ , interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6 e interleucina-8); mientras que las **citocinas anti-inflamatorias**, modulan negativamente a estos eventos (por ejemplo, interleucina-10 y el factor de crecimiento y transformación tipo beta) (Dinarello, 2000; Opal y DePalo, 2000).

Las citocinas son producidas tanto en células residentes y migrantes, como las células mástil, macrófagos y neutrófilos, y luego de liberarse, pueden actuar a nivel local o sistémico. Debido a sus acciones redundantes y pleiotrópicas, las citocinas forman una comunidad en la cual una citocina puede inducir su propia producción o incluso la generación secundaria de otras citocinas. Además, se ha demostrado ampliamente que la mayoría de las acciones de las citocinas implican la activación de factores de transcripción (por ejemplo, NF- $\kappa$ B) y a la proteína activadora-1) y a proteínas cinasas (MAPK y la proteína cinasa C), las cuales a su vez, regulan la expresión de muchos genes blanco indispensables para el mantenimiento del estado inflamatorio (Haddad, 2002; Kracht y Saklatvala, 2002).

Por ejemplo, las citocinas son responsables de la inducción de muchas enzimas como la sintasa de óxido nítrico inducible y ciclooxigenasa-2), receptores (del factor de agregación plaquetaria e interleucina-2) y moléculas de adhesión [**molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1)**, e integrinas  $\alpha$  y  $\beta$ ] (Calixto et al., 2004).

Un grupo distinto de citocinas, denominadas **quimiocinas**: interleucina-8, eotaxina, citocina inductora quimioatayente de neutrófilos-1, entre otras, tienen la habilidad de quimioatraer y activar a leucocitos en el sitio de la inflamación (Luster, 1998; Wong y Fish, 2003). La unión de las quimiocinas a sus receptores específicos permite a los leucocitos móviles convertirse en formas adherentes y así ser capaces de transmigrar a sus tejidos blanco; un proceso ampliamente dependiente de la activación de moléculas de adhesión, principalmente de las integrinas (Luster, 1998; D'Ambrosio et al., 2003).

### **1.8.1 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), pertenece a una superfamilia de citocinas importantes en la regulación de muchas funciones biológicas celulares entre las que podemos mencionar la inflamación, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. El TNF- $\alpha$  es un importante regulador de la inflamación y regula la producción de citocinas en el sistema inmune, y dispara las respuestas de regeneración y muerte celular. Se ha observado que TNF- $\alpha$  es esencial en la regeneración del hígado tras un daño y la inhibición de la señalización de TNF- $\alpha$  puede prevenir la regeneración del hígado (Han et al., 2009).

El TNF- $\alpha$  es el miembro fundador de las diecinueve distintas proteínas hasta ahora identificadas en esta familia. Los miembros de la familia TNF llevan a cabo su función biológica a través de la subfamilia de receptores de superficie celular TNFR. Algunos de estos receptores comparten un tramo de hasta 80 aminoácidos con la región citoplasmática, región denominada dominio de muerte, la cual es crítica para reclutar la maquinaria de muerte luego de la unión de los receptores. La unión de TNF- $\alpha$  al receptor TNFR1 desencadena una serie de eventos intracelulares de los cuales destacan la activación de las vías de NF- $\kappa$ B y

las MAPK, así como la activación de la cascada de caspasas (caspasa-8) que desencadena en la muerte celular por apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ . En la mayoría de las células, la combinación de las vías arriba mencionadas determinan las diversas actividades biológicas de TNF- $\alpha$ , que incluyen las ya mencionadas, proliferación celular, desarrollo, oncogénesis, inflamación, señalización inducida por estrés y muerte celular (Shen y Pervaiz, 2006).

### 1.8.2 Factor nuclear kappa de células B activadas (NF- $\kappa$ B)

El factor nuclear kappa de células B activadas (NF- $\kappa$ B), es uno de los mecanismos regulatorios clave en el control de la transcripción de un número importante de genes críticos de la función inmune, inflamación, proliferación y muerte celular (Shen y Pervaiz, 2006). El NF- $\kappa$ B está formado como homodímeros o heterodímeros de proteínas de la **subfamilia NF- $\kappa$ B** (por ejemplo, **p50**, **p52**) y la **subfamilia Rel** (por ejemplo, **p65 (Rel A)**, **c-Rel**, **RelB**). Estas proteínas están caracterizadas por la presencia de un dominio homólogo Rel necesario para la unión específica al sitio  $\kappa$ B del ADN y así llevar a cabo la dimerización y traslocación nuclear. En la mayoría de las células la forma prominente de NF- $\kappa$ B es el formado por el heterodímero **p50/p65**. En células no estimuladas, el NF- $\kappa$ B es secuestrado en el citoplasma por su proteína inhibitoria I $\kappa$ B. En presencia de un estímulo, la activación por las cinasas I $\kappa$ B (IKK) permite la fosforilación de I $\kappa$ B, su ubiquitinación y degradación para liberar a los dímeros NF- $\kappa$ B, acto seguido por la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y su unión a los elementos responsables en los genes blanco para activar su transcripción (Shen y Pervaiz, 2006).

Durante la señalización por medio de los receptores TNFR1, NF- $\kappa$ B es una de las vías principales en juego, y la activación de IKK requiere algunas de las proteínas adaptadoras en la vía de los TNFR1. Existe una controversia en relación al papel de las ERO intracelulares con respecto a la activación de NF- $\kappa$ B mediada por TNF- $\alpha$ , pero se sigue aceptando la idea de este vínculo. Lo que si es evidente y aceptado, es el papel de NF- $\kappa$ B en la producción de ERO y la acumulación de

TNF- $\alpha$  en células, ya que se ha observado que NF- $\kappa$ B actúa como un supresor de la formación de ERO intracelular en respuesta a TNF- $\alpha$  (Han et al., 2009).

### 1.8.3 Otros marcadores de inflamación

De acuerdo con la definición del Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org/>), las moléculas de adhesión celular son: “moléculas expresadas en la superficie de las células que median la adhesión de la célula a otras células o a la matriz extracelular”. Estas proteínas juegan varios papeles funcionales importantes en la interfase de las células y su medio ambiente, siendo este ambiente otras células de igual o diferente tipo, la matriz extracelular o incluso algunas veces elementos solubles. Las moléculas de adhesión están distribuidas ampliamente y virtualmente todas las células las expresan.

Las **moléculas de adhesión intracelular (ICAM)** pertenecen a la subfamilia de cinco miembros denominados ICAM-1 al 5. Estas moléculas son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), que son glicoproteínas receptoras de membrana, las cuales presentan una variedad de dominios Ig extracelulares. La **ICAM-1** se expresa ampliamente a nivel basal y puede ser regulada por citocinas proinflamatorias en leucocitos y células endoteliales (Blankenberg et al., 2003). Entre los ligandos para las ICAM podemos mencionar a las integrinas  $\beta_2$  específica para leucocitos, cada proteína ICAM es capaz de unir a más de un ligando al utilizar diferentes dominios de unión. En este tipo de moléculas, comunmente se observa dimerización o formación de grandes multímeros lo cual incrementa su afinidad a ligandos. Las ICAM-1 a 3, median la adhesión de leucocitos al endotelio activado para establecer fuertes lazos con las integrinas e inducir un firme arresto de células inflamatorias en la superficie vascular y participar en la extravasación de leucocitos (Blankenberg et al., 2003).

La **molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1)** es inducida transcripcionalmente en las células del endotelio pero pueden expresarse por otros tipos celulares como los macrófagos, mioblastos o células dendríticas. Estas moléculas interactúan con la integrina  $\alpha_4\beta_1$  también conocida como integrina 4 tardía, dando como resultado la inducción de la señal para el cambio de forma y

migración en las células leucocíticas. La VCAM-1 participa en el reclutamiento de células sanguíneas por la activación endotelial favoreciendo su firme adhesión con éste (Blankenberg et al., 2003).

En la patogénesis de enfermedades inflamatorias se ha observado que las ERO juegan un papel muy importante. Tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, se ha observado que los macrófagos usan ERO para eliminar a los patógenos que invaden a las células. Una de las vías oxidantes involucra a la **mieloperoxidasa (MPO)**, una hemo proteína expresada en altos niveles en diversas lesiones celulares, la cual puede localizarse en parte con los macrófagos. Esta enzima utiliza  $H_2O_2$  para llevar a cabo reacciones oxidantes en el fagolisosoma y la mielina extracelular, dando como resultado la formación de HOCl. El HOCl, es un potente agente antimicrobiano y es el producto final más abundante de iones cloruro en plasma generado por la MPO. Este ácido además de ser un potente antimicrobiano, tiene el potencial para dañar a los tejidos de su hospedante.

#### **1.8.4 Inflamación inducida por cisplatino**

Múltiples líneas de investigación han demostrado que la inflamación juega un papel fisiológico importante en la nefrotoxicidad inducida por CIS. Esto se ha demostrado al observar que la administración de CIS incrementa la infiltración de leucocitos, macrófagos, monocitos y neutrófilos en los tejidos renales dañados después de 72 h de su administración (Sung et al., 2008; Mukhopadhyay et al., 2010), así como un incremento en los marcadores de inflamación como son las moléculas de adhesión intracelular-1, proteína quimioatrayente-1 de monocitos (MCP-1) y ED-1 (Kang et al., 2009; Francescato et al., 2009). Además, se ha observado que el CIS induce el incremento en la expresión de una variedad de citocinas y quimiocinas inflamatorias como  $TNF-\alpha$  y la interleucina- $1\beta$  (Ramesh y Reeves, 2002, 2003; Pan et al., 2009), que a su vez permiten la activación de  $NF-\kappa B$  como producto de las ERO producidas (Sung et al., 2008).



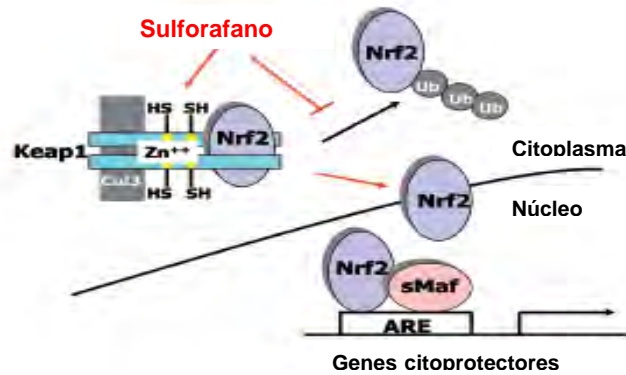
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Evidencias del sulforafano como antioxidante en distintos modelos de estrés oxidante

Como se ha mencionado anteriormente, el SFN es un antioxidante indirecto que tiene la capacidad de promover la inducción de enzimas antioxidantes por medio de la disociación del complejo Nrf2/Keap1 así como la activación de las proteínas de la vía de las MAPK (Yu et al., 1999; Hu et al., 2004; Kong et al., 2001; Lau et al., 2008). Como resultado, el Nrf2 modula la expresión de los genes vía ARE (Esquema 10). Dentro de los genes regulados por ARE podemos encontrar a NQO1, hemo oxigenasa-1, GCL, GST, entre otros y la inducción de estas enzimas se ha observado en experimentos *in vivo* e *in vitro* luego del tratamiento con SFN.

Dado que encontramos SFN en el brócoli, se han realizado muchos estudios por medio de la ingesta de este vegetal. Por ejemplo, una dieta de brotes secos de brócoli (200 mg/día) en ratas con hipertensión espontánea atenúa el estrés oxidante, la hipertensión y la inflamación generados por esta enfermedad (Wu et al., 2004). Además, el efecto antihipertensivo del brócoli estuvo acompañado de una mejora en las concentraciones de GSH así como en la actividad de las enzimas GR y GPx en corazón, aorta, carótida y riñón; se observó una disminución en la infiltración de macrófagos en tejidos de la aorta, arteria carótida y el endotelio cardiaco, así como en la médula renal y los túbulos. Estos efectos benéficos se asociaron con la supresión de la vía NF- $\kappa$ B (Wu et al., 2004). Se ha observado un efecto cardioprotector en preparaciones de corazones aislados sometidos a isquemia y reperfusión luego de alimentar a ratas con brócoli durante treinta días (Mukherjee et al., 2008). El efecto protector se observó al disminuir la apoptosis en los cardiomiocitos, lo cual se asoció con la conservación de las enzimas tioredoxina, glutarredoxina, peroxirredoxina, hemo oxigenasa-1 y SOD, así como la inducción de las proteínas de la vía de supervivencia Bcl2, Akt, ERK y la disminución en la activación de las proteínas de la vía de muerte celular (Bax, JNK, p38- $\alpha$  MAPK) (Mukherjee et al., 2008; Mukherjee et al., 2010). El efecto protector del SFN también se ha observado contra el daño producido por

hipoxia e isquemia cerebral. En dicho modelo el SFN disminuyó los niveles de malondialdehído y 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (marcadores de estrés oxidante en lípidos y ADN, respectivamente) (Ping et al., 2010). En el modelo experimental de inflamación cerebral inducida por lipopolisacáridos en ratas, el SFN atenuó este daño lo cual se asoció con inducción de Nrf2 y la expresión de la hemo oxigenasa-1 en el hipocampo de estos animales (Innamorato et al., 2008).



**Esquema 10.** Mecanismo de inducción de genes citoprotectores por SFN.

A nivel renal, en un modelo de nefrotoxicidad con glicerol donde se produce miólisis y hemólisis, se observó que la inducción de la hemo oxigenasa-1 previno la insuficiencia renal aguda inducida por este compuesto (Nath et al., 1992). Yoon y colaboradores demostraron que el pretratamiento con SFN (una sola inyección de SFN 500 µg/Kg) fue capaz de reducir el daño renal inducido por isquemia y reperfusión evaluado por marcadores bioquímicos e histológicos. Este efecto protector se asoció con la traslocación de Nrf2 al núcleo, la inducción de enzimas de fase II y la disminución de marcadores de estrés oxidante en los tejidos renales (Yoon et al., 2008). Shin y colaboradores demostraron en un modelo de fibrosis renal inducido por CSA, que el tratamiento con SFN previene este daño asociado al factor Nrf2 (Shin et al., 2010).

Esta serie de evidencias hacen del SFN un excelente candidato para ser utilizado como un arma terapéutica en una amplia variedad de las enfermedades humanas sin explorar, como es el caso del daño renal inducido por el tratamiento con CIS.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La nefrotoxicidad es el efecto colateral más importante en la terapia antitumoral con CIS. En estudios *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado que la generación de ERO, la depleción de enzimas antioxidantes y el aumento en el estado oxidante/nitrante celular, la disfunción mitocondrial así como la activación de vías de inflamación y muerte celular están relacionadas directamente con el daño ocasionado por este compuesto.

Dado que en diversos modelos experimentales se ha demostrado que el SFN es un agente favorable contra los eventos arriba mencionados, es necesario realizar más estudios con el SFN para prevenir los efectos secundarios devastadores en el tratamiento contra el cáncer humano.

## **4. HIPÓTESIS**

El tratamiento con SFN en las ratas tratadas con CIS prevendrá o disminuirá la nefrotoxicidad, las alteraciones mitocondriales, la inflamación y la muerte celular por medio de la activación del sistema antioxidante: sobreexpresión de enzimas antioxidantes y prevalencia de antioxidantes endógenos, los cuales impedirán la oxidación de moléculas celulares o la activación de vías proinflamatorias y de muerte celular relacionadas con el estrés oxidante.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 General**

- Determinar el efecto protector del sulforafano contra el estrés oxidante, daño mitocondrial, inflamación y muerte celular inducidos por cisplatino en riñones de ratas Wistar Macho.

### **5.2 Particulares**

- Evaluar el efecto protector del sulforafano contra la nefrotoxicidad inducida por cisplatino
- Evaluar el efecto protector del sulforafano contra las alteraciones mitocondriales inducidas por cisplatino
- Evaluar el efecto protector del sulforafano contra la muerte celular e inflamación inducidas por cisplatino

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materiales

El SFN se compró en LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA). El CIS, el dimetil sulfóxido (DMSO), la p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminido, el 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH), el cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), el azul de tetrazolio (NBT), la GST, el Tritón X-100, la poli-L-lisina (P-1524), el paraformaldehído, la albúmina sérica bovina (BSA) y la glicina se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El monoclorobimano y la tinción con Hoescht 33258 se adquirieron de Fluka (Schnelldorf, Germany). Las células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo (LLC-PK1) se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC). Los platos de cultivo celular se compararon de Nunc (Roskilde, Denmark). El medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), la tripsina TrypLE Express, el suero fetal bovino (SFB), el antibiótico/antimicótico (10,000 U/mL de penicilina G y 10,000  $\mu$ g/mL de sulfato de estreptomicina en 0.85% de sol. salina) se adquirieron de GIBCO (México D.F.). El anticuerpo monoclonal para ratón anti-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) se compró de Oxis International Inc. (Portland, OR, USA). El anticuerpo monoclonal anti-3-nitrotirosina (3-NT) se compró de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA). El anticuerpo secundario SP-conjugado de burro para biotina AffiniPure IgG anti-ratón y el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) se compraron de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, USA). El anticuerpo anti-Nrf2 se compró de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). El Declere se adquirió de Cell Marque (Hot Springs, AR, USA). El sustrato diaminobenzidina y la hematoxilina de Mayer (Lillie's Modification) se adquirieron de DAKO Corporation (Carpinteria, CA, USA). Vectastain ABC-kit se compró de Vector Laboratories (Orton Southgate, Peterborough, UK). El anticuerpo anti-(citocromo c) mAb (Clona 7H8.2C12) y el anticuerpo secundario conjugado para biotina se compraron de Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA). Los anticuerpos para caspase-3 anclada, p38- $\alpha$ , p38- $\beta$ , fosfo JNK (pJNK), JNK, fosfo ERK (pERK), ERK, p53, fosfo NF- $\kappa$ B

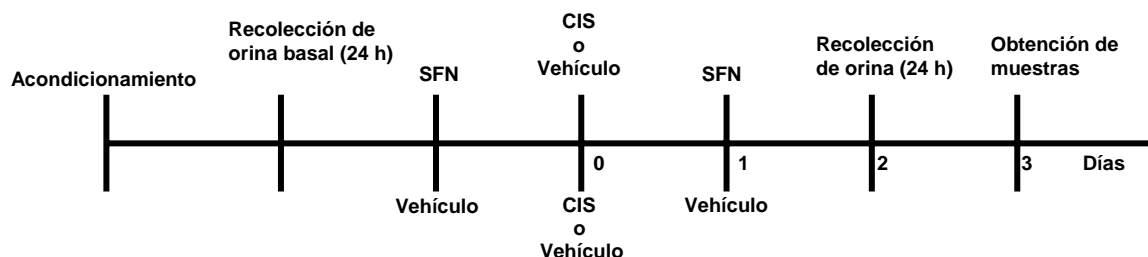
(p65) y NF- $\kappa$ B (p65) se compraron de Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA). Los anticuerpos para TNF- $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1 se adquirieron de R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN) y el anticuerpo para  $\beta$ -actina se compró de Chemicon (Temecula, CA). Todos los demás compuestos usados son de grado reactivo y se compraron comercialmente.

## 6.2 Diseño experimental

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de 230-260 g. Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h en condiciones de temperatura controlada, teniendo acceso *ad libitum* a agua y alimento. El trabajo experimental fue aprobado por *el Comité ético local (CICUAL)* y siguió *the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publicado por *the United States National Institutes of Health (US-NIH)*, así como *la Norma Oficial Mexicana* para el cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y de disposición de residuos biológicos (NOM-087-ECOL-1995).

Se estudiaron cuatro grupos de animales. (1) Grupo control (CT). Las ratas de este grupo se inyectaron por vía intravenosa (i.v. en la vena yugular) con una solución de DMSO/solución salina y luego con una inyección por vía intraperitoneal (i.p.) con solución salina isotónica. (2) Grupo sulforafano (SFN). Las ratas de este grupo se inyectaron vía i.v. a una dosis de 500  $\mu$ g/Kg (Yoon et al., 2008), dos veces (24 h antes y 24 h después de la inyección con la solución salina isotónica. El SFN se suspendió en una solución de DMSO/solución salina. (3) Grupo cisplatino (CIS). Las ratas de este grupo recibieron una sola inyección i.p. de una solución de CIS 7.5 mg/Kg/solución salina isotónica (Chirino et al., 2008). (4) Grupo sulforafano + cisplatino (SFN+CIS). Las ratas de este grupo se inyectaron con SFN 24 h antes y 24 h después de la inyección de CIS a las dosis y vías descritas para los grupos 2 y 3. Los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas 24 h previas a la inyección de SFN o la solución DMSO/solución salina y 24 h previas al sacrificio de las mismas para recolectar la orina y llevar a cabo la medición de proteinuria y excreción urinaria de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAG) como marcadores de nefrotoxicidad, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y contenido de

GSH como marcadores de producción de ERO. El diseño experimental se muestra en el esquema 11.



**Esquema 11.** Diseño del trabajo experimental.

Los animales se sacrificaron 72 h posteriores a la inyección con CIS o a la inyección del vehículo. Los animales se anestesiaron y la sangre fue obtenida vía la vena aorta usando una jeringa con una aguja #18 a temperatura ambiente y heparina de sodio (1,000 U/mg) como anticoagulante. El plasma sanguíneo se separó y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se midieron los siguientes parámetros de daño renal: creatinina plasmática, nitrógeno de urea en sangre (plasma) (BUN) y GPx en plasma (Pedraza-Chaverri et al., 2000). La depuración de creatinina se calculó con la fórmula estándar. Los riñones se removieron rápidamente para obtener las muestras histológicas, inmunohistoquímicas, realizar los estudios morfométricos, para medir la actividad de las enzimas GPx, CAT y GST, así como para medir el contenido de proteínas carboniladas y 4-HNE (marcadores de oxidación de proteínas y lípidos, respectivamente) y los demás estudios que se describen a continuación.

### 6.3 Métodos analíticos: Creatinina, BUN, NAG, proteinuria, $\text{H}_2\text{O}_2$ y GSH

- **Tratamiento de las muestras**

La orina recolectada durante 24 h se centrifugó a  $3,000 \times g$  por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se colocó en alícuotas en tubos eppendorf, se congeló y almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta realizar las determinaciones correspondientes.

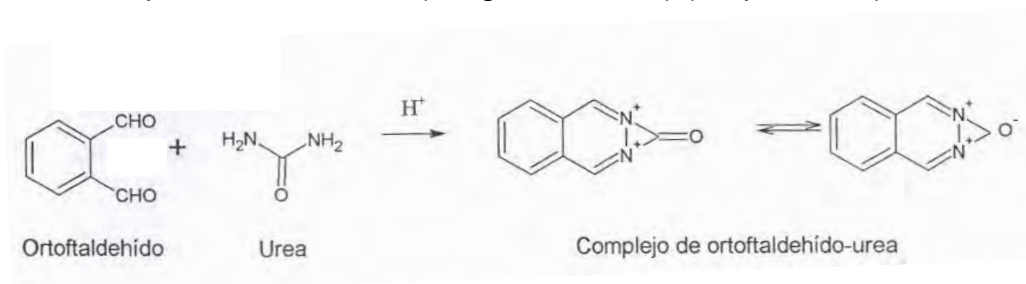
La sangre se recolectó individualmente al momento del sacrificio en tubos de ensayo de 13 x 100 mm, se dejó reposar a temperatura ambiente para después centrifugar a 3,000 x g por 10 min. El plasma obtenido se colocó en alícuotas en tubos eppendorf y se conservó a -20°C hasta su uso.

Los riñones se extrajeron y se cortaron transversalmente en tres secciones, una de las porciones (la media y más pequeña) se colocó en formalina al 10% para la preparación posterior de cortes histológicos y el resto se colocó en papel aluminio para congelarlos en nitrógeno líquido e inmediatamente almacenarlos a -80°C hasta ser utilizados.

## - Evaluación de la función renal

- **Nitrógeno de urea en sangre (BUN)**

La determinación de la concentración de BUN se realizó mediante un ensayo colorimétrico con un estuche comercial en un autoanalizador. Se mezclaron 10 µL de la muestra con 400 µL de ortoftaldehído 4.8 mM y 400 µL de borato 87 mM, los tubos se incubaron a 37°C por 15 min y transcurrido el tiempo se leyeron las absorbencias. A 510 nm, el producto de la reacción entre la urea y el ortoftaldehído absorbe la luz visible y por lo tanto puede ser determinado por métodos espectrofotométricos (Jung et al., 1975) (Esquema 12).



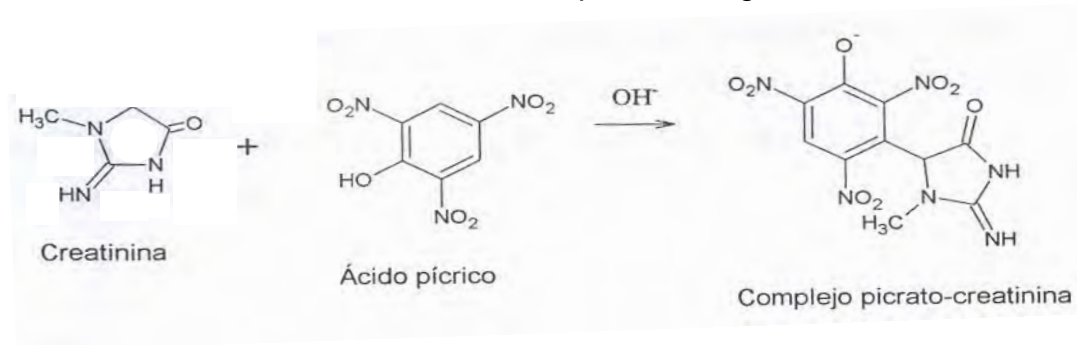
Esquema 12. Reacción entre la urea y el ortoftaldehído

- **Creatinina en plasma**

La cantidad de creatinina presente en el plasma se determinó con un estuche comercial en un autoanalizador, utilizando un método colorimétrico basado en la reacción de Jaffé (Esquema 13), en el cual al reaccionar la creatinina



con el ácido pícrico se forma un complejo anaranjado capaz de absorber a 492 nm. La cantidad de creatinina se expresó en mg/dL.



**Esquema 13.** Reacción de Jaffé

- **Depuración de creatinina**

La depuración de creatinina se emplea como un marcador para evaluar la función renal, ya que es una manera de medir la velocidad de filtración glomerular (Pedraza-Chaverri et al., 1999). Para su medición es necesario cuantificar la concentración de creatinina en orina y en plasma. Se calculó la depuración de creatinina usando la siguiente fórmula: depuración de creatinina =  $(UCREA \cdot VU) / (PCREA \cdot 1440)$ . Donde UCREA es la concentración de creatinina en orina, expresada en mg/dL; UV es el volumen urinario en 24 h, expresado en mL, y 1440 son los minutos que hay en 24 h. La depuración de creatinina se expresó en mL/min.

**- Evaluación de la función tubular**

- **Actividad de la enzima N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) en la orina**

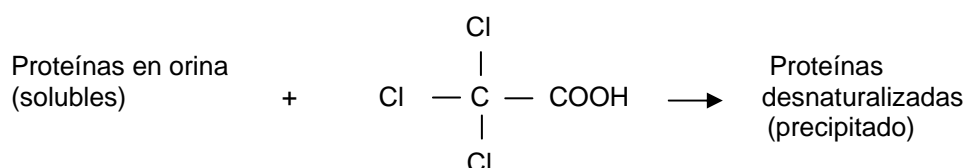
La NAG es una enzima involucrada en el metabolismo de las glicoproteínas, tiene un peso molecular de 150-160 kDa y está presente en dos isoformas: A y B. Éstas están presentes en órganos donde hay una alta velocidad de recambio. La excreción urinaria de enzimas lisosomales como la NAG, es empleada como un indicador del daño en el túbulo proximal (Lockwood y Bosmann, 1979). La actividad de la enzima NAG se determinó a través de un ensayo basado en la conversión del p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminido en p-nitrofenol, que a pH

ácido se encuentra protonado y es incoloro. Al alcalinizar el medio, el p-nitrofenol pasa de su forma protonada a su forma aniónica la cual absorbe a 405 nm.

Para este ensayo se utilizaron 50  $\mu\text{L}$  de orina sin diluir, se agregaron 375  $\mu\text{L}$  de un amortiguador de citratos 50 mM, pH 4.4 y posteriormente se le agregaron 125  $\mu\text{L}$  del sustrato p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminido 30 mM (Jung et al., 1991). Para evaluar la absorción basal de cada muestra de orina, se preparó un blanco sin sustrato y para evaluar la conversión espontánea del sustrato se preparó un blanco sin muestra de orina. Todos los tubos se agitaron y se incubaron a 37°C durante 15 min. La reacción se detuvo con 1.1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2 M, pH 10.4 y las muestras se leyeron a 405 nm. Las absorbencias de la forma aniónica del p-nitrofenol se interpolaron a la curva de calibración de p-nitrofenol en un intervalo de 5 a 175 nmol. Los resultados se expresaron como unidades (U) de NAG/24 h en donde una U se define como la cantidad de enzima que libera un  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones del ensayo.

- **Proteinuria**

La proteinuria se determinó midiendo la turbidez generada por la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético (TCA) a 420 nm. Se incubó 1 mL de orina diluida con agua destilada 1:5 y 250  $\mu\text{L}$  de TCA al 12.5% por 10 min a temperatura ambiente. Para cada muestra se preparó un blanco sin TCA. Se calibró a cero el espectrofotómetro utilizando 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y 250  $\mu\text{L}$  de TCA al 12.5%. Para determinar la concentración se interpolaron las densidades ópticas en una curva patrón de BSA al 0.1% con una concentración de entre 0.04 y 0.8 mg/mL. Los resultados se multiplicaron por el volumen urinario de 24 h y se expresaron en mg de proteína/24 h (Esquema 14).



**Esquema 14.** Reacción entre proteínas excretadas en la orina y el ácido tricloroacético para formar un precipitado que absorbe a 420 nm.

## - Marcadores de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)

### • Excreción urinaria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Esta medición se llevo a cabo mediante el ensayo de Hierro<sup>3+</sup>-naranja de xilenol (Fe<sup>3+</sup>-Orange Xilenol; FOX); el cual se usa para medir los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentes en la orina o la muestra a tratar. En este ensayo, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en la muestra oxida al ión ferroso (Fe<sup>2+</sup>) a la forma férrica (Fe<sup>3+</sup>) la cual se une entonces al naranja de xilenol y forma un complejo colorimétrico con absorbencia máxima a 560 nm (Long y Halliwell, 2001). El procedimiento consistió en mezclar en tubos eppendorf de 1.5 mL, 10 µL de metanol grado HPLC, 90 µL de los estándares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o la muestra y 900 µL de la solución de FOX; se incubó 30 min a 20-22°C. Se centrifugó a 15,000 g/10 min/ temperatura ambiente y se midió la absorbencia a 560 nm vs. la curva estándar.

### • Contenido de glutatión reducido (GSH)

El contenido de GSH se midió usando monoclorobimano. Este compuesto por si solo no es fluorescente, pero forma un aducto estable fluorescente con el GSH por medio de la reacción catalizada por la enzima GST. Los bimanos, son una familia de compuestos heterocíclicos que forman aductos fluorescentes con los grupos tioles (Fernández-Checa y Kaplowitz, 1990). La señal de fluorescencia registrada en el tiempo es directamente proporcional a la cantidad de GSH en el medio. En este estudio, la fluorescencia se midió usando longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) y emisión ( $\lambda_{em}$ ) a 385 nm y 478 nm, respectivamente, utilizando un lector para microplacas Synergy HT multi-mode (Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). El procedimiento consistió en mezclar 33.3 µL de la muestra o el estándar de GSH, 33.3 µL de monoclorobimano 1 mM, 33.3 µL de GST (1 U/mL) y 233 µL de solución salina o solución Krebs-Henseleit, pH 7.4. Se leyó la reacción en el fluorómetro durante 30 min (lecturas cada 15 min) a 37°C vs. la curva estándar de GSH.

## 6.4 Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos

- **Cortes histológicos**

Un corte transversal del riñón se fijó en una solución de formalina al 10% y amortiguador de fosfatos salino neutro (PBS) hasta su uso. El tejido se hidrató con tres lavados de etanol absoluto de 1 h cada uno. Posteriormente, se trataron con tres lavados de xilol y luego con tres lavados de parafina fundida a 60°C. Las muestras se colocaron por separado en moldes para su inclusión en parafina. Una vez que la parafina se enfría, el bloque se desmontó del molde y se llevaron a cabo cortes de 3-4  $\mu\text{m}$  con un microtomo de rotación Leica RM 2145. Los cortes se colocaron en portaobjetos silanizados y se incubaron por 24 h a 60°C. Al finalizar el tiempo de incubación, las muestras estaban listas para realizar los estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos necesarios.

- **Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)**

Esta tinción se realiza para observar las estructuras del tejido, donde la hematoxilina tiñe de morado los núcleos (estructuras ácidas) y la eosina tiñe de rosa el citoplasma y las membranas (estructuras básicas). Los cortes histológicos se desparafinaron con tres lavados de 5 min de xilol y se rehidrataron con tres lavados de 5 min de alcohol a concentraciones decrecientes hasta llegar a agua. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina durante 5 min, se enjuagaron seguidos por un lavado con una solución de HCl 1% en etanol al 70%. Se viró la hematoxilina con  $\text{LiCO}_3$  al 0.1% y los tejidos se tiñeron con eosina durante 15 seg y se lavaron con lavados breves de etanol absoluto. Finalmente, los cortes teñidos se deshidrataron en soluciones de etanol y xilol; se montaron para su observación con una resina soluble en xilol y un cubreobjetos.

- **Tinción de PAS (Periodic Acid-Schiff)**

En la tinción de PAS se tratan las muestras con ácido peryódico, que oxida los 1,2-glicoles formándose grupos aldehído. Con el reactivo de Schiff, los aldehídos reaccionan dando un color rojo luminoso. Con polisacáridos no

substituidos, mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas y glucoproteínas, glucolípidos y fosfolípidos, la tinción PAS da una reacción de color específica. Los cortes histológicos se desparafinaron con tres lavados de 5 min de xilol y se rehidrataron con tres lavados de 5 min de alcohol a concentraciones decrecientes hasta llegar a agua. Los tejidos se incubaron con el ácido peryódico durante 5 min y se lavaron con agua, seguidos de una incubación durante 15 min con el reactivo de Schiff y otro lavado con agua. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina durante 5 min, se lavaron con agua. Finalmente, los cortes teñidos se deshidrataron en soluciones de etanol y xilol; se montaron para su observación con una resina soluble en xilol y un cubreobjetos.

- **Inmunohistoquímica para 3-nitrotirosina (3-NT) y 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE)**

La nitrotirosina se utiliza como marcador de estrés oxidante ya que es una modificación de los residuos de tirosina de proteínas, debido al  $\text{ONOO}^-$  que se forma a partir del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y el  $\text{NO}^\bullet$  (MacMillan-Crow y Thompson, 1999). El 4-HNE renal se utiliza como marcador de estrés en lípidos. Cuando ocurre la peroxidación de los ácidos grasos poli-insaturados, los hidroperóxidos de ácidos grasos se convierten en aldehídos estables, siendo los productos prevalentes detectados: 4-HNE y malondialdehído (Gérard-Monnier et al., 1998). Los cortes histológicos se desparafinaron, se hidrataron y se incubaron en una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 4.5% en metanol durante 1.5 h para inhibir la peroxidasa endógena, seguido se bloquearon los tejidos con BSA al 3% por 30 min. Los tejidos se incubaron con el anticuerpo monoclonal para ratón anti-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y el anticuerpo monoclonal anti-3-nitrotirosina (3-NT) en BSA al 1% durante toda la noche. Los tejidos se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario SP-conjugado de burro para biotina AffiniPure igG anti-ratón y se lavaron con PBS. Se reveló con 3,3'-diaminobencidina y se contrastó con hematoxilina. Finalmente, los cortes teñidos se deshidrataron en soluciones de etanol y xilol; se montaron para su observación con una resina soluble en xilol y un

cubreobjetos. La reacción positiva se hizo evidente por una tinción café en las muestras.

- **Análisis histológico**

Los cortes teñidos se analizaron con un microscopio de luz Leica con un lente de 20x y la cuantificación del daño histológico se determinó usando un analizador de imágenes de Leica Qwin (Cambridge, Inglaterra). Se realizó el perfil histológico de 50 túbulos proximales por rata, seleccionados al azar. Para ello, se cuantificaron los túbulos dañados, células dañadas por túbulo, el área dañada por célula y el área celular total ( $\mu\text{m}^2$ ). El daño se identificó por la presencia de signos de necrosis y apoptosis como la inflamación, vacuolas y detritus.

## **6.5 Contenido de proteínas carboniladas y 4-hidroxi-2-nonenal**

- **Contenido de proteínas carboniladas**

Este método da evidencia de la actividad de las ERO y se basa en la reactividad de los grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar un complejo proteína-hidrazona que absorbe a 370 nm. El contenido de carbonilos de las proteínas se determinó utilizando el coeficiente de extinción molar del DNPH ( $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y la concentración de proteínas determinadas a 280 nm en los tubos blanco. Los resultados se expresan como nmoles de carbonilos/mg de proteína (Pedraza-Chaverri et al., 2008).

- **Contenido de 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE)**

El 4-HNE se midió de acuerdo a un método descrito previamente (Gérard-Monnier et al., 1998). La mezcla de reacción se incubó a 45°C por 30 min y la reacción se midió a 586 nm. El coeficiente de extinción molar aparente de  $110 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  se obtuvo con los dietilacetales del 4-HNE.

## 6.6 Enzimas antioxidantes

- **Actividad de la catalasa (CAT)**

Para determinar la actividad de la CAT se usó el método de Aebi (1984). En una celda de cuarzo se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida 1:30 en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7. Se mezcló con 725  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  7.7 mM en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7 y se midió el cambio de absorbencia a 240 nm cada 15 seg durante 30 seg, que es el período en que la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sigue una cinética de primer orden. Se usó la constante de reacción de primer orden (k) como unidad de actividad de la CAT, la cual se define de acuerdo con la siguiente fórmula:  $k = (1/t) (2.3 \times \log A1/[A2])$ , donde t = intervalo de tiempo medido, A1 y A2 son las absorbencias de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ .

- **Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)**

Para determinar la actividad de la GPx se usó el método de Lawrence y Burk (1976). La muestra se diluyó 1:10 con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7. Se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de esta dilución con 800  $\mu\text{L}$  de la siguiente solución: fosfato de potasio 50 mM pH 7, EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, GR 1 U/mL y GSH 1 mM. El blanco se preparó con la mezcla de reacción más agua en lugar de la muestra. Se preparó una muestra con la mezcla de reacción y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.25 mM a la muestra e inmediatamente después se leyó la absorbencia a 340 nm cada minuto durante 3 min. Los datos se expresaron como U/mg de proteína. Una unidad se define como los  $\mu\text{moles}$  de NADPH oxidado en un minuto.

- **Actividad de la glutatión S-transferasa (GST)**

La actividad de la GST se midió usando el método de Habig y colaboradores (1974). La mezcla de reacción consistió de 1.475 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.5, 200  $\mu\text{L}$  de GSH 1 mM, 25  $\mu\text{L}$  de CDNB 1 mM y 300  $\mu\text{L}$  de la muestra. Los cambios de absorbencia se midieron a 340 nm y la actividad enzimática se calculó como los nmoles formados de CDNB

conjugado/min/mg de proteína usando el coeficiente de extinción molar de  $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## **6.7 Cultivo celular y localización inmunocitoquímica de Nrf2**

- **Cultivo celular**

Las células LLC-PK1 se cultivaron en medio Eagle de Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con SFB al 10% y antibiótico estreptomina/penicilina al 1% y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> al 5% en cajas de Petri de 100 mm en una incubadora RMI30005-9-ABA (Revco Termo Electrón Corporation). Este procedimiento se realizó en un ambiente estéril dentro de un gabinete de seguridad biológica Clase II Tipo A2 modelo NU425-400 (Nuair). Las células se subcultivaron tres veces por semana al alcanzar del 90 al 100% de confluencia, para lo cual se retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS y se adicionó 1 mL de tripsina recombinante Tryple Express, seguido por una incubación durante 10 min a 37°C en la incubadora. Las células tripsinizadas se colocaron en un tubo estéril de 15 mL y se centrifugaron a 130 x g por 3 min en una centrífuga Heraeus modelo Megafuge. Se desechó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de DMEM suplementado. Las células se contaron usando una cámara de Neubauer para experimentos posteriores.

- **Localización inmunocitoquímica de Nrf2**

La inmunocitoquímica es una técnica que permite localizar proteínas presentes en células o tejidos, con base en una reacción antígeno-anticuerpo, donde la proteína o fragmento de la proteína que se pretende detectar es el antígeno, mientras que el anticuerpo específico para este antígeno, está conjugado con moléculas fluorescentes que hacen posible su detección posterior: peroxidasa de rábano o partículas de oro.

Para realizar el ensayo de traslocación nuclear de Nrf2 fue necesario esterilizar en autoclave cubreobjetos redondos de 18 mm de diámetro y 0.13 a 0.16 mm de grosor, colocarlos en los pozos de una placa de 12 pozos, tratarlos



con poli-L-lisina al 0.025% por 12 h y lavarlos con PBS. Las células se sembraron en los pozos y se crecieron durante 24 h. Pasado el tiempo, se agregó el SFN (10 y 25  $\mu$ M) por 3 h, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% por 10 min a temperatura ambiente. Luego se permeabilizaron con Tritón X-100 al 1% por 20 min, se bloquearon con BSA al 1%, Tritón X-100 al 1% y glicina 0.3 M, y se incubaron con anti-Nrf2 en BSA al 1%-Tritón X-100 al 1% por 2.5 h a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se incubaron toda la noche a 4°C en una cámara húmeda con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a FITC. Al día siguiente, los cubreobjetos se lavaron con PBS y el núcleo celular se tiñó con una solución de Hoechst 33258 0.2  $\mu$ g/mL por 1 min. Se llevó a cabo un nuevo lavado con PBS por 5 min y se realizó el montaje de los cubreobjetos en los portaobjetos con 5  $\mu$ L del medio acuoso Fluoromount. Finalmente, se selló el borde de los cubreobjetos con barniz transparente para evitar el secado y movimiento de los cubreobjetos. La fluorescencia se observó en un microscopio de fluorescencia invertida (Nikon Eclipse TS-100F) utilizando un filtro UV-2A para detectar la señal de Hoechst 33258 (longitud de onda de excitación de 330 a 380 nm). Las imágenes se obtuvieron con una cámara Nikon Digital Sight DS-Fi 1.

### **6.8 Aislamiento de mitocondrias renales**

El aislamiento de las mitocondrias se realizó por medio de centrifugaciones diferenciales como se indica a continuación. El riñón se extrajo rápidamente de las ratas y se depositó en una solución fría que contenía sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.3. El riñón se lavó, se le retiró el tejido conjuntivo y graso, y de nuevo se colocó en una nueva solución fría; antes de homogenizarlo en 50 mL de la solución de aislamiento utilizando un homogenizador tipo Potter, el riñón se cortó en pequeños trozos. El homogenizado se centrifugó a 750 x g por 10 min a 4°C para sedimentar el tejido conjuntivo, los restos celulares y el núcleo. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 12,000 x g por 10 min a 4°C para sedimentar las mitocondrias. Se decantó el sobrenadante y las mitocondrias se resuspendieron en 20 mL en la misma solución de aislamiento adicionada con BSA 0.1% y se incubaron durante 15 min. Posteriormente, la solución con las

mitocondrias se centrifugó a 12,000 x g por 10 min y finalmente el botón se resuspendió con 1 mL de la solución de aislamiento sin BSA. Todo el proceso se realizó a 4°C (Martínez-Abundis et al., 2010).

### **6.9 Actividad de la aconitasa**

La aconitasa (citrato-isocitrato hidratasa), es una enzima del ciclo del ácido cítrico que contiene un centro hierro-azufre y se localiza tanto en mitocondria como en el citosol (Gruer et al., 1997; Beinert y Kennedy, 1993). Esta enzima cataliza la conversión reversible del citrato a isocitrato, vía el intermediario cis-aconitato. La aconitasa es un blanco durante el estrés oxidante celular, debido a que esta enzima pierde un átomo de hierro del racimo (4Fe-4S) inducido por oxidación (Gardner, 1997). La inhibición en la actividad de la aconitasa se usa para determinar la producción de  $O_2^{\bullet-}$ , ya que esta inactivación se lleva a cabo en una reacción de varias órdenes de magnitud más rápida que con otras especies reactivas, como por ejemplo  $H_2O_2$  (Muller et al., 2004).

La actividad de la aconitasa se evaluó espectrofotométricamente como la formación del producto intermediario, cis-aconitato a partir del citrato (sustrato) en la interconversión de L-citrato e isocitrato a 240 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar de  $3.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Martínez-Abundis et al., 2010). El medio de reacción contiene  $KH_2PO_4$  25 mM, Tritón X-100 al 0.05%,  $MnCl_2$  0.6 mM, citrato de sodio 1 mM y  $NADP^+$  0.2 mM, pH 7.2. El ensayo se inició al agregar las mitocondrias a una concentración de proteína de 150  $\mu\text{g/mL}$ .

### **6.10 Consumo de oxígeno mitocondrial**

La síntesis de adenosina trifosfato (ATP) por la ATP-sintasa y la producción de agua como producto final de la reducción de oxígeno (consumo de oxígeno), son dos mecanismos acoplados que ocurren simultáneamente en las mitocondrias normales. Cuando la mitocondria está dañada, no ocurre este acoplamiento, dando como resultado el consumo de oxígeno sin la síntesis de ATP, fenómeno denominado como respiración desacoplada (Nicholls, 1987). El control respiratorio (CR) es una variable que permite comprobar la integridad mitocondrial. El CR se

define como el valor obtenido al dividir la velocidad de respiración dependiente de la síntesis de ATP (respiración en presencia de adenosina difosfato (ADP) y sustrato: Estado 3), entre la velocidad máxima independiente de la síntesis de ATP (Estado 4). A continuación se presenta la fórmula:

CR = Respiración del estado 3/Respiración del estado 4

El consumo de oxígeno mitocondrial se midió utilizando un electrodo para oxígeno tipo Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Spring, OH, USA), el cual determina directamente la velocidad de transferencia de electrones al oxígeno. El ensayo se llevó a cabo en la cámara de reacción con agitación magnética a temperatura ambiente en 1.5 mL de un medio que contenía KCl 125 mM, HEPES 10 mM y Pi 3 mM, pH 7.3. El estado 4 se evaluó en presencia de succinato de sodio 10 mM, 1 µg/mL rotenona, o con glutamato de sodio 10 mM y malato de sodio 10 mM. El estado 3 se estimuló al agregar ADP 200 µM. La respiración desacoplada se midió al agregar carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP) 1 µM. Todos los ensayos se realizaron con 1 mg de proteínas mitocondriales (Correa et al., 2008a).

### **6.11 Contenido de ATP mitocondrial**

Se homogenizaron 10 mg de proteína mitocondrial con HClO<sub>4</sub> al 25%/EDTA 1 mM. Se incubaron durante 1 h a 4°C y se centrifugaron a 2,300 x g por 10 min. El sobrenadante resultante se neutralizó con KOH 3 M /Tris y de nuevo se centrifugó a 2,300 x g por 10 min. El contenido de ATP se midió fluorométricamente en el sobrenadante a una longitud de onda de  $\lambda_{ex}$  345 nm y  $\lambda_{em}$  460 nm, usando un ensayo acoplado dependiente de glucosa 6-fosfatasa 50 U/mL, hexocinasa 50 U/mL, D-glucosa y NADP<sup>+</sup> en un medio con Tris 50 mM, EDTA 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.4 a 25°C (Correa et al., 2008b).

### **6.12 Poro de transición mitocondrial inducido por calcio**

El incremento en la permeabilidad mitocondrial se evaluó midiendo la cantidad de Ca<sup>2+</sup> liberado de la matriz mitocondrial al medio, utilizando un espectrofotómetro de doble haz (SLM-AMINCO) a una longitud de onda de 675-

685 nm en presencia del colorante metalocrómico Arsenazo III en el mismo medio con  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  (Kendrick, 1976).

### **6.13 Liberación de citocromo c mitocondrial**

El contenido de citocromo c en la mitocondria se evaluó mediante western blot. Luego de 10 min de incubación en el medio utilizado para medir la permeabilidad mitocondrial, 1 mL de la suspensión de mitocondrias se centrifugó a 8,160 x g por 10 min. Las proteínas contenidas en el sobrenadante se precipitaron con una solución de TCA al 4% (concentración final), mientras que el botón mitocondrial obtenido de la centrifugación anterior se resuspendió en el mismo volumen con amortiguador de carga. Se cargaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial y el mismo volumen de las muestras obtenidas de los sobrenadantes en geles desnaturizantes de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y se transfirieron en membranas PDVF. Se utilizó un anticuerpo primario monoclonal para citocromo c durante toda la noche, seguido por un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina durante 2 horas y para finalizar se utilizó un sistema de detección quimioluminiscente para obtener la señal. Para corroborar que las muestras se cargaron en la misma proporción, las membranas se limpiaron con un amortiguador Tris 62.5 mM/HCl,  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM, SDS al 2%, pH 6.7 por 20 min a 50°C. Luego las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Correa et al., 2007).

### **6.14 Análisis proteico por western blot**

Las proteínas se extrajeron de los homogenados de riñón usando el amortiguador de lisis RIPA que contiene un cocktail de inhibidores de proteasa tipo III y un cocktail de inhibidores de fosfatasas tipo I (Calbiochem, EMD Biosciences, San Diego, CA). Las proteínas renales se mezclaron con el amortiguador Laemmli (Laemmli, 1970) y se hirvieron durante 7 min. Se cargaron cantidades iguales de proteína (40  $\mu\text{g}$ ) a geles desnaturizantes Criterion Bis-Tris y se transfirieron en membranas de nitrocelulosa Hybond-C Extra (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ) utilizando una cámara semihúmeda de transferencia (Bio-Rad,

Hercules, CA). Las membranas se bloquearon por 2 h en leche en polvo descremada al 5% en PBS. Los anticuerpos primarios se diluyeron en un amortiguador PBS, Tween 20 al 0.1% y BSA al 5% en las concentraciones recomendadas por los fabricantes, y se dejaron incubar toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces con el amortiguador PBS, Tween 20 al 0.1% sin BSA y se incubaron durante 2 h con el anticuerpo secundario conjugado HRP (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL), seguido por tres lavados con el amortiguador PBS, Tween 20 al 0.1%. Los anticuerpos unidos a la membrana se observaron utilizando un sistema de detección por un sustrato quimioluminiscente (Supersignal West Pico chemiluminescent substrate, Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL) y se revelaron usando placas Kodak Biomax film (PerkinElmer, Wellesley, MA).

### **6.15 Detección de apoptosis por TUNEL, fragmentación del ADN y actividad de caspasas 3/7**

- **Detección de apoptosis por TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated uridine triphosphate (dUTP) nick-end labeling)**

Los cortes histológicos se desparafinaron y se realizó la detección de apoptosis in situ en los tejidos renales siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), y el número de células apoptóticas definidos por la condensación de cromatina de la fragmentación nuclear (cuerpos apoptóticos) fueron contadas. Después del marcaje con TUNEL, los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 y las células renales positivas para TUNEL se observaron usando un microscopio de fluorescencia Olympus IX81 con un objetivo a 20x y una resolución de 2048 x 2048. El análisis morfométrico se realizó por dos investigadores independientes y el número promedio de células apoptóticas en cada grupo experimental se calculó por el promedio de células apoptóticas positivas para TUNEL en 10 campos visuales de cada muestra renal.

- **Fragmentación del ADN**

El ensayo de fragmentación del ADN se basó en el principio de detección de las cantidades de mono- y oligonucleosomas presentes en las fracciones citoplasmáticas de los extractos tisulares renales, mediante un kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics) (Pan et al., 2009).

- **Actividad de caspasas-3/7**

La actividad de las caspasas-3/7 en homogenados de tejido renal se midió usando el estuche comercial Apo-One Homogenous Caspase-3/7 assay kit (Promega Corp., Madison, WI, USA). Una alícuota del reactivo para caspasas se agregó a cada muestra en platos de 96 pozos y se agitó en un agitador de platos por 1 h a temperatura ambiente protegidos de la luz. La fluorescencia se midió y se graficó vs. la curva estándar.

### **6.16 Tinción para mieloperoxidasa (MPO) e Inmunodetección de la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1)**

Los tejidos fijados en formaldehído y embebidos en parafina se desparafinaron y se hidratados en concentraciones decrecientes de etanol, seguidos por un calentamiento en microondas. A continuación, las secciones se incubaron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% en PBS para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Las secciones se incubaron con anticuerpos anti-MPO (Biocare Médica, Concord, CA), y anti-ICAM-1 (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN) durante toda noche a 4°C en una cámara húmeda. Luego de cinco lavados con PBS, se agregaron los anticuerpos secundarios biotinilados y se incubaron por 2 h. Se agregó el reactivo ABC según las instrucciones del kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). El color se desarrolló por incubación con un kit de DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 3-5 min, y la tinción específica se visualizó por microscopía de luz como se describió anteriormente (Bátkai et al., 2007; Moon et al., 2008; Mukhopadhyay et al., 2010; Pan et al., 2009). Después de la tinción para MPO y la inmunotinción para ICAM-1, los núcleos se contrastaron con Nuclear Fast Red H-3403 (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

### **6.17 Cuantificación de proteínas**

La detección de proteínas se realizó por el método colorimétrico de Lowry (1951). La técnica consta de dos fases, donde la primera se da con la formación del complejo proteína-cobre en solución alcalina y en la segunda fase el complejo se reduce con un reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico (reactivo de Folín y Ciocalteu) produciendo un intenso color azul que absorbe a 660 nm. La lectura obtenida es directamente proporcional a la concentración de proteínas presentes en la muestra. Los resultados se expresaron en mg/mL.

### **6.18 Análisis estadístico**

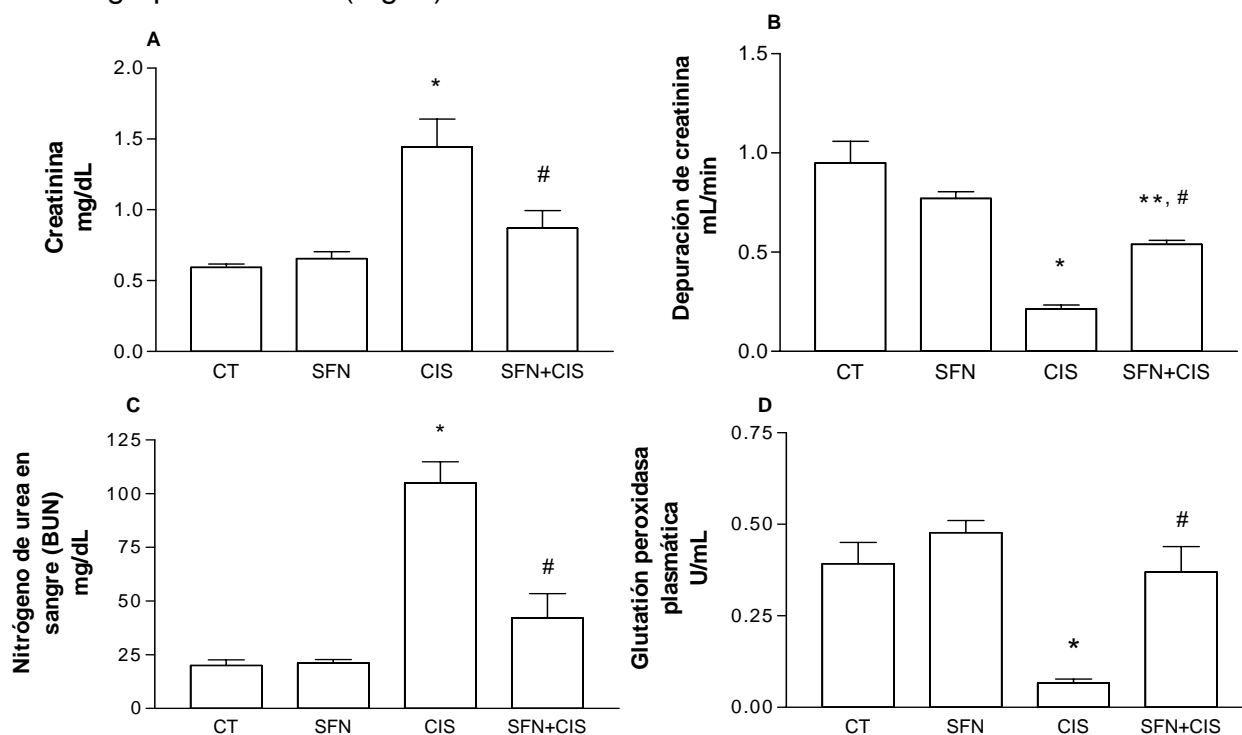
Los resultados se expresan como el promedio $\pm$ error estándar de la media (Prom $\pm$ EEM). Los datos se analizaron utilizando la prueba ANOVA seguida de la prueba de comparaciones múltiples Bonferroni o Dunnet, usando el programa Prism 2.01 (GraphPad, San Diego, CA). Las diferencias se consideraron significativas con valores de  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 El sulforafano protege contra la nefrotoxicidad inducida por cisplatino

#### 7.1.1 Efecto del sulforafano en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino

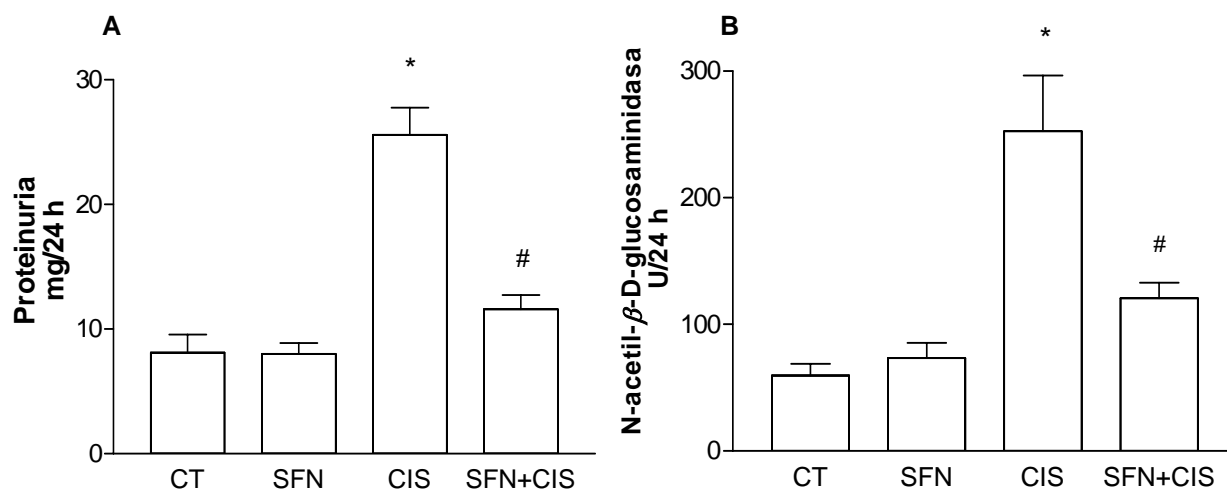
La función renal se evaluó en los cuatro grupos experimentales de ratas. En el grupo de ratas tratadas con CIS, la nefrotoxicidad fue evidente por el incremento de 2.43- y 5.25 veces en los niveles de creatinina y BUN en plasma, respectivamente, y la depuración de creatinina disminuyó un 76% en comparación con el grupo CT. Este aumento se previno significativamente por el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS (Fig. 1). Se observó además, que el CIS indujo la disminución en la actividad de la enzima GPx plasmática hasta un 16% con respecto al valor del grupo CT y que el tratamiento con SFN previno la disminución en el grupo SFN+CIS (Fig. 1).



**Figura 1.** Marcadores de nefrotoxicidad en los grupos de ratas estudiadas. (A) Creatinina en plasma, (B) Depuración de creatinina, (C) BUN y (D) Actividad de GPx en plasma. Prom±EEM. n=8-11. \*p<0.001 vs. CT y SFN. \*\*p<0.001 vs. CT; #p<0.001 vs. CIS.



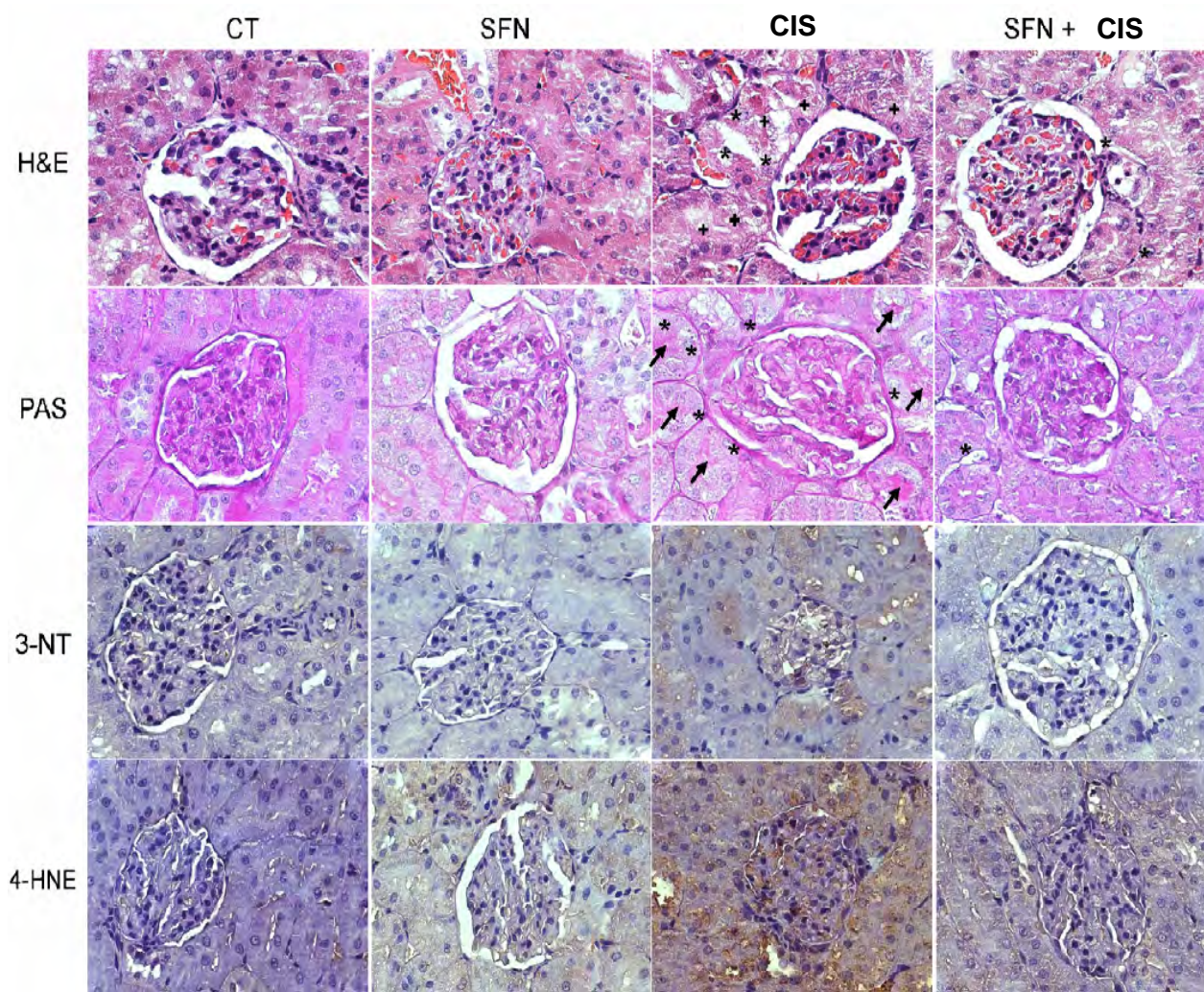
Además, el tratamiento con SFN fue capaz de prevenir el aumento en la excreción urinaria de proteínas (proteinuria) y la actividad de NAG inducidos por CIS de 3.3- y 5.1 veces, respectivamente (Fig. 2). Todos los parámetros arriba mencionados no se alteraron en el grupo de SFN respecto al grupo CT.



**Figura 2.** Excreción urinaria de (A) proteínas totales y (B) NAG en los grupos de ratas estudiadas. Prom $\pm$ EEM. n=8-12. \*p<0.001 vs. CT y SFN; #p<0.001 vs. CIS.

### 7.1.2 Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos

La evaluación histológica se realizó usando las tinciones de H&E y PAS con el fin de demostrar daño estructural, muerte celular y polisacáridos dentro de los túbulos (Fig. 3). Los estudios con microscopía de luz revelaron que los riñones aislados después de 72 h del tratamiento con CIS presentaron daño epitelial tubular, la mayoría de los túbulos corticales presentaron apoptosis (asteriscos), necrosis (signo de más, +) y vacuolización en las células epiteliales, así como detritus tubulares (flechas) observados claramente con la tinción de PAS (Fig. 3). En contraste, los riñones aislados del grupo SFN+CIS presentaron una morfología casi normal en las células epiteliales tubulares. El daño renal se atenuó significativamente con SFN en el grupo SFN+CIS (área afectada: 21.2 $\pm$ 2% vs. 11.2 $\pm$ 0.8%, p<0.001). Los cortes histológicos de los grupos CT y SNF presentaron una arquitectura celular normal (Fig. 3).

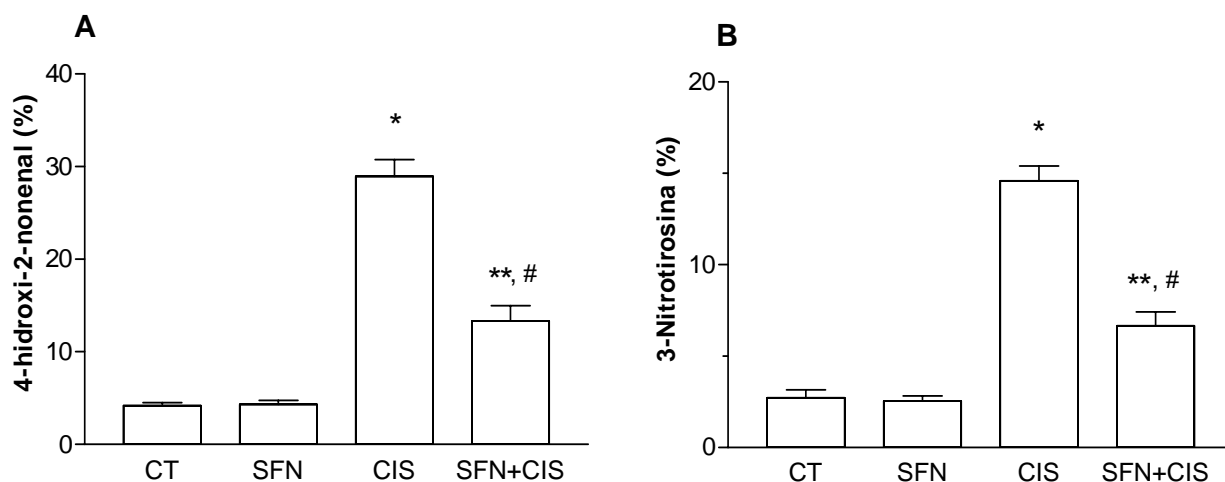


**Figura 3.** Análisis histopatológico e inmunohistoquímico en los cuatro grupos de ratas estudiadas. Los asteriscos (\*) indican apoptosis observado claramente en los núcleos celulares de las células tubulares y los signos de más (+) indican necrosis, observados como áreas eosinofílicas con vacuolas y destrucción de la morfología citoplasmática de las células tubulares; las flechas (→) indican numerosos detritus en la luz tubular. Las ratas se estudiaron 72 h después del tratamiento con CIS (7.5 mg/Kg).

### 7.1.3 Marcadores de estrés oxidante/nitrante

Se realizaron ensayos inmunohistoquímicos para 3-NT y 4-HNE como marcadores de estrés nitrante y oxidante, respectivamente, en cortes histológicos de riñón de los cuatro grupos de ratas estudiadas. En las figuras 3 y 4 se observa una inmunotinción débil para 3-NT y 4-HNE en las secciones renales del grupo CT y SFN; en contraste, una fuerte tinción para 3-NT y 4-HNE se observa en las ratas tratadas con CIS. El SFN atenuó significativamente el estrés nitrante y oxidante en

el riñón, ya que se observó una leve inmunoreactividad para 3-NT y 4-HNE en el grupo SFN+CIS (Figs. 3 y 4).

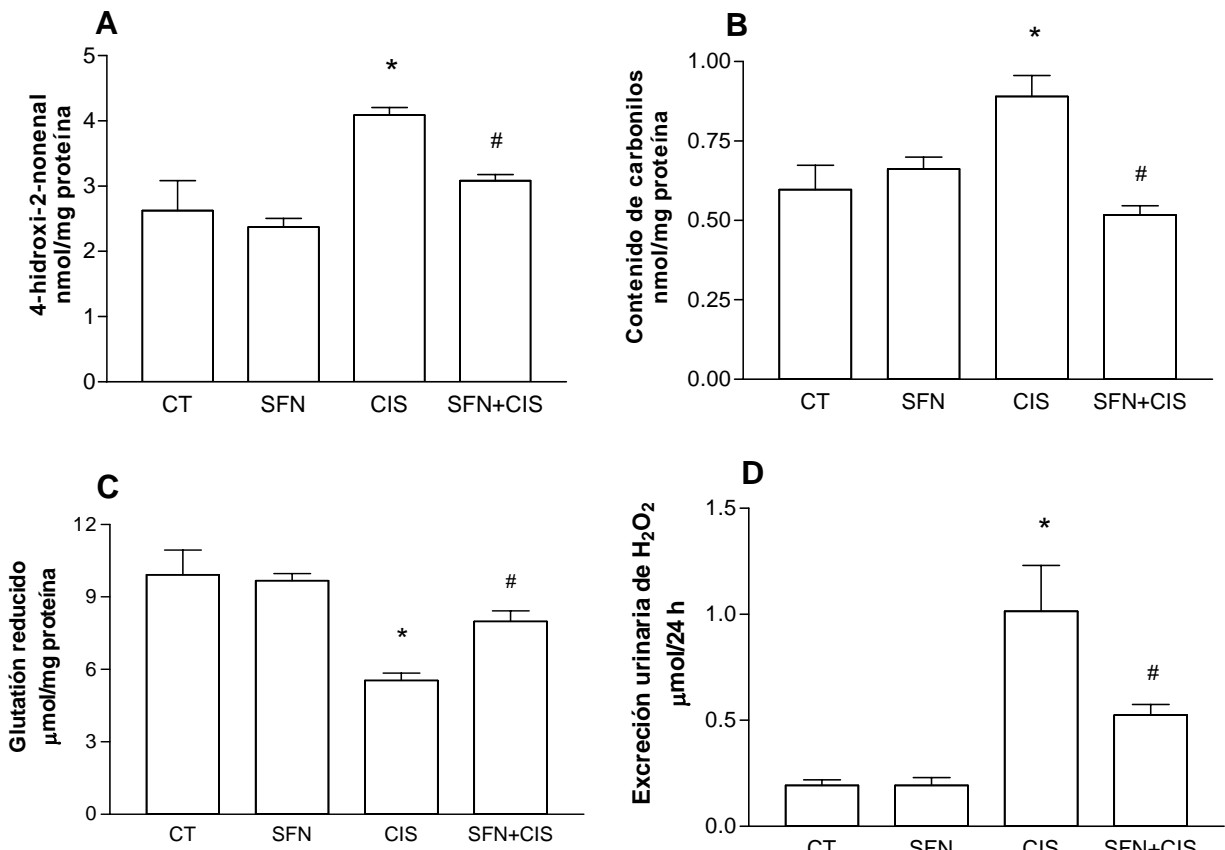


**Figura 4.** Análisis cuantitativo de los estudios inmunohistoquímicos (%) en los cuatro grupos de ratas estudiadas. Las ratas fueron estudiadas 72 h después del tratamiento con CIS (7.5 mg/Kg). (A) 4-HNE y (B) 3-NT. Prom±EEM. n=4. \*p<0.001 vs. CT y SFN; \*\*p<0.01 vs. CT y SFN; #p<0.001 vs. CIS.

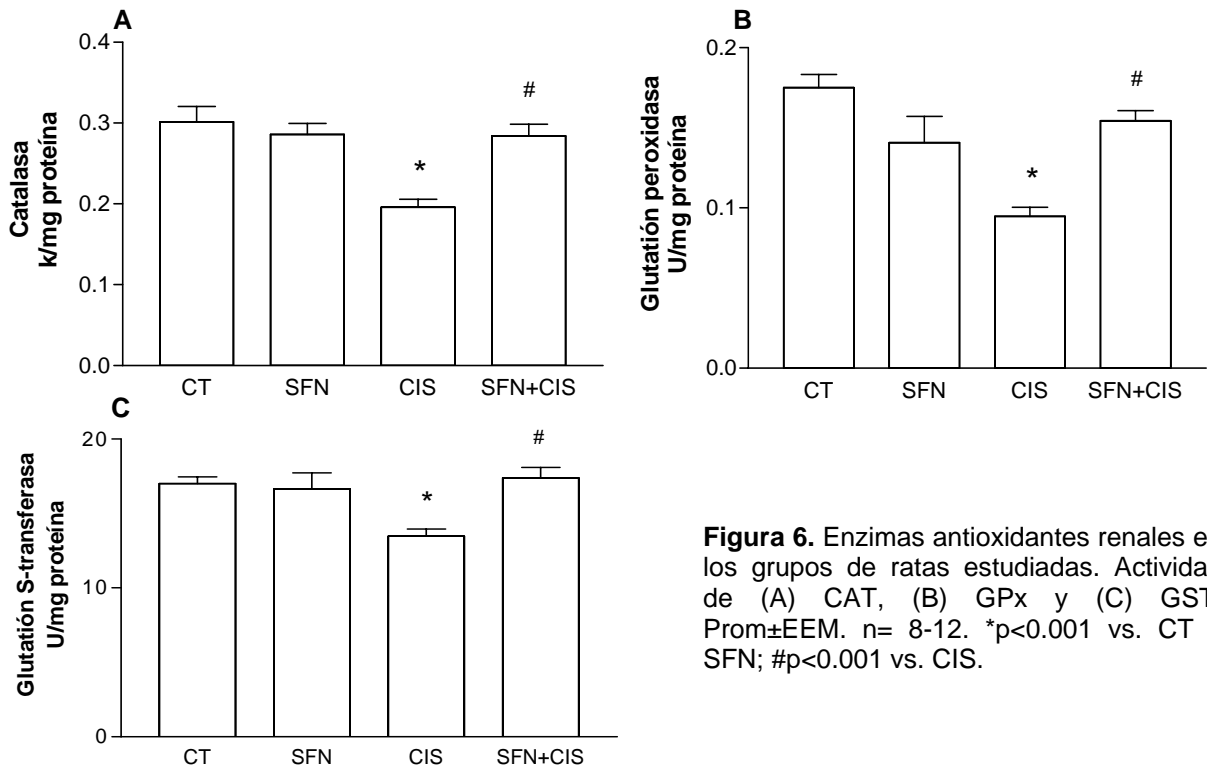
Por otra parte, los niveles renales de 4-HNE, el contenido de proteínas carboniladas y la excreción urinaria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se incrementó 1.6-, 1.5- y 5.2 veces, respectivamente, y los niveles de GSH disminuyeron a un 53% con respecto al grupo CT, en el grupo de ratas tratadas con CIS (Fig. 5). Estos cambios se previnieron significativamente por el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS (Fig. 5)

#### 7.1.4 Enzimas antioxidantes

La actividad de las enzimas renales CAT, GPx y GST disminuyó 35, 46 y 21%, respectivamente, en el grupo de ratas tratadas con CIS (Fig. 6). Estos cambios se previnieron completamente con el tratamiento de SFN en el grupo SFN+CIS (Fig. 6).



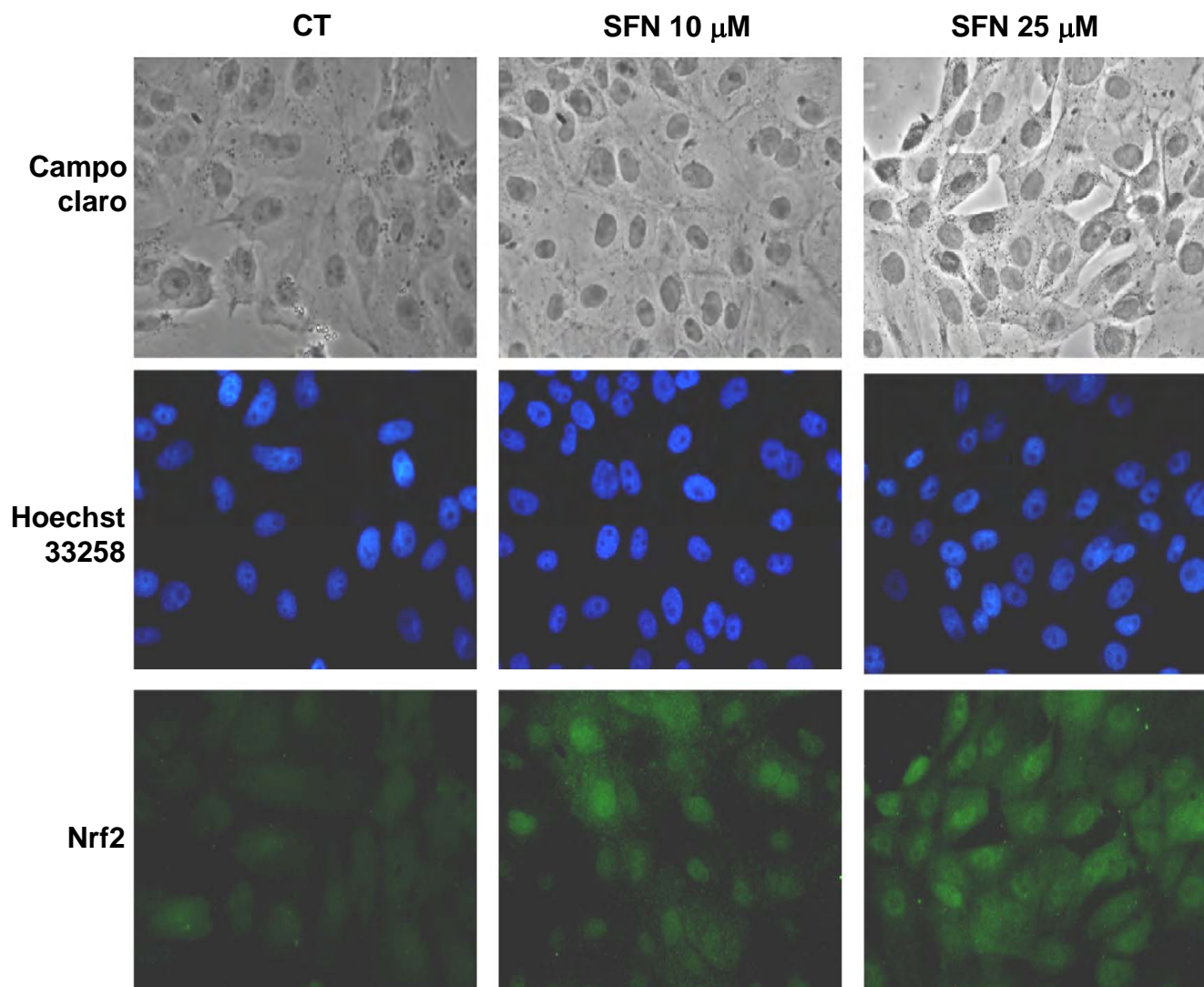
**Figura 5.** Marcadores de estrés oxidante en los grupos de ratas estudiadas. (A) 4-HNE, (B) contenido de grupos carbonilo, (C) contenido de GSH y (D) excreción urinaria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Prom±EEM. n=6-12. \*p<0.05 vs. CT y SFN; #p<0.001 vs. CIS.



**Figura 6.** Enzimas antioxidantes renales en los grupos de ratas estudiadas. Actividad de (A) CAT, (B) GPx y (C) GST. Prom±EEM. n= 8-12. \*p<0.001 vs. CT y SFN; #p<0.001 vs. CIS.

### 7.1.5 Efecto del sulforafano en la traslocación nuclear de Nrf2

La incubación de las células LLC-PK1 con dos concentraciones de SFN, dió como resultado la traslocación de Nrf2 al núcleo (Fig. 7).

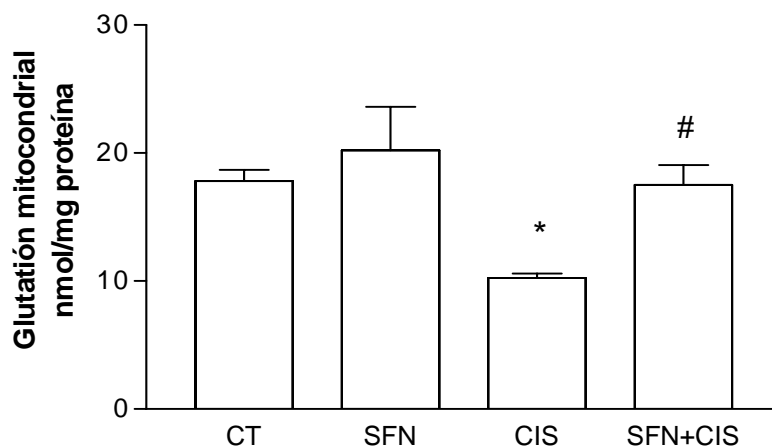


**Figura 7.** El SFN induce la traslocación de Nrf2 en las células LLC-PK1. Las células LLC-PK1 se incubaron con SFN (10 y 25  $\mu$ M) por 3 h. La traslocación nuclear de Nrf2 por SFN se determinó con tinción inmunofluorescente y contrastada con Hoechst 33258.

## 7.2 Efecto protector del sulforafano contra las alteraciones mitocondriales inducidas por cisplatino

### 7.2.1 El sulforafano previene la depleción de glutatión mitocondrial

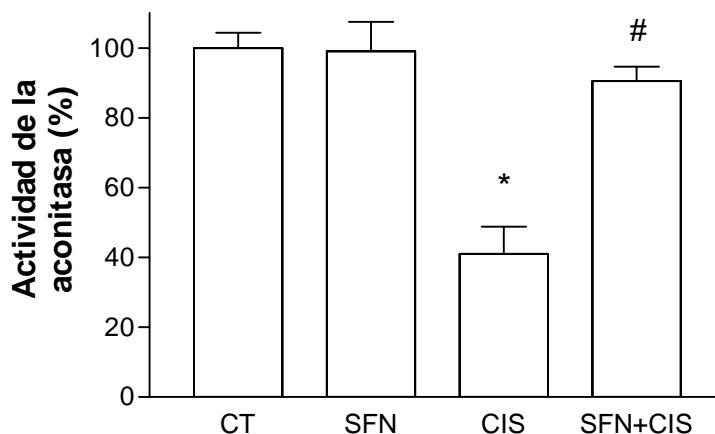
El tratamiento con CIS causó un deterioro en el estado antioxidante de las mitocondrias renales, lo cual se observó por la disminución significativa del contenido de GSH mitocondrial ( $10.23 \pm 0.36$  nmol/mg proteína) en comparación con el contenido en las mitocondrias del grupo CT ( $17.80 \pm 0.88$  nmol/mg proteína). La nefroprotección conferida por el SFN contra la toxicidad inducida por el CIS en el grupo SFN+CIS, se asoció a los niveles elevados mantenidos de GSH ( $17.50 \pm 1.57$  nmol/mg proteína), similares a los obtenidos de los grupos CT y SFN sin tratamiento con CIS ( $20.22 \pm 3.41$  nmol/mg proteína) (Fig. 8).



**Figura 8.** Concentración de GSH en mitocondrias aisladas de los cuatro grupos de ratas estudiadas. Prom $\pm$ EEM. n=5. \*p<0.05 vs. CT; #p<0.05 vs. CIS.

### 7.2.2 El sulforafano previene la disminución en la actividad de la aconitasa

La actividad enzimática de la aconitasa mitocondrial disminuyó un 67% en el grupo tratado con CIS, en comparación con los valores del grupo CT (100% de actividad). Estos cambios se previnieron significativamente por el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS. No se observaron diferencias significativas entre el grupo CT y SFN (Fig. 9).



**Figura 9.** Actividad de la aconitasa en mitocondrias aisladas de los cuatro grupos de ratas estudiadas. Prom $\pm$ EEM. n= 5. \*p<0.001 vs. CT; #p<0.001 vs. CIS.

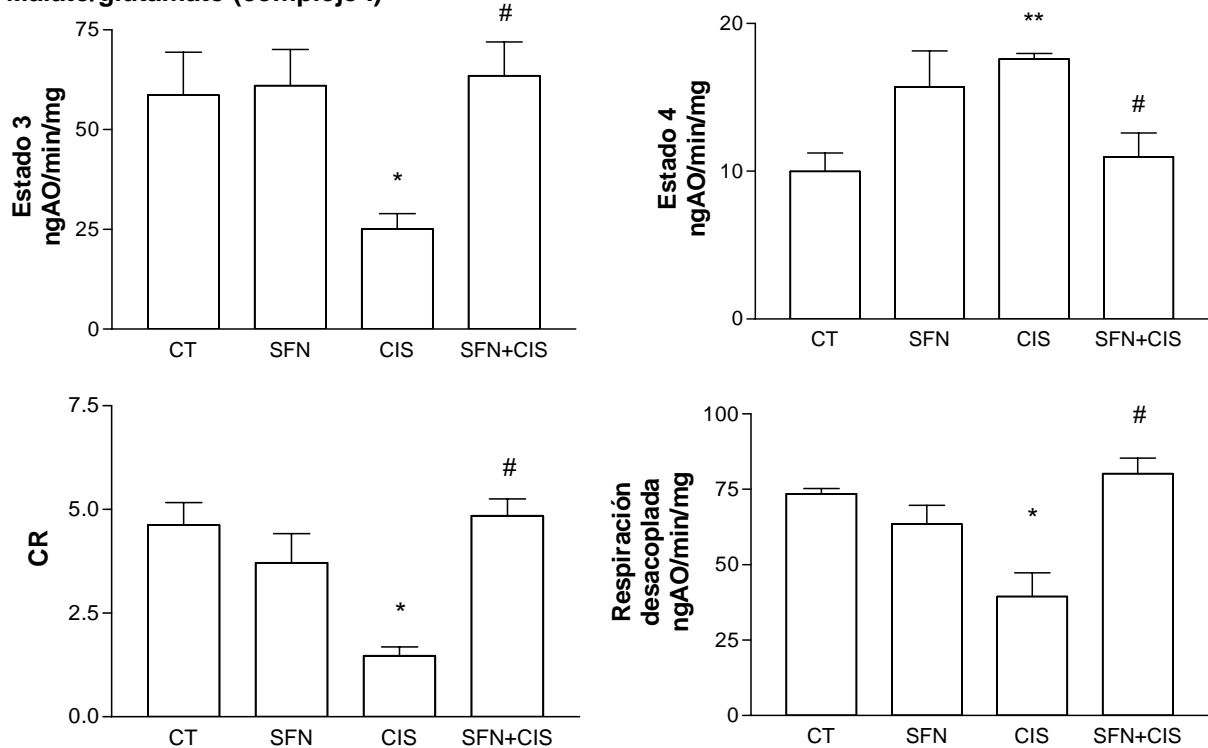
### 7.2.3 Efecto del sulforafano en la respiración mitocondrial

Para evaluar el efecto del SFN sobre la disfunción mitocondrial inducida por CIS se midió el estado 4 de la respiración (en ausencia de ADP), el estado 3 de la respiración (en presencia de ADP) y la respiración desacoplada, usando succinato o malato/glutamato como sustratos. El CR, fue calculado utilizando ambos sustratos para evaluar el desacoplamiento entre la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidante. La respiración mitocondrial en estado 3 y estado 4 usando malato/glutamato como sustratos fue significativamente diferente en el grupo tratado con CIS en comparación con el grupo CT (Fig. 10). El estado 3 disminuyó ( $25.13 \pm 3.82$  ngAO/min/mg) y el estado 4 aumentó ( $17.59 \pm 0.38$  ngAO/min/mg) en el grupo CIS. Estos cambios se previnieron significativamente con el tratamiento de SFN en el grupo CIS+SFN ( $63.55 \pm 8.41$  y  $10.97 \pm 1.62$  ngAO/min/mg, respectivamente) (Fig. 10). La respiración desacoplada se determinó luego de agregar CCCP  $1 \mu\text{M}$  a las mitocondrias. El CR y la respiración desacoplada disminuyeron a  $1.47 \pm 0.21$  y  $39.48 \pm 7.78$  ngAO/min/mg, respectivamente, en las mitocondrias de las ratas tratadas con CIS en comparación con las de los grupos CT ( $4.62 \pm 0.54$  y  $73.50 \pm 1.83$  ngAO/min/mg, respectivamente) (Fig. 10). Este efecto

se previno por el tratamiento con SFN en los grupos SFN+CIS ( $4.85 \pm 0.41$  y  $80.22 \pm 5.16$  ngAO/min/mg, respectivamente) (Fig. 10).

El estado 3 de la respiración usando succinato como sustrato, disminuyó significativamente en el grupo CIS ( $53.52 \pm 9.99$  ngAO/min/mg) en comparación con el grupo CT ( $107.06 \pm 13.20$  ngAO/min/mg) (Fig. 11). Estos cambios se previnieron significativamente por el tratamiento con SFN en el grupo CIS+SFN ( $119.81 \pm 7.10$  ngAO/min/mg) (Fig. 5). No se observaron diferencias en el estado 4 de la respiración entre los diferentes grupos experimentales (Fig. 11). El CR y la respiración desacoplada disminuyeron  $2.10 \pm 0.20$  y  $43.37 \pm 6.21$  ngAO/min/mg, respectivamente, en las mitocondrias de las ratas tratadas con CIS en comparación con las ratas CT ( $4.31 \pm 0.24$  y  $120.36 \pm 13.74$  ngAO/min/mg, respectivamente) (Fig. 11) y el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS ( $5.20 \pm 0.33$  y  $101.29 \pm 18.73$  ngAO/min/mg, respectivamente) previno esta disminución en comparación con el grupo CIS (Fig. 11).

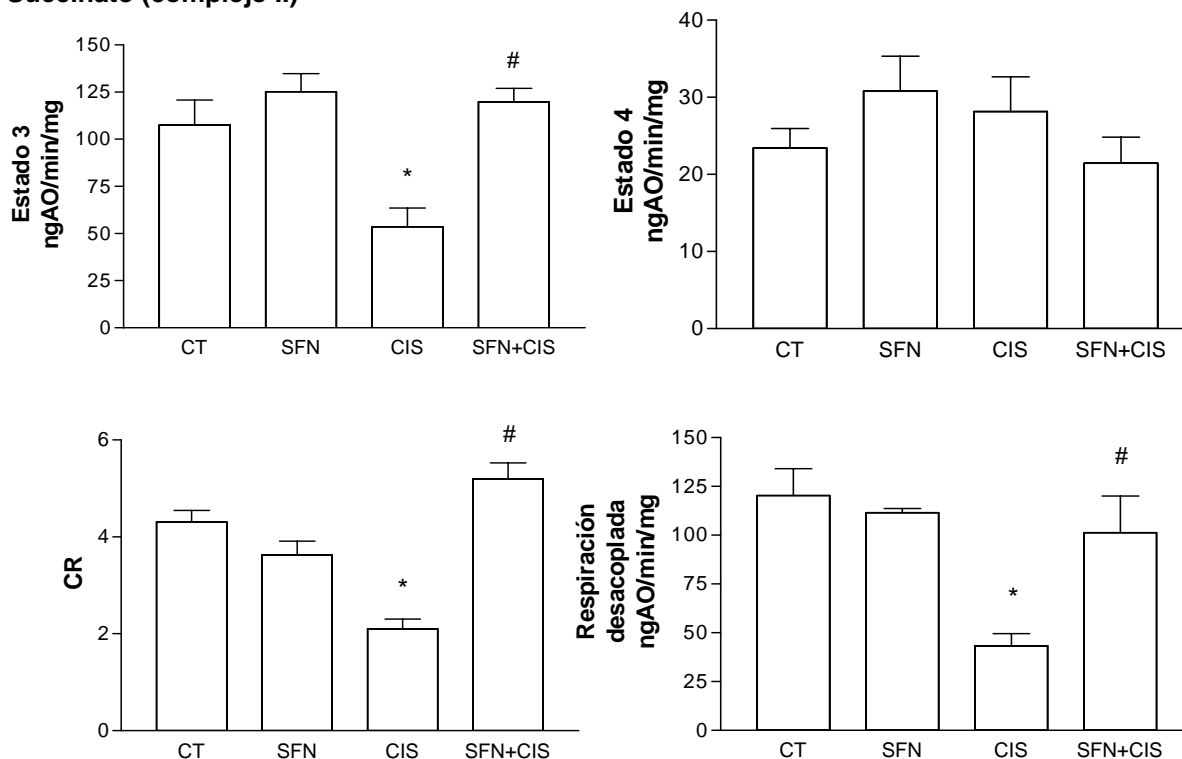
#### Malato/glutamato (complejo I)



**Figura 10.** Consumo de oxígeno usando malato/glutamato como sustratos en las mitocondrias de los cuatro grupos estudiados. Prom $\pm$ EEM. n=5, excepto en el panel donde se presenta la respiración desacoplada en el cual la n=3. CR: índice del control respiratorio, ngAO/min/mg: ng átomos de oxígeno/min/mg proteína. \*p<0.05 vs. CT; #p<0.05 vs. CIS.



### Succinato (complejo II)



**Figura 11.** Consumo de oxígeno usando succinato como sustrato en las mitocondrias de los cuatro grupos estudiados. Prom $\pm$ EEM. n=5, excepto en el panel donde se presenta la respiración desacoplada en el cual la n=3. CR: índice del control respiratorio, ngAO/min/mg: ng átomos de oxígeno/min/mg proteína. \*p<0.05 vs. CT; #p<0.05 vs. CIS.

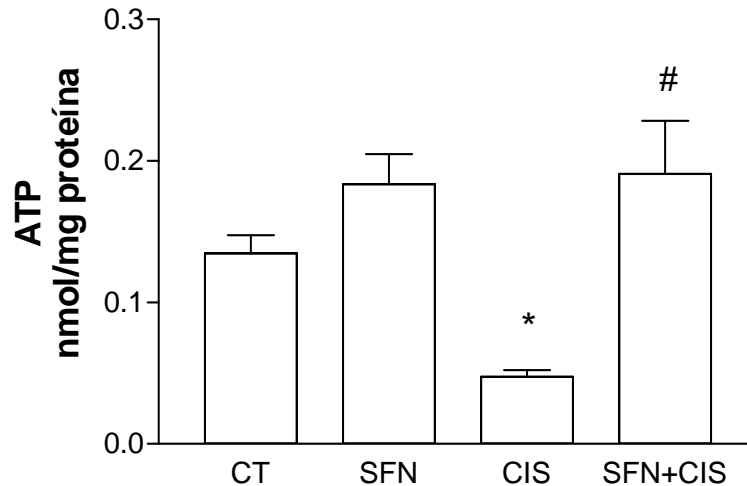
#### 7.2.4 El sulforafano previene la disminución del ATP mitocondrial inducido por cisplatino

El tratamiento con CIS disminuyó el contenido de ATP mitocondrial en el grupo CIS ( $0.05\pm 0.005$  nmol/mg proteína), cuando se comparó con los grupos CT ( $0.13\pm 0.01$  nmol/mg proteína) y SFN ( $0.18\pm 0.02$  nmol/mg proteína). Por el contrario, en el grupo SFN+CIS los niveles de ATP mitocondrial aumentaron significativamente ( $0.19\pm 0.04$  nmol/mg proteína), alcanzando valores similares a los grupos CT y SFN (Fig. 12).

#### 7.2.5 Efecto del sulforafano en la retención de calcio mitocondrial

La inducción de la transición de la permeabilidad en las mitocondrias susceptibles a  $Ca^{2+}$  es considerada una medida indirecta de la integridad estructural mitocondrial. Como se muestra en la figura 13, el  $Ca^{2+}$  se acumuló y se

mantuvo en la matriz mitocondrial en los grupos CT, SFN y SFN+CIS, en contraste con las mitocondrias aisladas del grupo CIS, las cuales fueron incapaces de retener el  $\text{Ca}^{2+}$ , como una consecuencia de la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP). Esta condición también se previno en su totalidad por la ciclosporina A (CSA), es un inhibidor bien caracterizado del mPTP (Fig. 13).

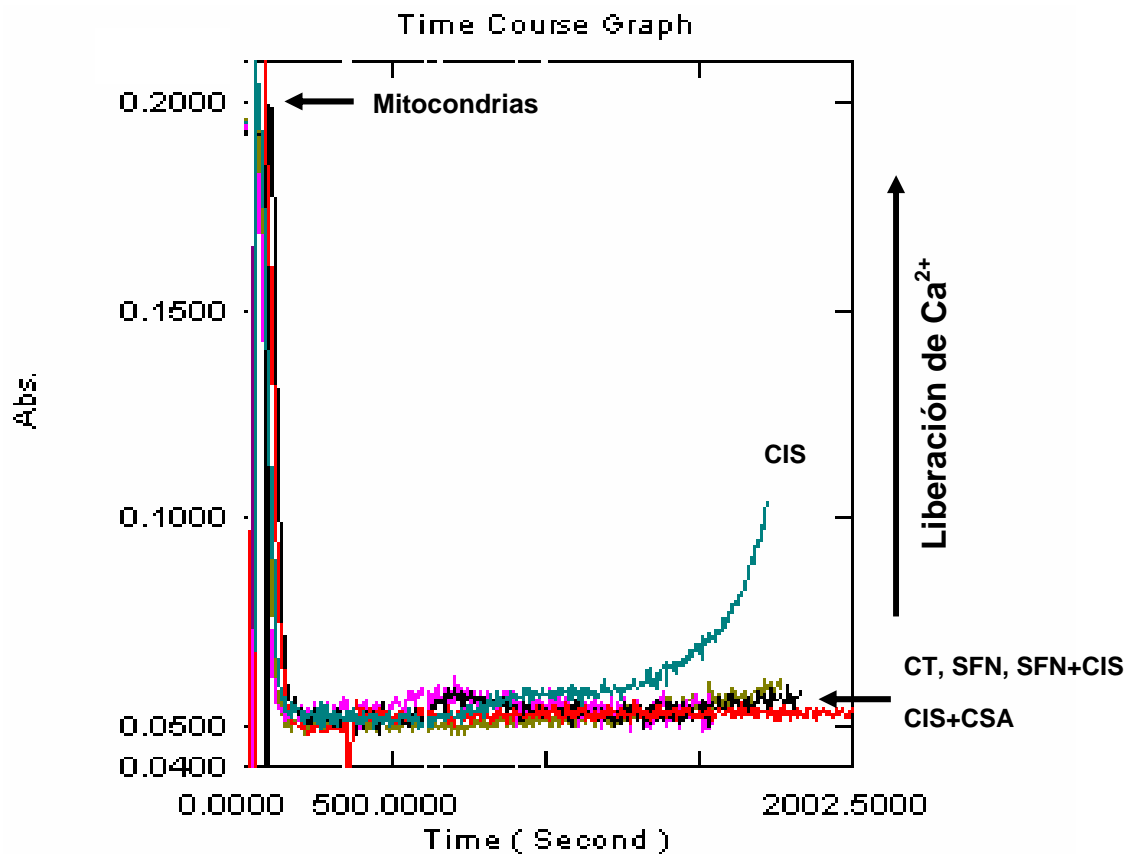


**Figura 12.** Contenido de adenosina trifosfato (ATP) en las mitocondrias de los cuatro grupos estudiados. Prom $\pm$ EEM. n=4, excepto en el grupo SFN+CIS donde la n=3. \*p<0.05 vs. CT; #p<0.001 vs. CIS.

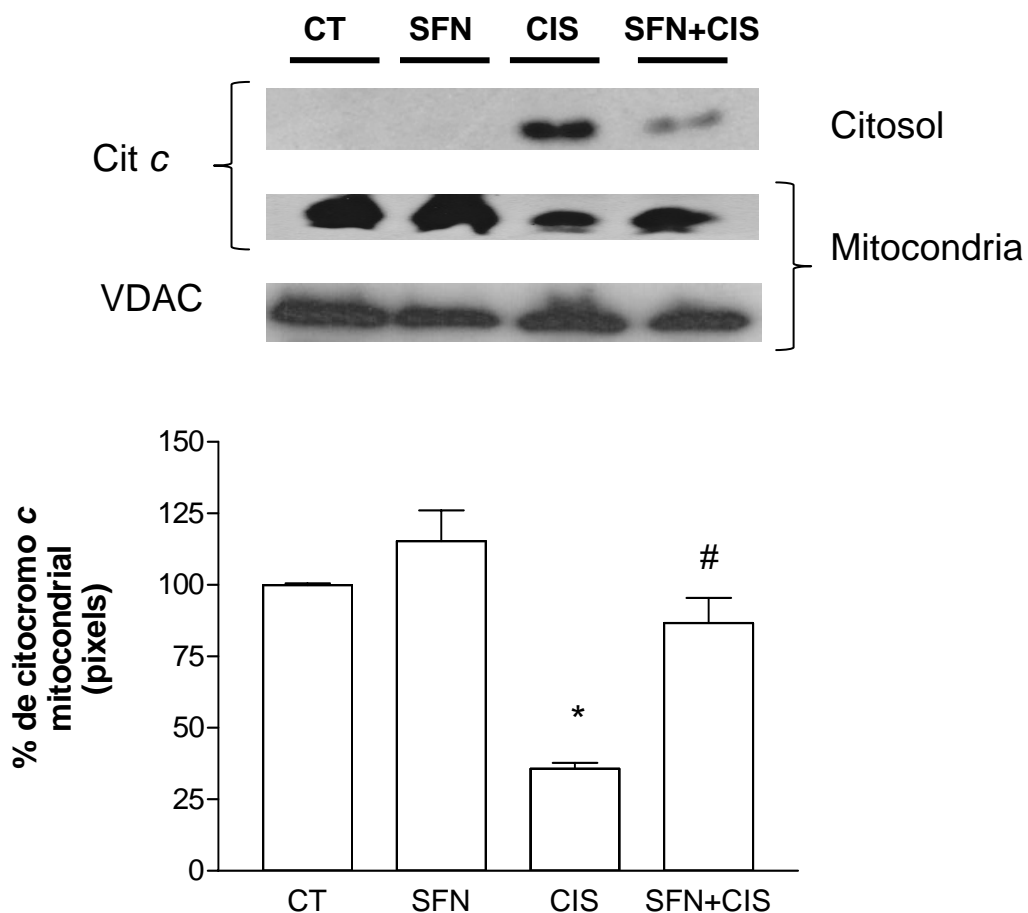
### 7.2.6 El sulforafano previene la liberación de citocromo c

Muchos informes indican que la apertura del mPTP es un mecanismo importante para la activación de la apoptosis por la vía mitocondrial, ya que la apertura de mPTP permite la liberación de citocromo c (Doran y Halestrap, 2000). Se piensa que la liberación del citocromo c al citosol, es esencial para la activación de la caspasa-9 y la subsecuente activación de la caspasa-3 (Li et al., 1997). Para determinar si la apertura del mPTP susceptible a  $\text{Ca}^{2+}$  observada en las mitocondrias de las ratas del grupo CIS (Fig. 13), está relacionada con la liberación de citocromo c de las mitocondrias y si el tratamiento con SFN puede prevenir esta liberación; se sometió a las mitocondrias de cada grupo experimental a una sobrecarga de calcio (100  $\mu\text{M}$ ). Se recuperó el sobrenadante (citosol), así como el botón mitocondrial y se midió el contenido de citocromo c por western

blot. El contenido de citocromo c en las mitocondrias del grupo CIS disminuyó en comparación con todos los demás grupos experimentales. Dicha disminución está asociada a un mayor contenido de citocromo c en el citosol de este grupo experimental en comparación con los grupos CT, SFN y SFN+CIS (Fig. 14). Estos resultados indican que el daño que permite la pérdida de la integridad estructural mitocondrial inducido por el CIS, es atenuado por el SFN.



**Figura 13.** Transporte de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial en los grupos de ratas estudiadas. La captación y liberación de Ca<sup>2+</sup> se determinaron por los cambios de absorbencia del Arsenazo III. CaCl<sub>2</sub> (100μM) estuvo presente en el medio antes de agregar las mitocondrias. CSA 0.2 μM fue usado como control. Los trazos son representativos de al menos tres experimentos diferentes.

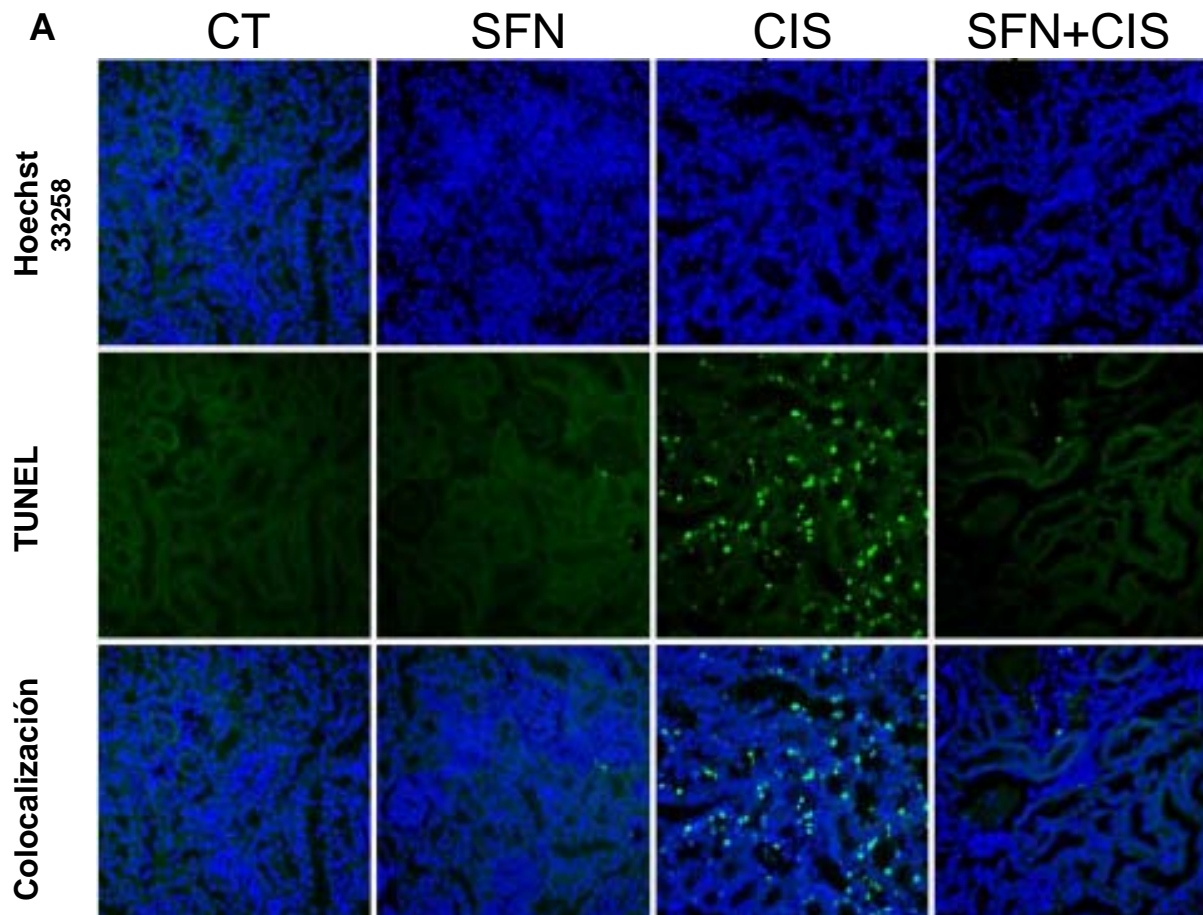


**Figura 14.** Contenido de citocromo *c* (Cit *c*) en las mitocondrias después de una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en los cuatro grupos de ratas estudiadas. Los anticuerpos para citocromo *c* y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) fueron utilizados de la manera descrita en el inciso 6.13. El contenido de VDAC se usó como marcador de carga en las muestras mitocondriales. El panel superior presenta una imagen de western blot representativa, mientras que el panel inferior presenta el análisis de la intensidad relativa expresada en píxeles del contenido de citocromo *c* en las mitocondrias y del citocromo *c* liberado de las mitocondrias tras la exposición a  $\text{Ca}^{2+}$ . Prom $\pm$ EEM. n=3. \*p<0.001 vs. CT; #p<0.01 vs. CIS.

### 7.3 El sulforafano previene la muerte celular e inflamación inducidas por cisplatino

#### 7.3.1 El sulforafano previene la muerte celular inducida por cisplatino

La muerte celular se evaluó por los ensayos de fragmentación del ADN, TUNEL, caspasa-3 renal y la actividad de las caspasas-3/7 (Figs. 15 y 16). Como se presenta en la figura 15, el número de células apoptóticas positivas para TUNEL y la fragmentación del ADN se incrementó en los grupos de ratas tratadas con CIS en ~54 células positivas-TUNEL/mm<sup>2</sup> y 1.9 veces, respectivamente (Fig. 15 A, B, C). El tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS previno significativamente el incremento en el número de células apoptóticas para TUNEL y la fragmentación del ADN. No se observaron diferencias significativas entre los grupos CT y SFN (Fig. 15 A, B, C).



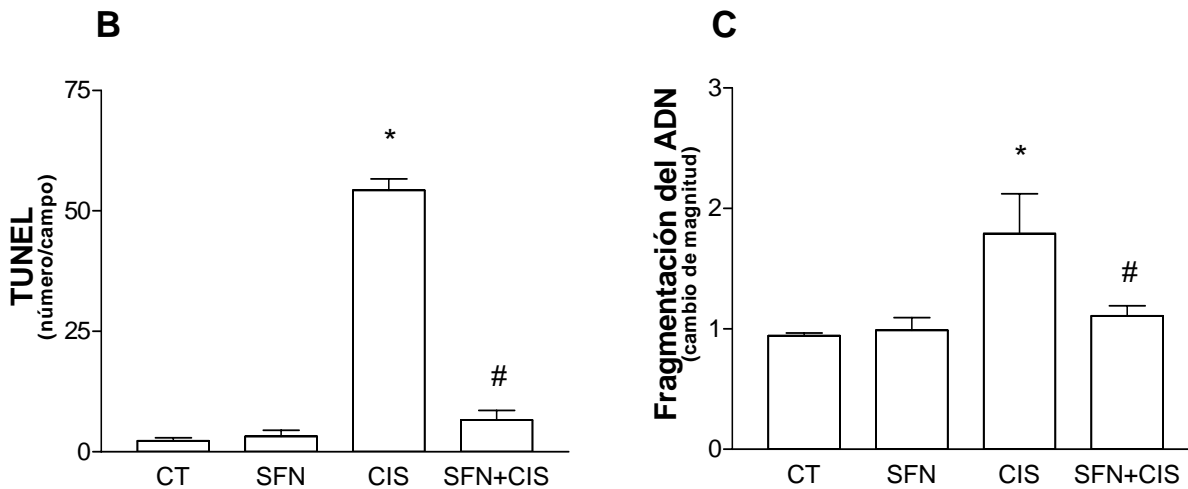
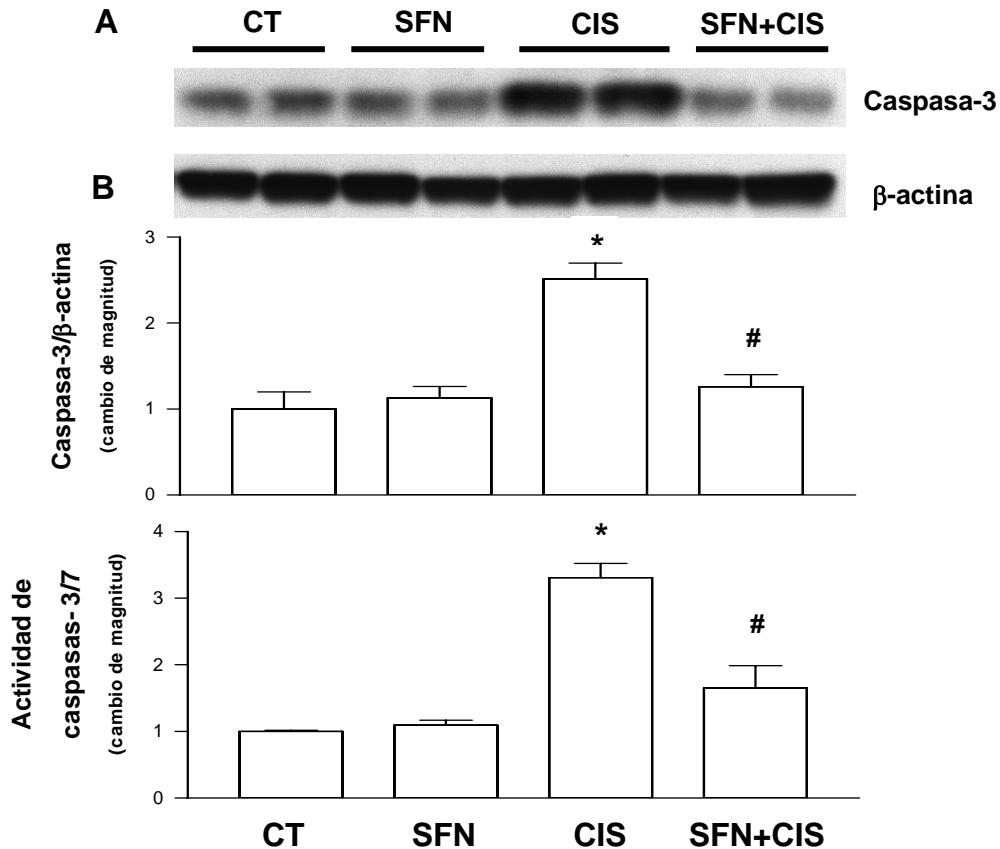


Figura 15. El tratamiento con SFN previene la muerte celular inducida por CIS. (A) Las células apoptóticas se evaluaron con tinción fluorescente para TUNEL. Como se presenta en las imágenes representativas (aumento original 200x), el CIS incrementó notablemente el número de células positivas para TUNEL (en verde) en el riñón (panel central). En el panel superior se presenta la tinción nuclear con Hoechst 33258 (en azul) y en el panel inferior la colocalización con TUNEL. (B) Análisis cuantitativo del estudio de TUNEL (número de células/campo) en los cuatro grupos de ratas estudiadas. El número de células positivas para TUNEL se atenuó con el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS en comparación con el grupo CIS. (C) Estudio de fragmentación del ADN. El CIS incrementó ampliamente la fragmentación del ADN; el tratamiento con SFN previno este daño al ADN. Prom $\pm$ EEM. n=5. \*p<0.001 vs. CT y SFN; #p<0.001 vs. CIS (B); \*p<0.05 vs. CT y SFN; #p<0.05 vs. CIS (C).

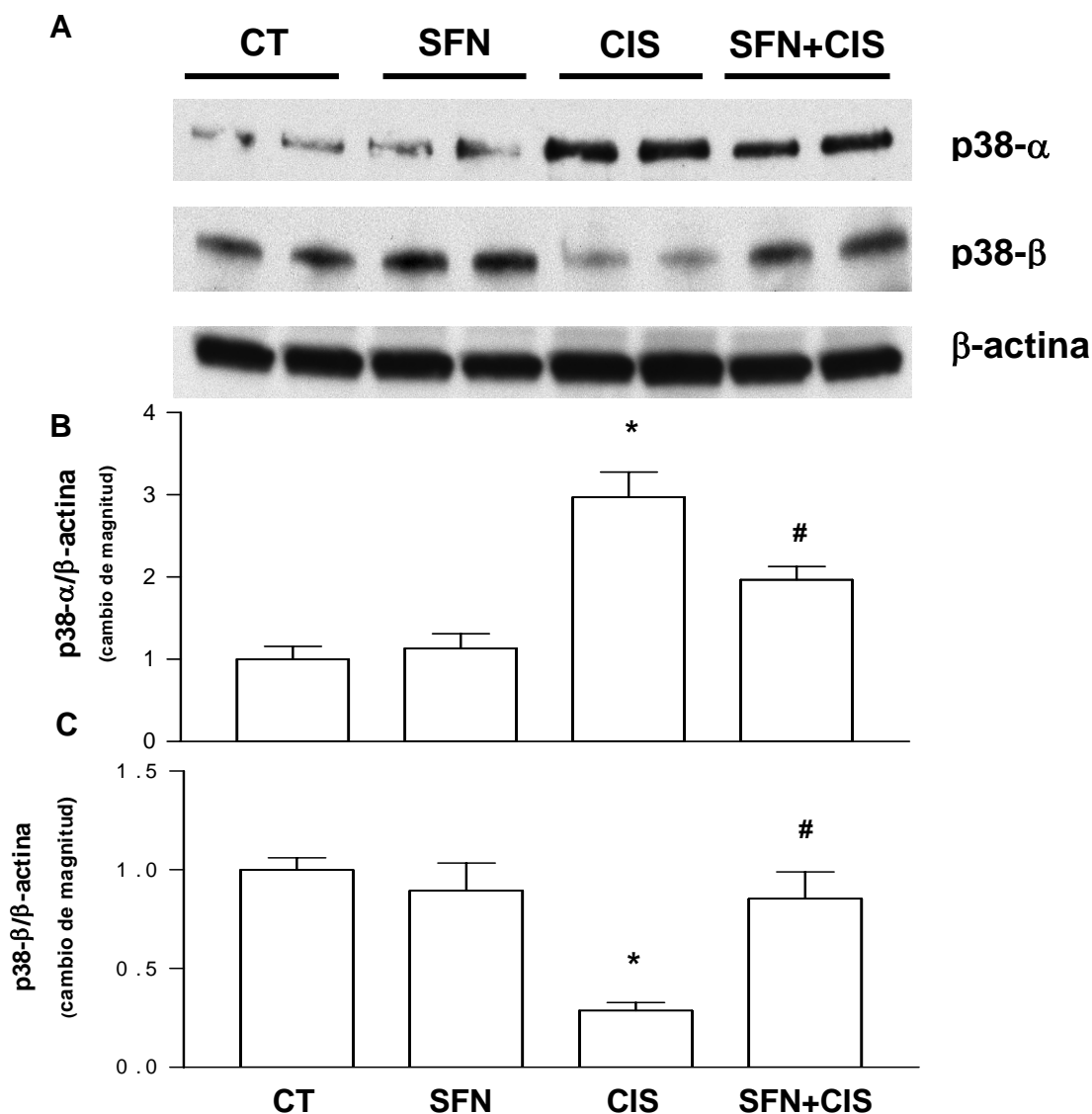
También se midió la actividad de las caspasas-3/7 y se realizó la cuantificación de la cantidad de la caspasa-3 por western blot. Se observó que la actividad de las caspasas-3/7 y la cantidad de caspasa-3 en homogenados de riñón aumentó 3.45- y 2.51 veces, respectivamente, en el grupo tratado con CIS en comparación con el grupo CT (Fig. 16); estos aumentos se previnieron significativamente por el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS (Fig. 16). No se observaron diferencias significativas entre los grupos CT y SFN.



**Figura 16.** El tratamiento con SFN previene la muerte celular inducida por CIS al disminuir la actividad de las caspasas-3/7 y el contenido de caspasa-3. El contenido y la actividad de la caspasa-3 y caspasas-3/7 en los homogenados renales aumentaron ampliamente en el grupo tratado con CIS. El tratamiento con SFN previno significativamente este incremento. Prom $\pm$ EEM. n=4 (B), n=5 (C). \*p<0.001 vs. CT y SFN; #p<0.001 vs. CIS (A y B).

### 7.3.2 El sulforafano previene el aumento de p38- $\alpha$ y la disminución de p38- $\beta$ MAPK mediado por cisplatino

Como se presenta en la figura 17 A y B, el SFN redujo significativamente la expresión de p38- $\alpha$  en el grupo SFN+CIS (1.97 veces vs. CT) en comparación con el grupo tratado con CIS (2.97 veces vs. CT). De forma interesante, el tratamiento con SFN fue capaz de prevenir la disminución en la expresión de p38- $\beta$  (0.85 veces vs. CT) en el grupo tratado con CIS (0.29 veces vs. CT) (Fig. 17 A y C). No se observaron diferencias significativas entre los grupos CT, SFN y SFN+CIS (Fig. 17).

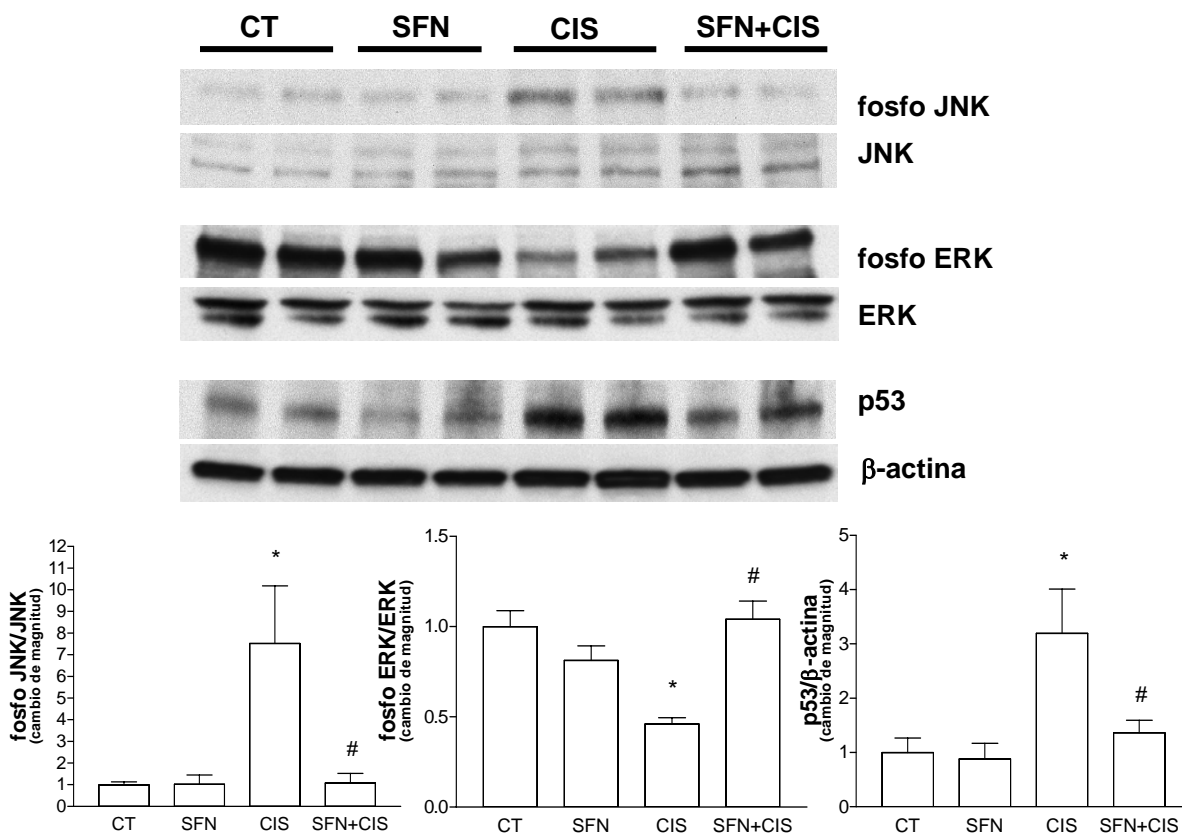


**Figura 17.** El tratamiento con SFN previene el incremento de p38-α y la disminución de p38-β MAPK mediada por CIS. Prom±EEM. n=4. \*p<0.001 vs. CT y SFN; #p<0.05 vs. CIS (B); \*p<0.001 vs. CT y SFN; #p<0.05 vs. CIS (C).

### 7.3.3 La inducción de MAPK por cisplatino es atenuado por sulforafano

El tratamiento con CIS indujo una marcada fosforilación en la fosfo JNK renal y la inducción de p53 (7.52- y 3.19 veces, respectivamente, en comparación con el grupo CT) y la defosforilación de la fosfo ERK (disminuyó a 0.46 veces vs. CT) (Fig. 18). El tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS previno significativamente la activación de estas MAPK (Fig. 18). No se observaron diferencias significativas entre los grupos CT y SFN (Fig. 18).

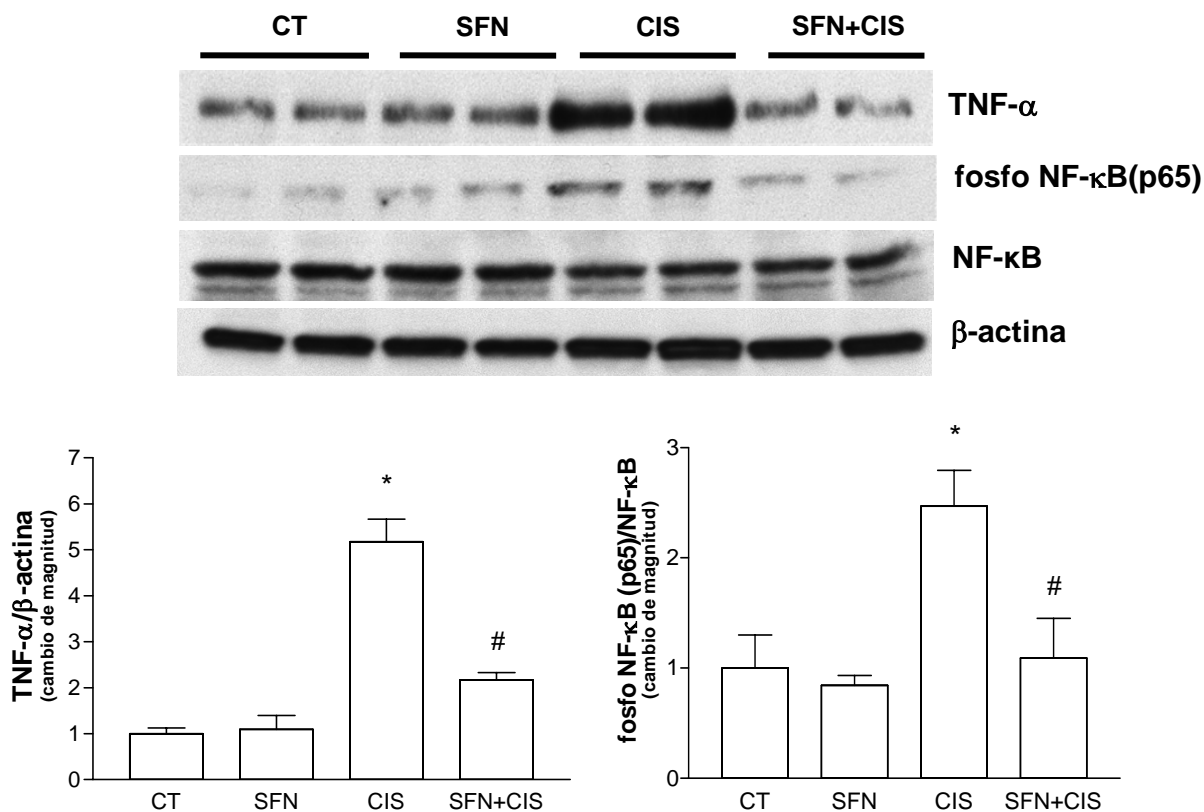




**Figura 18.** La activación de las MAPK inducida por CIS es atenuada por el tratamiento con SFN. Prom±EEM. n=4. \*p<0.05 vs. CT y SFN; #p<0.05 vs. CIS (fosfo JNK); \*p<0.001, \*p<0.05 vs. CT y SFN, respectivamente; #p<0.05 vs. CIS (fosfo ERK); \*p<0.05 vs. CT y SFN; #p<0.05 vs. CIS (p53).

### 7.3.4 El tratamiento con sulforafano previene la respuesta inflamatoria

El grupo tratado con CIS presentó un marcado incremento en los niveles de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  y de su blanco citosólico fosfo NF- $\kappa$ B (p65) (5.18- y 2.47 veces, respectivamente vs. el grupo CT) (Fig. 19). Como se demostró en los resultados previos, el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS produjo una disminución significativa en la expresión de estos elementos proinflamatorios inducidos por el tratamiento con CIS (Fig. 19). No se observaron diferencias significativas entre los grupos CT y SFN (Fig. 19).



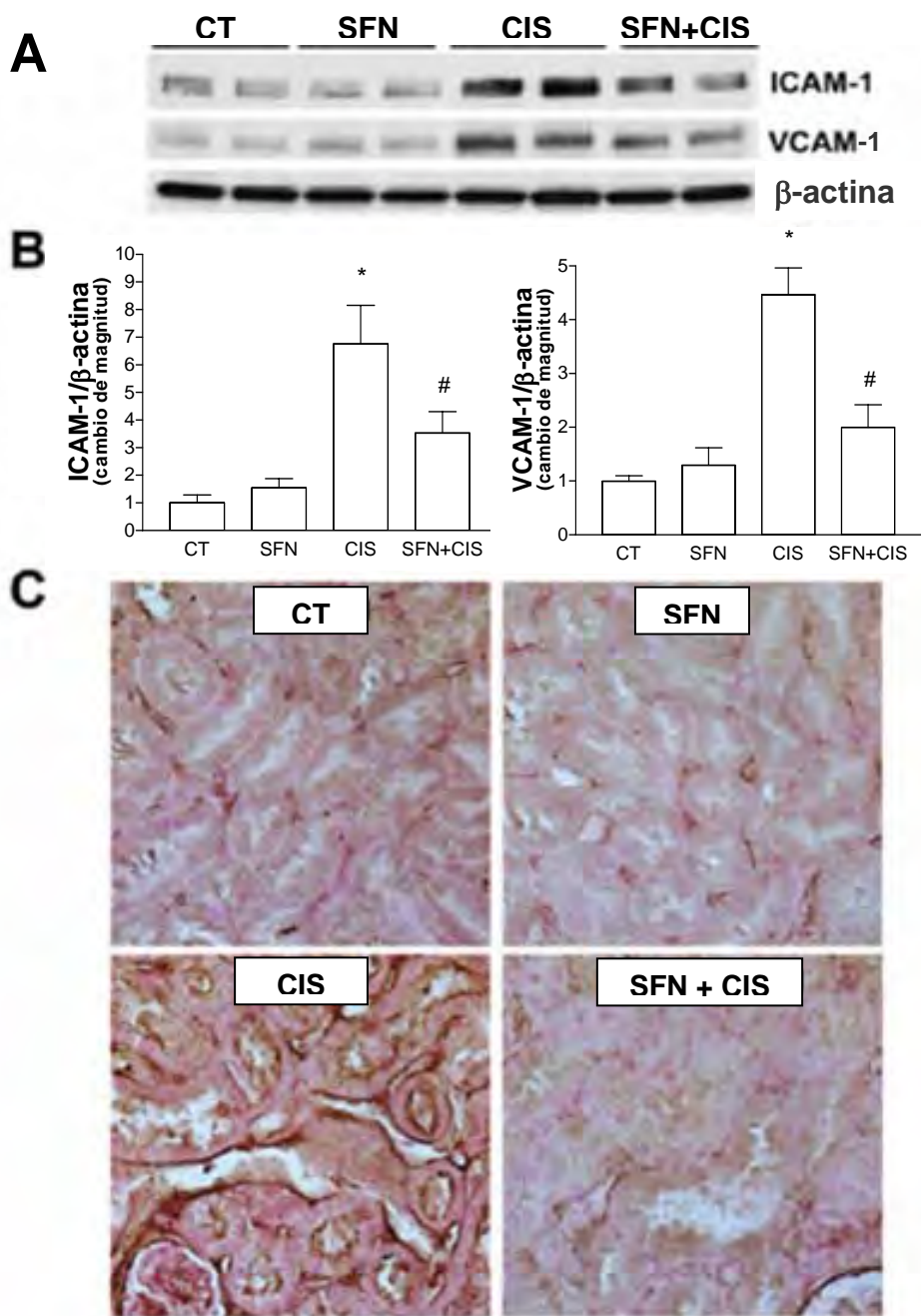
**Figura 19.** El tratamiento con SFN previene la respuesta inflamatoria en los riñones de las ratas tratadas con SFN+CIS. Prom±EEM. n=4. \*p<0.001 vs. CT y SFN; # p<0.001 vs. CIS (TNF-α); \*p<0.001 vs. CT y SFN; # p<0.05 vs. CIS [fosfo NF-κB (p65)].

### 7.3.5 El tratamiento con sulforafano previene la expresión de moléculas de adhesión y la infiltración de células inflamatorias renales

Como se presenta en la figura 20 A y B, el tratamiento con CIS indujo la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, 6.76- y 4.47 veces, respectivamente, en comparación con el grupo CT. La expresión de ICAM-1 fue evidente por su elevada e intensa tinción en los tejidos renales del grupo tratado con CIS (Fig. 20 C). Estos incrementos en la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y la tinción para ICAM-1 se previnieron por el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS (Fig. 20 A, B y C). No se observaron diferencias significativas entre los grupos CT y SFN (Fig. 20).

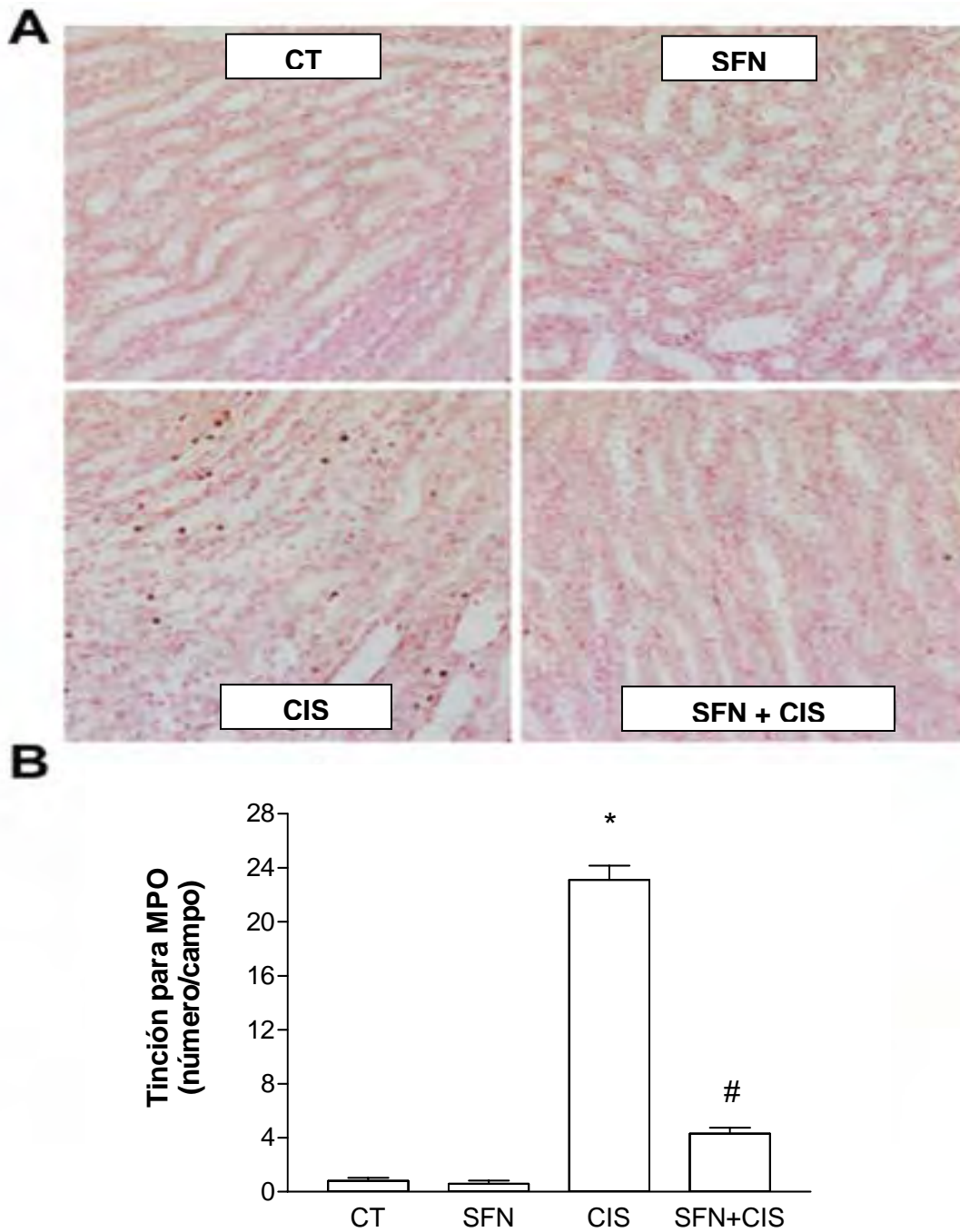
Por otra parte, el tratamiento con CIS incrementó el número de células inflamatorias positivas para MPO alrededor de las áreas dañadas (evidencia de

infiltración de neutrófilos y macrófagos) a ~33 células/campo en comparación con el grupo CT (Fig. 21 A y B). La infiltración de neutrófilos y macrófagos se previno significativamente por el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS (Fig. 21 A y B). No se observaron diferencias significativas entre los grupos CT y SFN (Fig. 21 A y B).



**Figura 20.** El tratamiento con SFN previene el aumento en la expresión de moléculas de adhesión renal (ICAM-1, VCAM-1). Prom $\pm$ EEM. n=4 (A y B), n=5 (C). \*p<0.001 vs. CT y SFN; #p<0.05 vs.

CIS (ICAM-1); \* $p < 0.001$  vs. CT y SFN; # $p < 0.001$  vs. CIS (VCAM-1).



**Figura 21.** El tratamiento con SFN previene la infiltración de células inflamatorias renales inducido por CIS. El CIS incrementó significativamente el número de células renales positivas para MPO alrededor de las estructuras tubulares dañadas (400x amplificación original). El tratamiento con SFN previno significativamente la infiltración de neutrófilos y macrófagos en el grupo SFN+CIS. Prom $\pm$ EEM. n=5. \* $p < 0.001$  vs. CT y SFN; # $p < 0.001$  vs. CIS.

## 8. DISCUSIÓN

### Efecto del sulforafano en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino

En el presente estudio realizado en células LLC-PK1 y en ratas Wistar macho se demostró el efecto renoprotector por el tratamiento con el antioxidante indirecto SFN contra la nefrotoxicidad inducida por CIS. En este estudio se utilizaron células LLC-PK tomando en cuenta que estas células tienen las mismas características morfológicas y bioquímicas de las células del segmento S3 (Kim et al., 2006). El segmento S3 en el túbulo proximal es el sitio de mayor daño inducido por CIS en el riñón (Pabla y Dong, 2008). Previamente en nuestro laboratorio se demostró que el pretratamiento de las células LLC-PK con SFN (0.5-5  $\mu$ M) resultó en una protección substancial dependiente de la concentración contra el daño inducido por CIS y se observó que el pretratamiento con SFN (5 $\mu$ M) incrementó la viabilidad a un 90.1 $\pm$ 4.7% (cerca de las observadas en el grupo CT). Se pensó que esta protección se debía a la capacidad bien caracterizada del SFN para inducir enzimas citoprotectoras a través de la vía Nrf2 (Thimmulappa et al., 2002; Innamorato et al., 2008; Yoon et al., 2008; Dinkova-Kostova y Talalay, 2008; Angeloni et al., 2009). En este trabajo se corroboró efectivamente que la incubación con SFN induce la traslocación al núcleo del factor de transcripción Nrf2 (Fig. 7). Este resultado obtenido *in vitro*, impulsó a abordar *in vivo*, el efecto protector potencial del SFN en el daño renal inducido por CIS.

En los estudio *in vivo*, se demostró que las ratas tratadas con CIS desarrollaron daño renal caracterizado por el incremento en los niveles plasmáticos de creatinina y BUN y la disminución en la depuración de creatinina. El tratamiento con SFN redujo esta disfunción renal inducida por CIS, demostrado por la atenuación de los marcadores arriba mencionados (Fig. 1). La nefrotoxicidad inducida por CIS también se caracterizó por la proteinuria, la disminución en la actividad de la enzima GPx-p y el incremento en la excreción urinaria de

NAG, que son marcadores de daño tubular. El tratamiento con SFN también fue capaz de atenuar los efectos en estos marcadores en el grupo SFN+CIS (Fig. 2).

Los resultados arriba mencionados, estuvieron en concordancia con nuestros estudios histopatológicos evaluados utilizando las tinciones H&E y PAS, demostrando la presencia de polisacáridos en la luz tubular, apoptosis, necrosis y vacuolización en las células epiteliales de las ratas tratadas con CIS. Se encontró que las ratas del grupo SFN+CIS presentaron menor daño tisular con pocas células epiteliales tubulares afectadas mostrando una arquitectura casi normal como las del grupo CT (Fig. 3).

El efecto renoprotector del SFN observado en este estudio se relacionó directamente con la disminución del estrés nitrante y oxidante presentado en la nefrotoxicidad inducida por CIS (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009; Pérez-Rojas et al., 2009). La inmunotinción para 3-NT, un marcador para estrés nitrante, se atenuó significativamente en las ratas tratadas con SFN (Fig. 3). La inducción de 4-HNE por CIS, un marcador de lipoperoxidación, se demostró por inmunotinción y un método espectrofotométrico. En ambos casos el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS fue capaz de atenuar el incremento de estos marcadores (Figs. 3, 4 y 5). Además, se observó la disminución en los niveles de GSH y el incremento en la excreción urinaria de  $H_2O_2$  en las ratas tratadas con CIS, apoyando la idea del daño inducido por estrés oxidante. Esto se corroboró ya que el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS atenuó la alteración de estos dos marcadores de estrés oxidante (Fig. 5).

Yoon et al. (2008) también observaron una renoprotección mediada por SFN contra el daño inducido por isquemia y reperfusión renal. Ellos observaron que el efecto protector se asoció con la disminución en la depleción de GSH y el incremento de la lipoperoxidación secundarios a la isquemia y reperfusión en las ratas.

Finalmente, se observó que el tratamiento con SFN fue capaz de atenuar la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GPx y GST inducida por CIS (Fig. 6). La disminución en la actividad de estas enzimas pudo haber estado relacionada con el estrés oxidante observado en las ratas tratadas

con CIS. Estos datos sugieren que el efector renoprotector del SFN *in vivo* fue mediado, en parte, por la conservación de la actividad de estas enzimas antioxidantes.

En resumen, estos datos demuestran el efecto renoprotector del SFN contra la nefrotoxicidad inducida por CIS. Este efecto protector se asoció con la disminución del estrés oxidante/nitrante y la conservación de las enzimas antioxidantes.

### **Efecto del sulforafano contra las alteraciones mitocondriales inducidas por cisplatino**

Como ya se mencionó anteriormente, el uso clínico del CIS para el tratamiento de distintos cánceres está restringido por su nefrotoxicidad. Muchos trabajos han demostrado que los antioxidantes previenen la disfunción mitocondrial inducida por CIS (Santos et al., 2008; Rodrigues et al., 2010), pero pocos se han hecho con antioxidantes de origen natural (Martínez-Abundis et al., 2010). Por esta razón, en este estudio se evaluó el efecto del SFN contra las alteraciones mitocondriales inducidas por CIS.

Ya que la generación de las ERO está relacionada directamente con la nefrotoxicidad inducida por CIS (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009) y la mitocondria es el principal sitio en la generación de éstas. En este trabajo se examinó el efecto protector del SFN contra la disfunción mitocondrial y el estrés oxidante inducidos por este fármaco.

El daño oxidante mitocondrial se ha observado como un evento temprano en la disfunción renal inducida por CIS (Gordon y Gattone 2nd, 1986). Los niveles de GSH, mantenidos en parte por el sistema de defensa antioxidante mitocondrial, disminuyen en la mitocondria en un 70% luego del tratamiento con CIS (Kuhlmann et al., 1997); incluso la actividad de la aconitasa, enzima importante en la función mitocondrial, disminuye por el tratamiento con CIS como consecuencia del estrés oxidante (Santos et al., 2007). En este estudio se demostró que el tratamiento con SFN previno la depleción de GSH y preservó la actividad de la aconitasa (Figs. 8 y

9, respectivamente). Es muy probable que lo anterior se deba a la conservación del sistema de defensa de las enzimas antioxidantes (Fig. 6).

En este estudio también se observó que la disfunción mitocondrial inducida por CIS que dio como resultado la disminución en el estado 3 de la respiración, el CR y la respiración desacoplada, y el incremento en el estado 4 de la respiración se previnieron por el tratamiento con SFN (Figs. 10 y 11). La inhibición de los complejos I al IV de la cadena respiratoria por el CIS, que promueve el desacople en la síntesis del ATP mitocondrial (Kruidering et al., 1997), también se previno por el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS (Fig. 12). Este resultado concuerda con nuestro resultado anterior en el cual el CIS afectó la actividad de la aconitasa, enzima relacionada directamente con la producción de ATP así como la disminución en la fosforilación oxidante ocasionadas por la disfunción mitocondrial (Kruidering et al., 1997).

En experimentos con mitocondrias aisladas (Byrne et al., 1999) se ha demostrado que los peróxidos, como el tert-butil hidroperóxido (t-BOOH), promueven la apertura del mPTP en presencia de pequeñas cantidades de  $Ca^{2+}$ . Es por esto, que el estrés oxidante es considerado como un jugador importante en la promoción del mPTP inducido por  $Ca^{2+}$  (Valle et al., 1993). Por lo tanto, dado el papel fundamental de la conservación de la capacidad antioxidante mitocondrial en la supervivencia celular y que el SFN tiene la capacidad de mantener y mejorar en el riñón el estatus antioxidante mitocondrial (Fig. 8) y la integridad mitocondrial (Figs. 9, 10, 11 y 12), es muy probable que la nefroprotección contra el daño inducido por CIS se deba al SFN. En este trabajo, también se demostró que el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS fue capaz de prevenir la apertura del mPTP inducido por  $Ca^{2+}$  observado en el grupo tratado con CIS (Fig. 13), indicando que este compuesto y el estatus antioxidante mitocondrial están relacionados con la mejora y/o conservación de la función y la integridad estructural mitocondrial.

En este contexto, la liberación de citocromo c al medio se mantiene como un canon de la vía de activación apoptótica mitocondrial que desencadena en la muerte celular (Correa et al., 2007, 2008a) y a su vez, el proceso de



permeabilización inespecífico dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido asociado con la liberación de citocromo *c*. En la figura 14 se demostró que el tratamiento con SFN evita la liberación de citocromo *c* en las mitocondrias del grupo SFN+CIS expuestas a una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , esto en concordancia con los resultados presentados en la figura 13.

En resumen, estos datos demuestran que el SFN es capaz de prevenir las alteraciones mitocondriales inducidas por CIS asociadas con la atenuación del estrés oxidante, haciendo de este potente inductor natural de enzimas de fase II un buen candidato para el tratamiento contra la nefrotoxicidad inducida por CIS y las disfunciones mitocondriales.

### **Efecto del sulforafano contra la inflamación y la muerte celular inducidas por cisplatino**

En estudios previos utilizando células renales y no renales se ha documentado que el SFN previene el daño contra el estrés oxidante, isquemia y reperfusión, diabetes y cáncer, entre muchas otras (Yoon et al., 2008; Davis et al., 2009). En este estudio se demostró que el SFN protege de la muerte celular (apoptosis medida por las células positivas para TUNEL) y la fragmentación del ADN (Fig. 15).

La activación de las caspasas es un paso clave en el génesis de la apoptosis, donde las caspasas-3/7 representan el paso final en la ejecución de este mecanismo de muerte celular. Muchos estudios han demostrado que el CIS induce apoptosis en las células renales con la activación de las caspasas ejecutoras (Cummings y Schnellmann, 2002; Kumar et al., 2009; Mukhopadhyay et al., 2010). En este trabajo se demostró que la activación de las caspasas se previno por el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS (Fig. 16).

La p38 MAPK existe en cuatro isoformas: p38- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ . Dos de las cuatro isoformas de p38 MAPK (- $\alpha$ , - $\beta$ ), parecen tener un papel regulatorio en modelos de preacondicionamiento cardíaco e isquemia y reperfusión, donde la p38- $\beta$  potencia la vía de supervivencia y la p38- $\alpha$  potencia la vía de muerte (Das et al., 2006;

Mukherjee et al., 2008). En este estudio se demostró que el tratamiento con SFN redujo significativamente la expresión de p38- $\alpha$  en el grupo SFN+CIS en comparación con el grupo CT. De forma interesante, el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS fue capaz de prevenir la disminución en la expresión de la p38- $\beta$  de sobrevivencia mostrado en el grupo CIS (Fig. 17). La fosfo JNK y la fosfo ERK pertenecen a la familia de las MAPK, y estas enzimas se han relacionado en la patogénesis de una variedad de desórdenes humanos y efectos citoprotectores (Wang et al., 2000; Francescato et al., 2007). Aquí se demostró que la activación de las fosfo JNK y fosfo ERK inducidas por CIS se previno por el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS (Fig. 18). p53, se mantiene como uno de los genes supresores de tumores más poderosos en el cáncer humano así como un regulador en la nefrotoxicidad inducida por CIS (Jiang et al., 2007; Francescato et al., 2007); en este estudio se demostró que el SFN también previno significativamente la activación de p53 mediada por CIS (Fig. 18).

Las vías de señalización de JNK y p38 MAPK son activadas por citocinas proinflamatorias o en respuesta a estrés celular como el estrés oxidante, osmótico o genotóxico (Francescato et al., 2007). Se ha demostrado que el CIS induce el incremento en la expresión la citocina inflamatoria TNF- $\alpha$  (Ramesh et al., 2003; Ramesh y Reeves, 2003; Pan et al., 2009), lo que permite a su vez la activación de NF- $\kappa$ B como resultado de las ERO producidas (Sung et al., 2008). La activación de NF- $\kappa$ B juega un papel importante en el daño renal inducido por CIS (Akca et al., 2009). En este trabajo se demostró, en concordancia con otros protocolos previos, que la expresión de TNF- $\alpha$  inducida por CIS y la subsiguiente fosforilación de NF- $\kappa$ B (p65) se previno por el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS (Fig. 19).

La inflamación juega un papel fisiológico importante en la nefrotoxicidad inducida por CIS; de hecho la administración de CIS incrementa la infiltración de leucocitos y macrófagos (Sung et al., 2008; Mukhopadhyay et al., 2010) y de moléculas de adhesión como la ICAM-1 (Kang et al., 2009) a las 72 h en los tejidos renales dañados. En este trabajo se encontró que la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en los riñones de las ratas tratadas con CIS (Fig. 20), que promueve la

adhesión de células inflamatorias facilitando a su vez el aumento en el reclutamiento de estas células y la subsiguiente activación y daño renal interrelacionado fue prevenida por el tratamiento con SFN en el grupo SFN+CIS (Figs. 20 y 21).

En este trabajo se demostró que la inflamación y la muerte celular inducidas por CIS fueron prevenidas por el tratamiento con SFN. Lo cual es particularmente interesante debido a que el SFN es un inductor natural de enzimas antioxidantes de fácil accesibilidad y bajo costo, y su eficacia ha sido probada por la reducción y prevención de diferentes enfermedades humanas (Guerrero et al., *en prensa*).

Aunque este estudio ha demostrado que la administración del SFN fue capaz de atenuar o prevenir el daño renal inducido por CIS, este no abordó la pregunta sobre la posible interferencia del SFN con la eficacia quimioterapéutica del CIS, lo cual es una posible limitante. Sin embargo, con base en múltiples informes que demuestran los efectos anticancerígenos del SFN por sí mismo (que incluye la inhibición de la desacetilación de histonas, la detención del ciclo celular, la inhibición del crecimiento celular y la inducción de la apoptosis, entre muchos otros mecanismos) en estudios de células humanas de hígado, colon, próstata, mama, ovario, vejiga y tumores malignos de células inmunes y estudios que indican la eficiencia del brócoli y del SFN en modelos de cáncer en animales (Jeffery y Keck, 2008), es más probable que el SFN mejore y potencie la eficacia quimioterapéutica del CIS. Esto último también es apoyado por las propiedades antiangiogénicas reportadas del SFN (Davis et al., 2009) y su efecto inhibitorio sobre la vía de transducción de señales de NF- $\kappa$ B observado en este trabajo. Además, recientemente se ha demostrado que el SFN no disminuye el potencial antitumoral del CIS (Di Pascua et al., 2010) y de hecho, en células cancerosas, éste puede mejorar su citotoxicidad (Kallifatidis et al., 2011).

Otra consideración importante a tratar es si la dosis administrada del SFN en nuestro estudio tiene alguna relevancia clínica humana. Esta es una pregunta muy difícil de responder; posiblemente debido a las diferencias en la cinética, la distribución y el metabolismo del compuesto en los seres humanos y en las ratas [por ejemplo, se ha reportado en humanos que el  $T_{1/2}$  del SFN es diez veces

mayor que en ratas (Hu et al., 2004; Shapiro et al., 2006)]. Sin embargo, los niveles plasmáticos de SFN en ratas alcanzan una concentración de  $46\pm 19$  ng/mL después de la administración de 0.5 mg/Kg de este isotiocianato (Hanlon et al., 2008), la misma dosis utilizada en el presente estudio. Niveles plasmáticos similares de SFN se reportaron en seres humanos después del consumo de brócoli:  $12\pm 1.6$  ng/mL (Hanlon et al., 2009) y  $18.2\pm 6.5$  ng/mL (Vermeulen et al., 2008), lo que sugiere que la dosis utilizada en el presente estudio puede tener relevancia clínica. Además, apoyando la idea de que el consumo regular de brócoli podría ejercer efectos terapéuticos, un estudio piloto ha encontrado que el consumo de sólo 68 g de brotes de brócoli fue capaz de inhibir la desacetilasa de histona (un objetivo putativo de las propiedades anticancerígenas del SFN) en células mononucleares de sangre periférica (Myzak et al., 2007). Es importante destacar que la dosis de SFN utilizada en el presente estudio también se encuentra en el rango de las concentraciones reportadas con efectos antitumorales en modelos animales de diversos tipos de cáncer (Jeffery et al., 2008).

En resumen, los resultados de este trabajo, junto con el potente efecto antitumoral del SFN reportado en múltiples estudios preclínicos y la evidencia epidemiológica que sugiere que la ingesta de verduras crucíferas como el brócoli el riesgo de cáncer en los seres humanos, son particularmente interesantes. Ensayos clínicos bien dirigidos para explorar el potencial benéfico de la suplementación de SFN y/o el consumo de brócoli en la prevención o el tratamiento del cáncer, o en contra de la nefropatía inducida por cisplatino, son el siguiente paso.

## 9. CONCLUSIONES

El SFN atenuó la disfunción renal, el daño estructural, el estrés oxidante/nitrante, la depleción de GSH, la excreción urinaria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la disminución de enzimas antioxidantes (CAT, GPx y GST), inducidos por CIS.

El SFN previno las alteraciones mitocondriales inducidas por CIS como la disminución en el consumo de oxígeno usando sustratos como succinato y malato/glutamate, la disminución de la actividad de la enzima aconitasa, la disminución del contenido de ATP y GSH, la inhibición en la captación de calcio mitocondrial, así como la liberación de citocromo c.

El SFN previno el incremento en la fragmentación del ADN, la actividad de caspasas-3/7 y TUNEL, la activación de varias vías de muerte celular y proinflamatorias (p53, JNK, p38- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B y MPO), la disminución de mecanismos de sobrevivencia (ERK y p38- $\beta$ ), y el incremento en la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1, inducidos por CIS.

## 10. REFERENCIAS

- **Aebi H.** 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-6.
- **Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CL.** 2009. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm.* 2009:137072.
- **Al Janobi AA, Mithen RF, Gasper AV, Shaw PN, Middleton, RJ, Ortori CA, Barrett DA.** 2006. Quantitative measurement of sulforaphane, iberin and their mercapturic acid pathway metabolites in human plasma and urine using liquid chromatography-tandem electrospray ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 844: 223-34.
- **Angeloni C, Leoncini E, Malaguti M, Angelini S, Hrelia P, Hrelia S.** 2009. Modulation of phase II enzymes by sulforaphane: implications for its cardioprotective potential. *J Agric Food Chem.* 57: 5615-22.
- **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: C367-C375.
- **Avissar N, Slemmon JR, Palmer IS.** 1992. Partial sequence of human plasma GPx and immunologic identification of milk GPx the plasma enzyme. *J Nutr.* 12: 1243-9.
- **Baek SM, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim YK.** 2003. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med.* 142: 178-86.
- **Barnes PJ.** 2001. Cytokine-directed therapies for asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 108: S72-S76.
- **Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Pan H, El-Assal O, Rajesh M, Mukhopadhyay P, Hong F, Harvey-White J, Jafri A, Haskó G, Huffman JW, Gao B, Kunos G, Pacher P.** 2007. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J.* 21: 1788-1800.
- **Beal MF.** 2005. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol.* 58: 495-505.
- **Beinert H, Kennedy MC.** 1993. Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *FASEB J.* 7: 1442-9.
- **Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP.** 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta.* 1758: 994-1003.
- **Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L.** 2003. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 170: 191-203.
- **Botero-Omary M, Brovelli E, Pusateri D, David P, Rushing J, Fonseca J.** 2002. Sulforaphane potential and vitamin C concentration in developing heads and leaves of broccoli (*Brassica olearacea var*). *J Food Qual.* 26: 523-30.

- **Brady** HR, Brenner BM, Clarkson MR, Lieberthal W. 2000. Acute renal failure. The kidney. 6a ed. USA. pp. 1200-50.
- **Bränden** G, Pawate AS, Gennis RB, Brzezinsk P. 2006. Transmembrane proton translocation by cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1775: 1052-63.
- **Brandt** U. 1997. Proton-translocation by membrane-bound NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta.* 1318: 79-91.
- **Breimer** LH. 1990. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol Carcinog.* 3: 188-97.
- **Burdon** RH, Rice-Evans C. 1989. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic Res Commun.* 6: 345-58.
- **Burton** GW, Joyce A, Ingold KU. 1982. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet.* 2: 327-9.
- **Byrne** AM, Lemasters JJ, Nieminen AL. 1999. Contribution of increased mitochondrial free  $Ca^{+2}$  to the mitochondrial permeability transition induced by tert-butylhydroperoxide in rat hepatocytes. *Hepatology.* 29: 1523-31.
- **Calixto** JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. 2004. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 70: 93-103.
- **Cárdenas-Rodríguez** N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química.* 17: 164-173.
- **Chance** B, Maehly AC. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in enzymology.* New York: Academic. pp 764-5.
- **Chang** B, Nishikawa M, Sato E, Utsumi K, Inoue M. 2002. L-Cartinine inhibits cisplatin-induced injury of the kidney and small intestine. *Arch Biochem Biophys.* 405: 55-64.
- **Chang** L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature.* 410: 37-40.
- **Chiarugi** P, Fiaschi T. 2007. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal.* 19: 672-82.
- **Chirino** YI, Pedraza-Chaverri J. 2009. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol.* 61: 223-42.
- **Chirino** YI, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Pedraza-Chaverri J. 2008. Protective effects of apocynin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology.* 245: 18-23.
- **Ciarimboli** G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ, Haier J, Jaehde U, Zisowsky J, Schlatter E. 2005. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol.* 167: 1477-84.
- **Conaway** CC, Getahun SM, Liebes LL, Pusateri DJ, Topham DK, Botero-Omary M, Chung FL. 2000. Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutr Cancer.* 38: 168-78.

- **Correa F**, García N, Robles C, Martínez-Abundis E, Zazueta C. 2008a. Relationship between oxidative stress and mitochondrial function in the post-conditioned heart. *J Bioenerg Biomembr.* 40: 599-606.
- **Correa F**, García N, Robles C, Gallardo-Pérez JC, Carreño-Fuentes L, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Zazueta C. 2008b. Post-conditioning preserves glycolytic ATP during early reperfusion: A survival mechanism for the reperfused heart. *Cell Physiol Biochem.* 22: 635-44.
- **Correa F**, Soto V, Zazueta C. 2007. Mitochondrial permeability transition relevance for apoptotic triggering in the post-ischemic heart. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: 787-98.
- **Cuadrado A**, Nebreda AR. 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 429: 403-17.
- **Cummings BS**, Schnellmann RG. 2002. Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 302: 8-17.
- **Custódio JB**, Cardoso CM, Santos MS, Almeida LM, Vicente JA, Fernandes MA. 2009. Cisplatin impairs rat liver mitochondrial functions by inducing changes on membrane ion permeability: prevention by thiol group protecting agents. *Toxicology.* 259: 18-24.
- **D'Ambrosio D**, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. 2003. Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J Immunol Methods.* 273: 3-13.
- **Das S**, Fraga CG, Das DK. 2006. Cardioprotective effect of resveratrol via HO-1 expression involves p38 map kinase and PI-3-kinase signaling, but does not involve NFkappaB. *Free Radic Res.* 40: 1066-75.
- **Davidson JF**, Schiestl RH. 2001. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 21: 8483-9.
- **Davis R**, Singh KP, Kurzrock R, Shankar S. 2009. Sulforaphane inhibits angiogenesis through activation of FOXO transcription factors. *Oncol Rep.* 22: 1473-8.
- **Devarajan P**, Savoca M, Castaneda MP, Park MS, Esteban-Cruciani N, Kalinec G, Kalinec F. 2002. Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. *Hear Res.* 174: 45-54.
- **Dinarello CA**. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 118: 503-8.
- **Dinkova-Kostova AT**, Talalay P. 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res.* 52: S128-S138.
- **Di Pasqua AJ**, Hong C, Wu MY, McCracken E, Wang X, Mi L. 2010. Sensitization of non-small cell lung cancer cells to cisplatin by naturally occurring isothiocyanates. *Chem Res Toxicol.* 23:1307-9.
- **Doran E**, Halestrap A. 2000. Cytochrome c release from isolated mitochondria can occur independently of outer membrane rupture: possible role of contact sites. *Biochem J.* 348: 343-50.
- **Esworthy RS**, Chu FF, Paxton RJ. 1991. Characterization and partial sequence of human plasma GPx. *Arch Biochem Biophys.* 286: 330-6.
- **Fahey JW**, Talalay P. 1999. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol.* 37: 973-9.



- **Fahey** JW, Zalcmann AT, Talalay P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 56: 5-51.
- **Fahey** JW, Zhang Y, Talalay P. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 10367-72.
- **Farnebo** M, Bykov VJ, Wiman KG. 2010. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 396: 85-9.
- **Fenwick** GR, Heaney RK, Mullin WJ. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 18: 123-201.
- **Fernández-Checa** JC, Kaplowitz N. 1990. The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Anal Biochem*. 190: 212-9.
- **Fimognari** C, Lenzi M, Cantelli-Forti G, Hrelia P. 2008. Induction of differentiation in human promyelocytic cells by the isothiocyanate sulforaphane. *In Vivo*. 22: 317-20.
- **Fita** I, Rossman MG. 1985. The NADPH binding site on liver catalase. *Proc Nat Acad Sci USA*. 82: 1604-8.
- **Forman** HJ, Dickinson DA. 2003. Oxidative signaling and glutathione synthesis. *Biofactors*. 17: 1-12.
- **Forman** HJ, Torres M. 2001. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med*. 22: 189-216.
- **Francescato** HD, Costa RS, da Silva CG, Coimbra TM. 2009. Treatment with a p38 MAPK inhibitor attenuates cisplatin nephrotoxicity starting after the beginning of renal damage. *Life Sci*. 84: 590-7.
- **Francescato** HD, Costa RS, Scavone C, Coimbra TM. 2007. Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage. *Toxicology*. 230: 64-75.
- **Freeman** BD. 1984. Biological sites and mechanisms of free radical production. *Free radicals molecular biology, aging, and disease*. Raven, New York. pp 43-52.
- **Frey** TG, Mannella CA. 2001. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 25: 319-24.
- **Galgano** F, Favati F, Caruso M, Pietrafesa A, Natella S. 2007. The influence of processing and preservation on the retention of health-promoting compounds in broccoli. *J Food Sci*. 72: S130-S135.
- **Gardner** PR. 1997. Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling. *Biosci Rep*. 17: 33-42.
- **Gérard-Monnier** D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J. 1998. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol*. 11: 1176-83.
- **Gliszczyńska-Swigło** A, Ciska E, Pawlak-Lemańska K, Chmielewski J, Borkowski T, Tyrakowska B. 2006. Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. *Food Addit Contam*. 23: 1088-98.
- **Gordon** JA, Gattone VH 2nd. 1986. Mitochondrial alterations in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol*. 250: F991-F998.

- **Gruer** MJ, Artymiuk PJ, Guest JR. 1997. The aconitase family: three structural variations on a common theme. *Trends Biochem Sci.* 22: 3-6.
- **Guerrero-Beltrán** CE, Calderón-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. **Experimental and Toxicologic Pathology.** *En Prensa.*
- **Habig** WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249: 7130-9.
- **Haddad** JJ. 2002. Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 297: 700-13.
- **Hadju** J, Wyss SR, Aebi H. 1977. Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. *Eur J Biochem.* 80: 199-207.
- **Han** D, Ybanez MD, Ahmadi S, Yeh K, Kaplowitz N. 2009. Redox regulation of tumor necrosis factor signaling. *Antioxid Redox Signal.* 11: 2245-63.
- **Hanlon** N, Coldham N, Gielbert A, Sauer MJ, Ioannides C. 2009. Repeated intake of broccoli does not lead to higher plasma levels of sulforaphane in human volunteers. *Cancer Lett.* 284: 15-20.
- **Hanlon** N, Coldham N, Gielbert A, Kuhnert N, Sauer MJ, King LJ, Ioannides C. 2008. Absolute bioavailability and dose-dependent pharmacokinetic behaviour of dietary doses of the chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in rat. *Br J Nutr.* 99: 559-64.
- **Hansberg** W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico.* 26: 19-54.
- **Havir** EA, McHale NA. 1989. Enhanced peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley and maize. *Plant Physiol.* 91: 812-5.
- **Hayes** JD, Kelleher MO, Eggleston IM. 2008. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Eur J Nutr.* 47: 73-88.
- **Higdon** JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH. 2007. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacol Res.* 55: 224-36.
- **Hopkins** SJ. 2003. The pathophysiological role of cytokines. *Leg Med (Tokyo).* 5: S45-S57.
- **Howard** LA, Jeffery EH, Wallig MA, Klein BP. 1997. Retention of phytochemicals in fresh and processed broccoli. *J Food Sci.* 62: 1098-104.
- **Hu** R, Hebbar V, Kim BR, Chen C, Winnik B, Buckley B, Soteropoulos P, Toliás P, Hart RP, Kong AN. 2004. In vivo pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate sulforaphane in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 310: 263-71.
- **Huo** X, Su Dwang A, Zhai Y, Xu J, Li X, Bartlam M, Sun F, Rao Z. 2007. Preliminary molecular characterization and crystallization of mitochondrial respiratory complex II from porcine heart. *FEBS Journal.* 274: 1254-9.
- **Innamorato** NG, Rojo AI, García-Yagüe AJ, Yamamoto M, de Ceballos ML, Cuadrado A. 2008. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J Immunol.* 181: 680-9.

- **Itoh** K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 236: 313-22.
- **Itoh** K, Igarashi K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. 1995. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol Cell Biol.* 15: 4184-93.
- **Jaiswal** AK. 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.* 36: 1199-207.
- **Jeffery** EH, Keck AS. 2008. Translating knowledge generated by epidemiological and in vitro studies into dietary cancer prevention. *Mol Nutr Food Res.* 52: Suppl1: S7-17.
- **Jiang** DJ, Jia SJ, Dai Z, Li YJ. 2006. Asymmetric dimethylarginine induces apoptosis via p38 MAPK/caspase-3-dependent signaling pathway in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 40: 529-39.
- **Jiang** M, Wei Q, Pabla N, Dong G, Wang CY, Yang T, Smith SB, Dong Z. 2007. Effects of hydroxyl radical scavenging on cisplatin-induced p53 activation, tubular cell apoptosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 73: 1499-510.
- **Jung** D, Biggs H, Erikson J, Ledyard PU. 1975. New colorimetric reaction for endpoint, continuous-flow and kinetic measurement of urea. *Clin Chem.* 21: 1136-140.
- **Jung** K, Priem F, Klotzek S, Becker S, Henke W. 1991. Methods compared for determining activity of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: different sensitivity and species effect. *Enzyme.* 45: 215-21.
- **Jung** M, Hotter G, Viñas JL, Sola A. 2009. Cisplatin upregulates mitochondrial nitric oxide synthase and peroxynitrite formation to promote renal injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 234: 236-46.
- **Kaissling** B, Kriz W. 1979. Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 56:1-123.
- **Kallifatidis** G, Labsch S, Rausch V, Mattern J, Gladkich J, Moldenhauer G. 2011. Sulforaphane Increases Drug-mediated Cytotoxicity Toward Cancer Stem-like Cells of Pancreas and Prostate. *Mol Ther.* 19: 188-95.
- **Kang** KP, Kim DH, Jung YJ, Lee AS, Lee S, Lee SY, Jang KY, Sung MJ, Park SK, Kim W. 2009. Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by suppressing renal inflammation. *Nephrol Dial Transplant.* 24: 3012-20.
- **Kassahun** K, Davis M, Hu P, Martin B, Baillie T. 1997. Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat: identification of phase I metabolites and glutathione conjugates. *Chem Res Toxicol.* 10: 1228-33.
- **Katoh** Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M. 2001. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells.* 6: 857-68.

- **Kendrick** NC. 1976. Purification of arsenazo III, a Ca<sup>2+</sup>-sensitive dye. *Anal Biochem.* 76: 487-501.
- **Kim** YH, Kim YW, Oh YJ, Back NI, Chung SA, Chung HG, Jeong TS, Choi MS, Lee KT. 2006. Protective effect of the ethanol extract of the roots of *Brassica rapa* on cisplatin-induced nephrotoxicity in LLC-PK<sub>1</sub> cells and rats. *Biol Pharm Bull.* 29: 2436-41.
- **Kirkman** HN, Gaetani GF. 1984. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Nat Acad Sci USA.* 81: 4343-7.
- **Kong** AN, Owuor E, Yu R, Hebbar V, Chen C, Hu R, Mandlekar S. 2001. Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab Rev.* 33: 255-71.
- **Kore** AM, Spencer GF, Wallig MA. 1993. Purification of the omega-(methylsulfinyl) alkyl glucosinolate hydrolysis products: 1-isothiocyanato-3-(methylsulfinyl)propane 1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)butane 4-(methylsulfinyl) butanenitrile and 5-(methylsulfinyl)pentanenitrile from broccoli and *Lesquerella fendleri*. *J Agric Food Chem.* 41: 89-95.
- **Kovacic** P, Pozos RS. 2006. Cell signaling (mechanism and reproductive toxicity): redox chains, radicals, electrons, relays, conduit, electrochemistry, and other medical implications. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 78: 333-44.
- **Kracht** M, Saklatvala J. 2002. Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine.* 20: 91-106.
- **Kroemer** G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 12: 1463-67.
- **Kruidering** M, Maasdam DH, Prins FA, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF. 1994. Evaluation of nephrotoxicity in vitro using a suspension of highly purified porcine proximal tubular cells and characterization of the cells in primary culture. *Exp Nephrol.* 2: 324-44.
- **Kruidering** M, Van de Water B, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF. 1997. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther.* 280: 638-49.
- **Kuhlmann** MK, Burkhardt G, Köhler H. 1997. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant.* 12: 2478-80.
- **Kumar** S, Allen DA, Kieswich JE, Patel NS, Harwood S, Harwood S, Mazzon E, Cuzzocrea S, Raftery MJ, Thiemermann C, Yaqoob MM. 2009. Dexamethasone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 20: 2412-25.
- **Kushad** MM, Brown AF, Kurilich AC, Juvik JA, Klein BP, Wallig MA, Jeffery EH. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *J Agric Food Chem.* 47: 1541-48.
- **Lam** KW, Wang L, Hong BS, Treble D. 1993. Purification of phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase from bovine retina. *Curr Eye Res.* 12: 9-15.

- **Laemmli** UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 1970.227: 680-5.
- Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. 2008. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res.* 58: 262-70.
- **Lawrence** RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 71: 952-8.
- **Lebwohl** D, Canneta R. 1998. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer.* 34: 1522-34.
- **Li** P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91: 479-89.
- **Liang** H, Li C, Yuan Q, Vriesekoop F. 2007. Separation and purification of sulforaphane from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.* 55: 8047-53.
- **Lin** W, Shen G, Yuan X, Jain MR, Yu S, Zhang A, Chen JD, Kong AN. 2006. Regulation of Nrf2 transactivation domain activity by p160 RAC3/SRC3 and other nuclear co-regulators. *J Biochem Mol Biol.* 39: 304-10.
- **Liu** H, Baliga R. 2005. Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol.* 16: 1985-92.
- **Lockwood** TD, Bosmann HB. 1979. The use of urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase in human renal toxicology. I. Partial biochemical characterization and excretion in humans and release from the isolated perfused rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol.* 49: 323-36.
- **Long** LH, Halliwell B. 2001. Antioxidant and prooxidant abilities of foods and beverages. *Methods Enzymol.* 335: 181-90.
- **Lowry** OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-75.
- **Luo** J, Tsuji T, Yasuda H, Sun Y, Fujigaki Y, Hishida A. 2008. The molecular mechanisms of the attenuation of cisplatin-induced acute renal failure by N-acetylcysteine in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 23: 2198-205.
- **Luster** AD. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 338: 436-45.
- **MacMillan-Crow** LA, Thompson JA. 1999. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 366: 82-8.
- **Maia** L, Duarte RO, Ponces-Freire A, Moura JJ, Mira L. 2007. NADH oxidase activity of rat and human liver xanthine oxidoreductase: potential role in superoxide production. *J Biol Inorg Chem.* 12: 777-87.

- **Maiorino** M, Chu F, Ursoni F. 1991. GPx-PH is the 18 KDa seleno proteins expressed in human tumor cell lines. *J Biol Chem.* 266: 7728-32.
- **Mannella** CA. 2006. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochem Biophys Acta.* 1762: 140-7.
- **Marklund** SL. 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79: 7634-8.
- **Martínez-Abundis** E, García N, Correa F, Hernández-Reséndiz S, Pedraza-Chaverri J, Zazueta C. 2010. Effects of alpha-mangostin on mitochondrial energetic metabolism. *Mitochondrion.* 10: 151-7.
- **Martins** NM, Santos NA, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. 2008. Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J Appl Toxicol.* 28: 337-44.
- **Massry** SG, Glasscock RJ. 1995. *Textbook of Nephrology.* 3a ed. Philadelphia. USA. pp 56-8.
- **Matusheski** NV, Wallig MA, Juvik JA, Klein BP, Kushad MM, Jeffery EH. 2001. Preparative HPLC method for the purification of sulforaphane and sulforaphane nitrile from *Brassica oleracea*. *J Agric Food Chem.* 49: 1867-72.
- **Maunsbach** AB. 1966. Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney. Comparison of results from phase contrast, fluorescence and electron microscopy. *J Ultrastruct Res.* 16: 239-58.
- **McNaughton** SA, Marks GC. Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates the biologically active constituents of cruciferous vegetables. 2003. *Br J Nutr.* 90: 687-97.
- **Moi** P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 9926-30.
- **Montagna** G, Hofer CG, Torres M. 1998. Impairment of cellular redox status and membrana protein activities in kidneys from rats with ischemic acute renal failure. *Biochim Biophys Acta.* 1407: 99-108.
- **Moon** KH, Hood BL, Mukhopadhyay P, Rajesh M, Abdelmegeed MA, Kwon YI, Conrads TP, Veenstra TD, Song BJ, Pacher P. 2008. Oxidative inactivation of key mitochondrial proteins leads to dysfunction and injury in hepatic ischemia reperfusion. *Gastroenterology.* 135: 1344-57.
- **Mosbah** AFB, Kushad M, Kurilich C, Juvik JA, Klein BP, Wallig MA, Jeffrey EH. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *J Agric Food Chem.* 47: 1541-8.
- **Motohashi** H, O'Connor T, Katsuoka F, Engel JD, Yamamoto M. 2002. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene.* 294: 1-12.

- **Mukherjee S**, Lekli I, Das M, Azzi A, Das DK. 2008. Cardioprotection with alpha-tocopheryl phosphate: amelioration of myocardial ischemia reperfusion injury is linked with its ability to generate a survival signal through Akt activation. *Biochim Biophys Acta*. 1782: 498-503.
- **Mukherjee S**, Lekli I, Ray D, Gangopadhyay H, Raychaudhuri U, Das DK. 2010. Comparison of the protective effects of steamed and cooked broccolis on ischaemia reperfusion- induced cardiac injury. *Br J Nutr*. 103: 815-23.
- **Mukhopadhyay P**, Rajesh M, Bátkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, Szabó C, Pacher P. 2009. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 296: H1466-H1483.
- **Mukhopadhyay P**, Rajesh M, Bátkai S, Patel V, Kashiwaya Y, Liaudet L, Evgenov OV, Mackie K, Haskó G, Pacher P. 2010. CB1 cannabinoid receptors promote oxidative stress and cell death in murine models of doxorubicin-induced cardiomyopathy and in human cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 85: 773-84.
- **Mukhopadhyay P**, Rajesh M, Pan H, Patel V, Mukhopadhyay B, Bátkai S, Gao B, Haskó G, Pacher P. 2010. Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress, and cell death in nephropathy. *Free Radic Biol Med*. 48: 457-67.
- **Muller F**, Liu Y, Van Remmen H. 2004. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 279: 49064-73.
- **Murcia MA**, López-Ayerra B, Martínez-Tomé M, Vera AM, García-Carmona F. 2000. Evolution of ascorbic acid and peroxidase during industrial processing of broccoli. *J Sci Food Agric*. 80: 1882-6.
- **Myzak MC**, Tong P, Dashwood WM, Dashwood RH, Ho E. 2007. Sulforaphane retards the growth of human PC-3 xenografts and inhibits HDAC activity in human subjects. *Exp Biol Med (Maywood)*. 232: 227-34.
- **Nakagawa K**, Umeda T, Higuchi O, Tsuzuki T, Suzuki T, Miyazawa T. 2006. Evaporative light-scattering analysis of sulforaphane in broccoli samples: Quality of broccoli products regarding sulforaphane contents. *J Agric Food Chem*. 54: 2479-83.
- **Nakano T**, Sato M, Takeuchi M. 1992. Partial purification and properties of GPx from carp hepatopancreas. *Comp Biochem Physiol*. 102: 31-5.
- **Nath KA**, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, Rosenberg ME. 1992. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest*. 90: 267-70.
- **Nath KA**, Norby SM. 2000. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med*. 109: 665-78.
- **Nicholls DG**. 1987. *Bioenergética: Introducción a la teoría quimiosmótica*. Editorial Reverté S.A. Barcelona. pp. 71-135.
- **Nioi P**, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. 2003. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J*. 374: 337-48.

- **Nordberg** J, Arnér ES. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 31: 1287-312.
- **Olinescu** R, Smith TL. 2002. *Free Radicals in Medicine.* Nova Science Publishers Inc. 1a ed. New York. USA. pp 87-95.
- **Opal** SM, DePalo VA. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 117: 1162-72.
- **Pabla** N, Dong Z. 2008. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* 73: 994-1007.
- **Pan** H, Mukhopadhyay P, Rajesh M, Patel V, Mukhopadhyay B, Gao B, Haskó G, Pacher P. 2009. Cannabidiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation, and cell death. *J Pharmacol Exp Ther.* 328: 708-14.
- **Park** HM, Cho JM, Lee HR, Shim GS, Kwak MK. 2008. Renal protection by 3H-1,2-dithiole-3-thione against cisplatin through the Nrf2-antioxidant pathway. *Biochem Pharmacol.* 76: 597-607.
- **Park** MS, De Leon M, Devarajan P. 2002. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol.* 13: 858-65.
- **Park** SA, Park HJ, Lee BI, Ahn YH, Kim SU, Choi KS. 2001. Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis by suppression of ERK-mediated p53 accumulation in B104 cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 93: 18-26.
- **Pavlov** E, Grigoriev SM, Dejean LM, Zweihorn CL, Mannella CA, Kinnally KW. 2005. The mitochondrial channel VDAC has a cation selective open state. *Biochim Biophys Acta.* 1710: 96-102.
- **Pedraza-Chaverri** J, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. 1999. Effect of the in vivo catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic Biol Med.* 27: 245-53.
- **Pedraza-Chaverri** J, Maldonado P, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME. 2000. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med.* 29: 602-11.
- **Pedraza-Chaverri** J, Yam-Canul P, Chirino YI, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Medina-Campos ON. 2008. Protective effects of garlic powder against potassium dichromate-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 46: 619-27.
- **Pérez-Rojas** JM, Cruz C, García-López P, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Ceballos G, Espinosa E, Meléndez-Zajgla J, Pedraza-Chaverri P. 2009. Renoprotection by  $\alpha$ -mangostin is related to the attenuation in renal oxidative/nitrosative stress induced by cisplatin nephrotoxicity. *Free Radic Res.* 43: 1122-32.
- **Perkins** G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T. 1997. Electron tomography of neural mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol.* 119: 260-72.
- **Ping** Z, Liu W, Kang Z, Cai J, Wang Q, Cheng N, Wang S, Wang S, Zhang JH, Sun X. 2010. Sulforaphane protects brains against hypoxic-ischemic injury through induction of Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Brain Res.* 1343: 178-85.



- **Piña-Garza** E, Huberman A, Chávez R, Lascurain R, Zenteno E, Piña E, Freck S. 1996. Radicales libres. Beneficios y problemas. *Gac Med Mex.* 132: 183-203.
- **Racusen** LC. 2001. The morphological basis of acute renal failure. *The Kidney. USA.* pp 1-12.
- **Raha** S, Robinson B. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 2: 5502-8.
- **Ramesh** G, Reeves WB. 2002. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest.* 110: 835-42.
- **Ramesh** G, Reeves WB. 2003. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 285: F610-F618.
- **Ramesh** G, Reeves WB. 2005. p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289: F166-F174.
- **Riedl** SJ, Salvesen GS. 2007. The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 405-13.
- **Ries** F, Klastersky J. 1986. Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *Am J Kidney Dis.* 8: 368-79.
- **Rodrigues** MA, Rodrigues JL, Martins NM, Barbosa F, Curti C, Santos NA, Santos AC. 2010. Carvedilol protects against the renal mitochondrial toxicity induced by cisplatin in rats. *Mitochondrion.* 10: 46-53.
- **Rosa** EAS, Heaney RK, Fenwick GR, Portas CAM. 1997. Glucosinolates in crop plants. *Hortic-rev.* 19: 99-215.
- **Rosenberg** B. 1985. Fundamentals studies with cisplatin. *Cancer.* 55: 2303-16.
- **Rouzaud** G, Young SA, Duncan AJ. 2004. Hydrolysis of glucosinolates to isothiocyanates after ingestion of raw or microwaved cabbage by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13: 125-31.
- **Rybak** LP. 2007. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 15: 364-69.
- **Sacca** R, Cuff CA, Ruddle NH. 1997. Mediators of inflammation. *Curr Opin Immunol.* 9: 851-7.
- **Santos** NA, Bezerra CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. 2008. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemother Pharmacol.* 61: 145-55.
- **Santos** NA, Catão CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. 2007. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol.* 81: 495-504.
- **Sanz** AB, Santamaría B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. 2008. Mechanisms of renal apoptosis in health and disease. *J Am Soc Nephrol.* 19: 1634-42.

- **Sauer** H, Wartenberg M, Hescheler J. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 11: 173-86.
- **Schmid** H, Karrer P. 1948. Synthese der racemischen und der optisch aktiven formen des sulforaphans. *Helv Chim Acta.* 31: 1497-505.
- **Shapiro** TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. 2001. Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10: 501-8.
- **Shapiro** TA, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Stephenson KK, Wade KL. 2006. Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study. *Nutr Cancer.* 55: 53-62.
- **Shen** HM, Pervaiz S. 2006. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J.* 20: 1589-98.
- **Shi** R, Huang Q, Zhu X, Ong YB, Zhao B, Lu J, Ong CN, Shen HM. 2007. Luteolin sensitizes the anticancer effect of cisplatin via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated p53 phosphorylation and stabilization. *Mol Cancer Ther.* 6: 1338-47.
- **Shin** DH, Park HM, Jung KA, Choi HG, Kim JA, Kim DD, Kim SG, Kang KW, Ku SK, Kensler TW, Kwak MK. 2010. The NRF2-heme oxygenase-1 system modulates cyclosporin A-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Free Radic Biol Med.* 48: 1051-63.
- **Sioka** C, Kyritsis AP. 2009. Central and peripheral nervous system toxicity of common chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 63: 761-7.
- **Somani** SM, Husain K, Whitworth C, Trammell GL, Malafa M, Rybak LP. 2000. Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. *Pharmacol Toxicol.* 86: 234-41.
- **Song** L, Thornalley PJ. 2007. Effect of storage processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food Chem Toxicol.* 45: 216-24.
- **Soussi** T, Wiman KG. 2007. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell.* 12: 303-12.
- **Srivastava** SK, Ansari NH. 1980. The peroxidatic and catalytic activity of catalase in normal and acatalasemic mouse liver. *Biochem Biophys Acta.* 633: 317-22.
- **Stepanik** TM, Ewing DD. 1993. Isolation of glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase of human erythrocytes. *J Biochem Biophys Meth.* 20: 157-69.
- **Stone** JR, Yang S. 2006. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal.* 8: 243-70.
- **Sung** MJ, Kim DH, Jung YJ, Kang KP, Lee AS, Lee S, Kim W, Davaatseren M, Hwang JT, Kim HJ, Kim MS, Kwon DY, Park SK. 2008. Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury. *Kidney Int.* 74:1538-47.

- **Takahashi** K, Akasaka M, Yamamoto C, Kobayashi C, Mizoguchi J, Koyama J. 1990. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA. *J Biochem (Tokyo)*. 108: 145-8.
- **Tang** L, Li G, Song L, Zhang Y. 2006. The principal urinary metabolites of dietary isothiocyanates N-acetylcysteine conjugates elicit the same anti-proliferative response as their parent compounds in human bladder cancer cells. *Anticancer Drugs*. 17: 297-305.
- **Tarladacalisir** YT, Kanter M, Uygun M. 2008. Protective effects of vitamin C on cisplatin-induced renal damage: a light and electron microscopic study. *Ren Fail*. 30: 1-8.
- **Thimmulappa** RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. 2002. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res*. 62: 5196-203.
- **Thorburn** A. 2004. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*. 16: 139–144.
- **Tisher** CC, Bulger RE, Trump BF. 1966. Human renal ultrastructure. I. Proximal tubule of healthy individuals. *Lab Invest*. 15: 1357-94.
- **Tsuruya** K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Kishihara K, Hirakata H, Iida M. 2003. Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int*. 63: 72-82.
- **Valle** VGR, Fagian MM, Parentoni LS, Meinicke AR, Vercesi AE. 1993. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. *Arch Biochem Biophys*. 307: 1-7.
- **Vallejo** F, Tomás-Barberán FA, Garcia-Viguera C. 2002. Glucosinolates and vitamin C content in edible parts of broccoli florets after domestic cooking. *Eur Food Res Technol*. 215: 310-16.
- **Van Poppel** G, Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA. 1999. Brassica vegetables and cancer prevention Epidemiology and mechanisms. *Adv Exp Med Biol*. 472: 159-68.
- **Vander** A. 2006. Fisiología renal de Vander. Mc Graw-Hill Interamericana. 6a ed. México. pp 1-23.
- **Verkerk** R, van der Gaag MS, Dekker M, Jongen WM. 1997. Effects of processing conditions on glucosinolates in cruciferous vegetables. *Cancer Lett*. 114: 193-4.
- **Vermeulen** M, Klöpping-Ketelaars IW, van den Berg R, Vaes WH. 2008. Bioavailability and kinetics of sulforaphane in humans after consumption of cooked versus raw broccoli. *J Agric Food Chem*. 56: 10505-9.
- **Wang** D, Lippard S J. 2004. Cisplatin-induced posttranslational modification of histones H3 and H4. *J Biol Chem*. 279: 20622-5.
- **Wang** D, Westerheide SD, Hanson JL, Baldwin AS Jr. 2000. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem*. 275: 32592-7.
- **Wilce** MC, Parker MW. 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys Acta*. 1205: 1-18.
- **Williams** RT. 1967. Comparative patterns of drug metabolism. *Fed Proc*. 26: 1029-39.

- **Wittstock** U, Halkier BA. 2002. Glucosinolate research in the Arabidopsis era. Trends Plant Sci. 7: 263-70.
- **Wong** MM, Fish EN. 2003. Chemokines: attractive mediators of the immune response. Semin Immunol. 15: 5-14.
- **Wu** L, Noyan-Ashraf MH, Facci M, Wang R, Paterson PG, Ferrie A, Juurlink BH. 2004. Dietary approach to attenuate oxidative stress hypertension and inflammation in the cardiovascular system. Proc Natl Acad Sci USA. 101: 7094-9.
- **Ye** L, Dinkova-Kostova AT, Wade KL, Zhang Y, Shapiro TA, Talalay P. 2003. Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma serum erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. Clin Chim Acta. 316: 43-53.
- **Yoon** HY, Kang NI, Lee HK, Jang KY, Park JW, Park BH. 2008. Sulforaphane protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through induction of the Nrf2-dependent phase 2 enzyme. Biochem Pharmacol. 75: 2214-23.
- **Yu** R, Lei W, Mandlekar S, Weber MJ, Der CJ, Wu J, Kong AN. 1999. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. J Biol Chem. 274: 27545-52.
- **Zachara** BA. 1991. Mammalian selenoproteins. J Trace Elem Electrolytes Health Dis. 6: 137-45.
- **Zhang** Y, Munday R, Jobson HE, Munday CM, Lister C, Wilson P, Fahey JW, Mhawech-Fauceglia P. 2006. Induction of GST and NQO1 in cultured bladder cells and in the urinary bladders of rats by an extract of broccoli (*Brassica oleracea italica*) sprouts. J Agric Food Chem. 54: 9370-6.
- **Zhang** Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. Proc Natl Acad Sci USA. 89: 2399-403.
- **Zhu** M, Fahl WE. 2001. Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element. Biochem Biophys Res Commun. 289: 212-9.

## 11. ARTÍCULOS GENERADOS

- **Guerrero-Beltrán CE**, Calderón-Oliver M, Tapia E, Medina-Campos ON, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Ortiz-Vega KM, Franco M, Pedraza-Chaverri J. 2010. Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. **Toxicology Letters. 192: 278-85.**

- **Guerrero-Beltrán CE**, Calderón-Oliver M, Martínez-Abundis E, Tapia E, Zarco-Márquez G, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J. 2010. Protective effect of sulforaphane against cisplatin-induced mitochondrial alterations and impairment in the activity of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and  $\gamma$  glutamyl cysteine ligase: studies in mitochondria isolated from rat kidney and in LLC-PK1 cells. **Toxicology Letters. 199: 80-92.**

- **Guerrero-Beltrán CE**, Calderón-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. **Experimental and Toxicologic Pathology. En Prensa.**

- **Guerrero-Beltrán CE**, Mukhopadhyay P, Horváth B, Rajesh M, Tapia E, García-Torres I, Pedraza-Chaverri J, Pacher P. Sulforaphane, a natural constituent of broccoli, prevents cell death and inflammation in nephropathy. **The Journal of Nutritional Biochemistry. En corrección con el editor.** Re: JNB-10-448.

- **Guerrero-Beltrán CE**, Tapia E, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cristobal-García M, Pedraza-Chaverri J. Tert-butylhydroquinone pretreatment protects kidney from ischemia/ reperfusion injury. **The Journal of Nephrology. En correccion con el editor.** Ms. No. JNEPHROL-D-10-00164R1.

- Pérez-Rojas JM, **Guerrero-Beltrán CE**, Cruz C, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Pedraza-Chaverri J. Preventive effect of tert-butylhydroquinone on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Enviado a Toxicology.* TOX-10-774.