



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Garcinia mangostana Linn COMO
ANTIOXIDANTE EN LA INSUFICIENCIA
RENAL AGUDA INDUCIDA CON
METOTREXATO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:

AURA MARIEL BECERRIL PARRA



MÉXICO, D.F

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El jurado asignado:

PRESIDENTE: JOSE PEDRAZA CHAVERRI
VOCAL: PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ
SECRETARIO: DIANA BARRERA OVIEDO

1er. SUPLENTE: OSCAR ARMANDO PEREZ MENDEZ
2do. SUPLENTE: MARIA ELENA BRAVO GOMEZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

Edificio de Investigación, 6° piso, Laboratorio 5, Departamento de Farmacología,
Facultad de Medicina, UNAM, México DF.

Financiamiento:

Este trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT IN205310.

Asesora: Dra. Diana Barrera Oviedo

Sustentante: Aura Mariel Becerril Parra

Indice

I .- Abreviaturas	5
II .- Resumen	7
III .- Marco teórico	9
1.- El riñón	9
Anatomía externa	9
Anatomía interna	9
La nefrona	11
El glomérulo	13
Sistema tubular de la nefrona	14
2.- Insuficiencia Renal Aguda	17
3.- Estrés oxidante	19
Especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN)	22
El daño celular que causa ERO	24
4.- Antioxidantes de los sistemas biológicos	27
Sistema Antioxidante no enzimático	27
Sistema Antioxidante enzimático	29
5.- El mangostán	32
Propiedades antioxidantes	35
6.- El metotrexato	38
Farmacocinética del Metotrexato	38
Farmacodinamia del Metotrexato	39
Toxicidad general del Metotrexato	42
IV.- Introducción	43
V.- Hipótesis	47
VI.- Objetivos	47

VII.- Materiales y Métodos.....	48
VIII.- Resultados y análisis	57
iX.- Conclusiones	69
X.- Bibliografía	70

I.- Abreviaturas

ADH	Aldosterona.
AICAR	5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido.
AMP	Monofosfato de adenosina.
BUN	Nitrógeno de urea en sangre.
BFG	Barrera de filtración glomerular.
BHT	Hidroxi-tolueno Butilado.
CT	Grupo de ratas control.
DHFR	dihidrofolato reductasa, enzima inhibida por metotrexato.
dTMP	5'-monofosfato de desoxitimidina.
dUMP	5'-monofosfato de desoxiuridina.
ERN	Especies reactivas de nitrógeno.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
FG	Filtración glomerular.
FH4(GLU)n	Folatos reducidos poliglutamados.
FH2(GLU)n	Folatos poliglutamados.
GAR	Glicina ribonucleótido.
Gly	Glicina.
GML	<i>Garcinia mangostana</i> Linn.
GMP	Monofosfato de guanosina.
GPx	Glutación peroxidasa.
GR	Glutación reductasa.
GSH	Glutación reducido.
GSSG	Glutación oxidado.
IMP	Inosina 5'-monofosfato.
IRA	Insuficiencia renal aguda.
LV	Leucovorina.

MBG	Membrana basal glomerular.
Met	Metionina.
MG	Grupo experimental que recibió una dosis de jugo de mangostán de 3ml/kg de peso .
MT	Metotrexato. Grupo experimental que recibió una dosis de metotrexato de 100mg/Kg de peso.
MT(GLU)n	Poliglutamatos de metotrexato.
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (reducido).
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (oxidado).
NADPH	Fosfato dinucleótido de nicotinamida y adenina (reducido).
NTA	Necrosis tubular aguda.
PRPP	5 fosfo- α -D-ribosil-1-pirofosfato.
Ser	Serina.
SOD	Superoxido dismutasa.
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.
TS	Timidilato sintasa.

II.- Resumen

El riñón es un órgano encargado de múltiples funciones que son necesarias para el mantenimiento de la vida, tales como las remover los productos de desecho de las células, mantener aquellos que son necesarios, mantener el equilibrio electrolítico y la presión sanguínea.

La insuficiencia renal aguda (IRA) es un padecimiento frecuentemente secundario a múltiples etiologías. Se caracteriza por una abrupta disminución de la función renal y conduce a un aumento de productos de desecho en la sangre tales como urea y creatinina. Se han acumulado evidencias de que en el daño isquémico y tóxico que produce una IRA participan especies altamente oxidantes, mejor conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO).

El metotrexato es un fármaco citotóxico ampliamente usado en el tratamiento de algunos tipos de cáncer y también en el tratamiento de padecimientos como artritis reumatoide y psoriasis. Diversas evidencias sustentan que éste fármaco puede causar IRA.

En este trabajo se estableció un modelo en rata (wistar) de IRA inducida con metotrexato. Este fármaco se administró por vía intraperitoneal a dosis de 100 mg/Kg de peso.

En este modelo se probó la capacidad del jugo de mangostán (Xango) para disminuir o evitar la IRA por metotrexato. Fue administrado previamente por vía intraperitoneal a una dosis de 3mL/Kg de peso.

El daño renal se evaluó mediante parámetros de daño funcional glomerular (creatinina en sangre, nitrogeneo de urea en sangre (BUN) y depuración de creatinina). Se evaluó el sistema antioxidante enzimático renal, que incluye a la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD), con el objetivo de saber si el metotrexato es capaz de disminuir la capacidad de este sistema. Además, se cuantificaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS), como marcador de estrés oxidante.

El modelo de IRA se estudió los días 2 y 3. El daño renal es más severo en el día 3. Se encontró que el jugo de mangostán es capaz de prevenir totalmente el aumento de creatinina en suero y BUN; y previene parcialmente la disminución de la depuración de creatinina. Por otro lado, el metotrexato afecta los niveles de actividad de la CAT mientras que los de GPx y SOD se mantienen estables; el jugo de mangostán no ejerció un efecto protector en la disminución de la actividad de la CAT ni se ve alguna influencia en la actividad de la SOD y de la GPx. En cuanto a la cuantificación de TBARS, se determinó que el metotrexato causa lipoperoxidación y que el jugo de mangostán no puede evitarla.

Por lo tanto el jugo de mangostán puede prevenir la IRA inducida con metotrexato pero no influye en la disminución de la actividad de CAT que causa el metotrexato, ni con SOD ni GPx. Y la protección ejercida no es por medio de prevención de la lipoperoxidación.

III.- Marco teórico

1. El riñón

Los riñones están situados en la parte posterior del abdomen, en ambos lados de la columna vertebral. Se localizan entre la última vértebra torácica y la tercera vértebra lumbar.

Anatomía externa:

En el adulto promedio mide de 10 a 12 centímetros de largo, de 5 a 7 centímetros de ancho y tiene una masa que oscila entre 125 y 170 gramos en el varón adulto y entre 115 y 155 gramos en la mujer.

En su cara medial o cóncava presenta una hendidura llamada hilio, a través de la cual sale el uréter renal, así como los vasos sanguíneos, linfáticos y un plexo nervioso.

Cada riñón está rodeado por tres capas de tejido. La más profunda es la cápsula renal, que es una membrana fibrosa, transparente, resistente y lisa. Sirve de barrera contra traumatismos y ayuda a mantener la forma del riñón. La capa intermedia es una cápsula adiposa que rodea la cápsula renal; también protege al riñón de traumatismos y lo sostiene firmemente en su sitio en la cavidad abdominal. La capa superficial llamada aponeurosis renal, es una delgada capa de tejido conectivo e irregular que fija el riñón a las estructuras circundantes y a la pared abdominal (Botella García, 2008).

Anatomía interna:

Un corte frontal del riñón revela dos regiones distintas: un área superficial de color rojizo con textura lisa llamada corteza renal y una región profunda de color marrón llamada médula renal (Brenner 2000).

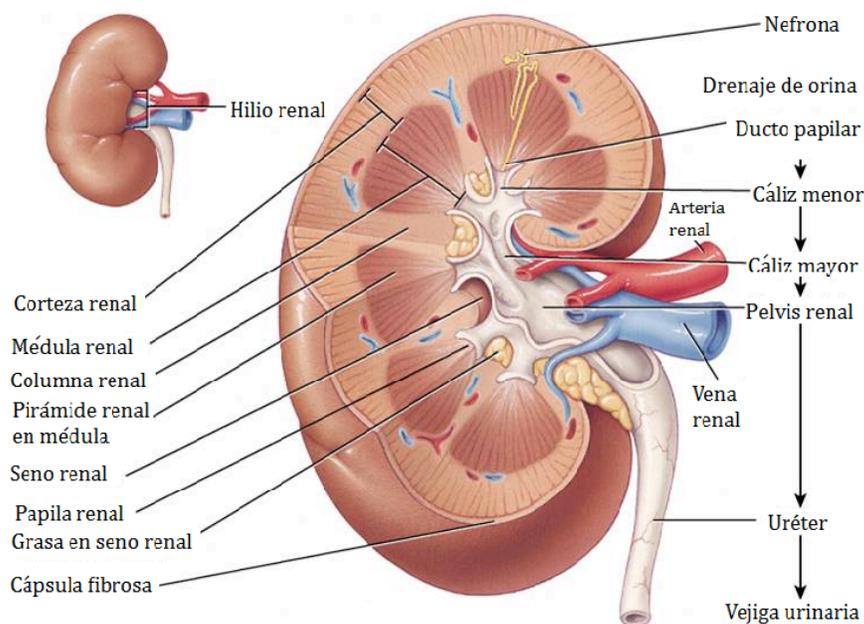
La médula está dividida en 8 a 18 masas cónicas estriadas, llamadas pirámides renales. La base de cada una se sitúa en el límite córtico-medular, y su vértice se dirige hacia la pelvis renal y forma una papila. En la punta de cada papila hay de 10 a 25 pequeñas aberturas que representan los extremos distales de los tubos colectores.

La corteza renal recubre la base de la pirámide renal y las porciones de ésta que se extienden entre las pirámides se denominan columnas renales.

En conjunto, la corteza renal y pirámides de la médula renal constituyen la porción funcional o parénquima del riñón. Aquí se encuentran las unidades funcionales del riñón, cerca de un millón de estructuras microscópicas llamadas nefronas. La orina que éstas forman, drena al interior de gruesos conductos papilares que se extienden a través de la papila renal de las pirámides. Los conductos papilares desembocan en estructuras en forma de copa llamados cálices.

Cada riñón tiene de 8 a 18 cálices menores y dos a tres mayores. Los primeros reciben a la orina de conductos papilares y la llevan a un cáliz mayor. Posteriormente la orina pasa a una cavidad grande llamada pelvis renal, luego pasa por los uréteres que se originan en la porción inferior de la pelvis renal a nivel de la unión ureteropélvica y tienen un recorrido descendente hasta desembocar en el fondo de la vejiga.

El hilo forma una cavidad llamada seno renal, la cual contiene parte de la pelvis renal, los cálices, y las ramas vasculares sanguíneas y nerviosas del riñón. El tejido adiposo ayuda a estabilizar la posición de estas estructuras en el seno renal (Brenner, 2000); véase el esquema 1.1



Esquema 1.1 Corte longitudinal de un riñón. Se observan las estructuras anatómicas principales.

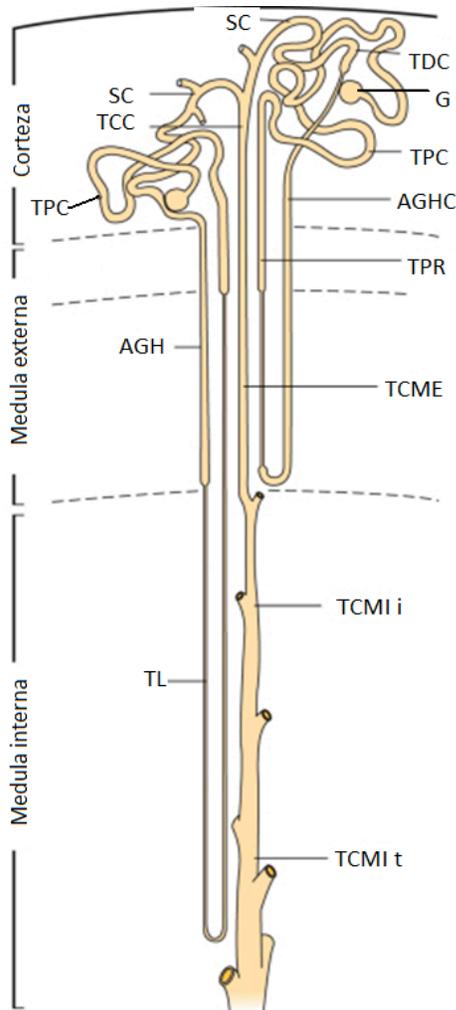
La Nefrona

La unidad funcional del riñón es la nefrona. El humano tiene de 1.5×10^6 a 2×10^6 nefronas (Avendaño, 2009).

Los componentes esenciales de la nefrona son el glomérulo y el sistema tubular córtico-medular. Se reconocen 4 subdivisiones del sistema tubular. Siguiendo el orden de la dirección del líquido: túbulo proximal, la porción delgada del asa de Henle, el túbulo distal y el segmento o túbulo colector.

La nefrona y los tubos contorneados proximales y distales se encuentran en la corteza renal, en tanto que el asa de Henle se extiende hacia la médula renal, efectúa una vuelta de horquilla y regresa a la corteza renal. Los túbulos contorneados distales desembocan en el túbulo colector. Estos últimos convergen y desembocan en conductos papilares que drenan en los cálices menores. Dichos conductos se prolongan desde la corteza, atraviesan la médula y llegan hasta la pelvis renal (Guyton y Hall, 2001).

Se pueden identificar dos clases de nefronas, alrededor del 80-85% se denominan corticales, sus corpúsculos glomerulares se encuentran en la porción externa de la corteza y poseen asas extraordinariamente cortas que se ubican principalmente en la corteza y penetran solo la región superficial de la médula renal. El otro 15-20% de las nefronas se llaman yuxtamedulares, sus corpúsculos renales se encuentran en la corteza interna, cerca de la médula y tienen el asa de Henle extraordinariamente larga, la cual se extiende hasta la región más profunda de la médula, su rama ascendente de Henle consta de dos partes, la ascendente delgada y la ascendente gruesa (véase esquema 1.2). Estas nefronas permiten excretar orinas muy diluidas o muy concentradas (Guyton y Hall, 2001).



Nefrona yuxtamedular (izquierda),
nefrona cortical (derecha).

G: glomérulo

TPC: túbulo contorneado proximal

TPR: túbulo proximal recto

ADH: asa delgada de Henle

AGHC: asa gruesa de Henle

TDC: túbulo contorneado distal

SC: segmento colector

TCC: túbulo colector cortical

TCME: túbulo colector de médula
externa;

TCMIi: túbulo colector de médula
interna inicial

TCMI t: túbulo colector de médula
interna terminal

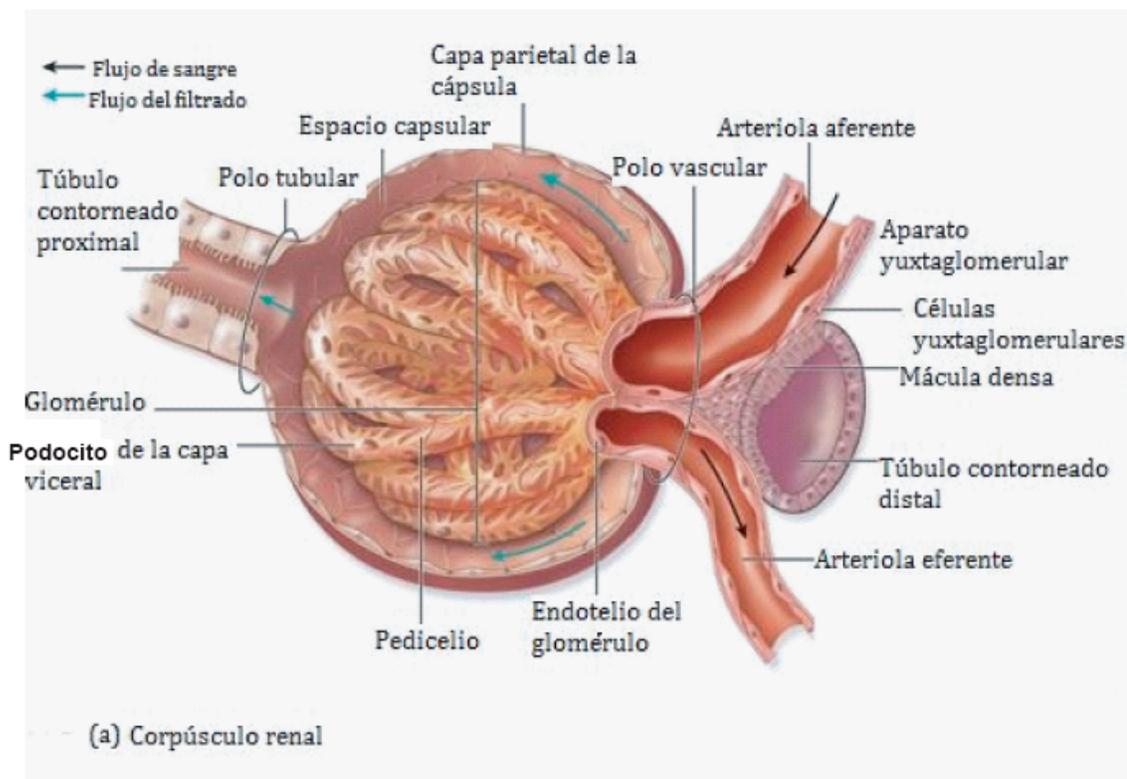
Esquema 1.2. Comparación entre nefronas corticales y yuxtamedulares. Imagen tomada de Brenner (2000).

El glomérulo

En el glomérulo se lleva a cabo la filtración de la sangre.

Consta de las capas visceral y parietal (esquema 1.3). La primera está formada por células epiteliales escamosas simples modificadas llamadas podocitos. Las múltiples prolongaciones de estas células semejan pies (pedicelos) que rodean y envuelven la capa simple de células endoteliales de los capilares glomerulares y forman la pared interna de la cápsula. La capa parietal se compone de epitelio escamoso simple y forma la pared externa. El líquido filtrado en los capilares glomerulares llega al espacio

capsular (o espacio de Bowman) que se halla entre las dos capas de la cápsula glomerular (Avedaño, 2009).



Esquema 1.3. Constituyentes del glomérulo.

Los capilares están formados por un endotelio fino compuesto de células planas que presentan fenestraciones de 40-100 nm en su pared. Los podocitos y el endotelio forman una membrana basal, que adopta una forma especial por fusión de ambas, originando la membrana basal glomerular (MBG). En conjunto, la pared del endotelio capilar, la MBG y los pedicelos de los podocitos forman un dispositivo llamado barrera de filtración glomerular (BFG) (Botella, 2008).

Filtración glomerular

La tasa de filtración está determinada por varios factores que incluyen el área superficial de los capilares, la permeabilidad de la BFG y el equilibrio entre fuerzas hidrostáticas y coloidosmóticas que actúan dentro de los capilares y en el espacio de Bowman. Los capilares glomerulares tienen una tasa de filtración mayor que los otros, debido a la elevada presión hidrostática glomerular y a un gran coeficiente de filtración

(el producto de la permeabilidad de la BFG con el área superficial capilar), (Guyton y Hall, 2001).

A pesar de las tres capas que forman la barrera de filtración glomerular, se filtra tres veces más agua y solutos que en una membrana común y a su vez, la BFG es selectiva para determinar qué moléculas serán filtradas con base a su tamaño y carga eléctrica (Guyton y Hall, 2001). Ciertos electrolitos como el sodio y compuestos orgánicos pequeños, como glucosa o aminoácidos, se filtran con gran facilidad.

Por lo general no se filtran las proteínas del plasma. El endotelio no actúa como barrera principal para las proteínas debido a que las fenestraciones son relativamente grandes, la MBG impide normalmente la filtración de éstas. Como la albúmina plasmática posee carga negativa, sufre repulsión electrostática ejercida por la intensa carga negativa de los proteoglicanos de la MBG (Deen, 1982).

En algunas nefropatías la MBG pierde sus cargas negativas, debido a esto algunas proteínas de peso molecular medio, especialmente la albúmina, se filtran y aparecen en la orina, provocando una proteinuria (Guyton y Hall, 2001).

Sistema tubular de la nefrona

Túbulo proximal

Es el segmento más largo de la nefrona, comienza en el polo urinario abarcando la parte contorneada y hasta el extremo final de la parte recta proximal. Mide 14mm de largo por 60 μm de calibre (Brenner, 2000). Está tapizado por un epitelio cúbico simple de aspecto eosinófilo. Su cara luminal está dotada de un ribete de cepillo muy desarrollado y un extenso laberinto de canales intracelulares, en conjunto esto suministra un área extensa sobre los lados luminal y basolateral del epitelio para el transporte rápido de sustancias (Guyton y Hall, 2001).

Las células del túbulo proximal tienen un metabolismo intenso y poseen un gran número de mitocondrias para apoyar procesos energéticos de transporte activo.

El borde de cepillo está cargado de moléculas portadoras proteicas que se encargan de transportar una gran cantidad de sodio, acopladas a un mecanismo de co-transporte

con numerosos nutrientes orgánicos como aminoácidos y glucosa. Este sitio también es importante para la secreción de ácidos y bases orgánicas (Guyton y Hall, 2001).

Porción delgada del asa de Henle

Surge del estrechamiento brusco de la porción descendente del túbulo proximal para formar un asa. Posee un diámetro de 15 μm y se compone de un epitelio plano en el que desaparece el borde de cepillo. Presenta algunas microvellosidades apicales (Brenner, 2000). Las células tienen un escaso citoplasma, el núcleo está desplazado hacia la luz, carece de lisosomas y peroxisomas, posee escasas mitocondrias, por lo que también su actividad metabólica es mínima (Tisher y Madsen, 2000).

La porción descendente es muy permeable al agua y moderadamente permeable a la mayor parte de los solutos. La función principal de este segmento es permitir el paso de sustancias a través de una difusión simple. Cerca del 20% del agua filtrada se reabsorbe en sus paredes y casi todo ocurre en la rama descendente delgada, porque la rama ascendente es casi impermeable (Guyton y Hall, 2001).

Túbulo distal

Se divide en tres: la rama ascendente gruesa de Henle, el túbulo contorneado y las células de la mácula densa.

La mácula densa es una placa celular alargada, está en la región de transición entre la parte recta y contorneada de ese túbulo, está ubicada sobre el polo vascular del glomérulo que es donde las arteriolas aferentes y eferentes entran en la cápsula de Bowman (Guyton y Hall, 2001).

La mácula densa actúa como receptor sensible a la cantidad de cloruro sódico en el túbulo distal y a cambios en el volumen de líquido que llega a este punto. Se encarga de mantener el volumen y las concentraciones de la sal constantes, manteniendo la filtración glomerular (FG), aún cuando la presión arterial tenga fluctuaciones (Guyton y Hall, 2001).

La pared del túbulo distal está compuesta de un epitelio de células cúbicas, más largas en la porción contorneada. En la superficie liminal pueden observarse algunas microvellosidades cortas. La superficie basal presenta múltiples invaginaciones y

plegamientos en los que se alojan mitocondrias, lo que le confiere al túbulo una estriación característica (Brenner, 2000).

La porción gruesa del asa de Henle está dotada de gran actividad metabólica y en este punto ocurre reabsorción del sodio, cloro, potasio y cantidades considerables de otros iones como calcio, bicarbonato y magnesio. Posee un mecanismo de transporte inverso, en el cual se reabsorbe sodio y se secretan iones hidrógeno (Brenner, 2000).

Esta porción es casi impermeable al agua, por lo que el líquido dentro de esta rama se vuelve muy diluido conforme avanza por el túbulo distal (Guyton y Hall, 2001).

Tubos y conductos colectores

Túbulo colector cortical

La transición de los túbulos distales a los colectores no ocurre de forma brusca, sino que existe un segmento corto de conexión en el que se pueden encontrar células de ambos distribuidas aleatoriamente.

El epitelio que constituye la pared de estos túbulos posee dos clases distintas de células, las principales (claras) y las intercaladas (oscuras).

Las células principales son casi planas y van ganando anchura progresivamente. Su membrana celular es lisa, el núcleo está localizado céntricamente y el resto del citoplasma es claro por poseer pocos organelos, en los que se encuentran mitocondrias pequeñas repartidas por toda la célula (Brenner, 2000). Las células principales reabsorben sodio y agua de la luz y secretan iones de potasio al interior de la luz.

Las células intercaladas son cúbicas. Su membrana posee numerosas microvellosidades, bajo las cuales se observan vesículas de pinocitosis. El núcleo es central y el plasma es oscuro, destacando numerosas mitocondrias grandes e hinchadas y repartidas por toda la célula (Brenner, 2000). Las células intercaladas secretan intensamente iones hidrógeno y reabsorben iones bicarbonato y potasio. (Guyton y Hall, 2001).

Conducto colector medular

Es el último sitio para el procesado y elaboración de orina. El epitelio está formado por células casi cúbicas con superficies lisas y pocas mitocondrias. La permeabilidad para el agua está regulada por la aldosterona (ADH). Cuando la concentración de ADH es alta, se reabsorbe agua ávidamente. Este conducto es permeable a la urea y es capaz de secretar iones hidrogeno en contra de un gradiente de concentración (Guyton y Hall, 2001).

2.- Insuficiencia renal aguda (IRA)

Es un síndrome clínico, frecuentemente secundario a múltiples etiologías, caracterizado por un rápido decline de la tasa de filtración glomerular y retención de desechos de nitrógeno como urea y creatinina, pudiendo producir alteraciones hidroelectrolíticas (hiperpotasemia, hipercalcemia, hiponatremia, hiperfosfatemia, hipomagnesemia) y del equilibrio ácido-base. Es potencialmente reversible.

Se dividen en tres grupos:

IRA prerrenal: debida a la disminución de la perfusión del flujo sanguíneo en el riñón, es secundario a una caída de la presión de perfusión y a una vasoconstricción renal intensa que sobrepasa los mecanismos de autorregulación intrarenales. Puede ser debido a disminución del gasto cardiaco o a cuadros que presentan disminución del volumen sanguíneo.

IRA intrínseca: Hay una lesión renal estructural establecida, en el que puede estar afectado el túbulo, el intersticio, los vasos sanguíneos o el glomérulo. Las causas que la producen se observan en la tabla 2.1.

IRA posrenal: es una enfermedad asociada con una obstrucción aguda del flujo urinario entre la uretra y el cuello de la vejiga o una obstrucción de los ureteres.

Tabla 2.1 .- Causas de la IRA intrínseca

Enfermedades	Causas:
Vasos renales	Arterial: trombosis, embolia, vasculitis. Venosa: trombosis. Arteriolar: hipertensión arterial maligna, vasculitis, coagulación intravascular diseminada, etc.
Microvasculatura y glomérulo	Inflamación: glomerulonefritis aguda, vasculitis, radiación. Vasos renales: hipertensión maligna, toxemia en el embarazo, hepercalcemia, fármacos, radiocontrastes. Hematológicas: síndrome urémico hemolítico, trombocitopenia, coagulación intravascular diseminada.
Túbulo Intersticio	Infecciones: viral, bacteriana, fúngica. Infiltración: linfoma, leucemia, sarcoma. Nefritis intersticial alérgica: antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos.
Túbulos renales (Necrosis Tubular Aguda, NTA)	<p>Origen isquémico: Alteraciones hemodinámicas</p> <p>Origen tóxico:</p> <p>Fármacos: Antibióticos: Aminoglucósidos, Cafalosporinas, Anfotericina B, Sulfamidas, Aciclovir, Vancomicina, etc.</p> <p>Anestésicos: Metoxifluorano, Enflurano.</p> <p>Quimioterapéuticos: Cisplatino, Nitrosoureas, Metotrexato.</p> <p>Otros: Ciclosporina A, manitol.</p> <p><u>Tóxicos exógenos:</u></p> <p>Metales pesados: As, Cd, Pb, Hg, Cr y Sb.</p> <p>Varios: Fungicidas y pesticidas, solventes orgánicos, <i>Amanita faloides</i>, anilinas, etc.</p> <p><u>Tóxicos endógenos :</u></p> <p>Pigmentos: mioglobina, hemoglobina, bilirrubina.</p> <p>Cristales: ácido úrico</p>

La necrosis tubular aguda (NTA) isquémica y nefrotóxica es la más frecuente, ocupa el 90% de los casos de IRA intrínseca (Brenner, 2000).

Fases de la NTA

La necrosis tubular aguda puede presentarse como forma oligúrica o no oligúrica.

La forma oligúrica se caracteriza clínicamente por oliguria y retención nitrogenada progresiva. Clásicamente se describen 3 fases: inicial u oligúrica, mantenimiento y recuperación. En la fase inicial hay oliguria, retención nitrogenada progresiva; en la fase de mantenimiento la retención nitrogenada alcanza una meseta y el paciente inicia la diuresis (por esta razón también se denomina fase diurética) y finalmente, en la fase de recuperación ocurre un incremento progresivo de la filtración glomerular y por consiguiente disminución de la retención nitrogenada. Por lo general la fase oligúrica tiene una duración entre 7 a 10 días, dependiendo de la magnitud del daño. Si la oliguria persiste por más de 14 días, se debe sospechar necrosis cortical.

La forma no oligúrica, incluye a los casos de IRA con volumen urinario mayor de 400 cc/24h y los casos de IRA con fase oligúrica inicial corta (pocas horas). Clínicamente hay retención nitrogenada leve a moderada y pueden presentar las mismas complicaciones que la forma oligúrica.

3.- Estrés oxidante

La gran concentración de oxígeno en la atmósfera y su baja reactividad en condiciones ambientales ha dado la impresión de que es inocuo, sin embargo por reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas mejor conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO, vease la tabla 3.1), que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, lo que puede llegar a producir daño celular. Por lo anteriormente expuesto se comprende que, si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo, no se deben olvidar sus muchos efectos tóxicos (Venereo, 2002).

Tabla 3.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO).

Radical libre	Superóxido	$(O_2^{\cdot-})$
	Hidroxilo	(OH^{\cdot})
Diradical	Oxígeno	O_2
No radicales	Peróxido de hidrógeno	(H_2O_2)
	Oxígeno singulete	$(^1O_2)$
Especies reactivas de nitrógeno (ERN)		
Radical libre	Óxido nítrico	(NO^{\cdot})
	Dióxido de nitrógeno	(NO_2^{\cdot})
No radicales	Peroxinitrito	$(ONOO^-)$

El oxígeno también forma compuestos reactivos con el nitrógeno los cuales se denominan especies reactivas de nitrógeno (ERN).

Algunas ERO y ERN son radicales, esto quiere decir que tienen uno o más electrones desapareados. El oxígeno molecular es un diradical, ya que tiene dos electrones desapareados y cada uno reside en un orbital (Rodríguez *et al.*, 2001).

Debido a que la naturaleza ha estado expuesta a las ERO por dos mil millones de años se han desarrollado mecanismos para contender con ellas y también mecanismos que las utilizan en sus múltiples funciones. La toxicidad depende de su concentración y del contexto en el que se producen.

Las bajas concentraciones de ERO estimulan el crecimiento de células, incluso el de bacterias y otros microorganismos.

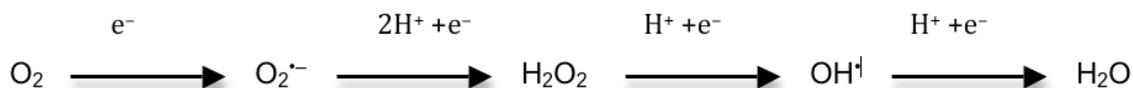
También las ERO son producidas por la NADPH oxidasa en los fagocitos, donde funcionan como agentes bactericidas, así también pueden funcionar como mediadores inflamatorios. (McCord *et al.*, 2000).

Las ERO han sido relacionadas como determinantes de expresión génica (McCord *et al.*, 2000). También, ciertas concentraciones celulares de éstas pueden inducir muerte celular programada (Hansgerg, 2008).

Aproximadamente el 98% del oxígeno que se metaboliza en la célula es manejado por una sola enzima, la citocromo oxidasa, presente en las mitocondrias, que le transfiere cuatro electrones al oxígeno en una reacción concertada para producir dos moléculas de agua como producto, como se muestra en la reacción 3.1 (McCord *et al.*, 2000).

Una estrategia evolutiva para la supervivencia en un medio ambiente oxidante es limitar las oportunidades para una mala transferencia de electrones al oxígeno, pero esta estrategia no es perfecta. Por lo menos dos sitios han sido identificados en la cadena de transporte de electrones (Complejo I y ubisemiquinona) donde los electrones pueden filtrarse y reaccionar con el oxígeno, lo que resulta en la formación de ERO (McCord *et al.*, 2000).

Reacción 3.1



Debido a que el ambiente intramitocondrial es altamente reductor, varios componentes respiratorios, incluyendo las flavinas, los centros [Fe-S] y las quinonas serían termodinámicamente capaces de transferir un electrón al oxígeno. No obstante el O₂ es un gas que se difunde libremente a través de las membranas, por lo que es muy factible que su forma activada se encuentre alrededor de la cadena respiratoria (Cadenas y Kelvin, 2000).

Existen también fuentes exógenas capaces de producir especies reactivas de oxígeno en los organismos, aquí se encuentran los algunos medicamentos, humo de cigarro, contaminantes ambientales, etc; que cuando interaccionan con la cadena transportadora de electrones pueden causar ruptura de su acoplamiento. Otra fuente exógena de producción de ERO es la exposición a radiación ultravioleta e ionizante, la cual proporciona energía a moléculas de oxígeno generando estados excitados altamente reactivos de la molécula y de los cuales se hablará mas adelante (Rodríguez *et al.*, 2001).

3.2 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

Anión peroxinitrito (ONOO^-)

Se forma por la reacción del óxido nítrico (NO) con el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Puede producir la nitración de aminoácidos aromáticos en reacciones que aumentan de rendimiento en presencia de CO_2 y metales de transición (Hansgerg, 2008).

Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$)

Se origina cuando uno de los dos electrones libres del O_2 cambia de giro al captar energía. Teniendo ahora giros opuestos los electrones libres se aparean inmediatamente (Olinescu y Smith, 2002).

En sistemas biológicos puede ser producido por la descomposición del H_2O_2 con el ácido hipocloroso que secretan los leucocitos. También se genera cuando diversos pigmentos como porfirinas, flavinas, retinol, clorofila, etc. absorben energía en forma de radiación y la ceden al oxígeno (Hansgerg, 2008).

La vida media del $^1\text{O}_2$ en aire seco es de 90 μs , en el agua pura es de 3 μs y en la célula de 0.5 μs (Hansgerg, 2008).

Reacciona muy cerca del sitio de donde se forma, con la mayoría de compuestos celulares, como ácido nucleico, proteínas, lípidos y carbohidratos. Se desactiva con carotenos y tocoferoles (Hansgerg, 2008).

Anión superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$

Cuando el O_2 capta un electrón, éste se aparea con uno de los dos electrones libres de los orbitales π^* y forma así el $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Se produce principalmente en la cadena respiratoria, aproximadamente el 0.1 % de O_2 que se consume en la respiración forma $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Hansgerg, 2008).

Otra fuente importante de $\text{O}_2^{\cdot-}$ es debido a la actividad de las NADPH oxidasas, que tienen la función específica de sintetizarlo. En el hombre la hemoglobina se oxida formando metahemoglobina y $\text{O}_2^{\cdot-}$. También se puede producir en las reacciones de las enzimas del citocromo P_{450} . Y por la actividad de la xantina oxidasa (Cadenas y Kelvin, 2000).

Es poco reactivo, pero juega un papel central en la formación subsecuente de especies reactivas. Reacciona con: el hierro libre, los centros hierro-azufre de proteínas, el NO·, el glutatión, el ascorbato y consigo mismo. No reacciona con las bases nitrogenadas del DNA, ni con los aminoácidos de las proteínas ni con los lípidos (Hansgerg, 2008).

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Es un líquido similar al agua aunque más denso y viscoso. Es un ácido débil, tiene un momento dipolar y una constante dieléctrica mayor que el agua. Se forma cuando cada uno de los dos electrones libres del O₂ se han apareado.

En las células, la reacción de la superóxido dismutasa (SOD) produce la mayor parte de H₂O₂. Su concentración va del orden de pico a micromolar (Hansgerg, 2008).

Puede difundir a través de compartimientos celulares. Reacciona con los centros Fe-S de algunas proteínas y al reaccionar con el hierro se produce el radical hidroxilo (OH·, vease la reacción 3.2) (Cadenas y Kelvin, 2000).

Radical hidroxilo (OH·)

Es el oxidante más potente, debido a que reacciona casi con todas las moléculas biológicas (Fong *et al.*, 1976). La célula no tiene mecanismos antioxidantes enzimáticos que puedan combatirlo, por lo tanto deben prevenir su formación mediante la eliminación de precursores (O₂^{•-} y H₂O₂).

El H₂O₂ puede reaccionar con metales divalentes y producir OH· vía reacción de Fenton. El ejemplo es la reacción con el Fe²⁺ libre (Jian *et al.*, 2008):

Reacción 3.2



El H₂O₂ también es capaz de reaccionar con el O₂^{•-} y con el grupo prostético de metaloproteínas que contienen hierro, según lo muestra la reacción (3.3) de Haber Weis (Jian *et al.*, 2008) y formar así el OH·.

Reacción 3.3



3.1 El daño celular que causan las ERO

- Proteínas

Los aminoácidos de las proteínas son ricos en electrones y reaccionan fácilmente con las ERO, porque estas últimas son deficientes en electrones (oxidantes electrofílicos). Los aminoácidos más susceptibles son la fenilalanina, el triptófano, la tirosina, la histidina, la cisteína y la metionina (Díaz, 2002).

La fenilalanina y la metionina son particularmente vulnerables a la oxidación por ONOO⁻ mientras que la tirosina y el triptófano son blancos selectivos para la nitración por el mismo (Piña y Zentella, 2008).

La oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos puede provocar desdoblamientos, cambios conformacionales, entre cruzamientos, radicales (alquil, peroxil y alcoxil) centralizados en la cadena proteica (Piña y Zentella, 2008) y/o fragmentación de la proteína (Venereo, 2002). Dependiendo del tipo de daño causado, la proteína puede sufrir pérdida parcial o total de su funcionalidad (Griffith *et al.*, 1988).

- ADN

Ocurren fenómenos de mutaciones, hay pérdida de expresión de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes (Días, 2002).

Estas alteraciones son causadas principalmente por el ·OH, el ¹O₂ que son muy reactivos y por el ONOO⁻ que puede nitrar y desaminar al ADN causando rupturas en las cadenas.

Los azúcares fosfato son también muy vulnerables a la oxidación, puede producir liberación de las bases y rompimiento de la cadena sencilla de hebras del ADN (Sanchez, 2005).

- Lípidos

La interacción de radicales libres y otras ERO con los lípidos de las membranas biológicas ocasionan la producción de diversos compuestos tóxicos. Los lípidos oxidados alteran la fluidez y permeabilidad de la membrana, así como la actividad de las proteínas, las enzimas y los canales iónicos asociados a ellas, situación que compromete la estructura y función celular.

La lipoperoxidación causada por ERO está dividida en tres etapas, vease el esuqema 3.1 (Zenteno y Saldaña, 2008).

Iniciación

Se desencadena cuando el residuo de un ácido graso poliinsaturado dentro de los lípidos de la membrana es atacado por una ERO que es capaz de abstraer o retirar un átomo de hidrógeno de un grupo metileno. El residuo de ácido graso queda como un radical libre centrado en el carbono. Este carbono es generalmente estabilizado mediante un arreglo molecular que da lugar a un dieno conjugado.

Propagación

Este nuevo radical reacciona con el oxígeno molecular y forma un radical peroxilo, molécula que tiene suficiente poder oxidante para atraer un hidrogeno metilénico del ácido graso adyacente. Estableciéndose una reacción en cadena y de ésta manera se propaga la lipoperoxidación en la membrana.

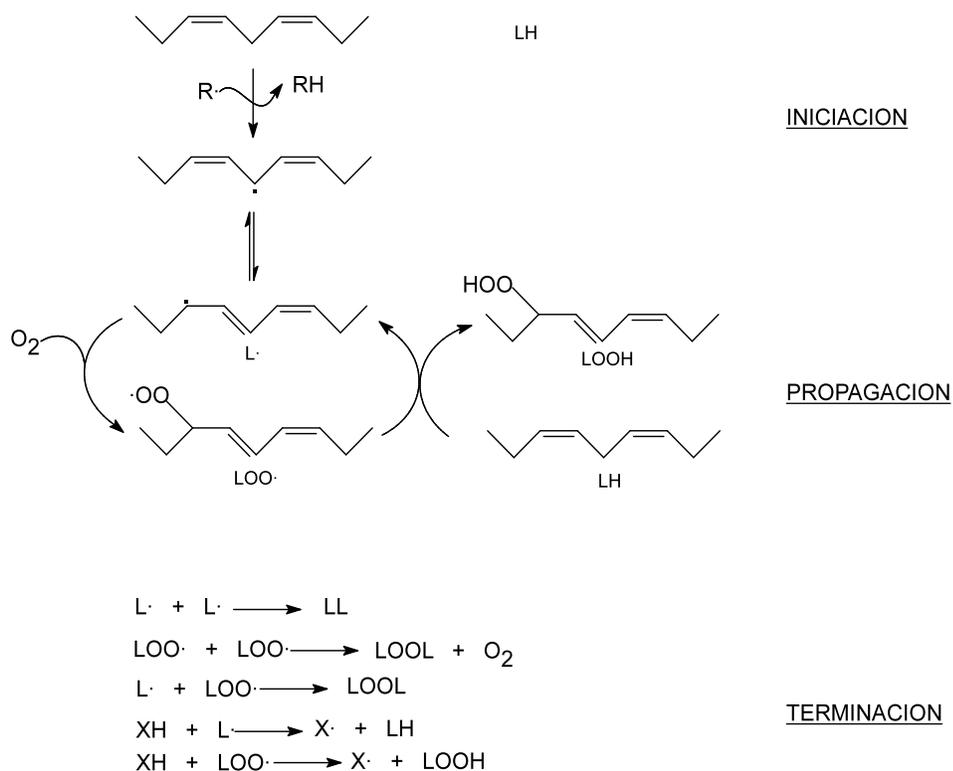
Otro mecanismo que se considera también como parte de la propagación de la lipoperoxidación esta dado por el lipoperóxido (ROOH) que al encontrarse en presencia de un metal de transición (preferentemente Cu o Fe) puede reaccionar y fraccionarse para dar lugar de nuevo a un radical peroxilo (ROO·); pero también puede romperse para dar lugar a la formación de un radical alcoxilo (RO·). Ambos pueden abstraer átomos de hidrógeno de cadenas vecinas y continuar la propagación.

Terminación

Puede finalizar cuando el radical lipídico reacciona con otra molécula, la cual puede ser un segundo radical lipídico, el resultado es la formación de agregados o dímeros que

dentro de la membrana, alteran sus funciones, principalmente la fluidez y la permeabilidad.

Alternativamente se puede finalizar la propagación cuando alguno de estos radicales encuentra a una molécula antioxidante capaz de donar un átomo de hidrógeno, terminando así la cadena de reacciones. La vitamina E es el antioxidante más relevante en la lipoperoxidación.



Esquema 3.1. Proceso de lipoperoxidación.

4.- Antioxidantes en los sistemas biológicos

Los mecanismos antioxidantes de las células se llevan a cabo mediante procesos enzimáticos y no enzimáticos, a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de ERO.

Sistema antioxidante no enzimático

1.- El glutatión (GSH) es una pequeña molécula de naturaleza proteica. Está compuesta de tres residuos de aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína.

Su capacidad de donación de electrones está ligada a su grupo sulfhidrilo. La habilidad de esta molécula está en donar un electrón (hidrógeno), que hace posible su bioactividad (Ahmad, 1995).

El GSH existe en dos formas: la activa o reducida (GSH) y la forma oxidada o inactiva (GSSG). La relación de GSH respecto al GSSG en la mayoría de las células es de 500 a 1 (Ahmad, 1995).

El GSH mantiene en estado reducido los grupos tiol de las cisteínas de las proteínas. Es sustrato de la enzima glutatión peroxidasa. El GSSG se reduce por la enzima glutatión reductasa dependiente de NADPH (Mathewes et al; 2002).

2.- Ácido ascórbico (vitamina C), es un antioxidante hidrosoluble, localizado en el citosol, como en el ambiente extracelular. Su actividad antioxidante puede proceder por dos mecanismos, a través de la transferencia de un solo electrón con la formación del radical ascorbato o con la transferencia de dos electrones formando ácido L-dehidroascorbico (Ahmad, 1995).

Las formas oxidadas del ascorbato pueden ser reducidas vía directa por reacciones químicas (como reacción con GSH) o enzimáticas (ácido dehidroascorbico reductasa o ascorbato reductasa) (Ahmad, 1995).

3.- La vitamina E es el término general para todos los tocoferoles y tocotrienoles biológicamente activos y sus derivados. El más activo es el α - tocoferol.

Es el antioxidante lipofílico mayoritario en la protección del ataque de radicales libres en la membrana celular.

Los tocoferoles donan un hidrógeno regenerado moléculas oxidadas en la membrana

lipídica y produciendo a su vez el radical tocoferilo. In vitro reacciona directamente con radical ROO[•], ¹O₂ y con el O₂^{•-} (Ahmad, 1995).

Esta vitamina es altamente eficaz porque se requiere de pequeñas cantidades de ella para funcionar, además el radical tocoferilo formado es bastante estable debido a la deslocalización del electrón no apareado y puede ser regenerado a tocoferol por interacción con vitamina C (Packer, *et al.*, 1979) o el glutatión reducido (GSH) (Haenen y Bast, 1983).

4.- Carotenoides, son compuestos liposolubles que se encuentran en membranas lipídicas e impiden la lipoperoxidación de estas. Reacciona con el ¹O₂ y con el radical hidroxilo. La interacción con estas ERO genera el radical carotenilo (Car[•]), el cual puede ser reciclado al interaccionar con el ácido ascórbico y/o con el α-tocoferol (Halliwell y Gutteridge, 2001).

5.- Proteínas antioxidantes. Son la mayor defensa antioxidante en el plasma humano. La formación de radicales libres dependientes de metales de transición es inhibida por proteínas que tienen sitio de unión para estos. En la tabla 4.1 se muestra las proteínas y su funcionalidad (Ahmad, 1995).

Tabla 4.1. Proteínas antioxidantes y su funcionalidad

Proteínas antioxidantes	Funcionalidad
Albúmina	<ul style="list-style-type: none"> • Atrapadora de Cu
Ceruloplasmina	<ul style="list-style-type: none"> • Oxidoreductasa, convierte el Fe(II) a Fe(III) • Promueve la incorporación de Fe(III) a la Ferritina
Transferrina	<ul style="list-style-type: none"> • Transporte de Fe
Ferritina	<ul style="list-style-type: none"> • Almacenamiento del Fe
Metalotioneínas	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Atrapadora de una variedad de metales, incluyendo metaloides

3.3.2 Sistema antioxidante enzimático

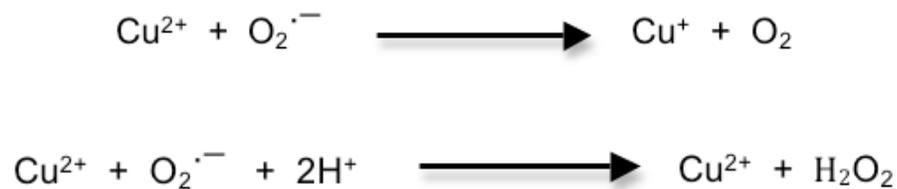
1.- La **superóxido dismutasa (SOD)**, es una metaloenzima, que cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 .

En mamíferos, la SOD posee tres isoformas que desempeñan funciones antioxidantes en varios compartimentos.

La primera es la Cu / Zn-SOD se localiza en el citosol y en el núcleo de todos los tipos de células, y funciona como el sistema antioxidante intracelular.

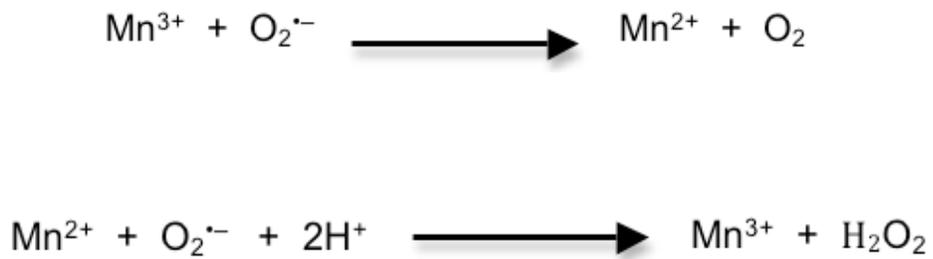
La SOD de distribución extracelular (EC-SOD) también usa Cu/Zn como cofactor. Es de suma importancia porque el $O_2^{\cdot-}$ del espacio extracelular no puede cruzar la membrana celular y por lo tanto no puede ser removido por SOD intracelular (Oury, *et al.*, 1996).

El mecanismo catalítico de estas se basa en el ciclo redox del catión cobre (Banci *et al.*, 1998).



La SOD de manganeso (Mn-SOD) está exclusivamente localizada en las mitocondrias.

Su mecanismo catalítico de estas se basa en el ciclo redox del catión manganeso (Fridovich, 1998).



2.- La **catalasa**, es una hemoproteína tetramérica con subunidades idénticas.

Cataliza la descomposición de H_2O_2 en agua y oxígeno molecular. Esta enzima se encuentra en peroxisomas, citoplasma y mitocondria. Es una enzima inusual ya que no cumple una cinética Michelis Menten. No exhibe saturación y su actividad incrementa linealmente con el aumento de peróxido, incluso a concentración de saturación la enzima descompone el peróxido, siguiendo una reacción de primer orden (Ahmad, 1995).

Su mecanismo catalítico consta de dos fases, formándose la especie oxoferrilo como uno de los productos de la primera fase y usado como reactivo en la segunda fase. Véase las siguientes reacciones (Putnam *et al.*, 2000).

Fase I



Fase II



3.- La glutatión peroxidasa (GPX) cataliza la descomposición de H_2O_2 y de hidroperóxidos a agua. Tiene un absoluto requerimiento del GSH para su actividad catalítica en la donación de un hidrógeno (Jian *et al.*, 2009).

Llevan a cabo las siguientes reacciones:



Actualmente se conocen 4 isoformas, la citosólica, la plasmática, la gastrointestinal y la de fosfolípidos (Ahmad, 1995).

Exceptuando a la plasmática (que es Se-glicoproteína monomérica), las demás son proteínas tetraméricas con 4 átomos de Se por molécula. El Se está presente en el centro catalítico. La catálisis ocurre en varios pasos. Primero, el centro catalítico de la enzima reduce el peróxido y la enzima se oxida. Segundo, la forma oxidada de la enzima forma un complejo con una molécula de GSH. Tercero, el complejo usa otra molécula de GSH resultando en la oxidación de las dos moléculas de GSH a GSSG con la liberación de la enzima en su estado reducido.

La GPX plasmática se sintetiza en los túbulos proximales del riñón.

La GPX de los lípidos reduce preferentemente hidroperóxidos fosfolipídicos, actúa directamente sobre ellos sin la necesidad de que sean liberados de la membrana por las fosfolipasas (un requisito para la GPX citosólica).

La gastrointestinal es llamada así porque es localizada en este tracto en roedores y en humanos. Es diferente a las demás porque no da reacción cruzada con antisuero de las demás GPX. Tiene la característica de que no usa como sustrato a hidroperóxidos de fosfatidilcolina (Ahmad, 1995).

4.- Glutación reductasa. Es una enzima que requiere de NADPH y que cataliza la conversión de GSSG a GSH.



En donde las formas $\text{GR}-(\text{SH})_2$ y $\text{GR}-\text{S}_2$ corresponden a las formas reducidas (ditiol) y oxidadas de la GR, respectivamente. La glutación reductasa es esencial para mantener los niveles adecuados de GSH (Ahmad, 1995).

5.-El mangostán

Es un árbol perenne de lento crecimiento, alcanza una altura de 6 a 25 m. La corteza joven tiene un color verde brillante y es lisa; con la edad se vuelve marrón oscuro y áspero. Sus hojas son elípticas, coriáceas y son de color verde brillante. Las flores se encuentran solas o en pares, con 4 pétalos blancos o rosas y 4 sépalos. El fruto es redondo, morado oscuro a rojo-púrpura, tiene de 5 a 8 cm de diámetro, tiene una corteza gruesa que rodea de 4 a 8 segmentos de fruta (esquema 5.1). La pulpa es aromática y tiene un agradable sabor agridulce. Su nombre científico es *Garcinia mangostana* Linn (GML), pertenece a la familia Guttiferae (Morton, 1987). Es cultivada en la selva tropical de las naciones de Asia como Indonesia, Sri Lanka, Malasia, Filipinas y Tailandia, así como también en la India. En estos lugares le han atribuido una gran variedad de propiedades medicinales (Jung *et al.*, 2006).

Esquema 5.1. Fruto y hojas del árbol del mangostán.

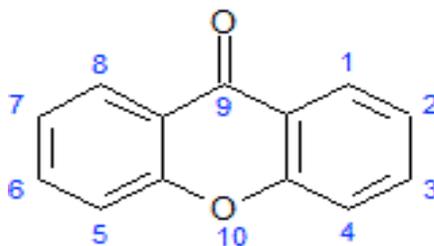


Los componentes químicos de GML son glucósidos de antocianidinas, benzofenona, maclurin (Du y Francis, 1975) y una gran variedad de metabolitos secundarios derivados de xantonas preniladas y oxigenadas. Estos metabolitos son de gran interés debido a los beneficios medicinales que presentan (Govindachari *et al.*, 1971).

Las xantonas se han aislado del pericarpio, hojas, flor y fruto del mangostan (Suksamraran, 2006).

Las xantonas están formadas por una estructura base (núcleo de la xantona) llamada 9H-xantenon-2-ona o dibenzo-GAMMA-pirona la cual es simétrica, ver esquema 5.2 (Pinto *et al.*, 2005).

Esquema 5.2

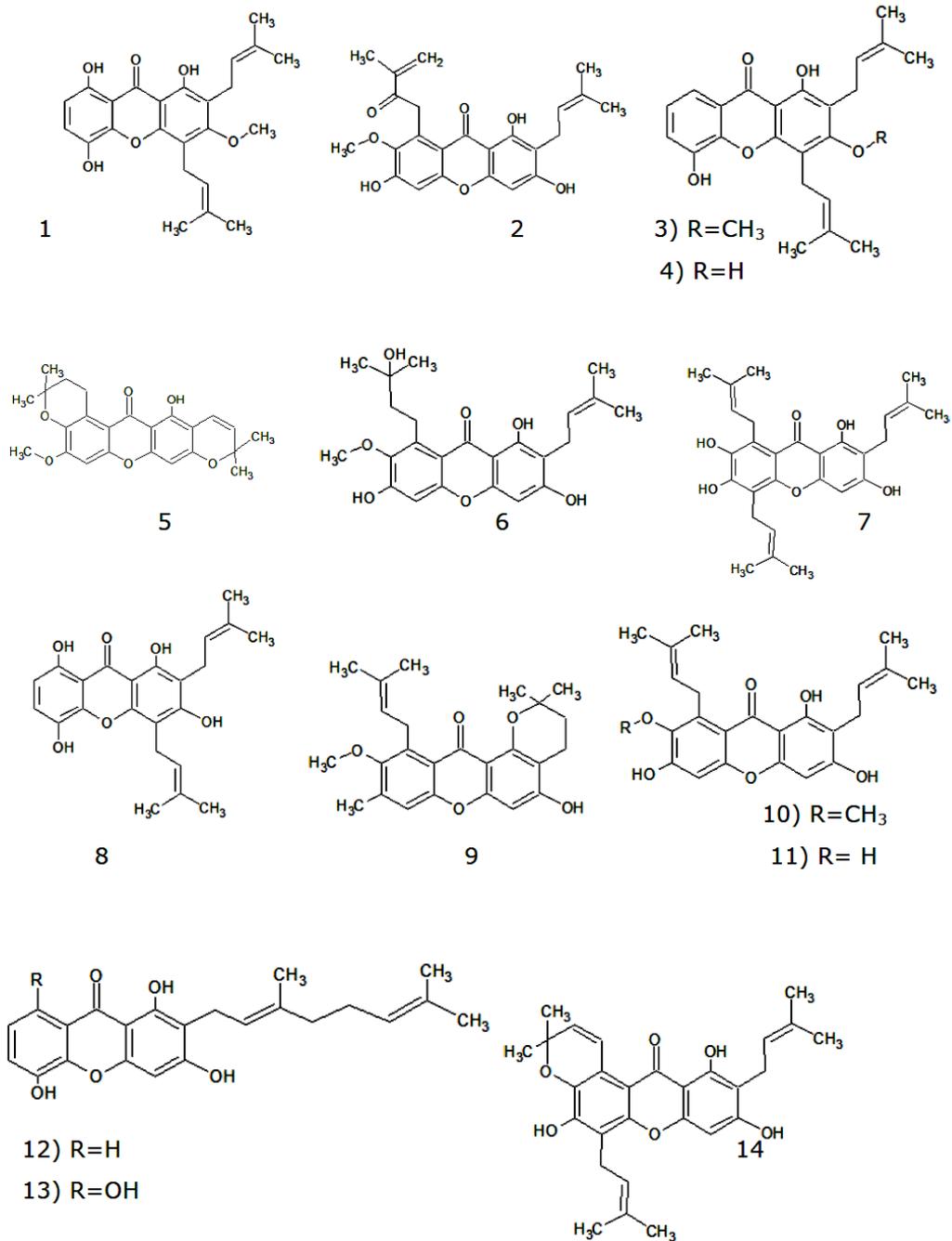


Núcleo de la xantona

Imagen modificada de Pedraza-Chaverri et al.,(2008).

En el esquema 5.3 se muestran las xantonas aisladas del pericarpio de GML y en las tablas 5.1 y 5.2 se encuentran los nombres de cada una.

Estructuras de los compuestos aislados del pericarpio de GML



Esquema 5.3. Imagen tomada de Jung *et al.*, (2006).

Tablas 5.1 y 5.2.

Xantona	Nombre
1	8-hidrixicuadraxantona G
2	Mangostingona
3	Cuadraxantona G
4	8-Deoxigartanina
5	Garcinomangoson B
6	Garcinona D
7	Garcinona E

Xantona	Nombre
8	Gartanina
9	1-Isomangostina
10	α -Mangostina
11	γ -Mangostina
12	Mangostinona
13	Smetahxhantone
14	Tovofilina A

Estudios biológicos han demostrado sus propiedades antibacteriales (Mahabusakaram, 1986; Linuma, 1996), antiinflamatorias (Balasubramanian y Rajagopalan, 1988), antitumorales (Sakai, 1993), fungicidas (Gopalakrishnan *et al.*, 1997), antioxidantes (Jung *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que el extracto de GML inhibe la prostaglandina E₂ (Nakatani *et al.*, 2002). Chen y colaboradores (1996) mostraron que también inhibe la producción de la proteasa que requiere el virus del HIV-1 para autoensamblarse.

Propiedades antioxidantes

EL extracto metanólico del pericarpio de GML presentó una capacidad antioxidante en la actividad atrapadora del radical peroxinitrito. Jung *et al.*, (2006) evaluó la actividad antioxidante para las xantonas 1-14, exceptuando la 2, debido a que se obtuvo en muy baja cantidad (ver esquema 5.3) usando auténtico ONOO⁻ y ONOO⁻ SIN-derivado (obtenido de acuerdo a los métodos de Kooy *et al.*, 1994; y Zou *et al.*, 2002), Las xantonas 1, 8, 10, 11 y 13 mostraron tener una potente actividad antioxidante atrapadora, vease la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Actividad atrapadora del peroxinitrito de los compuestos aislados del pericarpio de GML.

Compuesto	Peroxinitrito	
	Autentico (CI ₅₀ μM)	SIN-derivado (CI ₅₀ μM)
1	4.6	10
3	>30	3.2
4	>30	11.9
5	15.9	>30
6	26.4	15.1
7	14.1	>30
8	9.1	9.3
9	19.2	24.1
10	12.2	<0.49
11	8.0	3.1
12	>30	>30
13	2.2	9.7
14	>30	>30
DL- penicilamina	3.1	7.4

Los compuestos son considerados inactivos cuando su IC₅₀ es >30 (Jung et al., 2006).

Weecharangsan y colaboradores, (2006) determinaron la capacidad antioxidante de GML por medio del ensayo de DPPH. Obtuvieron varios extractos de GML: en etanol al 50%, al 95%, en agua y en acetato de etilo. Todos presentaron propiedades antioxidantes, pero el más potente fue el extracto de etanol al 50%, seguido del extracto de agua.

Weecharangsan y colaboradores (2006) también evaluaron la capacidad neuroprotectora ahora del extracto en agua y etanol al 50% de GML. Para esto se realizaron dos protocolos; uno preventivo y otro simultáneo, ambos en células de neuroblastoma NG108-15 y usando H_2O_2 como agente oxidante.

Primeramente las células solo fueron tratadas con 200 μM de H_2O_2 lo cual indujo la pérdida de su viabilidad en un 50-60% con respecto a las controles.

Después se realizó el protocolo simultáneo, es decir se administró el extracto de GML junto con el H_2O_2 a las células y los resultados mostraron una protección significativa de ambos extractos de manera dependiente de la concentración del extracto en el intervalo 1-50 $\mu g/ml$, pero no a 100 $\mu g/ml$.

El protocolo de pretratamiento (se administró el extracto de GML previo al H_2O_2) mostró un incremento significativo en la viabilidad de la célula después de haberla expuesto al peróxido de hidrogeno, igualmente de manera dependiente de la concentración 1-50 $\mu g/ml$, pero no a 100 $\mu g/ml$, para ambos extractos. Los resultados sugieren que el pretratamiento con GML previene el daño ocasionado por el H_2O_2 .

Es importante resaltar que exposiciones altas de GML (100 $\mu g/ml$) provocan toxicidad significativa en células en condiciones normales, resultando un decremento de la capacidad atrapadora de radicales libres, así también como su capacidad protectora.

Williams et al., (1995), demostraron que la α -mangostina disminuye la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducida por el radical peroxilo en plasma humano. Disminuye también el consumo de α -tocoferol inducido por la oxidación de LDL.

6.- El metotrexato (MT)

Es un fármaco antagonista del ácido fólico que pertenece a la clase de los citotóxicos conocida como antimetabolitos.

Es usado para el tratamiento de enfermedades neoplásicas como: coriocarcinoma, leucemia linfoblástica aguda, cáncer de mama, cánceres epidermoides de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, linfoma no-Hodgkin, osteosarcoma y en otras enfermedades como: psoriasis y artritis reumatoide (Goodman *et al.*, 1991).

Farmacocinética

A dosis inferiores a 30 mg/m², el metotrexato se absorbe por completo en el tracto gastrointestinal, pero por arriba de dicha dosis, la absorción es incompleta debido a fenómenos de saturación de transporte. El metotrexato puede ser inactivado parcialmente en el intestino y en el hígado, contribuyendo a que la biodisponibilidad sea baja; de ahí que para las dosis altas se prefiera la vía intravenosa (Florez y Armijo, 1997).

Se distribuye en todo el organismo y penetra con dificultad y lentitud en los líquidos pleural, ascítico y cefalorraquídeo (Florez y Armijo, 1997).

Tiene un tiempo de vida media inicial de aproximadamente 2-3 h. (Goodman *et al.*, 1991)

Aproximadamente el 35% del metotrexato se encuentra unido a la albúmina y puede ser desplazado por algunos fármacos, como sulfonamidas, salicilatos, cloranfenicol, fenitoína y tetraciclina (Goodman *et al.*, 1991).

El metabolismo del metotrexato en el hígado es mínimo, pero a dosis altas los metabolitos se acumulan, esto incluye al 7-hidroximetotrexato que es nefrotóxico (Chabner *et al.*, 1982).

En varios tejidos sufre metabolismo intracelular, en donde una enzima llamada folilpoliglutamatosintetasa une residuos de glutamilo a la molécula (Shane y Cichowicz, 1987). Dado que estos poliglutamatos atraviesan con dificultad las

membranas celulares, se crea un mecanismo de atrapamiento y es responsable de la retención prolongada de metotrexato en algunos tejidos (durante semanas en los riñones; durante meses en el hígado), aunque también estas pueden ser reconvertidas a MT por hidrolasas (Chabner *et al.*, 1985).

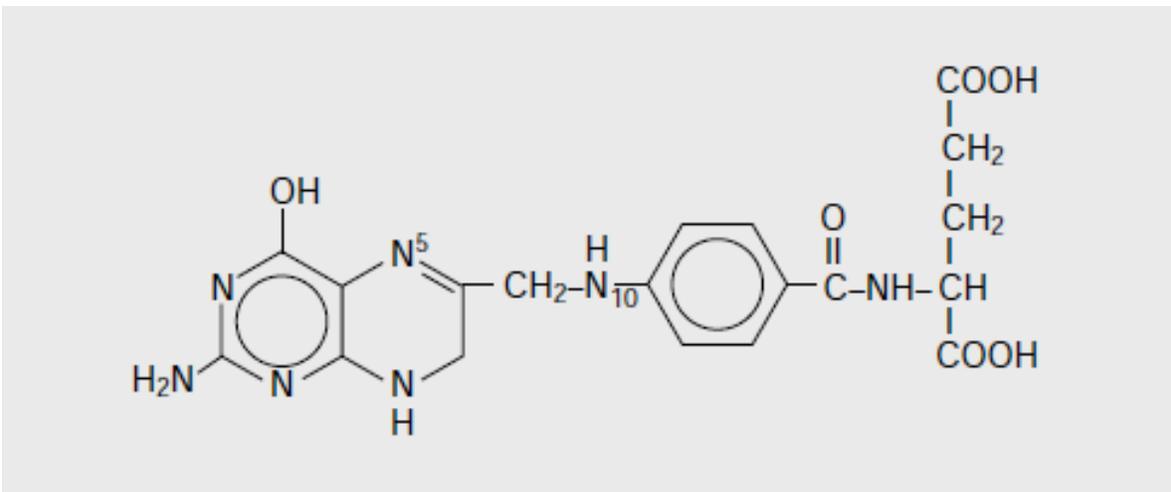
La retención y acción farmacológica prolongada de estos metabolitos varía en diferentes tipos de tejidos, células y tumores.

Se excreta en forma casi inalterada por la orina; una pequeña cantidad por heces, probablemente a través del tracto biliar. Se excreta por orina mediante una combinación de filtración glomerular y secreción tubular activa (Goodman *et al.*, 1991).

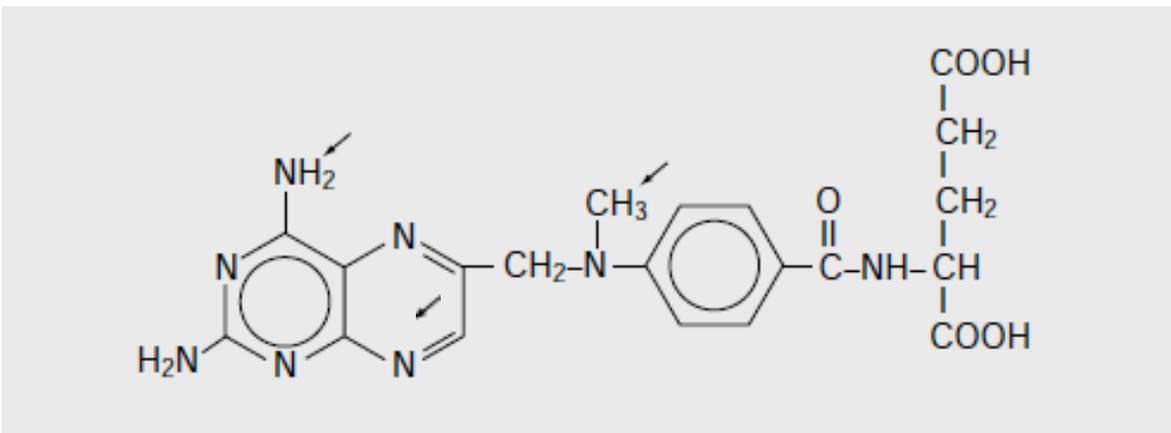
Farmacodinamia del metotrexato

El ácido fólico (FH_2) (esquema 6.1) es un factor esencial en la dieta. Funciona como cofactor en reacciones de transferencia monocarboxílica, pero para esto debe ser reducido por la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) a tetrahidrofolato (FH_4). Fragmentos de un solo carbono se agregan enzimáticamente al FH_4 y entonces este carbono puede ser transferido en posteriores reacciones de síntesis.

El sitio primario para los análogos fólicos como el MT (esquema 6.2) es la enzima DHFR. La inhibición de la enzima produce un agotamiento parcial de los cofactores tetrahidrofolatos necesarios para la síntesis de novo de purinas y timidilato; también, debido a que en el metabolismo de estos folatos interviene la síntesis de metionina y serina, estos dos aminoácidos se ven finalmente afectados en su producción, (ver esquema 6.3; Chabner *et al.*, 1985).



Esquema 6.1. Estructura química del ácido Fólico (FH₂).

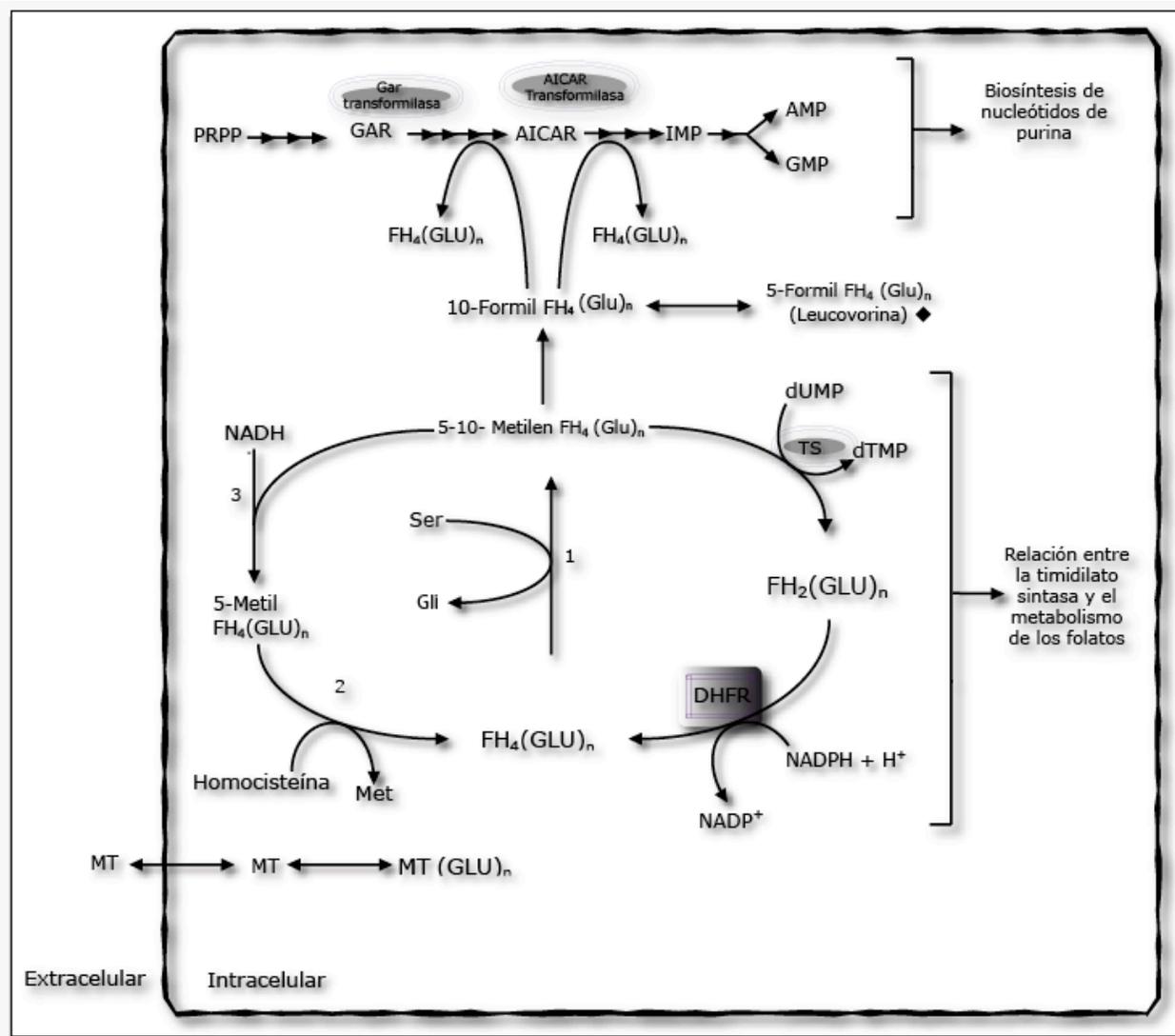


Esquema 6.2. Estructura química de metotrexato.

Las flechas en el esquema 6.2 señalan las diferencias químico-estructurales del metotrexato con respecto a el ácido fólico.

Las formas poliglutamadas del MT poseen afinidad por enzimas dependientes de folatos y también pueden inhibirlas, tales como la timidilato sintasa (TS), 5-aminoimidazol, ribonucleótido transformilasa (AICAR), glicinamida ribonucleótido transformilasa (GAR) (Chabner *et al.*, 1985), en el esquema 6.3 se presenta la ruta metabólica en la cual están implicadas estas enzimas.

Debido a su mecanismo de acción producen la muerte de las células que están en la fase S del ciclo celular. Lo que le da cierta selectividad para las células tumorales que están en constante replicación. Pero resulta tóxico para las células normales que también están en división rápida, como las del epitelio intestinal y las de la médula ósea (Goodman *et al.*, 1991).



Esquema 6.3. Rutas metabólicas que implican el mecanismo de acción del MT.

Dentro de un recuadro: enzima inhibida por MT; en óvalos: enzimas inhibidas por pologlutamatos de MT; 1: serina transhidroximetilasa; 2: metionina sintasa; 3: metilen tetrahidrofolato reductasa.

- El nombre de los sustratos y/o productos enzimáticos y de enzimas abreviados puede consultarse en el apartado de abreviaturas al inicio.

4.4 Toxicidad general

Los principales efectos tóxicos del MT son mielosupresión, mucositis gastrointestinal que aparecen de 3-7 días después de la administración y precede a la mielosupresión, siendo ambas reversibles (Goodman *et al.*, 1991).

Otros efectos tóxicos dependen de la forma de administración: cirrosis, osteoporosis, alopecia e inmunodepresión se han relacionado con la administración crónica de dosis bajas, mientras que alteraciones renales, vómitos y dermatitis descamativa se han observado con dosis altas.

La aparición de efectos tóxicos depende de la concentración extracelular que se alcance y del tiempo de exposición, existiendo una concentración y un tiempo de exposición umbrales que varían para cada órgano diana. La toxicidad aparece cuando se rebasan simultáneamente ambos umbrales, siendo tanto más grave cuanto mayor es el tiempo de exposición por encima de la concentración umbral (Flores y Armijo, 1997).

Para la médula ósea y el epitelio gastrointestinal, las concentraciones plasmáticas y el tiempo de exposición umbrales son de 2×10^{-8} M y de unas 42 horas, respectivamente; para el riñón se requieren 10^{-4} M durante unas pocas horas; para la piel y el cerebro también son necesarias concentraciones relativamente altas (10^{-5} M), mientras que para el pulmón y el hígado bastan concentraciones más bajas (de 10^{-8} a 10^{-7} M), (Flores y Armijo, 1997).

La toxicidad aumenta cuando disminuye la depuración renal, ya que dosis relativamente pequeñas pueden originar y mantener niveles citotóxicos (Goodman *et al.*, 1991).

IV.- Introducción

El riñón es un órgano que desempeña múltiples funciones en el mantenimiento de la homeostasis en la vida de los vertebrados. En el cuadro 1 se enuncian dichas funciones.

Cuadro1. Funciones del riñón

Funciones específicas
<ul style="list-style-type: none">• Excreción de desechos metabólicos• Mantenimiento del equilibrio hidro-electrolítico
Funciones en la que el riñón participa junto con otros órganos
<ul style="list-style-type: none">• Regulación de la presión arterial<ul style="list-style-type: none">○ Diuresis, natriuresis○ Activación del sistema renina-angiotensina• Regulación del pH• Síntesis de eritropoyetina• Síntesis de la forma activa de la vitamina D• Gluconeogénesis

Representa el 0.4% del peso corporal de un humano y recibe el 21% del gasto cardiaco. Es fácil advertir que reciben una cantidad de sangre sumamente alta en comparación con otros órganos.

Este órgano está expuesto a cantidades importantes de sustancias que se encuentren en la sangre. En condiciones normales este hecho no afecta a dicho órgano, pero cuando el organismo se expone a tóxicos exógenos (Xenobióticos), tóxicos endógenos o fármacos, puede haber nefrotoxicidad y dependiendo del tiempo de exposición y de la cantidad, se pueden presentar diferentes patologías.

La necrosis tubular aguda, una forma de insuficiencia renal aguda intrínseca, es una de ellas (Véase marco teórico, capítulo 2).

La importancia de una insuficiencia renal aguda deriva de las múltiples funciones que lleva a cabo el riñón, además de que presenta una morbilidad y mortalidad considerable.

De ahí el interés por estudiar cómo mitigar este estado patológico, tomando como base características patofisiológicas ocurridas durante el proceso.

Se han acumulado evidencias que sustentan la participación fundamental de ERO en el daño isquémico y tóxico que provoca una IRA (Pedraza-Chaverri y Medina., 2008).

Las ERO tienen la capacidad de producir múltiples efectos lesivos en las células como resultado de su interacción con proteínas, ADN, carbohidratos y lípidos, (ver marco teórico, capítulo 3).

La lesión por IRA afecta el sistema antioxidante enzimático de defensa, dando como resultado una disminución significativa de los niveles tanto de SOD, como de catalasa y glutatión peroxidasa en los riñones.

En diversos modelos de IRA como los inducidos por cisplatino (Lau, 1999), gentamicina (Pedraza-Chaverri et al., 2000) y dicromato de potasio (Barrera et al., 2003), por mencionar algunos, se ha demostrado que la presencia de sistemas antioxidantes pueden proporcionar cierta protección celular mitigando los daños y a su vez reduciendo la gravedad de la IRA.

El MT, un fármaco antineoplásico ampliamente usado en algunos tipos de cáncer (Marco teórico, capítulo 6) es primariamente excretado por el riñón y puede causar necrosis tubular aguda. Se sabe que el MT y el 7-OH-MT (metabolito producido en el hígado, ver marco teórico capítulo 6) pueden precipitar en los túbulos renales y obstruirlos (Joerger *et a l.*, 2005).

Se ha reportado que el MT puede causar lesión tubular directa, ya que se han observado casos de necrosis tubular proximal (Brenner, 2000).

Devrim y colaboradores (2005) reportaron que las ERO están implicados en la patogénesis de la IRA que induce el metotrexato. Jahovic y colaboradores (2003) reportaron que la administración de metotrexato incrementa los niveles de

malonaldehído. Se ha demostrado infiltración de neutrófilos y estrés oxidante en el daño renal que provoca el metotrexato (Kolli., 20009).

Grönroos y colaboradores (2006), demostraron en estudios in vitro que el metotrexato induce edematización de las células tubulares renales mediante la activación del mecanismo de transporte inverso del Na^+/H^+ en el túbulo distal dando como resultado un incremento en el flujo de Na^+ a las células y de la secreción de H^+ a la luz del túbulo. Estas alteraciones en la regulación del volumen celular juegan un rol importante en el daño celular tubular ya que dio lugar a necrosis y a inflamación intersticial.

Chelab y Majeed (2009) mostraron que riñones de ratones tratados con MT a dosis de 0.15, 0.2 y 0.3 mg/Kg durante 6 meses, presentaron cambios histológicos comparados con los ratones control; todos los grupos tratados con MT tenían congestionados los tubos renales y el efecto fue mayor conforme la dosis aumentó. Los túbulos se encontraban dilatados, había infiltraciones de linfocitos, los riñones de los sujetos que recibieron la dosis mayor adicionalmente presentaron degeneración de los túbulos corticales caracterizado por desechos de las células epiteliales exfoliadas en el lumen.

Por último no se ha establecido si el MT ejerce un efecto consistente sobre la arteriola aferente con vasoconstricción, aunque este efecto se ha considerado en algunos casos de niños con osteosarcoma tratados con MT (Brenner, 2000).

La hidratación antes del tratamiento, alcalinización de orina, contrarresta la precipitación del MT y su metabolito; También la vigilancia rutinaria de las concentraciones séricas de MT postinfusional y el rescate guiado con leucovorina (LV, marco teórico capítulo 6, figura 3) ha disminuido la incidencia de intoxicación grave y potencialmente mortal.

Sin embargo cuando las concentraciones séricas de MT son persistentemente superiores a 10-100 mM, altas dosis de LV no revierten por completo la toxicidad del MT. La timidina puede ser utilizada en caso de toxicidad MT, pero debido a su rápido aclaramiento debe ser administrada en altas dosis por infusión continua (Goodman et al, 1991).

La diálisis peritoneal no es eficaz, muy probablemente debido a una combinación de factores, como la unión a proteínas del MT de alto grado de ionización (Ahmad et al, 1978). La hemodiálisis y la hemoperfusión tienen una eficacia variable y por lo general sólo producen una disminución transitoria de concentraciones plasmáticas de MT. Los métodos alternativos para tratar la toxicidad del MT son necesarios.

Sabemos que si causa necrosis o hay infiltrado de células blancas hay producción de ERO que a su vez también dañan al tejido contiguo contribuyendo a la gravedad del estado patológico.

En este proyecto se pretende generar un modelo experimental de IRA inducida con MT y realizar una comparación introduciendo un antioxidante durante el transcurso del experimento, se determinará si existe efecto un preventivo o reductor de la IRA inducida con éste fármaco.

El antioxidante que se usará en éste experimento es el Xango. Es un suplemento alimenticio, compuesto con puré de la fruta entera del mangostán y una combinación de otros jugos de fruta como manzana, uva, pera, arándano, frambuesa y cereza; además de pectina, goma xantana y benzoato de sodio como conservador.

Diversos usuarios del producto han descrito múltiples beneficios, similares a los que el fruto del mangostán posee; sin embargo no se ha comprobado del todo, ya que se han realizado pocos estudios, como el que llevó a cabo Gonzáles Cuahutenco (2007), donde probó la capacidad antioxidante del Xango. En dicho estudio se demostró que puede atrapar al HOCL, al O_2^- y al ONOO⁻ y comparado con el extracto de la cáscara de mangostán, este último resultó más efectivo.

Ya que el fruto del mangostán se cosecha principalmente en el sureste de Asia, es poco accesible para el resto del mundo, pero al menos podemos aprovechar algunas de sus múltiples propiedades benéficas por medio del Xango, que es comercializado en diversos países.

V.- Hipótesis

Debido a que el estrés oxidante participa en el desarrollo de una IRA, la administración de jugo de mangostán, el cual posee propiedades antioxidantes será capaz de prevenir o disminuir la gravedad de éste padecimiento que será inducido con metotrexato.

VI.- Objetivo general

Investigar si el jugo mangostán previene o reduce la IRA mediante la disminución del estrés oxidante producido por el metotrexato.

Objetivos particulares

- Corroborar la nefrotoxicidad del metotrexato.
- Establecer un modelo de IRA inducida con metotrexato en ratas.
- Evaluar el efecto protector del jugo de mangostán (Xango) en la IRA.
- Evaluar las enzimas antioxidantes.
- Determinar si el jugo de mangostán tiene alguna influencia en la lipoperoxidación ocurrida durante la IRA.

VII.- Materiales y métodos

1.- Sujetos experimentales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar entre 250-300 g de peso, se mantuvieron en jaulas metabólicas (NALGE COMPANY) bajo condiciones estándar de temperatura a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ con ciclos artificiales de luz-oscuridad de 12 h. El alimento (RODENT LABORATORY CHOW) y el agua (*ad libitum*) se proporcionaron durante todo el experimento.

2.- Fármaco y antioxidante

El metotrexato se compró en farmacias especializadas. Se utilizó metotrexato de Asofarma, es un liofilizado que contiene 500 mg del fármaco. La solución inyectable de MT se preparó el mismo día de su uso con agua destilada hasta obtener la concentración requerida.

El jugo de mangostán fue obtenido comercialmente de la marca Xango y se administró luego de centrifugarse 10 min a 3000 xg.

3.-Reactivos

Para las determinaciones de creatinina en suero, depuración de creatinina y nitrógeno de urea en sangre (BUN) se emplearon kits comerciales de SPINREACT de Ctra. Coloma, Girona, España. El ácido tiobarbiturico, el tetrametoxipropano, el mesilato de deferoxamina, nitroazul de tetrazolio, el NADPH, el hidroxitouleno butilado (BHT), la glutatión reductasa, el glutatión reducido, la albúmina sérica bovina, el reactivo de Folin, el carbonato de sodio, el p-nitrofenol-N-acetil- β -D-glucosaminado, la xantina, la xantina oxidasa fueron de SIGMA-ALDRICH de St. Louis, USA. El etanol, el fosfato de potasio monobásico, el fosfato de sodio dibásico, el butanol, la piridina, el ácido clorhídrico, el tartrato de sodio potásico, el peróxido de hidrógeno, el sulfato de amonio, el sulfato cúprico, el cloruro cúprico y la sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético fueron de JT BAKER del edo. de México, México.

4.- Muestras

4.1 Orina. La orina se recolectó en intervalos de 24 h. Se centrifugaron a 1000 g por 10 min a temperatura ambiente en una centrifuga Hettich Zentrifugen EBA 20. Se tomaron alícuotas de 1 mL y se conservaron a -20°C en tubos eppendorf.

4.2 Suero. Después de sacrificar a las ratas, se recolectó su sangre en tubos de ensayo. Después de que coagularon, se despegó el coagulo y las muestras se centrifugaron a 1000 g por 10 min a temperatura ambiente y se tomaron alícuotas de 1 mL que se conservaron en microtubos.

4.3 Riñones. Fueron extraídos de las ratas, se les realizó un corte transversal y se mantuvieron a -20°C en papel aluminio.

4.4 Homogenizado para el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Se tomaron 0.05 g de tejido renal, que se obtuvo a partir de un corte transversal a la altura del hilio. Se colocó en 0.425 mL de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 que contenía 0.025 mL de hidroxitouleno butilado (BHT) 0.1 M. Se licuó con un homogenizador tipo politrón PT 10-35 durante 20 s y se congelaron hasta su uso.

4.5 Homogenizado para determinación de la actividad enzimática. Se preparó en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, tritón 1%, empleando el homogenizador durante 20 s. Después las muestras se sometieron a centrifugación en una microcentrífuga Beckman a 15 000 x g durante 1 h a 4°C.

5.- Diseño experimental

5.1 Modelo de insuficiencia renal inducida con metotrexato

Se realizaron diferentes protocolos para probar varias dosis (20, 65, 75, 100, 125 y 150 mg/Kg de peso) de metotrexato. En cada protocolo se incluyó un grupo de ratas control a las cuales no se les administró fármaco. Cada grupo estuvo formado por 3 ratas control y 4 experimentales.

Los animales se pesaron diariamente y se recolectó la orina de cada 24 h. El MT se administró en el día cero y las ratas se sacrificaron por decapitación el día 2. Se recolectó su sangre, a partir de la cual se obtuvo el suero.

A partir de estas dos muestras biológicas se determinó BUN, creatinina en suero, depuración de creatinina y proteínas totales en orina.

5.2 Influencia del jugo de mangostán (MG) en la IRA inducida con MT

Se formaron 4 grupos experimentales de 3 ratas cada uno. En la tabla 1 se puede observar el tratamiento que se le dio a cada grupo. La vía de administración de MT y MG fue intraperitoneal.

La tabla 2 describe las actividades realizadas cada día. La orina de las ratas de cada 24 h y los riñones obtenidos se guardaron en congelación para su posterior análisis. A partir de estas dos muestras biológicas se determinaron el BUN, la creatinina en suero y la depuración de creatinina, actividad de enzimas antioxidantes en riñón (catalasa, SOD y GPx) y el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Tabla1. Indicaciones para el tratamiento de cada grupo

Grupo	Tratamiento	Dosis (Se administró por vía intraperitoneal)	Días de administración
1	Control (CT)	-	-
2	Metotrexato (MT)	100 mg/kg	0
3	MG + MT	3 ml/Kg (MG) + 100 mg/kg (MT)	-1, 0, 1 y 2 (MG) 0 (MT)
4	Mangostán (MG)	3 ml/Kg	-1, 0, 1 y 2

Tabla 2. Actividades realizadas durante el protocolo

Día	Actividad
-1	-Pesar ratas -Administrar MG
0	-Pesar ratas -Administrar MG -Administrar MT
1	-Pesar ratas -Administrar MG -Colocar a las ratas en las cajas metabólicas
2	-Pesar ratas -Administrar MG -Obtener muestras de suero sanguíneo por medio de un corte en la punta de la cola -Recolectar muestras de orina
3	-Pesar ratas -Recolectar muestras de orina -Sacrificar ratas -Recolectar sangre -Extraer riñones

6.- Marcadores de función renal

6.1 Creatinina en suero.

Se determinó por un método colorimétrico-cinético mediante la reacción de Jaffé. El ácido pícrico en medio alcalino forma con la creatinina un complejo llamado picrato de creatinina de color naranja rojizo brillante que absorbe a una longitud de onda de 500 nm.

El espectro se ajustó a cero con un blanco de agua destilada. Posteriormente se leyó un estándar de creatinina de 2 mg/dL y a continuación las muestras de suero como se indica: en una celda de cuarzo se adicionó 50 µL de muestra (estándar o suero) y 500 µL de mezcla de reacción (ácido pícrico 17.5 mM e hidróxido de sodio 0.29M, 1:1), se leyó en el espectro la absorbencia a los 0, 30, 60 y 90 s.

La cantidad de creatinina se obtuvo realizando un cociente de la diferencia de absorbencia de la muestra a los 90 s y a los 60 entre la diferencia de absorbencia del estándar a los 90 s y a los 60 s y multiplicando por la concentración del estándar.

6.2 Depuración de creatinina

Se cuantificó la creatinina en suero y en orina con el método de Jaffé. Se realizó una dilución 1:50 de la orina para realizar la cuantificación.

Se calculó la depuración de creatinina usando la siguiente fórmula:

$$DC_{(mL/min)} = \frac{[CreaOrina] \times VOrina}{[CreaSuero] \times 1440}$$

Dónde:

[CreaOrina] es la concentración de creatinina en orina (mg/dL)

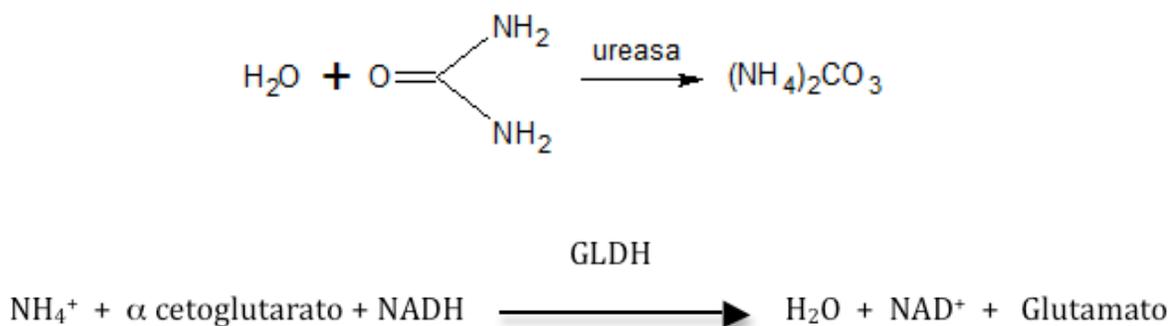
[CreaSuero] es la concentración de creatinina en suero (mg/dL)

Vorina es el volumen de orina de 24 h (mL)

1440 son los minutos que hay en 24 h

6.3 Nitrógeno de urea en sangre

Se utilizó un método enzimático acoplado, en el cual se llevaron a cabo las siguientes reacciones:



Dónde:

- GLDH, es la glutamato deshidrogenasa

La velocidad de esta segunda reacción es dependiente de la primera y puede medirse por la velocidad de conversión de NADH a NAD⁺ con el cambio de absorbencia a 340 nm.

La disminución de la NADH es proporcional a la concentración de urea de la muestra.

En una celda se adicionó 5 µL del suero y 500 µL de la mezcla de reacción (R1: TRIS pH7.8, 80 mM + α-cetogluturato 6 mM + ureasa 75000 U/L; R2: GLDH 60000 U/L + NADH 0.32 mM; 4:1). Se ajusto a cero con un blanco de agua destilada, y se tomaron lecturas a los 0, 30, 60 y 90 s. Primero se leyó un estándar de urea de 50 mg/dL y posteriormente las muestras de suero. La urea se determinó calculando el cociente de las diferencias de absorbencia de 30 s y 90 s de la muestra entre el estándar y multiplicando por la concentración de éste último. Finalmente para obtener el BUN se dividió entre 2.14, factor que indica la cantidad de nitrógeno por molécula de urea.

7. Evaluación del sistema antioxidante enzimático del riñón

7.1 Catalasa

Se determinó por el método de Aebi (1984). En una celda de cuarzo se adicionaron 25 μL del homogenizado diluido 1:10 en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7. Se mezcló con 725 μL de H_2O_2 3 mM en amortiguador de fosfatos 10 mM. Se hicieron lecturas a 240 nm a los 0, 15 y 30 s. Se tomó como reacción de primer orden con una constante k como una unidad de actividad de catalasa.

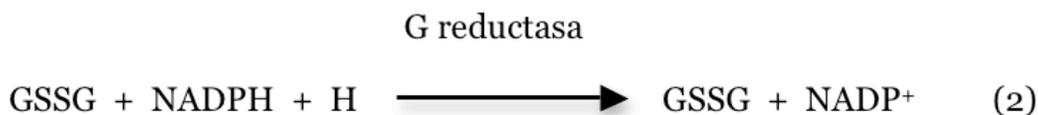
$$k = \frac{1}{t} \left(2.3 \times \text{Log} \frac{A1}{A2} \right)$$

Donde A1 y A2 son las absorbencias a los 15 y 30 s respectivamente.

Finalmente la actividad se dividió entre la cantidad de proteína total añadida a la muestra leída, previamente calculada por el método de Lowry y col (1959).

7.2 Glutación peroxidasa (Gpx)

Se empleó el método de Lawrence y Burk (1976), es una determinación acoplada e indirecta, ya que se determina a 340 nm el NADPH que se va consumiendo durante la reacción (2), el cual es directamente proporcional a la actividad de la GPx. En la reacción (2) G reductasa se refiere a la enzima glutatión reductasa.



Se hizo una dilución del homogenizado 1:60 con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0. Se tomaron 100 μ L de la dilución que se mezclaron con 800 μ L.

De la mezcla de reacción (fosfato de potasio 50 mM pH 7, EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, 1 unidad de glutatión reductasa/mL, glutatión reducido 1 mM) y se dejaron incubar por 5 min. Se preparó un tubo para la actividad inespecífica, agregando amortiguador de fosfatos en vez de la muestra. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocaron 0.1 mL de solución sustrato (2 μ L de H₂O₂ al 30% + 10 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7) en una celda de cuarzo y se mezcló con los 900 μ L previamente incubados que contenían la muestra. El espectro se ajustó a cero con un blanco de amortiguador de fosfatos 50 mM. Se calcularon las U/mg de proteína. Donde U=1 μ mol de NADPH oxidado en un minuto.

7.4 Superoxido dismutasa (Total)

La actividad de SOD se determinó por medio de la reducción de NBT (Oberley y Spitz, 1984). Se preparó una solución de xantina oxidasa con una concentración de 168 U/L y una mezcla de reacción que contenía en concentración final: xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 μ M, ASB 0.006% y carbonato de sodio 4 mM. Se colocaron 2.45 mL de mezcla de reacción en dos tubo de ensayo y se mantuvieron a 27°C. Posteriormente se adicionaron 0.5 mL del homogenizado renal diluido 1:1200 con agua, e inmediatamente la reacción se inició con 50 μ L de solución de xantina oxidasa. Se preparó un blanco con los mismos reactivos, pero en lugar de xantina oxidasa se agregó agua. De manera simultánea, se preparó un blanco que contenía xantina oxidasa, pero sin el homogenizado. Todos los tubos se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Al termino de esta se adicionó cloruro cúprico 0.8 mM y se leyó la densidad óptica a 560 nm. Los datos se expresaron como U de SOD/mg de proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción de NBT.

8. Evaluación del estrés oxidante

8.1 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Se basa en la reacción existente entre las sustancias producidas como resultado de la lipoperoxidación lipídica y el ácido tiobarbitúrico (TBA) bajo condiciones de calentamiento y bajo pH, el resultado es la formación de un cromógeno rosa.

Se colocó lo equivalente a 0.5 mg de proteína de cada muestra en tubos de vidrio (para esto se realizó previamente la determinación de Lowry para medir la cantidad de proteína en el homogenizado) y se llevó el volumen a 100 μ L con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Se añadieron 500 μ L de solución TBA/HC/TCA/DFO (Ácido tiobarbitúrico/ácido clorhídrico/ácido tricloroacético/mesilato de deferoxamina) a cada uno de los tubos (incluidos el blanco y los estándares para una curva patrón de MDA) y se agitaron en vortex. Después se colocaron por 10 min en baño de agua hirviendo. Después se añadieron 0.5 mL de butanol-piridina (15:1 v/v) a cada tubo con muestra. Se volvieron a agitar en el vortex. Posteriormente se centrifugó a 3, 000 xg por 10 min a temperatura ambiente. Se obtuvo la fase superior de cada tubo y las muestras se leyeron a 532 nm. Los datos obtenidos se interpolan en la curva patrón de MDA. Se calcularon los nmol de MDA/mg de proteína.

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

10.- Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa Prism 3.02 (Graphpad, San Diego, CA) por análisis ANOVA, y comparaciones múltiples con el pos test Dunnett. Un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

VIII.- RESULTADOS Y ANALISIS

- **Modelo de insuficiencia renal inducida con metotrexato**

La búsqueda de datos sobre la insuficiencia renal en ratas Wistar no es amplia ni concluyente. Por tanto se probaron diferentes dosis de metotrexato (20, 65, 75, 100, 125 y 150 mg/Kg) para determinar la dosis adecuada para inducir la insuficiencia renal en las ratas de esta cepa. La dosis de 20 mg/Kg no generó daño funcional renal. Las dosis de 65 y 75 mg/kg, indujeron IRA en algunos animales. Sin embargo no todos los animales se enfermaron y por tanto no existió diferencia significativa vs. el grupo CT. La dosis de 150 mg/Kg resultó ser fatal para los sujetos experimentales. Por lo que ninguna de las dosis anteriores fue adecuada para un modelo de insuficiencia renal aguda. Las dosis de 100 y 125 mg/Kg (MT 100 y MT 125) indujeron IRA y los resultados se presentan a continuación.

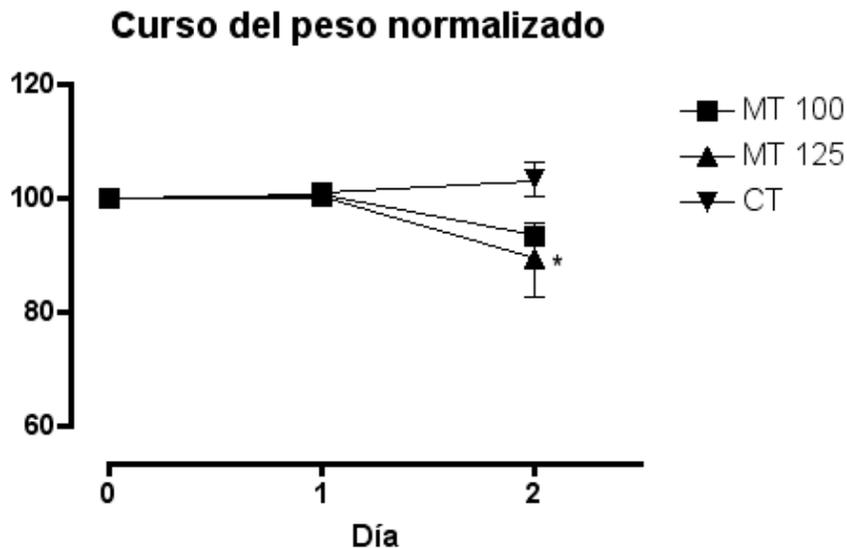


Figura 1. Se tomó como un 100% el peso inicial de cada rata y se usó como referencia para comparar las variaciones de peso de cada rata conforme a los días. Grupos CT: control, 100: grupo experimental que recibió dosis de 100 mg/Kg de peso de metotrexato. 125: grupo experimental que recibió dosis de 125 mg/Kg de peso de metotrexato. Promedio \pm EEM. n=3-4. * P< 0.05 vs CT.

En la figura 1 se observa que el tratamiento con metotrexato influye en el peso corporal. Las ratas de los tres grupos no presentan variaciones en el peso en el día 0 y 1. Pero para el día dos el grupo de MT125 presenta una tendencia a la baja y con respecto a los demás grupos, este si muestra una diferencia significativa.

Evaluación de la IRA

La IRA fue evaluada mediante la determinación de BUN, de creatinina en suero y de depuración de creatinina, realizadas en el día 2.

Se realizaron éstas tres determinaciones ya que en conjunto nos brindan un panorama más confiable sobre la función de filtrado del glomérulo. Aproximadamente el 40% de la urea es reabsorbida en el sistema tubular. Actualmente se sabe también que la creatinina es secretada y reabsorbida en pequeñísimas cantidades en el sistema tubular, por lo que para tener una mejor representación de la función glomerular se hizo una correlación de la filtración de estas dos moléculas.

En la figura 2, la gráfica de BUN muestra una tendencia en orden creciente comenzando por el grupo: CT, seguido del grupo 100 y finalmente con el de 125. Esto significa que el BUN aumenta conforme aumenta la dosis de MT, mientras que el grupo CT muestra un BUN aún menor que la dosis mas baja de MT. Sin embargo estadísticamente no hay diferencia significativa. Por lo tanto este parámetro por sí solo no determina la IRA.

La gráfica de creatinina en suero está indicando que la creatinina se está acumulando en el suero de los dos grupos experimentales (100 y 125), ya que los niveles de ésta molécula están significativamente sobre los niveles del grupo control.

En cuanto a la gráfica de depuración de creatinina se aprecia una significativa disminución de la filtración de creatinina para los grupos experimentales (100 y 125) con respecto al grupo control. Estos datos son congruentes con los de la gráfica 2.2, ya que si no se está llevando a cabo la filtración, la creatinina comienza a acumularse en el suero tal como lo muestra dicha gráfica.

De acuerdo a la definición de IRA (ver marco teórico, capítulo 2, p-10) podemos entonces admitir su existencia en los grupos experimentales a los que se administró MT a concentraciones de 100 y 125 mg/Kg de peso.

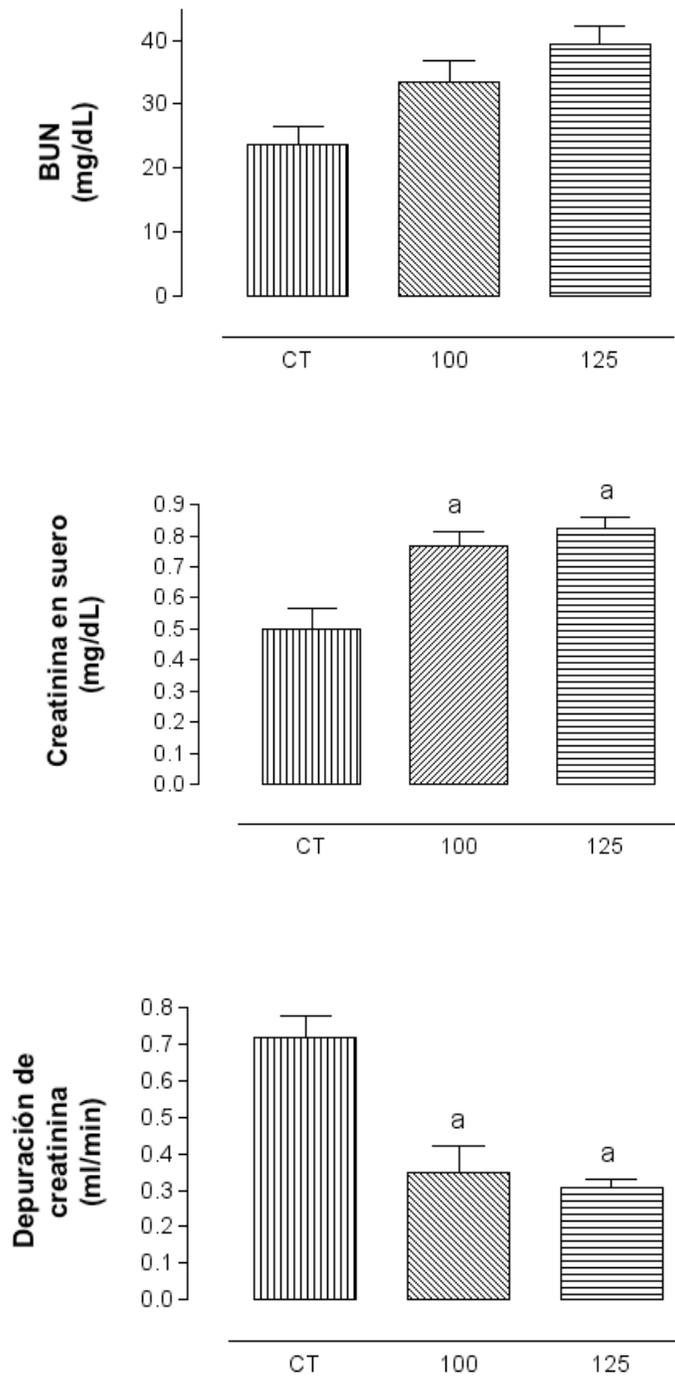


Figura 2. Marcadores de insuficiencia renal aguda. 1) Nitrógeno de urea en sangre (BUN), 2) creatinina en sangre y 3) Depuración de creatinina. Grupos CT: control, 100: grupo experimental que recibió dosis de 100 mg/Kg de peso de metotrexato. 125: grupo experimental que recibió dosis de 125 mg/Kg de peso de metotrexato. Promedio \pm EEM. n=3-4. a: P< 0.05 vs CT.

Para los experimentos que se realizaron posteriormente se decidió manejar la dosis de 100 mg/kg peso debido a que produce IRA y a que con respecto a la dosis de 125 mg/kg de peso, no hay diferencia entre los marcadores de daño renal.

- **Influencia del jugo de mangostán (MG) en la IRA inducida con MT**

Se decidió evaluar los parámetros de IRA en el día 2 como se realizó en el protocolo anterior y además también para el día 3, esto para observar si la IRA aumentaba o se revertía.

Se evaluó el peso corporal durante el experimento para observar si existía diferencia en éste parámetro en los diferentes grupos.

Se determinó el BUN, la creatinina en suero y la depuración de creatinina para determinar la influencia del jugo de mangostán en el IRA que produce el MT.

Se evaluaron los niveles de actividad del sistema antioxidante enzimático que incluye a la SOD, GPx y catalasa.

Finalmente se hizo un TBARS que consiste en cuantificar sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico que son producto de la lipoperoxidación.

La dosis de jugo de mangostán usada fue de 3 mL/Kg. La dosis de MT usada fue de 100 mg/kg de peso corporal.

En la figura 3 se observa que el grupo CT se mantuvo estable para los días -1, 0 y 1, pero para el día 2 hay un ligero aumento y que es aún mayor para el día tres. El grupo de MG se mantiene casi estable a lo largo de los tres días. El grupo de MT y de MG+MT presentan tendencias parecidas, su peso comienza a disminuir a partir del día cero y esto continúa hasta el día 3.

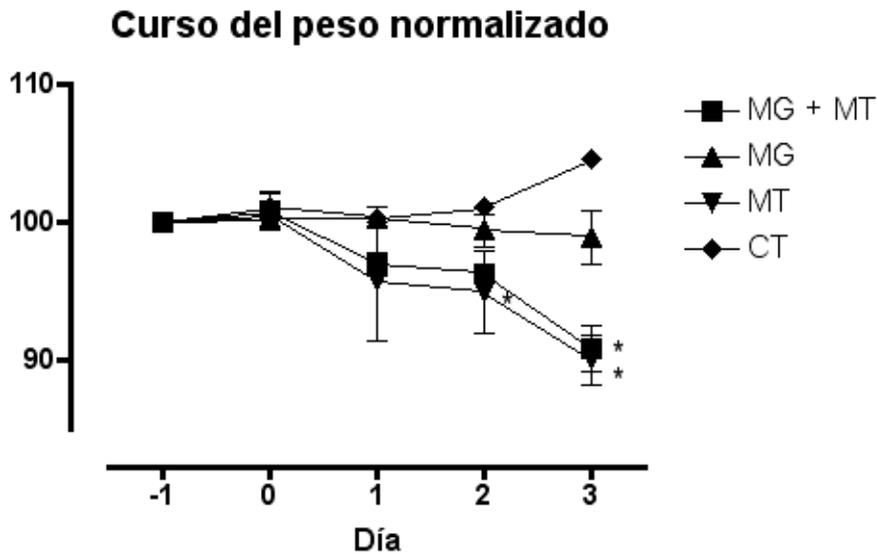


Figura 3. Curso del peso corporal normalizado. Se tomó como un 100% el peso inicial de cada rata y se usó como referencia para comparar las variaciones de peso de cada rata conforme a los días. Grupos CT: control, MT: grupo que recibió 100 mg/kg de peso de metotrexato, MG: grupo que recibió una dosis de 3 mL/Kg de peso de jugo de mangostán. MG+MT: grupo que recibió mangostán y metotrexato. Promedio \pm EEM. n=3-8 *P< 0.05 vs CT.

En la figura 4, en el día dos se observa que los niveles de BUN entre los grupos son iguales entre si, por lo tanto podemos decir que la urea no se está acumulando en la sangre. En contraste con el día tres, el grupo de MT aumenta en comparación con el grupo CT y con MG que continúan manteniendo sus niveles de BUN. De acuerdo a acumulación de BUN del día dos al día tres en el grupo MT se puede dilucidar una IRA en los animales. Para el grupo MG+MT presenta aumento de BUN del día 2 al día 3, sin embargo estos cambios no son significativos con respecto a los grupos CT y MG.

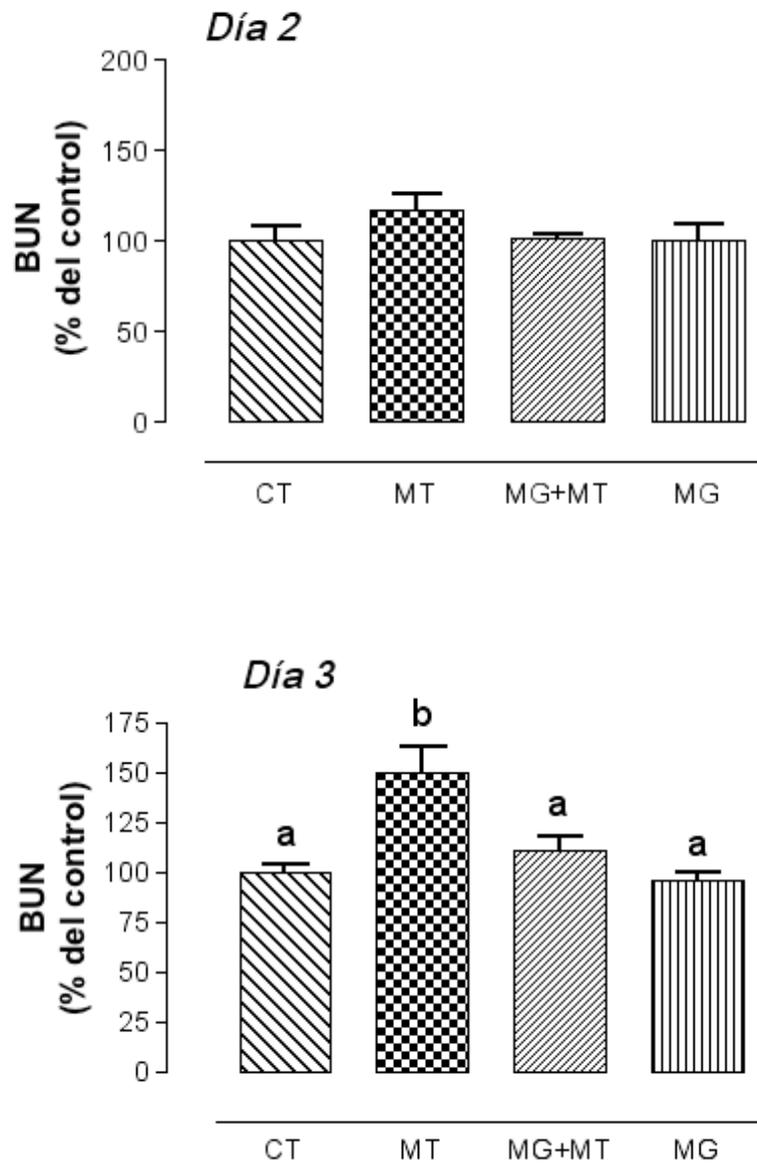


Figura 4. Influencia del jugo de mangostán en la IRA inducida con metotrexato. Nitrógeno de urea en sangre (BUN) del día 2 y 3. Grupos CT: control, MT: grupo que recibió 100 mg/kg de peso de metotrexato, MG: grupo que recibió una dosis de 3 mL/g de peso de jugo de mangostán. MG+MT: grupo que recibió mangostán y metotrexato. Promedio \pm EEM. n=3-8. a $P < 0.05$ vs MT, b $P < 0.05$ vs CT.

En la figura 5, en el día dos, se observa que los niveles de creatinina en el grupo MT aumentan comparado con los grupos CT y MG. El grupo MT+MG tiene un ligero aumento, pero el análisis estadístico indica que es igual a los grupos CT y MT, esto nos indica que existe protección parcial. En el día 3, se puede ver que los niveles de creatinina en suero se elevaron en el grupo de MT. En el grupo de MT+MG la creatinina en suero se muestra igual al de el grupo CT., esto nos indica que hay una protección total por parte del jugo de mangostán.

La figura 6 se observa que la depuración de creatinina en el día 2 y 3. Situandonos en el día 2 vemos que es considerablemente mas baja en los grupos MG+MT y MT comparada con los grupos MG y CT. Para el día 3, los grupos CT y MG mantienen sus niveles de depuración. La depuración del grupo de MT tendió a disminuir aún mas que en el día 2. La depuración del grupo MG+MT muestra un ligero aumento respecto al día 2. El análisis estadístico revela que hay diferencia entre los grupos MT y MT+MG y entre los grupos CT y MT+MG, lo cual evidencía que el jugo de mangostán está ejerciendo protección parcial.

Estos resultados muestran con seguridad una IRA establecida en el grupo MT, que del día 2 a el día 3 tendió a empeorar y claramente se aprecia que aunque el grupo MT+MG elevó sus niveles de creatinina y disminuyó su depuración en el día dos, muestra una tendencia diferente a el grupo MT hacia el día 3, ya que se comportó como el grupo CT y MG.

Es importante resaltar que el jugo de presenta un efecto protector contra la IRA que claramente se aprecia en el día 3.

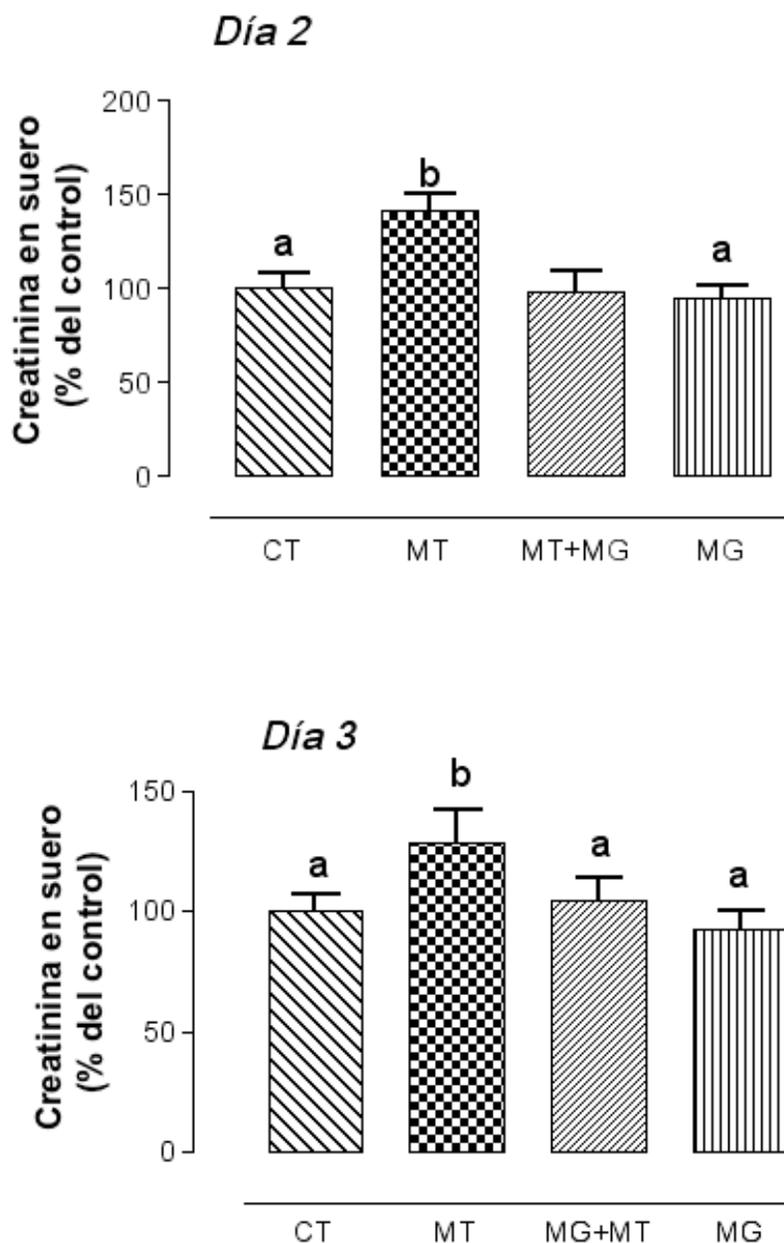


Figura 5. Influencia del jugo de mangostán en la IRA inducida con metotrexato. Creatinina en suero del día 2 y 3. Grupos CT: control, MT: grupo que recibió 100 mg/kg de peso de metotrexato, MG: grupo que recibió una dosis de 3 mL/Kg de peso de jugo de mangostán. MG+MT: grupo que recibió mangostán y metotrexato. Promedio \pm EEM. n=3-8. a $P < 0.05$ vs MT, b $P < 0.05$ vs CT.

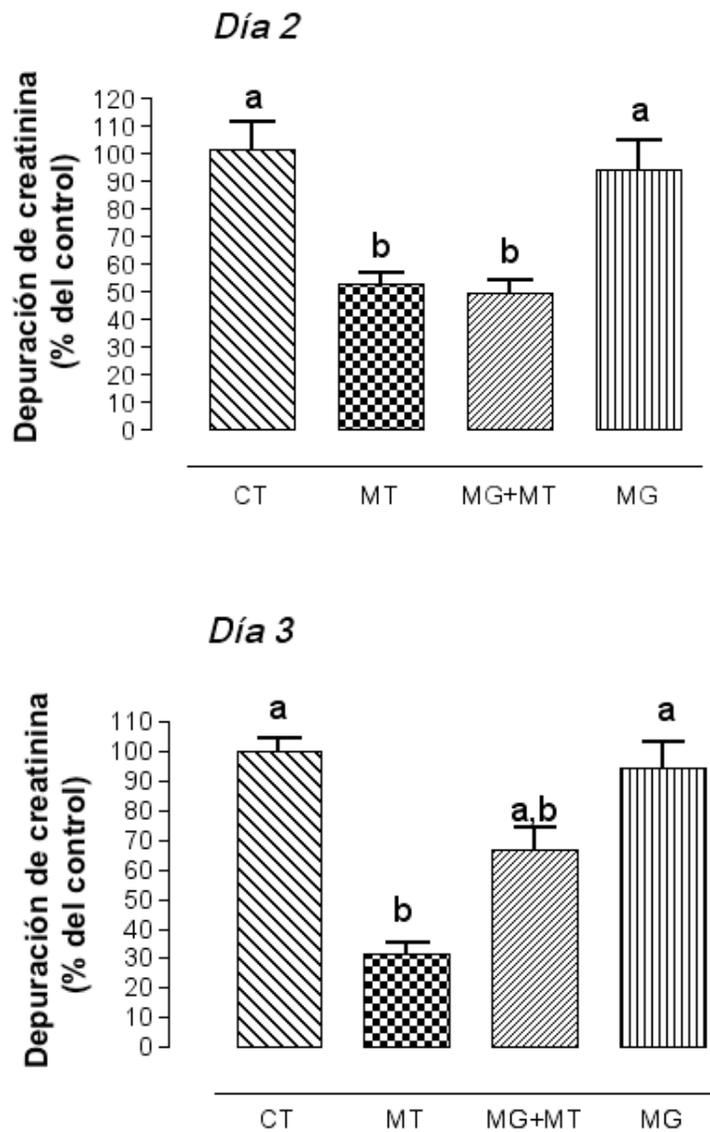


Figura 6. Influencia del jugo de mangostán en la IRA inducida con metotrexato. Depuración de creatinina del día 2 y 3. Grupos CT: control, MT: grupo que recibió 100 mg/kg de peso de metotrexato, MG: grupo que recibió una dosis de 3 mL/Kg de peso de jugo de mangostán. MG+MT: grupo que recibió mangostán y metotrexato. Promedio \pm EEM. n=3-8. a $P < 0.05$ vs MT, b $P < 0.05$ vs CT.

- **Evaluación de la actividad del sistema antioxidante enzimático**

Para la determinación de esta actividad se empleó un homogenado de riñón obtenido del día tres.

En la figura 7 en la gráfica de actividad de la catalasa se observa que el metotrexato afecta los niveles de actividad de esta enzima. El grupo MG+MT presenta un nivel de actividad más bajo y estadísticamente diferente al de los grupos MG y CT y que además es igual al grupo MT. Por lo tanto es claro que el metotrexato disminuye la actividad de la catalasa y que el jugo de mangostán no es capaz de prevenir esta disminución.

Las gráficas de actividad de la SOD y de la GPx nos dicen dos cosas: 1.- La administración de MT no influye en los niveles de estas enzimas, y 2.- Los animales tratados con jugo de mangostán no presentaron diferencias en los niveles de estas dos enzimas con respecto a el grupo CT.

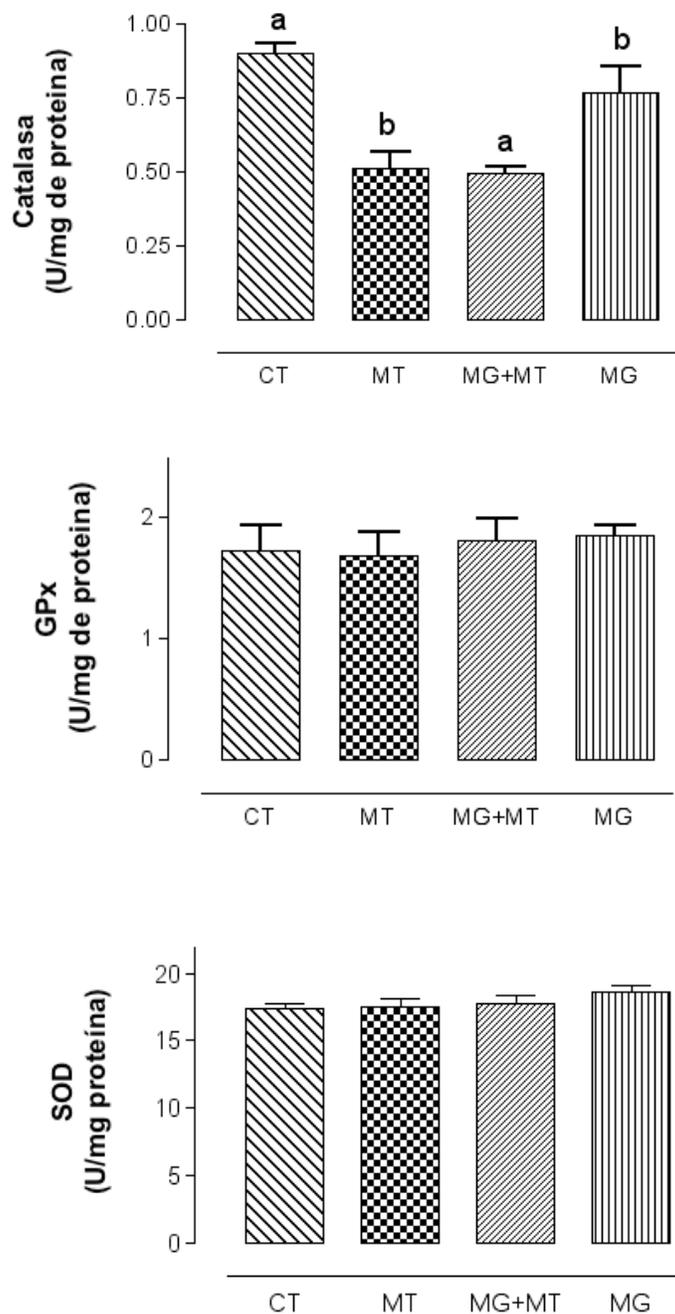


Figura 7. Evaluación del sistema antioxidante enzimático. 1) Catalasa, 2) Glutati6n peroxidasa, 3) Super6xido dismutasa. Grupos CT: control, MT: grupo que recibió 100 mg/kg de peso de metotrexato, MG: grupo que recibió una dosis de 3 mL/g de peso de jugo de mangostán. MG+MT: grupo que recibió mangostán y metotrexato. Promedio \pm EEM. n=3-8. a $P < 0.05$ vs MT, b $P < 0.05$ vs CT.

- **Evaluación del estrés oxidante**

Se realizó un TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico), que consiste en determinar los niveles de malonaldehído que es producto de la peroxidación lipídica mediante la reacción con ácido tiobarbiturico.

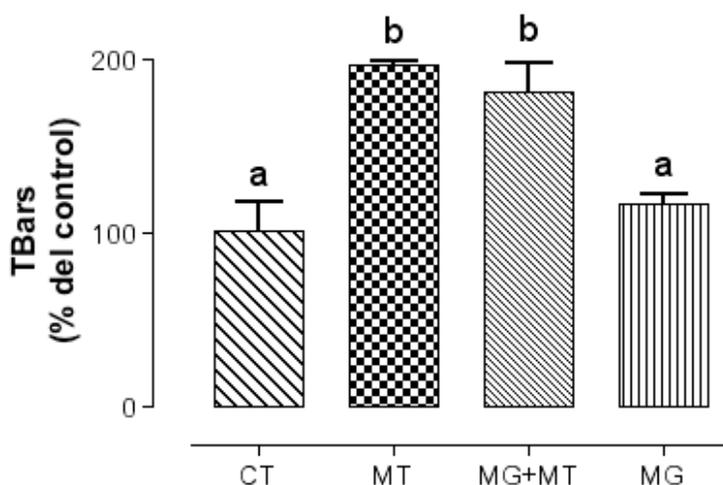


Figura 8. Evaluación del estrés oxidante. TBARS. Grupos CT: control, MT: grupo que recibió 100 mg/kg de peso de metotrexato, MG: grupo que recibió una dosis de 3 mL/g de peso de jugo de mangostán. MG+MT: grupo que recibió mangostán y metotrexato. Promedio \pm EEM. n=3-8. a $P < 0.05$ vs MT, b $P < 0.05$ vs CT.

En la figura 8 se observa un aumento de TBARS en el grupo MT y en MG+MT en comparación con el de MG y CT. Estos resultados indican que el metotrexato produce peroxidación lipídica y que el jugo de mangostán no ejerce protección contra este daño oxidativo.

Resumen de resultados

- El metotrexato causa IRA a dosis de 100 y 125 mg/Kg de peso y resulta ser fatal a 150 mg/Kg de peso en ratas Wistar macho.
- La IRA por metotrexato con una dosis de 100 mg/kg es más severa en el día 3 que en el día 2.
- El jugo de mangostán previene la disminución de la filtración glomerular, el aumento de creatinina y BUN en suero inducidos con el metotrexato a dosis de 100 mg/kg de peso en ratas.
- El metotrexato inhibe la actividad de la enzima catalasa, por lo que es una posible causa de generación de estrés oxidante.
- El metotrexato no afecta la actividad de las enzimas SOD y GPx.
- El mangostán no previene la disminución de la actividad de la catalasa inducida con el metotrexato.
- La administración de metotrexato en ratas aumentó la peroxidación lipídica.
- El jugo de mangostán no previno la peroxidación lipídica.

IX.- Conclusiones

- El metotrexato causa IRA a ratas wistar macho a dosis de 100 y 125 mg/Kg de peso.
- El jugo de mangostán es capaz de prevenir parcialmente la IRA inducida con metotrexato.
- El metotrexato causa la disminución de la actividad de la catalasa y no afecta los niveles de actividad de SOD y de GPx.
- El jugo de mangostán no ejerce influencia sobre las enzimas antioxidantes: CAT, SOD y GPx.
- El jugo de mangostán no previene la lipoperoxidación lipídica.

X.- Bibliografía

- Aebi, IH. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105: 121-126.
- Ahmad, S. (1995). *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses In Biology*, USA: Chapman & Hall, pp10-457.
- Avendaño, LH. (2009). *Nefrología clínica*, España: Médica Panamericana, pp1-79 y 731-739.
- Balasubramanian, K. y Rajagolapan, K. (1981). Novel Xanthones from *Garcinia mangostana*, structures of BR-xantone-A and BR-xantone-B. *Phytochemistry*, 27: 1552-1554.
- Banci, L., Benedetto, M., Bertini, I., Del Conte, R., Piccioli, M., Viezzoli, MS. (1998). Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc super oxide dismutase (SOD). Why is a SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry*, 37: 11780-11791.
- Baram, J., Allegra, CJ., Fine, RL. y Chabner, BA. (1987). Effect of Methotrexate on Intracellular Folate Pools in Purified Myeloid Precursor Cells from Normal Human Bone Marrow *The Journal of Clinical Investigation*, 79: 692-697.
- Barrera, OD., Maldonado, PD., Medina-Campos, ON., Hernández-Pando, R., Ibarra-Rubio, MA. y Pedraza-Chaverri, J. (2003). Protective effect of SnCl₂ on K₂Cr₂O₇-induced nephrotoxicity in rats: The indispensability of HO-1 preinduction and lack of association with some antioxidant enzyme. *Life Sciences*, 73(23): 3027-3041.
- Botella, GJ. (2008). *Manual de Nefrología Clínica*. España: MASSON, pp 3-8 y 85-88.
- Brenner, BM. (2000). *El riñón, tratado de nefrología*. USA: Elsevier, 30-60.
- Cadenas, E. y Davies, KJ. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging mitochondrial free radical generation, oxidative stress. *Free Radic Biol Med.*, 29: 222–230.

- Chabner, BA., Carmen, J., Gregory, Neil, J., Baram J., Koizumi S., Drake, J. y Jolivet, J. (1985). Polyglutamation of Methotrexate, Is Methotrexate a Prodrug?. J Clin Invest., 76: 907-912.
- Chelab, KG. y Majeed, KH. (2009). Methotrexate-induced histopathological changes in the kidneys of mice. Iraqi Journal of Veterinary, 23(II): 219-222.
- Chen, SX., Wan, M., Loh, BN. (1996). Active constituents against HIV-protease from *Garcinia mangostana*. Planta Med., 62: 381-382.
- Clendeninn; Baram, J., Koizumi, S., Drake, JC. y Jolivet J. (1985). Polyglutamation of Methotrexate, Is Methotrexate a Prodrug? The Journal of Clinical Investigation, 76: 907-912.
- Deen, WM. (1982). The glomerular barrier to macromolecules: theoretical and experimental considerations. En: Brenner BM, Stein JH. Nephrotic syndrome. Contemporary issues in Nephrology. Vol. 9 New Yorke, Churchil Livingstone, pp 1-20.
- Devrim, E., Cetrin, R., Kilicoglu, B. (2005). Methotrexate-induced renal stress in rats kidney tissues. Ren. Fail., 27: 771-773.
- CT, DU., y FJ, F. (1977). Anthocyanins of mangosteen, *Garcinia mangostana*, Journal of Food Science, 42: 1667-1668.
- Flórez, J., Armijo, JA., Mediavilla, A. (1997). Farmacología humana, España: MASSON, pp 1019-1038.
- Fong, KL., Mc Cay, PB. y Poyer, JL. (1976). Evidence for superoxide-depent reduction of Fe³⁺ and its role in enzyme-generated hydroxil radical formation. Chem. Biol. Interact, 15: 77-89.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. J. Exp. Biol., 201: 1203-1209.
- Grönroos, M., Chen, M., Jahnukainen, T., Capitano, A., Aizman RI. y Celsi G. (2006) Methotrexate induces cell swelling and necrosis in renal tubular cells. Pediatrics Blood Cancer., 46: 624–629.
- Gonzáles, CO. (2007). Propiedades antioxidantes in vitro del mangostán (*Garcinia mangostana* L.) tesis para obtener grado de licenciatura, UNAM. pp 4-52.

- Goodman, GA., Theodore, WR., Nies, SA. y Taylor, P. (1991), Las bases farmacológicas de la terapéutica. USA: Panamericana, pp 184-1188.
- Govindachari, TR., Kalyanaram, PS., Muthukumaraswamy, N. y Pai, BR. (1971). Xanthonas of *Garcinia mangostana* Linn. Tetrahedron 27: 3919-3926.
- Griffith, HR., Unsworth, J., Blake, DR. y Lunec, J. (1988). Free radicals in chemistry, pathology and medicine. London: Richelieu, 439–54.
- Gopalakrishnan, C., Shankaranarayanan, D., Kameswaran. L. y Nazimudeen, SK. (1997), Evaluation antifungal activity of natural xanthonas from the fruits *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. J. Nat. Prod., 60: 519-524.
- Guyton y Hall (2001). Tratado de Fisiología Médica, España: Mc Graw-Hill / Interamericana, pp 385-415.
- Haenen, GRM. y Bast, A. (1983). Protection against lipid peroxidation by a microsomal glutathionedependent labile factor. FEBS Lett., 159: 24-28.
- Halliwell, B. y Gutteridge, JM. (2001). Free radicals in biology and medicine. USA: Oxford university press, 36-104.
- Hansberg, TW. (2008). El dioxígeno y sus especies reactivas. Konigsberg FM. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. México: Manual moderno, pp 2-46.
- Jahovic, N., Cevic, H. y Sheirli, AO. (2003). Melatonin prevents methotrexate induced hepatorenal oxidative injury in rats. J. Pineal Res., 34: 282-287.
- Jian, Wu, Hecker, JH., Chiamvimonvat, N., (2009). Antioxidant enzyme gene transfer for ischemic diseases, Advanced Drug Delivery Reviews, 6: 351–363.
- Joerger, M., Huitema, H., Van den Bongard, P., Baas, JH., Schornagel, J., Schellens y Beijnen (2005). Determinants of the elimination of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate following high-dose infusional therapy to cancer patients. Br J Clin Pharmacol, 62: 71–80.
- Jung, HA., Su, BN., Keller, WJ., Mehta, RG., y Kinghorn, D. (2006). Antioxidant Xanthonas from pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). Agric. Food Chem., 54(6): 2077 -2082.

- Kolli, VK., y Abram P., Issac B. (2009). Neutrophil infiltration and oxidative stress may play a critical role in metotrexato-induced renal damage. *Chemotherapy*, 55: 83-90.
- Kooy, NW., Royall, JA., Ischiropoulos, H. y Beckman, JS. (1994). Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biol. Med.*, 16: 149-156.
- Lau, AH. (1999). Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury, *Kidney International*, 56: 1295–1298
- Lawrence, RA, y Burk, RF. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 71: 952-958.
- Linuma, M., Tosa, H., Tanaka, T., Asai, F., Kobayashi, Y., Shimano, R., Miyauchi, K., (1996). Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol.*, 48: 861-865.
- Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL. y Randall, RL. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Mahabusarakam, W., Proudfoot, J., Taylor, W. y Croft, K. (2000). Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthenes derived from mangostin. *Free Radic Res.*, 33: 643-659.
- Mathews, C., (2002). *Bioquímica, España: Pearson Addison-Wesley*, pp 500-508.
- McCord, JM. (2000). The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am J Med.*, 108: 652– 659.
- Morton, J., (1987). *Fruits from Warm Climates. USA: Creative Resource Systems Inc.*, 301-304.
- Nakatani, K., Atsumi, M., Arakawa, T., Oosawa, K., Shimura, S., Nakahata, N. y Ohizumi, Y. (2002). Inhibitions of histamine release and prostaglandin E2 synthesis by mangosteen. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 25: 1137-1141.

- Nakatani, K., Nakahata, N., Arakawa, T., Yasuda, H. y Ohizumi, Y. (2002). Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by c-mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. *Biochem. Pharmacol.*, 63: 73–79.
- Olinescu, RS. (2002). *Free radicals in medicine*. Nova Science Publishers, 11-34.
- Oury, TD., Day, BJ. y Crapo, JD. (1996). Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab. Invest.*, 75: 617-636.
- Packer, JE., Slater, TF. y Willson, RL. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 287: 737–738.
- Pedraza-Chaverri J., Cárdenas-Rodríguez N., Orozco-Ibarra M., y Pérez-Rojas JM. (2008). Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology*, 49(10): 3227-3239.
- Pedraza-Chaverri J., Maldonado PD., Medina-Campos ON., Olivares-Corichi IM., Granados-Silvestre MA., Hernández-Pando R. e Ibarra-Rubio ME. (2000). Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med.*, 29(7): 602-611.
- Pedraza-Chaverri J. y Medina-Campos ON. (2009). Daño oxidativo y nitrosativo en la insuficiencia renal aguda. Ed. Konigsberg FM. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual moderno*, pp 395-414.
- Peres, V. y Nagem, TJ. (1996). Tetroxygenated naturally occurring xanthenes. *Phytochemistry*, 44, 191–214.
- Peres, V., Nagem, TJ. y Faustino de Oliveira, F. (2000). Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. *Phytochemistry*, 55: 683–710.
- Pinto, MM., Sousa, ME. y Nascimento, MS. (2005). Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Curr. Med. Chem.*, 12: 2517–2538.
- Piña E. y Zentella PM. (2008). Daño a proteínas. Ed. Konigsberg FM. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual moderno: México*, pp 97-117.

- Putnam CD, Arvai AS., Bourne Y. y Tainer JA. (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPB binding and catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.*, 296: 295-309.
- Rodríguez PJM., Menéndez LJR., y Trujillo LY. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar* 30:1.
- Sakai, S., Katsura, M., Takayama, H., Aimi, N., Chokethaworn, N. y Suttajit, M., (1993). The structure of garcinone E. *Chem. & Pharm. Bull.*, 41: 958-960.
- Sanchez RMA. (2005). Estrés oxidativo en poblaciones de ancianos de residencia en area rural vs. area urbana, Tesis para obtener el grado de licenciatura, FEST Zaragoza. UNAM, 4-21.
- Shane, B. Cichowicz, DJ. (1987). Mammalian folyl- γ -polyglutamate synthetase. Purification and general properties of the hog liver enzyme. *Biochemistry*, 26: 504-512.
- Suksamrarn, S., Komutiban, O., Ratananukul, P., Chimnoi, N., Lartpornmatulee, N. y Suksamrarn, A. (2006). Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruit of *Garcinia mangostana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 54: 301-305.
- Venereo, GJR. (2002), Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar Rev Cub Med Mil.*, 31:2.
- Suksamrarn, S., Suwannapoch, N., Phakhodee, W., Thanuhiranlert, J., Ratananukul, P., Chimnoi, N. y Suksamrarn, A. (2003). Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem. Pharm. Bull.*, 51: 857-859.
- Sultanbawa, MUS. (1980). Xanthonoids of tropical plants, *Tetrahedron*, 36: 1465-1506.
- Tisher, CC. y Madsen KM. (2000). Anatomy of the kidney. *The kidney*. Brenner BM y Rector FC Jr. Brenner (ed) Saunders Co., Philadelphia, 3-67.
- Weecharangsan, W., Opanasopit, P., Sukuma, M., Ngawhirunpat, T., Sotanapuhun, U. y Siripong, P. (2006). Antioxidative and neuroprotective activities of extracts hull of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn). *Med. Princ. Pract.*, 15: 281-287.

- Williams, P., Ongsakul, M., Proudfoot, J., Croft, K. y Beilin, L., (1995). Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. *Free Radical Research* 23:175-184.
- Winter, ME. (1994). *Basic clinical Pharmacokinetics*. España: Diaz Santos p. 560
- Zenteno, ST. y Saldaña, BY. (2008). Daño a lípidos. Ed. Konigsberg FM. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. México: Manual moderno, pp 135-162.
- Zou, Y., Kim, AR., Kim, JE., Choi, JS. y Chung, H. (2002). Peroxynitrite scavenging activity of sinapic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) isolated from *Brassica juncea*. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 5884-5890.