



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL CON
CURCUMINA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD
RENAL CRÓNICA PROTEINÚRICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A N :

ALEJANDRA ELIZABETH ÁLVAREZ MEJÍA
SEBASTIÁN GUERRA LEÓN



México, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: **Profesora:** Perla Carolina Castañeda López

VOCAL: **Profesora:** Raquel Ortega Muñoz

SECRETARIO: **Profesor:** José Pedraza Chaverri

SUPLENTE 1: **Profesora:** Laura Carmona Salazar

SUPLENTE2: **Profesora:** Ana Margarita Zavala Ortiz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

LABORATORIO 209, EDIFICIO F, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

ASESOR DEL TEMA:

JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ

SUPERVISOR TÉCNICO:

ANGÉLICA SARAÍ JIMÉNEZ OSORIO

SUSTENTANTES:

ALEJANDRA ELIZABETH ÁLVAREZ MEJÍA

SEBASTIÁN GUERRA LEÓN

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

- La realización de este proyecto de tesis de licenciatura contó con la colaboración de las siguientes instituciones: Facultad de Química (UNAM), el Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos (HRLALM), la Clínica de diagnóstico automatizado (CLIDDA) anexa al HRLALM y el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICH).
- Se agradece la colaboración de la Dra. Magdalena Madero Róvalo (Jefa del departamento de nefrología del INCICH) y de la Dra. Martha Eunice Rodríguez (Jefa del Departamento de Investigación del HRLALM).
- Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) SALUD-2013-201519 y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN:	5
I. ANTECEDENTES	7
1.1 Curcumina.....	7
1.1.1 Generalidades	7
1.1.2 Usos terapéuticos de la curcumina	8
1.1.3 Propiedades antioxidantes.....	9
1.2 ESTRÉS OXIDANTE	9
1.2.1 Radicales libres y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.	10
1.2.2 Estrés oxidante y daño a blancos celulares.....	11
a) Peroxidación lipídica	11
b) Oxidación de proteínas	12
c) Daño a DNA	13
1.2.3 Sistema de defensa antioxidante.....	13
a) Glutación.....	13
b) Superóxido dismutasa (SOD)	14
c) Catalasa (CAT)	14
d) Glutación peroxidasa (GPx).....	15
e) Glutación reductasa (GR).....	15
1.2.4 Factor de transcripción nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2)	15
1.3 Enfermedad renal crónica (ERC).....	17
1.3.1 Causas de la ERC	19
1.3.2 Importancia de la proteinuria en la ERC	19
1.3.3 Estrés oxidante y enfermedad renal crónica (ERC).....	19
1.3.4 Tratamiento de la ERC	20
1.4 Curcumina y ERC	20
II. JUSTIFICACIÓN	21
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS.....	21
4.1 Objetivo General	21

4.2 Objetivos específicos	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 Reactivos	22
5.2 Primera etapa: Evaluación del estrés oxidante en los pacientes con ERC ..	23
5.2.1 Diseño del estudio	23
5.3 Segunda etapa: Evaluación de la suplementación oral con curcumina en pacientes con nefropatía de cualquier etiología	24
5.3.1 Diseño del estudio de intervención	24
5.4 Determinaciones bioquímicas	25
5.4.1 Determinaciones espectrofotométricas.....	25
5.5 Capacidad antioxidante en plasma	25
5.5.1 DPPH.....	25
5.5.2 ORAC	26
5.6 Marcadores de estrés	27
5.6.1 MDA en plasma	27
5.6.2 Determinación de GSH total en plasma	27
5.7 Actividad de enzimas antioxidantes	29
5.7.1 Actividad de glutatión reductasa	29
5.7.2 Actividad de glutatión peroxidasa	30
5.7.3 Actividad de catalasa (CAT) en eritrocitos	31
5.7.4 Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos	32
5.8 Cuantificación de Nrf2.....	33
5.8.1 Extracción de células mononucleares de sangre periférica con Lymphoprep®	33
5.8.2 Extracción de la fracción nuclear	34
5.8.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	34
5.8.4 Determinación de la actividad transcripcional de Nrf2	35
5.9 Análisis Estadístico	35
VI. RESULTADOS.....	36
6.1 Primera etapa: Evaluación del estrés oxidante	36
6.1.1 Características de la población de estudios.....	36

6.1.2 Evaluación del estrés oxidante en la población de estudio.....	38
6.1.2.1 Evaluación de la capacidad antioxidante.....	38
6.1.2.2 Marcadores de estrés oxidante	39
a) Concentración de malondialdehído.....	39
b) Concentración de GSH	39
c) Concentración de GSSG.....	40
d) Cociente GSH/GSSG.....	41
6.1.2.3 Actividad de enzimas antioxidantes en plasma	41
6.1.2.4 Actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos	42
6.2 SEGUNDA ETAPA.....	43
6.2.1 Evaluación de la suplementación oral con curcumina	43
6.2.2 Evaluación del estrés oxidante	44
6.2.2.1 Efecto de la curcumina sobre la capacidad antioxidante	44
6.2.2.2 Marcadores de estrés oxidante	45
a) Efecto de la curcumina sobre la concentración de MDA.....	45
b) Efecto de la curcumina sobre la concentración de GSH	46
c) Cociente GSH/GSSG	47
6.2.2.3 Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes	48
a) Efecto de la curcumina sobre la actividad de GPx en plasma.	48
b) Efecto de la curcumina sobre la actividad de GR en plasma; SOD y CAT en eritrocitos.....	49
6.2.2.4 Efecto de la curcumina sobre la inducción del factor de transcripción Nrf2.....	50
VII. DISCUSIÓN.....	50
VIII. CONCLUSIONES	57
XIX. PERSPECTIVAS	57
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXO I.....	68

ABREVIATURAS.

Abreviatura	Significado
1M2Fi	1-metil-2-fenilindol
4-HNE	4- hidroxinonenal
AAPH	2-2'-azobis(2-metilpropionamida) dicloruro
ABC	Área bajo la curva
ANOVA	Análisis de varianza
ARA II	Antagonistas de los receptores de angiotensina
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ASB	Albúmina sérica bovina
BHT	Hidroxitolueno butilado
bZIP	Cadena de leucinas
CAT	Catalasa
CLIDDA	Clínica de diagnóstico automatizado
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CTRL	Grupo control
CUR	Grupo tratado con curcumina
Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de cobre/zinc
C-DM	Grupo control diabéticos
DC	Grupo nefrópatas diabéticos tratados con curcumina
DEM	Desviación estándar sobre la media
DM	Diabetes mellitus
DMT2	Diabetes mellitus tipo II
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
DP	Grupo nefrópatas diabéticos con placebo
DPPH	2,2-difenilpicrilhidrazilo
DTNB	5,5'-Ditiobis-2 ácido nitrobenzoico
EC-SOD	Superóxido dismutasa extracelular

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas
ERC	Enfermedad renal crónica
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
FAD	Flavin adenina dinucleótido
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación-s-transferasa
GS-TNB	Aducto glutación oxidado- ácido 5-tionitrobenzoico
GSH/GSSG	Glutación reducido/oxidado
HTA	Hipertensión arterial
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HO-1	Hemo oxigenasa-1
HO₂[•]	Radical hidroperoxilo
HOMA-IR	Modelo homeostático de evaluación de la resistencia en insulina
HRLALM	Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos
HRP	Peroxidasa del rábano
IC	Insuficiencia cardíaca
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina I
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de masa corporal
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INCICH	Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Keap 1	Kelch-like ECH-associated protein 1
MDA	Malondialdehído
Maf	Fibrosarcoma aponeurótico de músculo
Mn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NDC	Grupo nefrópatas no diabéticos tratados con curcumina
NDGA	Ácido nordihidroguayarético
NDP	Grupo nefrópatas diabéticos con placebo
NEF	Grupo nefrópatas no diabéticos
NEF-DM	Grupo nefropatía diabética
NF-kB	Factor nuclear kappa B
NO[•]	Óxido nítrico
NO₂[•]	Dióxido de nitrógeno
NO₂⁺	Catión nitronio
NO⁺	Catión nitrosilo
NO⁻	Anión nitrosilo
NQO1	NADPH Quinona oxidoreductasa 1
Nrf2 (NFE2)	Factor de transcripción nuclear derivado de eritroide 2
NYHA	Asociación del corazón de Nueva York
¹O₂	Oxígeno singulete
O₂^{•-}	Anión superóxido
O₃	Ozono
OH[•]	Radical hidroxilo
ONOO⁻	Anión peroxinitrito
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PBO	Grupo con placebo
RO[•]	Radical alcoxilo
ROO[•]	Radical peroxilo
ROONO⁻	Alquil peroxinitrato
SOD	Superóxido dismutasa

SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TFG-β	Factor de crecimiento transformante beta
TMPO	Tetrametoxipropano
TNB	Ácido 5-tionitrobenzoico
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Trólox®	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
VFG	Velocidad de filtración glomerular
XO	Xantina oxidasa

RESUMEN:

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud pública a nivel mundial. Se caracteriza por el daño estructural del riñón y consecuentemente la disminución de la velocidad de filtración glomerular que conlleva a la disfunción renal. Está asociada a factores de riesgo tales como: hipertensión arterial sistémica, dislipidemia, obesidad, diabetes mellitus (DM), proteinuria >300 mg/día, estrés oxidante e inflamación, entre otros; siendo la proteinuria el factor de riesgo de mayor importancia para la progresión de la enfermedad renal. Actualmente el tratamiento para la nefropatía proteinúrica está enfocada en el bloqueo del sistema renina-angiotensina- aldosterona (SRAA) el cual atenúa la progresión de la ERC, sin embargo muchos pacientes progresan a ERC terminal y requieren terapia sustitutiva de la función renal. En la literatura existen diversos estudios que sustentan el uso de la curcumina como coadyuvante en el tratamiento de la ERC. La curcumina está presente en los extractos del rizoma de la planta *Curcuma longa L.* y se ha demostrado que posee propiedades terapéuticas útiles para el tratamiento de diversos padecimientos por su capacidad anti-inflamatoria y su acción como antioxidante bifuncional, ya que puede reducir especies reactivas y es capaz de inducir enzimas endógenas antioxidantes a través de la vía Keap1/Nrf2/ARE. En este trabajo de investigación se evaluó el efecto de la administración oral de curcumina en pacientes con ERC sobre marcadores de estrés oxidante, proteinuria y función renal como un posible tratamiento secundario con el objetivo de atenuar la progresión de la enfermedad renal.

METODOLOGÍA: Para evaluar el estado redox en los nefrópatas, se estratificaron a los sujetos de estudio en 4 grupos: Individuos sanos no diabéticos no nefrópatas (CTRL), Diabéticos sin nefropatía (C-DM) con más de 10 años de evolución de la DM, Nefrópatas no diabéticos (NEF) y Nefrópatas diabéticos (NEF-DM). Se determinaron los valores basales de parámetros bioquímicos y características antropométricas, la capacidad antioxidante por el método de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) así como por el método de atrapamiento del radical 2,2-difenilpicrilhidracilo (DPPH), las concentraciones de glutatión (GSH) y glutatión disulfuro (GSSG), malondialdehído (MDA) y la actividad de las enzimas glutatión

reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). De estos pacientes, se seleccionaron 98 individuos de la primera etapa. Se trató de un ensayo aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo. A los grupos de prueba se les administró 4 g de curcumina al día dividido en tres dosis con cada comida, durante 8 semanas. El grupo control recibió placebo por el mismo tiempo. Se determinaron los marcadores de estrés oxidante, la capacidad antioxidante y la actividad de enzimas antioxidantes al final de las 8 semanas. Los datos se analizaron con el programa Graph Pad 5.0 (Graph Pad, San Diego, EUA) utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar entre el grupo placebo y curcumina al final del estudio. Para analizar la variación de los datos de cada grupo al inicio y al finalizar el tratamiento con curcumina, se utilizó la prueba de Wilcoxon y una t-no paramétrica.

RESULTADOS: La curcumina administrada vía oral en pacientes con nefropatía de cualquier etiología indujo de manera significativa la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx). Se encontró también que la concentración de malondialdehído (MDA) en plasma disminuyó de manera significativa en el grupo de prueba respecto al grupo control. La administración oral de curcumina no presentó un efecto significativo en los ensayos de ORAC, DPPH, GSH, GR y cuantificación de Nrf2 en los grupos de estudio.

CONCLUSIONES: Los hallazgos sugieren que la administración oral de 4 g al día de curcumina en pacientes con nefropatía proteinúrica disminuye la concentración de MDA e induce la actividad de la enzima GPx en plasma. Bajo las condiciones en las que se realizó el estudio (cantidad de curcumina administrada, tiempo y control del tratamiento) la administración de curcumina no modificó la proteinuria, parámetros bioquímicos o antropométricos evaluados.

I. ANTECEDENTES

1.1 Curcumina

1.1.1 Generalidades

La *Curcuma longa* L. es una planta de origen asiático que pertenece a la familia de las Zingiberáceas, cuyo rizoma es utilizado por sus propiedades organolépticas como especia, por sus propiedades terapéuticas en la medicina tradicional así como colorante textil y alimenticio (Goel *et al.*, 2008).

Entre los componentes del extracto de este rizoma se encuentran: carbohidratos (4.7-8.2%), aceites esenciales (2.4-4.0%), ácidos grasos (1.7-3.3%), curcuminoides (curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina) cuyo contenido aproximado es de un 2.5%, aunque puede estar entre 2.5-5.0% del peso seco y otros polipéptidos como la turmerina (0.1% del extracto seco) (Srinivas *et al.*, 1992).

La cúrcuma contiene tres diferentes curcuminoides: diferuloilmetano, también llamada curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina (Fig.1); los cuales son capaces de atrapar especies reactivas de oxígeno (ERO) en sistemas *in vitro* (Aggarwal *et al.*, 2007).

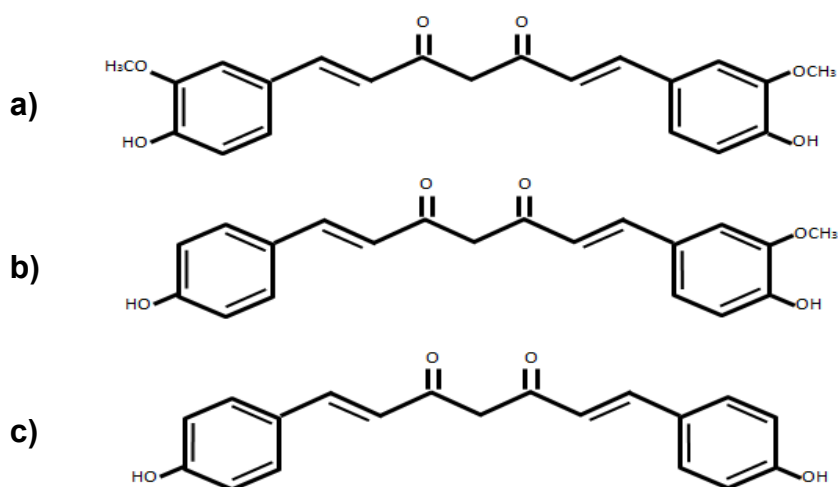


Figura 1. Estructura de los curcuminoides aislados del rizoma de la planta *Curcuma longa* L. a) curcumina o diferuloilmetano, b) demetoxicurcumina, c) bisdemetoxicurcumina. Modificada de Trujillo *et al.* (2013).

1.1.2 Usos terapéuticos de la curcumina

El principal componente activo aislado de la planta *Curcuma longa L.* es la curcumina. Esta molécula presenta diversos efectos terapéuticos contra diversos padecimientos como cáncer, pulmonares, neurológicos, hepáticos, metabólicos, autoinmunes, cardiovasculares gracias a sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias (Gupta *et al.*, 2011).

La curcumina ha sido utilizada por mucho tiempo en países orientales en la medicina tradicional para el tratamiento de varios padecimientos comunes como dolor de estómago, heridas en la piel, inflamación, úlceras, artritis, infecciones y disentería (Goel *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que la curcumina puede actuar como antiviral (González-Reyes *et al.*, 2013), antiparasitario (Reddy *et al.*, 2005) y fungicida (Kim *et al.*, 2003). Diversos estudios *in vivo* sustentan que la suplementación oral con curcumina es efectiva para tratar diversas patologías, tales como afecciones inflamatorias intestinales (Holt *et al.*, 2005) y enfermedades neurodegenerativas, hepáticas y renales (Trujillo *et al.*, 2014).

Recientemente se ha evaluado a la curcumina como un tratamiento potencial para prevenir y tratar la diabetes. En un estudio que se realizó durante 9 meses en una población pre-diabética de origen tailandés, se demostró que la curcumina tiene la capacidad de disminuir los niveles séricos de hemoglobina glicosilada (HbA1c), disminuir la resistencia a la insulina evaluada mediante el índice HOMA-IR (modelo homeostático de evaluación de la resistencia en insulina) y desacelerar la evolución de la pre-diabetes a diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (Chuengsamarn *et al.*, 2012). Por otro lado, se demostró que la suplementación oral de curcumina en pacientes con nefropatía de etiología diabética es capaz de atenuar la proteinuria y disminuir significativamente los niveles de interleucina 8 (IL-8) en plasma y orina (Khajehdehi *et al.*, 2011). Por otra parte, la curcumina tiene efectos benéficos en el tratamiento de enfermedades del corazón y relacionadas con el cáncer (Rouse *et al.*, 2014).

1.1.3 Propiedades antioxidantes

Actualmente es bien reconocido que la curcumina posee capacidad antioxidante, es decir, tiene la capacidad de prevenir, retardar o evitar el daño causado por la oxidación (Halliwell y Gutteridge, 2007). Es considerada como un antioxidante bifuncional ya que es capaz de atrapar especies reactivas y de inducir la expresión de diversas proteínas citoprotectoras a través de la vía Keap1/Nrf2/ARE (Dinkova-Kostova y Talalay, 2008).

La capacidad antioxidante directa de la curcumina se ha demostrado en estudios *in vitro* y está definida por su capacidad para reaccionar de manera directa con especies altamente reactivas como el radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH[•]), anión superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales peroxilo (ROO[•]), radicales hidroxilo (OH[•]), oxígeno singulete (¹O₂), óxido nítrico (NO[•]) y peroxinitrito (ONOO⁻) (Trujillo *et al.*, 2013). Además presenta una mayor capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica en comparación con la de otros compuestos antioxidantes conocidos, como hidroxitolueno butilado (BHT), α -tocoferol y trólox (Ak y Gülçin, 2008).

1.2 ESTRÉS OXIDANTE

El estrés oxidante se define como un desbalance entre la producción de ERO y especies reactivas del nitrógeno (ERN) con la producción de sistemas celulares de defensa antioxidante, encargados de neutralizar las especies reactivas producidas, previniendo los daños causados a nivel celular, protéico, lipídico y genómico. Entre las ERO producidas se encuentran el O₂^{•-}, H₂O₂ y OH[•]; las ERN se forman a partir de la combinación del NO[•] y el O₂^{•-} para formar ONOO⁻ los cuales en conjunto con las ERO dañan las células y causan el estrés nitrosativo (Tabla 1) (Betteridge, 2000).

El estrés oxidante juega un papel importante en el desarrollo de padecimientos metabólicos, así como en otras enfermedades como cáncer, diabetes mellitus (DM), enfermedades neurodegenerativas, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, entre otras y se ha demostrado que éste se encuentra estrechamente relacionado con el índice de masa corporal (IMC) (Le Lay *et al.*, 2014). En los

últimos años se ha observado un incremento en la prevalencia de obesidad a nivel mundial, lo cual ha generado un aumento en la incidencia de pacientes que desarrollan DMT2 y sus complicaciones como la enfermedad renal crónica (ERC) (Levey *et al.*, 2007).

1.2.1 Radicales libres y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Los radicales libres son moléculas inestables con uno o más electrones desapareados en su último orbital con un grado considerable de reactividad que les permiten participar en reacciones metabólicas, generando especies reactivas con propiedades oxidantes (Valko *et al.*, 2007). Las ERO pueden ser o no radicales del oxígeno que contienen un oxígeno parcialmente reducido y que presentan una mayor reactividad que el oxígeno molecular (Tabla 1). El 90% de las ERO son producidas dentro de la mitocondria como consecuencia del transporte de electrones (Valko *et al.*, 2006). Se ha demostrado que las ERO generan daño en diversas moléculas como ácido desoxirribonucleico (DNA), carbohidratos, proteínas y lípidos (Céspedes y Sánchez, 2000). Mientras que las ERN son capaces de llevar a cabo diversas modificaciones como nitración, oxidación, hidroxilación y nitrosación de diversas biomoléculas (Guzmán *et al.*, 2006).

Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	
Especies reactivas del oxígeno	
Radicales	Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)
	Hidroxilo (OH^{\bullet})
No Radicales	Peroxilo (ROO^{\bullet})
	Alcoxilo (RO^{\bullet})
	Hidroperoxilo (HO_2^{\bullet})
	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
	Ácido hipocloroso (HOCl)
	Oxígeno singulete (1O_2)
	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
	Ozono (O_3)
Especies reactivas del nitrógeno	
Radicales	Óxido nítrico (NO^{\bullet})
	Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet})

No radicales	Ácido nitroso HNO_2 Cloruro de nitrilo NO_2Cl Cation nitrosilo NO^+ Anion nitrosilo NO^- Tetróxido de dinitrógeno N_2O_4 Alquil peroxinitrato ROONO^- Trióxido de dinitrógeno N_2O_3 Peroxinitrito ONOO^- Cation nitronio, NO_2^+
---------------------	---

Tabla 1. Especies Reactivas de oxígeno y nitrógeno. Modificada de Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009.

1.2.2 Estrés oxidante y daño a blancos celulares

a) Peroxidación lipídica

La susceptibilidad de los lípidos a su oxidación por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos y la formación de productos derivados de la peroxidación lipídica se encuentran asociados a diversos padecimientos donde el estrés oxidante juega un papel esencial para su desarrollo (Niki, 2008). Los ácidos grasos poliinsaturados son los lípidos más afectados por las especies reactivas debido a sus dobles enlaces que desencadenan daño oxidativo causado por los productos finales e intermediarios de la peroxidación lipídica (Niki, 2014). La peroxidación lipídica puede ser descrita mediante tres mecanismos: oxidación mediada por radicales libres, oxidación no enzimática mediada por radicales libres y oxidación enzimática (Yoshida *et al.*, 2013).

El daño oxidativo producido por la peroxidación lipídica es generado principalmente por el radical OH^\bullet que actúa sobre los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana celular los cuales son oxidados debido a la salida de un átomo de hidrógeno del grupo metileno para unirse con el hidroxilo formando el radical ROO^\bullet el cual dará lugar a un hidroperóxido lipídico y a un nuevo radical lipídico ocasionado por liberación de un átomo de hidrógeno de un segundo ácido graso, este proceso se realiza en cadena hasta la muerte celular (Andresen *et al.*, 2006). Los hidroperóxidos se descomponen en etano, pentano, aldehídos reactivos y cetonas, dentro de los aldehídos formados se encuentran el malondialdehído (MDA) y el 4- hidroxinonenal (4-HNE) capaces de

reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos (Fig. 2) (Céspedes y Castillo, 2008).

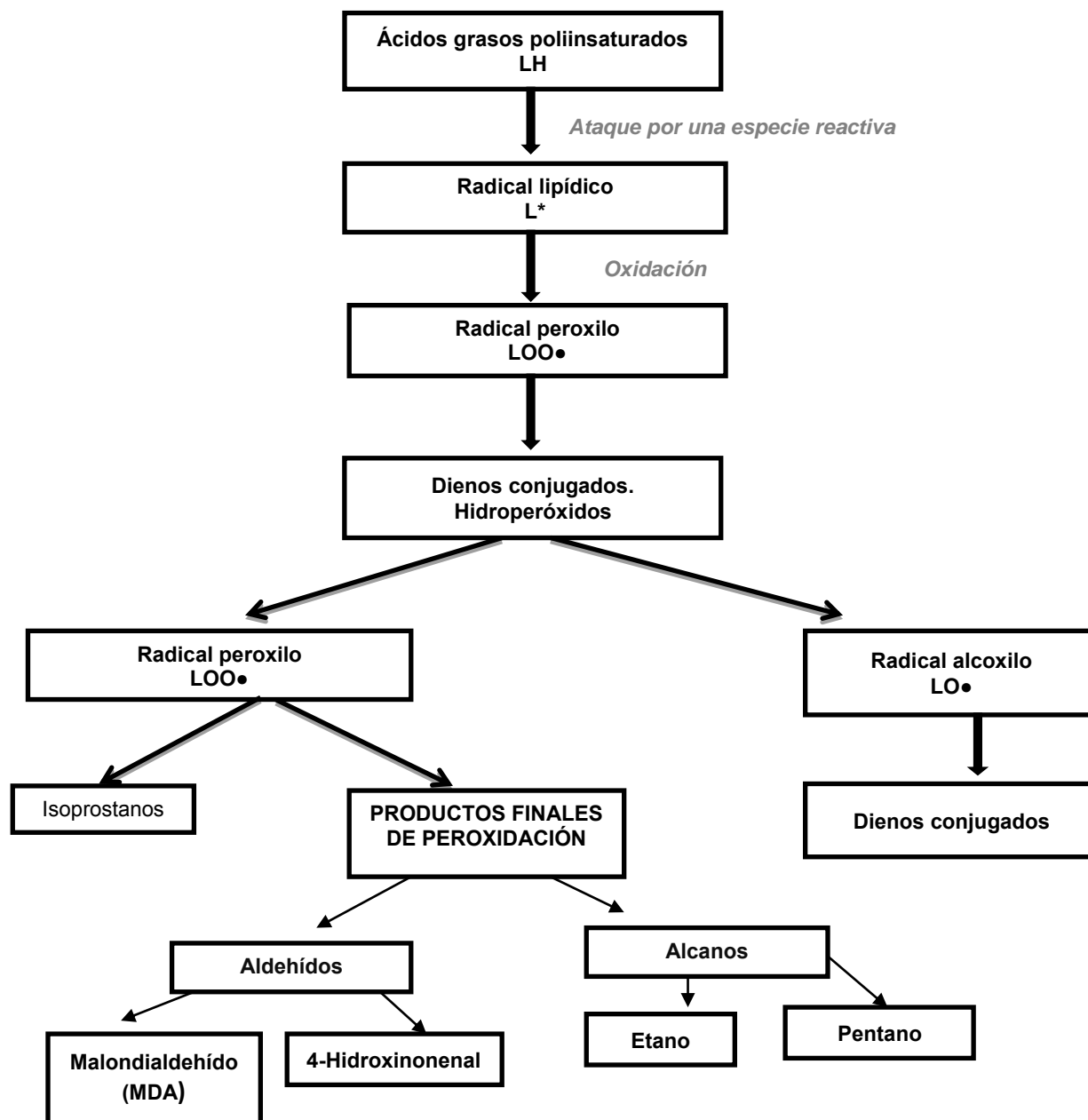


Figura. 2 Mecanismo de la peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados en presencia de radicales libres (Céspedes y Castillo, 2008).

b) Oxidación de proteínas

La oxidación de proteínas está definida como la modificación covalente de su estructura y afecta prácticamente a todos los aminoácidos favoreciendo la proteólisis, la disminución de la función protéica, la inactivación de enzimas, el

bloqueo de la fosforilación de tirosinas y liberación de iones metálicos (Olivares *et al.*, 2006). Se ha descrito que la modificación proteica por acción de radicales libres desencadena la formación de grupos carbonilos derivados de la oxidación directa de cadenas laterales de aminoácidos y ruptura de proteínas (Andresen *et al.*, 2006). Además, las proteínas también resultan susceptibles al daño producido por intermediarios o productos finales derivados del daño de radicales libres sobre lípidos como el 4-HNE (Olivares *et al.*, 2006).

c) Daño a DNA

El daño al DNA es causante de mutaciones y transformaciones carcinogénicas que pueden desencadenar muerte celular. Las ERO y ERN son las responsables de la interacción directa sobre el DNA así como de la modificación de transducción de señales, proliferación celular y comunicación intercelular (Medeiros, 2008). Dentro de las ERO que afectan al DNA se encuentra el OH^\bullet que es capaz de formar dobles enlaces en las bases nitrogenadas, de abstraer un átomo de hidrógeno del grupo metilo de la timina así como la formación de aductos con bases nitrogenadas (Cooke *et al.*, 2003).

1.2.3 Sistema de defensa antioxidante

El sistema de defensa antioxidante y los niveles de ERO están controlados por mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los mecanismos antioxidantes enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), mientras que en los mecanismos antioxidantes no enzimáticos se encuentra el glutatión (GSH) (Choi *et al.*, 2014).

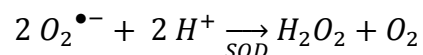
a) Glutatión

El γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina mejor conocido como glutatión es un tripéptido sintetizado a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina necesario en diversos procesos asociados a la regulación y mantenimiento del estatus redox de tioles proteínicos esenciales (Aquilano *et al.*, 2014). La oxidación de GSH conduce a la formación de glutatión disulfuro (GSSG) por la enzima GPx, el cual puede ser reciclado a GSH mediante la reacción catalizada por la enzima GR que utiliza

nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como cofactor (Timme-Laragy *et al.*, 2013). El GSH mitocondrial es el encargado del mantenimiento y función celular por lo que es considerado como un antioxidante capaz de regular las vías de muerte celular y la inducción del desarrollo de diversos padecimientos. Además el GSH actúa como coenzima de otras enzimas antioxidantes como la glutarredoxinas y tiorredoxinas (Fernández y García, 2008).

b) Superóxido dismutasa (SOD)

Uno de los mecanismos antioxidantes enzimáticos más importante es el de la superóxido dismutasa la cual cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 3). En seres humanos se encuentran presentes tres isoformas de superóxido dismutasa: SOD dependiente de cobre/zinc (Cu/Zn-SOD citosólica), Mn-SOD mitocondrial dependiente de manganeso (Mn-SOD o SOD2) y extracelular (EC-SOD o SOD3), también dependiente de Cu/Zn (Valko *et al.*, 2006).



El $O_2^{\bullet-}$ generando en su mayoría dentro de la mitocondria durante la cadena de transporte de electrones (e^-) es convertido en H_2O_2 y este a su vez en H_2O por la CAT y GPx. Se ha informado que el $O_2^{\bullet-}$ es capaz de producir daño a nivel molecular que contribuye al proceso de envejecimiento celular (Doonan *et al.*, 2008).

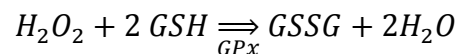
c) Catalasa (CAT)

La enzima CAT es considerada una enzima intracelular presente en la mayor parte de los organismos aeróbicos; en mamíferos se encuentra principalmente en eritrocitos y tejidos como hígado y riñón. Dentro del hígado la CAT está localizada en los peroxisomas (Greenwald, 1990). Su principal función es su actividad catalítica basada en la descomposición de H_2O_2 en agua y oxígeno. La producción de H_2O_2 está relacionada directamente en procesos fisiológicos y patofisiológicos asociados al estrés oxidante como arterosclerosis, hiperlipidemia, DM,

hipertensión y enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Kodydková *et al.*, 2014).

d) Glutación peroxidasa (GPx)

La enzima GPx es una selenoproteína antioxidante que requiere de 2 moléculas de GSH para la reducción del H₂O₂ en agua. El GSH actúa como donador de equivalentes reductores por lo que la reducción del peróxido y la oxidación del GSH a GSSG ocurren de manera simultánea (Zachara *et al.*, 2006).



Además cataliza la reducción de los hidroperóxidos de los ácidos grasos dependientes de GSH, tal es el caso de los productos de lipoperoxidación de los ácidos linolénico y linoleico, entre otros (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008).

e) Glutación reductasa (GR)

La GR es una enzima dependiente de flavin adenina dinucleótido (FAD) y la principal flavoproteína en eritrocitos, encargada de reducir el GSSG a GSH, protegiendo a eritrocitos, hemoglobina y membranas celulares del daño producido por estrés oxidante mediado por GSH (Bhattacharyya *et al.*, 2014). La deficiencia de la actividad de esta enzima puede alterar el cociente 2GSH:GSSG que conduce a estrés oxidante (Martin y Teismann, 2009).

1.2.4 Factor de transcripción nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2)

El factor de transcripción Nrf2 pertenece a una familia de proteínas caracterizadas por poseer una cadena de leucinas (bZIP) en su estructura. La regulación de la expresión de genes antioxidantes y citoprotectores capaces de contrarrestar el estrés oxidante está mediado de manera crucial por Nrf2 (Choi *et al.*, 2014).

En condiciones normales, Nrf2 se encuentra en citoplasma unido a su proteína represora rica en cisteína conocida como Keap 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) y su degradación es favorecida vía ubiquitinización del proteosoma mediada por el complejo Keap1-culina 3-Nrf2 (Tapia *et al.*, 2012).

La oxidación de grupos sulfhidrilos provenientes de los grupos cisteína de Nrf2 genera cambios conformacionales que conducen a la disociación de Keap 1 de Nrf2, por lo que Nrf2 se transloca al núcleo.

Dentro del núcleo y en conjunto con proteínas Maf (Fibrosarcoma aponeurótico de músculo) se unen a la secuencia de elementos de respuesta antioxidante (ARE) la cual regula positivamente la transcripción de genes que codifican para enzimas antioxidantes tales como GPx, SOD, GSH y GR (Fig.3) (Stefanson y Bakovic, 2014).

El factor Nrf2 también está involucrado en la expresión de enzimas generadoras de NADPH, como la enzima málica 1, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, además de la NADPH quinona oxidorreductasa 1 (NQO1) y la hemo oxigenasa-1 (HO-1) (Choi, 2014).

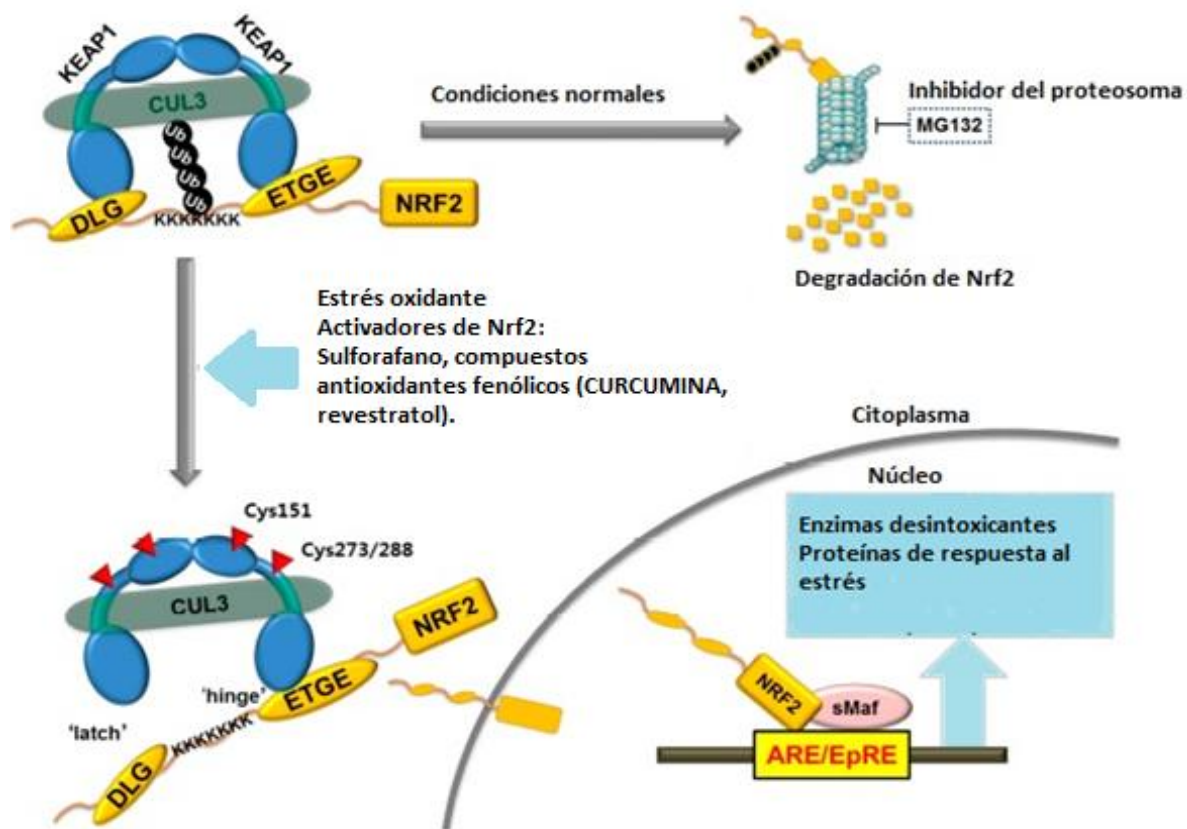


Figura 3. Vía de regulación de genes antioxidantes por la vía de Keap1-Nrf2.

Modificada de Choi *et al.* (2014).

1.3 Enfermedad renal crónica (ERC)

Actualmente la ERC es un problema de salud pública de proporciones epidémicas, resultante de diversas enfermedades crónico degenerativas entre las que destacan la hipertensión, la DM y dislipidemia (Guías Latinoamericanas, 2012). En México las cifras de morbilidad y mortalidad de la ERC son alarmantes, debido al número creciente de casos, los altos costos de inversión, recursos humanos y de infraestructura limitados. La detección resulta tardía generando una alta prevalencia de las complicaciones más frecuentes de la ERC (Méndez Durán *et al.*, 2010).

Se estima una incidencia de pacientes con ERC de 377 casos por millón de habitantes y la prevalencia es de 18-20% en estadios tempranos y hasta un 40-75% en la etapa terminal; además alrededor de 52,000 pacientes se encuentran en terapias sustitutivas de la función renal, de los cuales el 80% de los pacientes son atendidos en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). La ERC se encuentra entre las primeras 10 causas de mortalidad en el país ocupando la 8° causa de defunción en el varón de edad productiva y la sexta en la mujer de 20 a 59 años, mientras que por demanda de atención en los servicios de urgencias en instituciones de segundo nivel ocupa el 13° lugar, el 9° en instituciones de tercer nivel y el 8° como causa de egreso hospitalario por defunción (Méndez Durán *et al.*, 2010).

La ERC se define como la disminución de la función renal caracterizada por un descenso de la velocidad de filtración glomerular (VFG) menor a 60 mL/min/1.73 m² (López-Cervantes *et al.*, 2009) o como el daño renal generado por alteraciones histológicas, proteinuria o alteraciones del sedimento urinario de forma persistente durante, al menos, 3 meses (Guía de Práctica Clínica, 2009).

El filtrado glomerular está definido como el ultrafiltrado del plasma sanguíneo de moléculas de bajo peso molecular como urea, ácido úrico, creatinina, glucosa y algunos péptidos. De esta forma, el riñón regula estrechamente los niveles de volumen sanguíneo, electrolitos como el sodio, potasio, calcio, cloro, magnesio, fosfato y la osmolaridad sérica (Hernando Avendaño *et al.*, 2008). La disminución

de la VFG está asociada a la pérdida del número de nefronas por daño al tejido renal y un proceso combinado con pérdida del número y disminución de la función de las nefronas (Hernando Avendaño *et al.*, 2008).

La ERC se clasifica con base en la gravedad de la reducción de la VFG en diferentes estadios (Tabla 2).

Estadios de la ERC			
Estadio	Descripción	VFG (mL/min/ 1.73 m ²)	Términos relacionados
En riesgo	En riesgo	≥ 90 (con factores de riesgo para ERC)	
1 (Alto y óptimo)	Presencia de indicadores de daño renal, acompañado de una VFG normal o ↑	≥ 90	Albuminuria, proteinuria, hematuria
2 (Leve)	Presencia de indicadores de daño renal con una ↓	60-89	Albuminuria, proteinuria, hematuria
3 (Leve moderado)	↓ moderada de la VFG	30-59	ERC, insuficiencia renal temprana, prediálisis
4 (Severo)	↓ severa de la VFG	15-29	I ERC, insuficiencia renal tardía, prediálisis
5* (Falla renal)	Falla renal	< 15 o en terapia sustitutiva	Falla renal, uremia, ERC terminal

Tabla 2. Estadios de la Enfermedad renal crónica. * Pacientes que reciben tratamiento sustitutivo con diálisis. Tomada de Guías Latinoamericanas de Práctica Clínica sobre la Prevención, Diagnóstico y tratamiento de los Estadios 1-5 de la ERC, 2012.

1.3.1 Causas de la ERC

La ERC está asociada a factores de riesgo como la enfermedad cardiovascular, progresión de enfermedad renal, hipertensión arterial sistémica, dislipidemia y DM así como factores de riesgo no tradicionales y propios de la ERC como proteinuria, anemia, trastornos del metabolismo mineral óseo, sobrecarga de volumen, estrés oxidante y la inflamación, entre otros (Guía de Práctica Clínica, 2009).

1.3.2 Importancia de la proteinuria en la ERC

El factor de riesgo más importante asociado a la progresión de la enfermedad renal es la proteinuria la cual está definida como la excreción anormal de proteínas en la orina mayor a 300 mg/día. Dentro de las proteínas excretadas se encuentran principalmente la albúmina, considerada como un marcador de ERC, DM, enfermedad glomerular e hipertensión arterial; además indica un mayor riesgo de muerte cardiovascular. Mientras que las inmunoglobulinas de bajo peso molecular o proteínas tubulares son características de enfermedades túbulo-intersticiales (Guía de Práctica Clínica, 2009).

1.3.3 Estrés oxidante y enfermedad renal crónica (ERC)

La ERC es considerada una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial debido a que es un padecimiento crónico progresivo caracterizado por generar daño renal irreversible; se ha sugerido en varios estudios que la pérdida de la función renal está relacionada con diversos mecanismos tales como el descontrol de la presión sanguínea, dislipidemia, resistencia a insulina, proteinuria y estrés oxidante (Tiryaki *et al.*, 2014).

La ERC se encuentra asociada directamente con el estrés oxidante debido a la producción de EROs y toxinas urémicas de naturaleza oxidante que favorecen la progresión de este padecimiento y sus complicaciones (Choi *et al.*, 2014). Además se ha demostrado que en los mecanismos fisiopatológicos de los trastornos renales están presentes factores que favorecen el desequilibrio oxidante.

La producción excesiva de EROs desencadena fenómenos isquémicos o tóxicos que generan daño agudo tubular y glomerular comprometiendo la función renal del paciente (Cachofeiro *et al.*, 2008). A nivel renal, el estrés oxidante promueve la

apoptosis, la disminución de la regeneración celular y fibrosis; además el factor nuclear kappa B (NF- κ B) es activado por ERO el cual inicia la vía de señalización asociada a fibrosis renal (Small *et al.*, 2012).

1.3.4 Tratamiento de la ERC

El tratamiento en pacientes con ERC tiene como objetivo interrumpir, retardar o revertir la progresión del daño renal e incluye el manejo de medidas farmacológicas y no farmacológicas. Dentro de las recomendaciones no farmacológicas se encuentran el control de la glucosa, restricción de alimentos, control de peso e ingesta de agua. El control estricto de la glucosa se asocia con la prevención del desarrollo de la microalbuminuria a macroalbuminuria. Esto resulta indispensable para evitar la progresión del daño renal en pacientes con nefropatía diabética (Guía de Práctica Clínica, 2009).

En pacientes que presentan proteinuria el tratamiento farmacológico incluye el uso de medicamentos antihipertensivos con el objetivo de mantener una presión arterial sistémica <125/75 mm Hg. Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (IECAs) y antagonistas del receptor de angiotensina (ARAs) se consideran los fármacos de primera línea en estas condiciones ya que poseen propiedades nefroprotectoras, disminuyen la hipertensión intraglomerular, mejoran la sensibilidad a la insulina y son además cardiocitoprotectoras. La progresión de la ERC se atenúa con el bloqueo del sistema renina angiotensina-aldosterona (SRAA), sin embargo, muchos pacientes aún progresan a ERC terminal y requieren terapia sustitutiva de la función renal (Barnett *et al.*, 2004).

1.4 Curcumina y ERC

En recientes investigaciones se ha demostrado que la curcumina es capaz de mejorar los eventos cardiovasculares y sus complicaciones en algunos pacientes. Este compuesto es capaz de reducir la disfunción cardíaca mientras mantiene la integridad mitocondrial en pacientes urémicos (Correa *et al.*, 2013)

Los efectos renoprotectores de la curcumina se han asociado con la prevención del estrés oxidante mediante tres mecanismos: reduciendo la generación del $O_2^{\bullet-}$

y de diferentes ERO, mediante la prevención de la degradación de Nrf2 por vía de la ubiquitinación del proteosoma y el aumento de enzimas antioxidantes. Es capaz de reducir el proceso inflamatorio mediante la reducción de los factores de transcripción inflamatorias tales como NF- κ B y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Trujillo *et al.*, 2013).

En estudios con pacientes que cursan ERC, se ha encontrado una reducción continua de la función renal, aumento de la inflamación y la reducción de la capacidad antioxidante. Los efectos de la suplementación con curcumina en pacientes con ERC no dializados, demuestran que existe una mejora en la inflamación sistémica, el estado antioxidante y un mejoramiento en los niveles de citocinas inflamatorias (Moreillon *et al.*, 2013).

II. JUSTIFICACIÓN

La Fundación Mexicana del Riñón estima que alrededor del 8.3% de los mexicanos padecen ERC en diferentes etapas de la enfermedad. El efecto sobre marcadores de estrés oxidante, proteinuria y función renal en pacientes con nefropatía de cualquier etiología tras la suplementación oral con curcumina puede ser usado como un tratamiento secundario con el objetivo de atenuar la progresión de la ERC debido a los pocos efectos secundarios reportados y el costo accesible de este antioxidante.

III. HIPÓTESIS

La administración oral de curcumina en pacientes con ERC inducirá la actividad de enzimas antioxidantes mediante la activación de la vía Keap1/Nrf2 y disminuirá los niveles de marcadores de progresión de la ERC.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la suplementación oral con curcumina sobre marcadores de estrés oxidante en pacientes con ERC.

4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar si existe diferencias en la capacidad antioxidante plasmática, marcadores de estrés y enzimas antioxidantes en pacientes con ERC.

- b) Determinar si el consumo oral de curcumina tiene efectos sobre la glucosa, colesterol, triglicéridos y proteinuria.

- c) Establecer si el consumo de curcumina oral tiene efectos sobre marcadores de estrés oxidante mediada por la cantidad de glutatión total (GSH/GSSG), la cantidad MDA, la capacidad antioxidante total en presencia del radical DPPH, evaluación de la capacidad de absorción de radicales libres del oxígeno (ORAC), y la actividad en plasma de las enzimas antioxidantes: GR y GPx, así como la actividad en eritrocitos de las enzimas antioxidantes: SOD y CAT.

- d) Determinar si la curcumina es capaz de activar el factor de transcripción Nrf2 mediante la vía Keap1/Nrf2/ARE.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron de Active Motif North America: Kit comercial para extracción de núcleos Nuclear Extract Kit Versión C4 (# catálogo40410) y el kit comercial Nrf2 TransAm para determinación de la actividad transcripcional de Nrf2 (# catálogo 50296).

El reactivo comercial para cuantificación de proteínas de la fracción nuclear por el método de Bradford fue adquirido de la casa comercial Sigma-Aldrich, número de catálogo B6916. El Lymphoprep® utilizado para extracción de células mononucleares de sangre periférica se adquirió de la casa comercial Axis-Shield PoC, lote: 12FFS22. Otros compuestos y reactivos utilizados fueron de la más alta pureza comercialmente disponible.

5.2 Primera etapa: Evaluación del estrés oxidante en los pacientes con ERC

Se trató de un estudio multicéntrico que contó con la colaboración de las siguientes instituciones: El Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos (HRLALM), la Clínica de diagnóstico automatizado (CLIDDA) anexa al HRLALM y el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICH). Los sujetos no diabéticos y diabéticos se reclutaron en el HRLALM, mientras que los nefrópatas se reclutaron en el INCICH. Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) SALUD-2013-201519.

5.2.1 Diseño del estudio

Se incluyeron un total de 222 sujetos en el estudio, los cuales se clasificaron en cuatro grupos: 77 sujetos sanos en el grupo control (CTRL), 35 sujetos diabéticos previamente diagnosticados con DM2 con 10 años de evolución de la enfermedad y sin nefropatía (C-DM), 48 sujetos nefrópatas no diabéticos (NEF) y 62 sujetos con nefropatía diabética (NEF-DM).

El estudio se dividió en dos etapas. En la primera etapa se determinó que los sujetos presentasen estrés oxidante. Para proseguir a la segunda etapa, se seleccionaron 98 pacientes nefrópatas para evaluar el efecto de la suplementación oral de curcumina en la ERC.

Criterios de inclusión: Se invitó a participar a pacientes mayores de 18 años, con nefropatía de cualquier etiología con proteinuria igual o mayor a 1 gramo que se encuentran en doble o triple bloqueo del SRAA o en monoterapia con IECA, ARA II o espironolactona con alguna contraindicación para el doble o triple bloqueo (hipotensión, hipercalemia) y que fueran pacientes del servicio de Nefrología del INCICH. Los sujetos CTRL mayores de 18 años sin diagnóstico de DM o nefropatía así como los sujetos C-DM mayores de 18 años con evolución de la DM mayor a 10 años, sin antecedentes heredofamiliares de nefropatía, con valores de creatinina sérica <1.5 fueron reclutados en HRLALM y CLIDDA.

Criterios de exclusión: Pacientes embarazadas, con insuficiencia cardíaca (ICC) clasificación III o IV de la asociación del corazón de Nueva York (por sus siglas en

inglés NYHA), en diálisis o en trasplante de órgano, con enfermedad hepática, antecedente de quimioterapia en los últimos 2 años, pacientes que no tengan la facilidad para asistir al Instituto para las visitas programadas. Los pacientes que decidieron no participar después de haber sido explicado y leído el consentimiento informado fueron excluidos del protocolo.

Criterios de eliminación: Se eliminó del protocolo a los pacientes que no firmaron, no completaron el consentimiento informado ó cuya muestra fue insuficiente para las determinaciones.

A cada sujeto se le extrajeron 4 tubos de sangre periférica por medio de punción venosa de la arterial cubital. Uno de los tubos sin aditivo utilizado para la medición de la química sanguínea de 5 elementos y 3 tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para biometría hemática y medición de marcadores de estrés oxidante.

5.3 Segunda etapa: Evaluación de la suplementación oral con curcumina en pacientes con nefropatía de cualquier etiología

El reclutamiento de pacientes, toma, recolección, análisis de parámetros bioquímicos y características antropométricas se llevó a cabo en el INCICH. Los pacientes seleccionados cumplieron con los criterios de inclusión y brindaron su consentimiento para formar parte del proyecto.

5.3.1 Diseño del estudio de intervención

Se realizó un ensayo clínico, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo en el que se incluyeron 98 pacientes con ERC de la primera etapa. El reclutamiento de pacientes, toma y recolección de muestras se llevó a cabo en el INCICH. Los pacientes seleccionados cumplieron con los criterios de inclusión y brindaron su consentimiento para formar parte del proyecto. Los parámetros bioquímicos se midieron por técnicas automatizadas en el hospital.

Tratamiento: A los grupos de estudio se les administró 4 gramos de curcumina al día dividido en tres dosis con cada comida, durante 8 semanas. El grupo control recibió placebo por el mismo tiempo.

***Nota:** Para cuantificación de proteinuria se recolectó una muestra de orina de 24 h y se ajustó por creatinuria.

5.4 Determinaciones bioquímicas

A cada sujeto se le extrajeron 4 tubos de sangre periférica por medio de punción venosa de la arterial cubital. Uno de los tubos sin aditivo utilizado para la medición de la química sanguínea de 5 elementos y 3 tubos con EDTA para biometría hemática y medición de marcadores de estrés oxidante para las dos etapas del estudio.

5.4.1 Determinaciones espectrofotométricas

Se determinó las absorbancias de las muestras a las longitudes de onda señaladas para cada ensayo, en el lector de microplacas multi-modo Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

5.5 Capacidad antioxidante en plasma

5.5.1 DPPH

Fundamento: El ensayo de DPPH determina la capacidad de donar un electrón y por tanto, provee una evaluación de la capacidad antioxidante total en presencia del radical DPPH. Éste en su forma radical presenta una coloración púrpura y al ser reducido a difenilpicril hidracina se torna a color amarillo, el cual puede ser determinado espectrofotométricamente a 517 nm. El cambio de coloración indica que tan eficiente es el antioxidante evaluado para atrapar al DPPH (Ozcelik *et al.*, 2003).

Metodología: El procedimiento para este ensayo se basó en el descrito por Koren *et al.* (2010). Se prepararon por duplicado tubos de reacción con 25 µl de solución salina al 0.9% estéril más 50 µl de plasma. Se añadieron 50 µL de DPPH (stock: 1 mM) preparado previo al uso, protegido de la luz y con agitación constante. Se utilizaron 75 µL de solución salina con 50 µL de DPPH como control. Dos minutos después, se agregaron 800 µL de etanol absoluto a todos los tubos. La mezcla se agitó en vortex y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos; posteriormente se centrifugó a 1,500 x g por 2 minutos.

La capacidad de atrapamiento del radical DPPH se expresó como la diferencia porcentual entre densidades ópticas de cada muestra respecto al control de corrida. El valor de la densidad óptica (D.O.) del control es equivalente al porcentaje de generación máxima (100%) del radical DPPH.

5.5.2 ORAC

Fundamento: El ensayo de ORAC se basa en el uso de la proteína fluorescente R-ficoeritrina como sustrato oxidable y 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) diclorhidrato (APPH) como generador de radicales ROO^{\bullet} . Este ensayo permite medir la actividad del radical libre a través del decremento de la fluorescencia y la integración de áreas bajo la curva (ABC) de las muestras evaluadas.

Metodología: Para la determinación de la actividad antioxidante en plasma se siguió el procedimiento del ensayo "ORAC fluorescence no injection", descrito por Huang *et al.* (2002), el cual requiere preparar una solución de fluoresceína 4 μ M y seis estándares de Trólox® en concentraciones 10.0, 7.5, 5.0, 2.5, 1.0 y 0 μ M. Se pesó en un tubo de ensayo 82.8 mg de AAPH disuelto en 10 mL de amortiguador de fosfatos 75 mM pH=7.4 (APPH 30.5 mM), y se almacenó hasta el momento de su uso. En cada ensayo se realizó una dilución 1:500 plasma:agua. El ensayo se realizó por duplicado en placas negras (Corning 3915). Para la curva estándar se colocaron en cada pozo 25 μ l de cada una de las concentraciones de Trólox®; 25 μ l de la solución amortiguadora de fosfatos 75 mM, pH=7.4 como blanco; 25 μ l de las muestras de plasma diluido. Se adicionaron 25 μ l de APPH (30.5 mM) y 150 μ l de fluoresceína 4 μ M en los pozos de reacción.

Los valores de ABC de cada estándar, blanco y muestras se determinaron mediante la disminución de la fluorescencia los cuales reflejaron la capacidad de atrapamiento de radicales peroxilo del estándar, blanco y muestras. Se realizó una curva estándar con los valores de ABC obtenidos del blanco y concentraciones del estándar de Trólox® los cuales se interpolaron con los valores de ABC de las muestras determinando así su capacidad antioxidante mediante equivalencia respecto a los estándares de Trólox®.

5.6 Marcadores de estrés

5.6.1 MDA en plasma

Fundamento: Este ensayo se basa en la reacción entre el MDA con 1-metil-2-fenilindol (1M2Fi) la cual produce un cromóforo de alto coeficiente de extinción molar con un máximo de absorción de longitud de onda de 586 nm. Esta reacción es específica en presencia de ácido clorhídrico.

Metodología: El procedimiento se realizó de acuerdo a la metodología descrita previamente por Gérard-Monnier *et al.* (1998). Al inicio del ensayo se preparó una solución 15.4 mM de 1M2Fi en una mezcla de acetonitrilo: metanol (3:1).

Para la curva estándar se utilizó la solución de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMPO) 0.0739 mM. Para la curva estándar se utilizó el stock de TMPO en concentraciones: 0,10, 20,40, 80,160 y 320 μ l. Se mezclaron 200 μ l de plasma con 650 μ l de la solución de 1M2Fi con acetonitrilo/metanol (3:1) a una concentración final de 10 mM. La reacción se inició al añadir 150 μ l de ácido clorhídrico (HCl) al 37%. Posteriormente, se incubaron los puntos de la curva estándar y las muestras a 48°C por 50 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron los tubos a 20,000 x g durante 5 minutos.

5.6.2 Determinación de GSH total en plasma

Fundamento: Determinación de GSH: El ensayo se basa en la reacción de GSH con 5,5'-ditiobis-2 ácido nitrobenzoico (DTNB) también conocido como reactivo de Ellman, que produce ácido 5-tionitrobenzoico (TNB), que tiene una absorbancia máxima a 412 nm y que forma el aducto glutatión oxidado-TNB (GS-TNB). La velocidad de formación de TNB es proporcional a la concentración de GSH en la muestra. El producto disulfuro (GS-TNB) se reduce a continuación por la GR en presencia de NADPH y GSH. Debido a que la GR reduce el GSSG de la muestra a 2 moléculas de GSH, la cantidad de GSH total es la suma de las formas oxidadas y reducidas (Fig. 4) (Rahman et al., 2006).

$$[GSH]_{total} = [GSH] + (2)[GSSG]$$

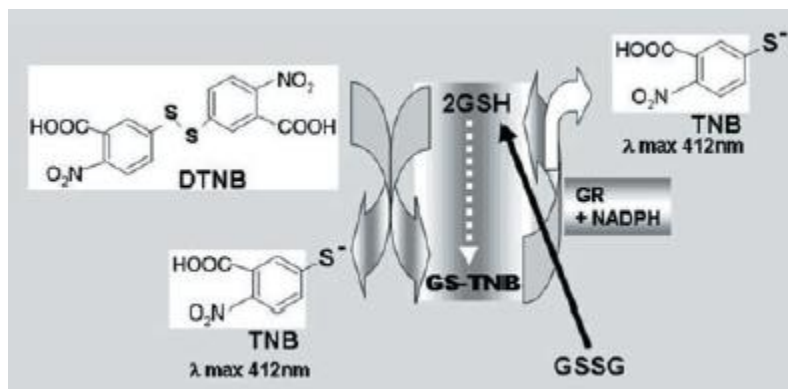


Figura 4. Proceso enzimático de GSH a GSSG por la GR en presencia de NADPH (Rahman *et al.*, 2006).

Determinación de GSSG: El método de reciclaje de GR se utiliza para la determinación de GSSG mediante el control de NADPH. La muestra se trata con 2-vinilpiridina, que reacciona covalentemente con GSH pero no con GSSG. El exceso de 2-vinilpiridina se neutralizó con trietanolamina.

Metodología: La determinación de glutatión total se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Rahman y col (2006). Se preparó una alícuota con 150 μ l de plasma y se agregaron 75 μ l de ácido sulfosalicílico al 0.6%, para desproteinizar la muestra. Enseguida se centrifugó a 8,000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se usó el sobrenadante para la determinación de GSH y GSSG.

1. *Concentración de GSH:* se tomaron 20 μ l de muestra y se colocaron en un pozo de la microplaca. Se mezclaron cantidades iguales de DTNB y GR, se añadieron 120 μ l de esta solución a cada pozo. Después de 30 segundos (tiempo necesario para la conversión de GSSG a GSH), se agregaron 60 μ l de NADPH y se leyó la placa a una absorbancia de 412 nm, tomando cada minuto la lectura durante 2 minutos (3 lecturas de 0 – 120 segundos). La concentración de GSH se determinó por regresión lineal utilizando una curva de calibración con 9 estándares de GSH a concentraciones de 26.40, 13.20, 6.60, 3.30, 1.65, 0.825, 0.4125, 0.20625, 0.103 nM/mL, utilizando como blanco 20 μ l de una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1 M con EDTA.

2. *Concentración de GSSG*: se tomaron 100 μ l del plasma procesado con el ácido sulfosalicílico y se colocó en un tubo de 1.5 ml. Enseguida se adicionaron 2 μ l de 2-vinilpiridina para derivatizar la reacción, se mezcló y se incubó 1 h a temperatura ambiente en campana de extracción. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 6 μ l de trietanolamina, se mezcló vigorosamente y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió de la misma manera que para la determinación de GSH, tomando 20 μ l de muestra, blanco o estándar derivatizado en el pozo junto con 120 μ l de DTNB: GR y 60 μ l de β -NADPH. La concentración de GSSG se determinó por regresión lineal utilizando una curva de calibración de 9 estándares de GSSG a concentraciones de 26.40, 13.20, 6.60, 3.30, 1.65, 0.825, 0.4125, 0.20625, 0.103 nM/mL y utilizando como blanco 20 μ l de KPE.

5.7 Actividad de enzimas antioxidantes

5.7.1 Actividad de glutatión reductasa

La actividad de esta enzima se determinó mediante una reacción cinética en la cual la enzima convierte el GSSG a GSH utilizando NADPH como cofactor. La reacción se basa en la disminución de la D.O. a 340 nm del NADPH (Fig. 5).

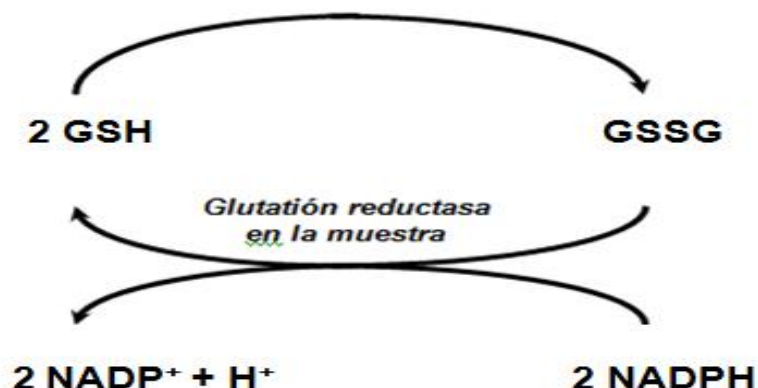


Figura 5. Reacción de reducción de GSSG a GSH utilizando NADPH como cofactor mediada por la enzima GR (Modificada de Dolphin, 1989).

Metodología: Al inicio del ensayo se preparó una mezcla de reacción que contenía amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.6, EDTA 0.5 mM, GSSG 1.25 mM y NADPH 0.1 mM. Para el análisis de la actividad de GR, fue necesario cuantificar un blanco de corrida o “inespecífico” junto con las muestras, adicionando 20 µl del amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.6 para restar el valor de la D.O. proveniente del inespecífico a cada una de las muestras. La reacción se inició al adicionar 10 µl de la muestra de plasma diluida 1:2 en amortiguador de fosfatos 100 mM y 340 µl de la mezcla de reacción. El decremento de la D.O. del NADPH se midió durante 3 minutos utilizando un programa de cinética controlada. Los resultados se expresan como unidades de enzima por ml de plasma (U/mL).

5.7.2 Actividad de glutatión peroxidasa

Fundamento: La actividad de la GPx se mide de manera indirecta por una reacción acoplada con la GR (Lawrence y Burk, 1976) y se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NADPH. La GPx al reducir los hidroperóxidos consume GSH, el cual es regenerado por GR a partir de GSSG, proceso que consume NADPH (Fig. 6).

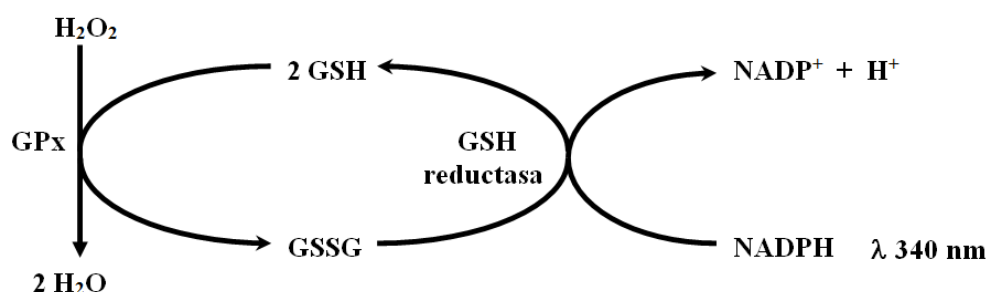


Figura 6. Reacción de reducción del H_2O_2 catalizada por la GPx y utilizando como agente reductor el GSH. El GSH es regenerado a partir de GSSG por la GR.

Metodología: Para cuantificar la actividad de la enzima GPx, se elaboró una solución que contenía EDTA 1.0 mM, GSH 1.0 mM, azida de sodio 1.0 mM, NADPH 0.2 mM y GR 1 U/ml en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7,4 (Mezcla A).

Debido a que GPx tiene la capacidad de catalizar la descomposición del H_2O_2 o de

otros peróxidos orgánicos a H_2O se utilizó una solución 30 mM de H_2O_2 que se preparó con 2.8 μ l de H_2O_2 al 30% en 10 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7,4 (Mezcla B). El procedimiento para esta prueba consta de tres pasos: el plasma se diluyó 1:2 con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4, se colocaron 35 μ L de muestra o amortiguador como blanco. Para la reacción se adicionaron 280 μ L de la mezcla A más 35 μ L de la mezcla B. Los resultados se expresan como unidades de enzima por ml de plasma (U/mL).

5.7.3 Actividad de catalasa (CAT) en eritrocitos

Fundamento: Para esta determinación se empleó el método de Aebi (1982) el cual se basa en el cambio en la D.O. a 240 nm debido a la desaparición de H_2O_2 mediante su degradación por CAT presente en la muestra. La absorbancia de la muestra se mide cada 15 s durante 30 s (período en el que la descomposición de H_2O_2 sigue una cinética de primer orden).

La diferencia entre la primera y las subsecuentes lecturas no debe ser menor de 0.02 (lo que indica que la muestra está muy diluida) ni mayor de 0.2 (lo que indica que la muestra está muy concentrada).

Metodología: Una vez extraída la sangre del paciente en un tubo con anticoagulante, se separó el plasma del paquete globular y se almacenó en tubos de 2 mL etiquetado con el ID del paciente. Para el ensayo, se utilizó una dilución de eritrocitos 1:100 (10 μ l de eritrocitos más 990 μ l de agua). Se preparó una solución de H_2O_2 30 mM, adicionando 170 μ l de H_2O_2 al 30% a 50 mL de amortiguador de fosfatos 10 mM pH= 7.4.

Antes de iniciar el ensayo, fue necesario probar la solución de peróxido la cual debe presentar una absorbancia de 1.00 a una longitud de onda de 240 nm. Si la absorbancia de la solución resulta menor a 1.00 se adicionan 5 a 10 μ l de H_2O_2 al 30%, por lo contrario si la absorbancia resulta mayor a 1.00 se adiciona amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4.

Para el ensayo, se tomaron tubos de ensayo de 13x100 y se adicionaron 725 μ l de la solución 30 mM de H_2O_2 más 25 μ l de la dilución 1:100 de eritrocitos, se

agitaron y se realizó la lectura en espectrofotómetro por el método KINETICS “catalasa”. Los resultados se expresan como unidades de enzima por mg de proteína en eritrocitos.

5.7.4 Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos

Fundamento: La actividad de la SOD se determina por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Fig. 7) (Oberley, 1984).

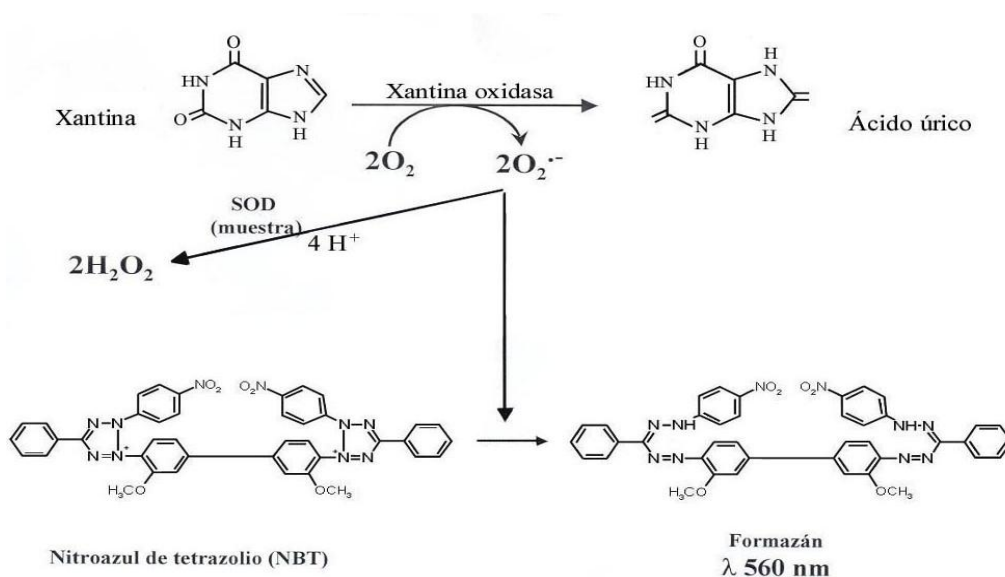


Figura 7. Inhibición de reducción del NBT por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa por la SOD de la muestra.

Metodología: La actividad de SOD total se determinó por la reducción del NBT. Para ello se preparó una solución de xantina y xantina oxidasa (XO) para generar el anión $\text{O}_2^{\bullet-}$ el cual reduce el NBT a formazán, cuando hay SOD el $\text{O}_2^{\bullet-}$ que se generó se descompone con lo cual se evita la reducción de NBT. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción de NBT.

Se prepararon las siguientes soluciones para la mezcla de reacción: solución de XO 0.3 mM, EDTA 0.6 mM, NBT 150 μM y Na_2CO_3 400 mM. Al inicio del ensayo

se verificó que funcionara el sistema generador de anión superóxido. Para ello se colocaron en un tubo de vidrio 332 μ l de la mezcla de reacción, 66 μ l del amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4, 5, 10, 15 y 20 μ l de XO y 132 μ l de CuCl_2 para detener la reacción, el cambio de las absorbancias debe ser menor a 0.2 nm y mayor a 0.15 nm. Una vez que se aseguró que el sistema funcionara, se analizaron las muestras generando 3 tubos (blanco de muestra y problema por duplicado); al blanco de muestra no se le adicionó XO.

De igual forma, se preparó un tubo denominado 100% el cual contenía 332 μ l de la mezcla de reacción, 66 μ l del amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 y la cantidad de XO probada con anterioridad; de esta manera se observó únicamente la actividad de la enzima. Todos los tubos se incubaron 15 min a 27°C, transcurrido el tiempo, se adicionaron 132 μ l de CuCl_2 0.8 mM para detener la reacción y se realizó la lectura a 560 nm. Los resultados se expresan como unidades de enzima por mg de proteína en eritrocitos.

****NOTA:** Para los ensayos de CAT y SOD en eritrocitos se determinó la actividad específica de dichas enzimas mediante el método de Lowry.

5.8 Cuantificación de Nrf2

5.8.1 Extracción de células mononucleares de sangre periférica con Lymphoprep®

A un tubo de sangre con EDTA se adicionaron 6.0 mL de solución salina estéril 0.9%, agitando por inversión. En un tubo Falcon nuevo se adicionaron 5.0 mL de Lymphoprep®. Posteriormente se añadió la sangre vertiendo el contenido por la pared del tubo para evitar romper el gradiente de densidad, quedando el Lymphoprep® por debajo de la sangre. Los tubos se centrifugaron a 21,591 x g por 30 min. Una vez concluido el ciclo de centrifugación, se extrajeron las células blancas por pipeteo y se colocaron en tubos Eppendorf nuevos de 1.5 ml aforando con solución salina estéril 0.9%, finalmente se centrifugaron los tubos a 250 x g por 10 m y el botón obtenido se resuspendió en 1 ml de solución salina estéril 0.9%.

5.8.2 Extracción de la fracción nuclear

Para la extracción de la fracción nuclear se utilizó un kit comercial de Active Motif. Durante el procedimiento se utilizó el botón obtenido durante la extracción de células blancas con Lymphoprep el cual se lavó con 1.5 mL de amortiguador PBS/Inhibidor de fosfatasas frío mezclando por pipeteo suave para limitar las posibles modificaciones de la proteína (expresión, proteólisis, desfosforilación, etc.). Después del lavado se centrifugó a 500 rpm durante 5 min a 4°C. Transcurrido el tiempo de centrifugación se descartó el sobrenadante y se conservó el botón en hielo el cual se resuspendió por pipeteo suave en 500 µl de amortiguador hipotónico 1x el cual favorece la turgencia de la célula, haciéndola más frágil y se incubó durante 15 min en hielo. Transcurrido el período de incubación se añadieron 50 µl de detergente el cual favorece el rompimiento de la membrana y la salida de las proteínas citoplasmáticas al sobrenadante, se agitó en vórtex por 10 s a máxima velocidad y se centrifugó por 30 s a 14,000 x g a 4°C. El sobrenadante que contenía la fracción citoplasmática se transfirió a un tubo Eppendorf de 600 µl frío y se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso. Después de la lisis nuclear; las proteínas nucleares se solubilizaron en 50 µl de amortiguador de lisis total en presencia del coctel inhibidor de proteasas y se agitó en vórtex 10 s a máxima velocidad. Posteriormente se incubó durante 30 min en hielo y con agitación en vórtex cada 5 min, transcurrido el período de incubación se agitó en vórtex por 30 s a máxima velocidad, se centrifugó por 10 min a 14,000 x g. El sobrenadante que contenía la fracción nuclear se transfirió a un tubo Eppendorf de 600 µl frío y se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

5.8.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La determinación de la concentración de proteínas en la fracción nuclear se llevó a cabo mediante el método de Bradford. Este método se basa en la formación de un complejo entre el Azul brillante G y las proteínas contenidas en la solución el cual causa un desplazamiento en el máximo de absorción del azul brillante de 465 a 595 nm, donde la absorbancia obtenida es proporcional a la cantidad de proteína contenida en la muestra. Durante el procedimiento se realizaron pruebas con la cantidad de fracción nuclear requerida para obtener 20 µg de proteína, en

promedio se utilizan entre 2 y 3 μL de los 50 μL de fracción nuclear disponible y se adicionaron 40 μL de reactivo de Bradford. La concentración de proteínas se determinó mediante una curva estándar con ASB 0.01 mg/dL.

5.8.4 Determinación de la actividad transcripcional de Nrf2

Para determinar la actividad transcripcional de Nrf2 se utilizó un kit comercial de Active Motif, basado en un ensayo de ELISA. El kit consiste de una placa de 96 pozos los cuales contienen en el fondo de los pozos el oligonucleótido con la secuencia consenso de unión a los sitios ARE (5'-GTCACAGTGA CT CAGCAGAATCTG-3') de manera que la forma activa de Nrf2 contenida en los extractos nucleares se une a los oligonucleótidos. La adición de anticuerpos primarios anti-Nrf2 reconoce a la proteína Nrf2 que queda unida al oligonucleótido. El reconocimiento de este complejo se realizó con la adición de anticuerpos secundarios acoplados a la HRP y la adición de un sustrato. La formación del producto de esta reacción se midió espectrofotométricamente a 450 nm. El protocolo se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se usaron 20 μg de proteínas del extracto nuclear (cuantificadas por el método de Bradford con el reactivo comercial Sigma, utilizando ASB como estándar) a los cuales se agregaron el amortiguador de unión junto con la muestra (el kit incluye un control positivo: células COS-7 transfectadas con Nrf2). Posteriormente se incubó 1 h con los anticuerpos anti-Nrf2 y anticuerpo secundario (usando una dilución 1:1000) y se realizaron 3 lavados. Se añadió el reactivo desarrollador de color que se dejó por 6 minutos y al final se añadió el reactivo para detener la reacción. La D.O. se determinó en un lector de microplacas multi-modo Synergy™ HT. Los resultados se expresan como el cambio de la densidad óptica a 450 n.m., dada la activación de Nrf2.

5.9 Análisis Estadístico

Primera etapa: Los parámetros bioquímicos y características antropométricas se analizaron con el programa Graph Pad 5.0 (Graph Pad, San Diego, E.U.A) mediante una prueba de ANOVA de una vía y comparaciones múltiples por la

prueba de Bonferroni, los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media (EEM).

Segunda etapa: Los datos se analizaron con el programa Graph Pad 5.0 (Graph Pad, San Diego, EUA) utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar entre el grupo placebo y curcumina al final del estudio. Para analizar la variación de los datos de cada grupo al inicio y al finalizar el tratamiento con curcumina, se utilizó la prueba de Wilcoxon y una t-no paramétrica.

VI. RESULTADOS

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

6.1 Primera etapa: Evaluación del estrés oxidante

6.1.1 Características de la población de estudios

Se incluyeron un total de 222 pacientes en el estudio, los cuales fueron clasificados en cuatro grupos: 77 pacientes sanos en el grupo CTRL, 35 pacientes en el grupo C-DM, 48 pacientes NEF y 62 pacientes con NEF-DM. Las características poblacionales se presentan en la Tabla 3. El estudio se llevó a cabo en 125 pacientes hombres y 97 pacientes mujeres.

Debido a que en el grupo C-DM se incluyeron pacientes con 10 años de evolución de la enfermedad, la media de la edad de este grupo es superior a los sujetos CTRL. En el grupo de NEF, se incluyeron 23 pacientes menores de 40 años, el 50% de los pacientes se encuentran en un rango intercuartílico de 25 a 56 años y en el grupo NEF-DM de 50 a 62 años, lo que conlleva a que la media sea inferior en comparación con el grupo CTRL y C-DM.

En cuanto al IMC los grupos estudiados se encontraron en un estado de sobrepeso (IMC >25 y <30). Sin embargo, de los 4 grupos de estudio, la media del grupo con NEF-DM presentó mayor IMC, comparados con el grupo CTRL y NEF.

La hipertensión es una enfermedad asociada a factores metabólicos como la DM, las cuales en conjunto (y por sí mismas) pueden contribuir al desarrollo de la ERC.

Sólo se encontraron diferencias significativas en la presión arterial sistólica (PAS) en el grupo de NEF-DM con respecto a los grupos CTRL, C-DM y NEF. Por el contrario, no se observaron cambios en la presión arterial diastólica en los 4 grupos de estudio.

La glucosa sérica en ayunas es el parámetro bioquímico fundamental para el diagnóstico de la DM, por lo que los pacientes en los grupos C-DM y NEF-DM presentan niveles mayores de glucosa respecto al grupo CTRL y al grupo NEF. Sin embargo los niveles más altos de glucosa se presentaron en el grupo NEF-DM los cuales fueron significativamente mayores comparados al grupo C-DM y NEF, lo que nos podría sugerir que el descontrol glicémico es uno de los principales factores para la progresión de nefropatía en estos pacientes. Los niveles de urea y creatinina séricos en los grupos NEF y NEF-DM son más altos con respecto al grupo CTRL y al C-DM, lo que era de esperar ya que estos grupos ya presentan daño renal. No se encontraron diferencias significativas en presión arterial diastólica, triglicéridos y colesterol total.

Características poblacionales: información antropométrica y parámetros bioquímicos								
Género	CTRL n=77		C-DM n=35		NEF n=48		NEF-DM n=62	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Edad	51.4 (38-79)		60.4 (36-78)*		40 (18-68)*#		55.9 (34-73)●	
IMC	27.4 (21.2-42.97)		28.7 (18.6-45.5)		26.6 (19.7-44.3)		29.6 (22.5-38.9)*●	
PAS	113 (80-160)		120 (90-155)		106 (80-190)		131 (105-185)*#●	
PAD	75 (60-100)		78 (50-100)		72 (55-110)		77 (60-100)	
Glucosa	92 (72-118)		139 (41-313)*		88 (67-124)#		131 (56-425)*●	
Triglicéridos	163 (53-350)		167 (50-359)		171 (64-444)		192 (68-602)	
Colesterol	197 (130-305)		174 (63-262)		206 (105-562)		184 (83-324)	
Urea	28 (13-54)		44 (13.2-199)		77 (15-227)*#		90 (30-167)*#	
Creatinina	0.78 (0.48-1.2)		1.18 (0.15-1.38)		2.54(0.75-9.19)*#		2.8 (0.8-9.5)*#	

Tabla 3. Características poblaciones: información antropométrica y parámetros bioquímicos. Los resultados se presentan como la media (valor mínimo- valor máximo). M: masculino; F: femenino. (p<0.05) *vs. CTRL; # vs. C-DM; ● vs. NEF

6.1.2 Evaluación del estrés oxidante en la población de estudio

6.1.2.1 Evaluación de la capacidad antioxidante

Para evaluar la capacidad antioxidante de los grupos de estudio, se realizaron los ensayos de DPPH y ORAC.

a) La capacidad de atrapamiento del radical DPPH en el plasma de los grupos C-DM y NEF-DM es menor con respecto al grupo CTRL (29.5% y 27.8%, respectivamente) la cual se relaciona con el curso de la DM y la nefropatía de etiología diabética. Se observó una ligera disminución de la capacidad de atrapamiento del radical DPPH del grupo NEF-DM con respecto al grupo NEF (17.9%), sin embargo ésta diferencia no fue significativa (Fig. 8a).

b) Para la evaluación de la capacidad de atrapamiento de radicales libres del oxígeno por el método de ORAC no se observaron diferencias significativas (Fig. 8b).

Evaluación de la Capacidad Antioxidante

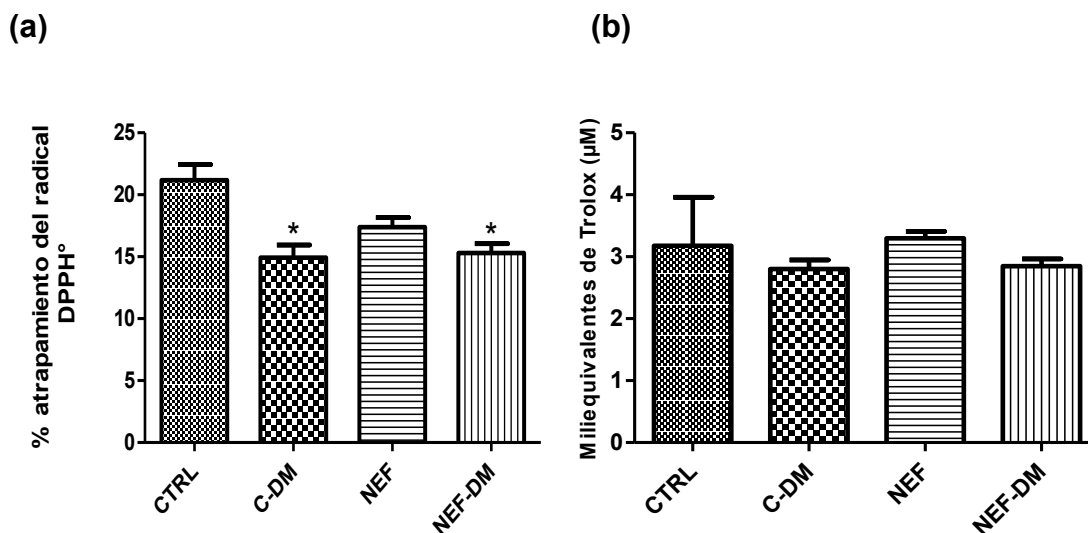


Figura 8. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de (a) DPPH y (b) ORAC en plasma. Los resultados se presentan como la media±EEM, n= 222. (a) *p<0.05 vs CTRL. (b) No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio.

6.1.2.2 Marcadores de estrés oxidante

a) Concentración de malondialdehído

La concentración de MDA en plasma proporciona un índice de la peroxidación de lípidos y la actividad natural de componentes antioxidantes del plasma para prevenir dicho daño. En los grupos de estudio se observó que la peroxidación de lípidos aumenta en los grupos C-DM y NEF (3.65 ± 1.88 y 3.56 ± 2.03 , respectivamente) respecto al control (2.66 ± 1.38), lo que indica que el estrés oxidante está asociado al daño en lípidos generado durante el curso de estos padecimientos (Fig. 9a).

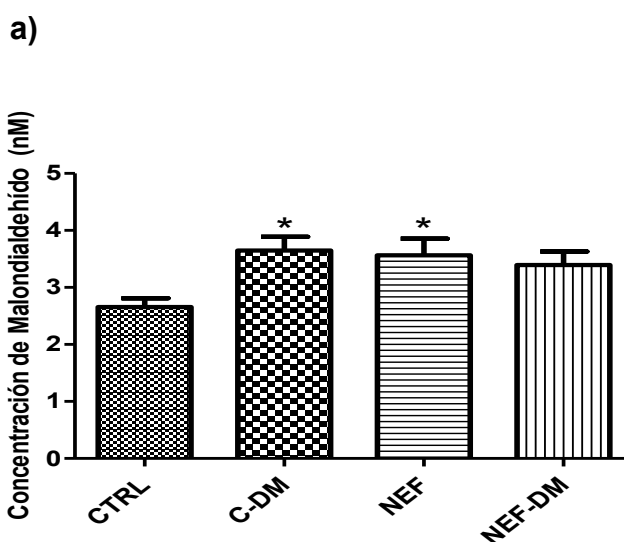


Figura 9a. Concentración de malondialdehído (MDA) en plasma. Los resultados se presentan como la media \pm EEM, n= 222. *p<0.05 vs CTRL.

b) Concentración de GSH

Para determinar el estado redox de las muestras, se cuantificó la concentración de GSH en plasma. La disminución de la concentración de GSH en los grupos C-DM, NEF y NEF-DM (2.76 ± 1.61 , 3.26 ± 1.82 , 2.97 ± 1.43 , respectivamente) con respecto al CTRL (6.12 ± 2.68) está relacionado con el déficit de la capacidad antioxidante presente en pacientes con nefropatía y DM, por lo que se observó una menor concentración de glutatión en los grupos DM, NEF y NEF-DM comparado con el grupo CTRL (Fig. 9b).

b)

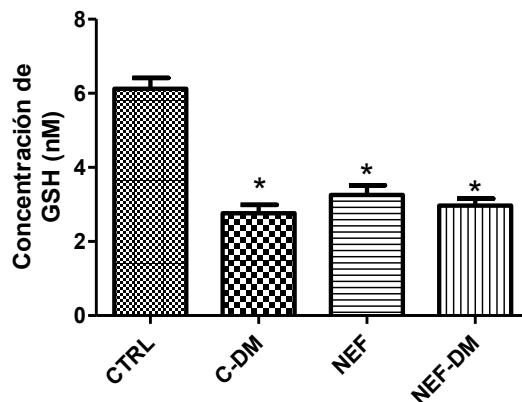


Figura 9b. Concentración de glutatión (GSH) en plasma. Los resultados se presentan como la media±EEM, n= 222. *p<0.05 vs CTRL.

c) Concentración de GSSG

Un parámetro para evaluar el desbalance redox en plasma es el de cuantificación de GSSG, en poblaciones con disfunción renal o DM, la concentración plasmática de GSSG aumenta indicando un mayor daño por estrés oxidante, contrario a esto se observó que en el grupo C-DM las concentraciones de GSSG disminuyen respecto al CTRL (0.41 ± 0.38 , 0.85 ± 0.77 , respectivamente); sin embargo y consistente con lo que se ha informado anteriormente los grupos NEF y NEF-DM (0.96 ± 0.63 , 0.77 ± 0.46) presentan un aumento significativo de las concentraciones plasmáticas de GSSG respecto al grupo C-DM, incremento que podría estar mediado por la disfunción renal que a su vez está asociado con el daño generado por estrés oxidante (Fig. 9c).

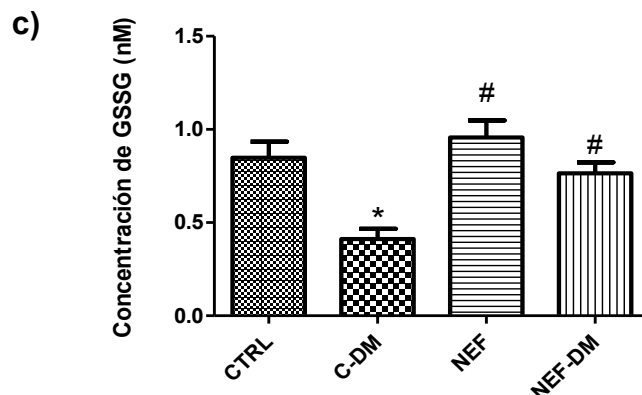


Figura 9c. Concentración de glutatión disulfuro (GSSG) en plasma. Los resultados se presentan como la media±EEM, n= 222. *p<0.05 vs CTRL, #p<0.05 vs C-DM.

d) Cociente GSH/GSSG

El cociente de GSH/GSSG (Fig. 9d) se utiliza para conocer qué tanto del GSH se está oxidando en condiciones normales. Los resultados revelan que el cociente GSH/GSSG más bajo fue identificado en los grupos C-DM, NEF y NEF-DM comparadas con el CTRL (6.59 ± 1.12 , 3.86 ± 0.96 , 4.17 ± 0.81 , 9.49 ± 1.10 respectivamente).

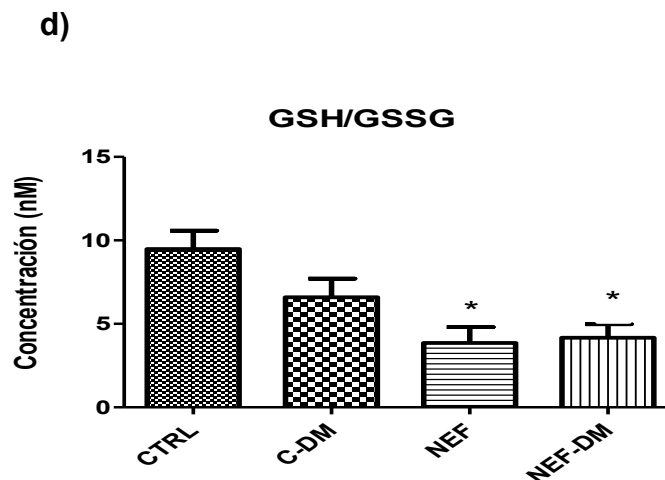


Figura 9d. Cociente GSH/GSSG. Los resultados se presentan como la media \pm EEM, n= 222. *p<0.05 vs CTRL.

6.1.2.3 Actividad de enzimas antioxidantes en plasma

La evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes nos brinda un panorama del sistema natural antioxidante. La actividad de la enzima GPx (Fig. 10a) en pacientes que cursan con nefropatías disminuyeron de manera significativa en los grupos NEF y NEF-DM con respecto al CTRL (0.23 ± 0.10 , 0.22 ± 0.10 y 0.42 ± 0.39) además el grupo NEF-DM también presenta una disminución en la actividad de GPx con respecto al grupo C-DM (0.34 ± 0.11).

Dicha disminución puede estar asociada a que este grupo cursa con nefropatía de etiología diabética. La actividad de la enzima GR en los grupos de estudio no presentó ningún cambio significativo durante esta etapa del estudio (Fig. 10b).

Actividad enzimática antioxidante en plasma

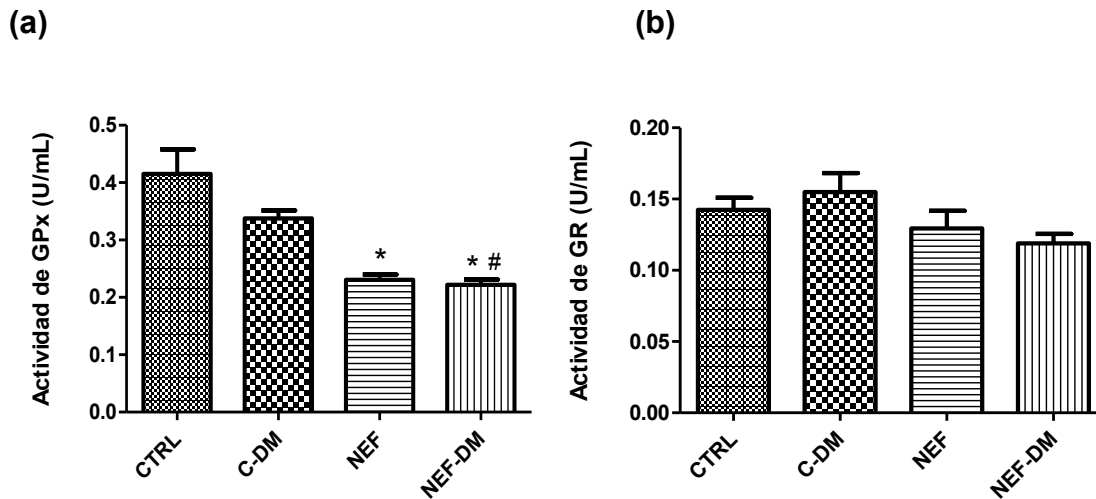


Figura 10. Actividad enzimática antioxidante en plasma (a) GPx y (b) GR. Los resultados se presentan como la media±EEM, n=222. (a) *p<0.05 vs CTRL, #p<0.05 vs C-DM. (b) No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

6.1.2.4 Actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos

La actividad de la enzima SOD en el grupo C-DM se encontró ligeramente incrementada con respecto al CTRL (69.68 ± 25.10 , 58.35 ± 33.35), sin embargo este aumento en su actividad no fue significativo. En cambio, los grupos NEF y NEF-DM (43.01 ± 24.01 , 47.73 ± 22.30) presentaron una disminución en la actividad de esta enzima con respecto al C-DM y sólo NEF presentó una disminución significativa respecto al CTRL (Fig. 11a).

La actividad de CAT en el grupo C-DM se ve inducida con respecto al CTRL (0.59 ± 0.23 , 0.37 ± 0.18). En los grupos NEF y NEF-DM (0.14 ± 0.10 , 0.26 ± 0.25) se observó que ésta enzima se encuentra significativamente disminuida respecto al CTRL y C-DM, además se observó que en el grupo NEF-DM la actividad de CAT se encuentra aumentada respecto al grupo NEF (Fig. 11b).

Actividad enzimática antioxidante en eritrocitos

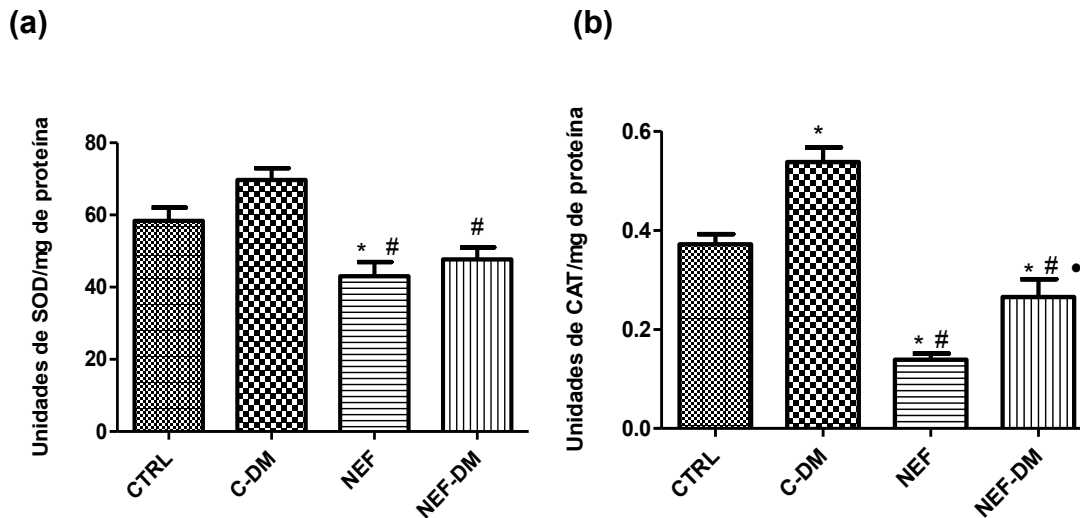


Figura 11. Actividad enzimática antioxidante en eritrocitos (a) SOD y (b) CAT. Los resultados se presentan como la media \pm EEM, n= 222. (a) * p <0.05 vs CTRL, # p <0.05 vs C-DM. (b) * p <0.05 vs CTRL, # p <0.05 vs C-DM, • p <0.05 vs NEF.

6.2 SEGUNDA ETAPA.

6.2.1 Evaluación de la suplementación oral con curcumina

Después de evaluar los parámetros bioquímicos y los marcadores de estrés oxidante de los pacientes en la primera etapa, se seleccionaron 98 pacientes con nefropatía de cualquier etiología los cuales fueron aleatorizados para recibir el tratamiento con curcumina (CUR) o placebo (PBO). Las determinaciones se realizaron al inicio y final de estudio, comparando los grupos CUR vs PBO, además se realizó una asociación de la respuesta del tratamiento con curcumina y placebo en pacientes nefrópatas diabéticos y no diabéticos. Los grupos de estudio fueron los siguientes: pacientes no diabéticos con placebo (NDP), pacientes no diabéticos con curcumina (NDC), pacientes diabéticos con placebo (DP) y pacientes diabéticos con curcumina (DC).

Se evaluaron los parámetros bioquímicos y características antropométricas al inicio y al final de las 8 semanas de tratamiento para el grupo con PBO y el grupo CUR. Los resultados se presentan en la Tabla 4 como la media \pm DEM así como el valor p obtenido mediante el análisis estadístico con una prueba no paramétrica

Wilcoxon utilizando el software Graph Pad 5.0 (Graph Pad, San Diego, EUA). No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados entre los grupos de estudio después del tratamiento.

Parámetros bioquímicos y antropométricos de los grupos de estudio				
	Placebo n=44		Curcumina n=54	
	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
IMC	27.95± 4.18	27.43± 6.28 p=0.8623	27.89± 5.12	28.07± 5.19 p=0.1496
PAS	113.63± 20.28	112.89± 18.87 p=0.3796	129.61± 23.39	126.67± 20.88 p=0.2681
PAD	72.26± 10.46	72.16± 11.18 p=1.00	77.43± 15.86	75.96± 10.76 p=0.1719
Glucosa	102.39± 38.72	107.71± 42.95 p=0.6634	116.06± 62.57	106.20± 40.71 p=0.5155
TG	179.95± 98.33	171.66± 92.27 p=0.9653	158.65± 58.54	157.49± 68.02 p=0.8737
Colesterol	192.26± 101.9	179.47± 89.71 p=0.0679	184.77± 39.9	182.87± 53.59 p=0.9326
Urea	12.63±5.60	13.21±6.49	15.11±8.48	16.46±16.49
Proteinuria	3.71± 3.6	3.17± 3.33 p=0.1511	4.71± 3.45	4.48± 2.89 p=0.5115
Creatinina	2.20±1.18	2.34±1.24	2.88±1.90	3.17±2.54
VFG	45.14± 30.41	41.66± 28.06 p=0.0306	37.46± 29.35	36.86± 31.14 p=0.2726

Tabla 4. Parámetros bioquímicos y antropométricos de los grupos de estudio. Los resultados se presentan como la media ± DEM. IMC: Índice de masa corporal, PAS: Presión arterial sistólica, Presión arterial diastólica, TG: Triglicéridos, VFG: Velocidad de filtración glomerular. Valor p obtenido mediante prueba no paramétrica por el método de Wilcoxon.

6.2.2 Evaluación del estrés oxidante

6.2.2.1 Efecto de la curcumina sobre la capacidad antioxidante

a) Método de DPPH. El tratamiento con curcumina es capaz de atenuar el daño ocasionado por estrés oxidante, atrapando radicales como DPPH en plasma, sin embargo bajo las condiciones experimentales y el tiempo de exposición al tratamiento oral con curcumina no se observaron diferencias significativas en el ensayo en los grupos CUR y PBO (16.68±5.83, 16.24±5.10) (Fig.12a).

b) Método de ORAC. Si bien la curcumina es capaz de atrapar ERO directamente, la capacidad antioxidante por el método de ORAC en plasma no hace evidente algún cambio significativo en los grupos de estudio, pero sí una tendencia en el aumento de la capacidad antioxidante comparada con Trolox (un análogo de la vitamina E, utilizado para la curva estándar) en los grupos que recibieron curcumina comparado con el grupo PBO (CUR final 3177 ± 932.50 , PBO final 3091 ± 957.60) (Fig.12b).

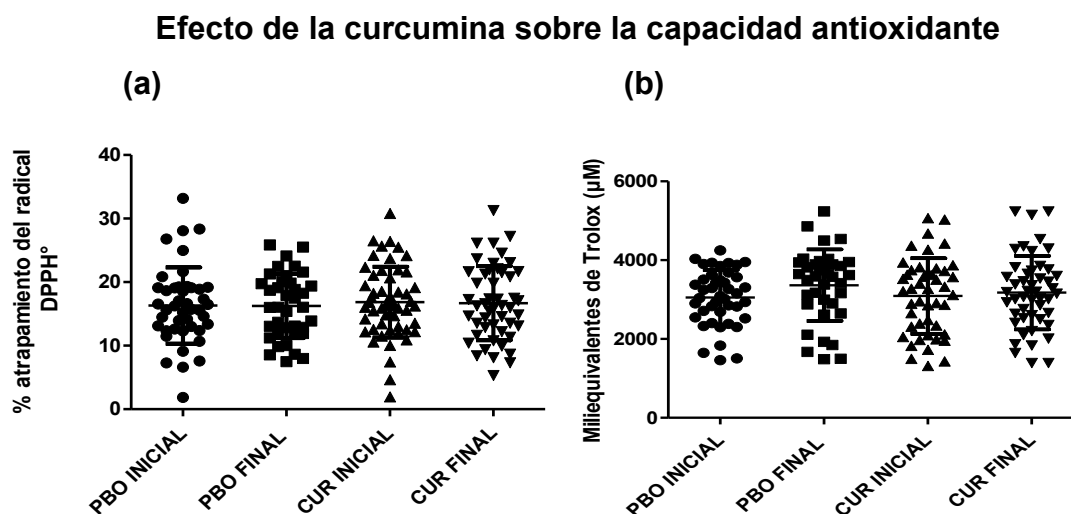


Figura 12. Efecto de la curcumina sobre la capacidad antioxidante por el método de (a) DPPH y (b) ORAC en plasma. Los resultados se presentan como la media±EEM, n=98. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en los dos ensayos.

6.2.2.2 Marcadores de estrés oxidante

a) Efecto de la curcumina sobre la concentración de MDA

El efecto antioxidante de la curcumina es capaz de disminuir los niveles de MDA en plasma evitando la oxidación de lípidos por estrés oxidante. Se observó una disminución significativa de los niveles de MDA en pacientes que fueron administrados oralmente con curcumina después de un periodo de 8 semanas con respecto a los valores basales obtenidos previos a dicha administración (CUR inicial 3.69 ± 2.03 , CUR final 2.85 ± 1.14). Se realizó un segundo análisis complementario a este cambio significativo para observar la asociación de la nefropatía y la DM con respecto a la concentración plasmática de MDA después

del tratamiento con curcumina, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estos grupos (Fig.13a).

Efecto de la curcumina sobre marcadores de estrés oxidante

1) Análisis por tratamiento

2) Análisis por patología

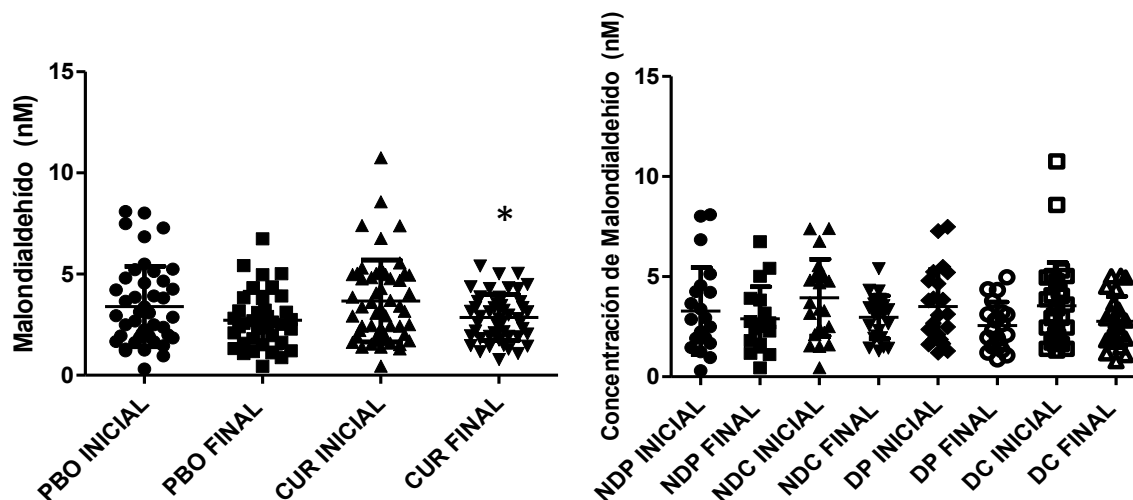


Figura 13a. Concentración de malondialdehído (MDA) en plasma. Los resultados se presentan como la media±EEM, n=98. (1) *p<0.05 CUR FINAL vs CUR INICIAL. (2) No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

b) Efecto de la curcumina sobre la concentración de GSH

Es posible observar que el grupo de pacientes con tratamiento oral de curcumina presenta una mayor concentración de GSH en plasma con respecto a los pacientes que recibieron PBO (CUR final 3.40 ± 1.44 , PBO final 3.02 ± 0.93) así como una concentración menor de GSSG. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio, pero sí una tendencia al aumento de la concentración de GSH y un descenso de GSSG (PBO inicial 0.86 ± 0.54 , PBO final 0.77 ± 0.42 /CUR inicial 0.91 ± 0.57 , CUR final 0.86 ± 0.73), esto ocurre cuando existe una mayor cantidad de GSH haciendo una proporción significativa entre el GSH que se está oxidando y la búsqueda de proteger a las células contra el daño por estrés oxidante (Fig. 13b).

1) Concentración GSH en plasma

2) Concentración GSSG en plasma

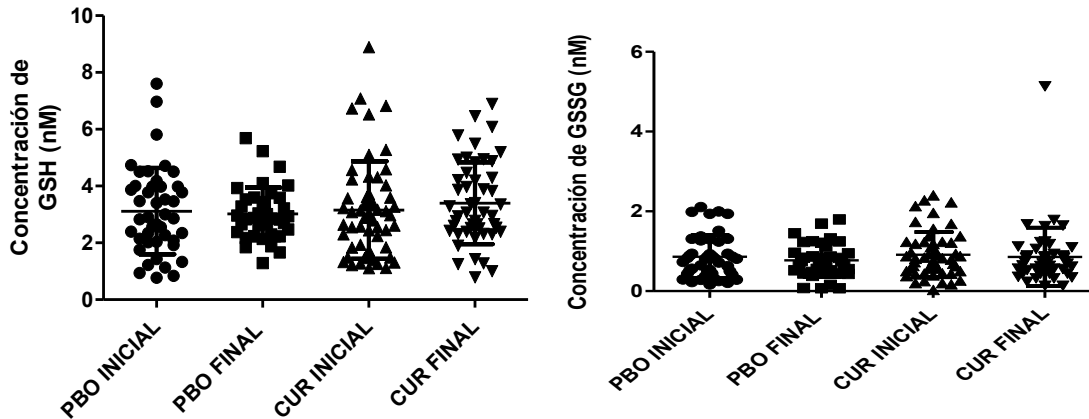


Figura 13b. (1) Concentración de glutatión (GSH) y (2) Concentración de glutatión disulfuro (GSSG) en plasma. Los resultados se presentan como la media±EEM, n=98. (c,d) No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

c) Cociente GSH/GSSG

Para cuantificar el estado de estrés oxidante en el que se están los grupos de estudio, se calculó el cociente GSH/GSSG (Fig. 13c), donde se observa que el grupo evaluado con CUR sugiere una disminución al finalizar el tratamiento (CUR inicial 4.11 ± 7.22 , CUR final 3.30 ± 3.24) del estrés y el grupo PBO se ve un aumento (PBO inicial 3.80 ± 5.11 , PBO final 4.90 ± 9.60).

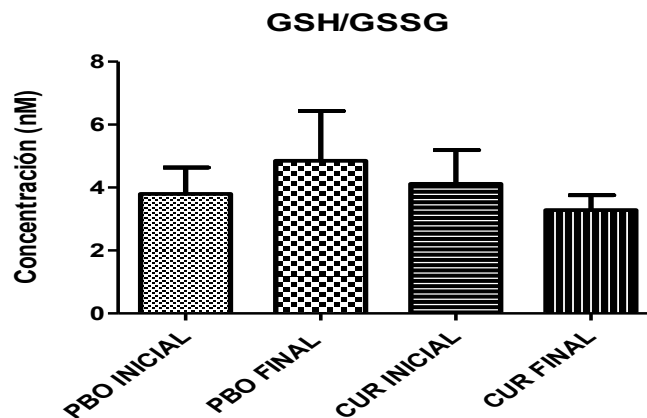


Figura 13c. Cociente GSH/GSSG. Los resultados se presentan como la media±EEM, n=98. (e) No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

6.2.2.3 Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes

a) Efecto de la curcumina sobre la actividad de GPx en plasma.

La actividad de esta enzima en el grupo CUR (CUR inicial 0.20 ± 0.06 , CUR final 0.23 ± 0.22) al final del tratamiento con curcumina de 8 semanas presentó un incremento significativo con respecto a los valores iniciales reportados por el mismo grupo. Debido a la presencia de este cambio en la actividad de GPx se realizó un segundo análisis para evaluar el efecto de la curcumina en nefropatías de etiología diabética y no diabética. Se observó una inducción mayor de esta enzima en el grupo de pacientes con nefropatía de etiología diabética (DC inicial 0.18 ± 0.10 , DC final 0.21 ± 0.06) que recibieron el tratamiento de curcumina respecto a los valores iniciales descritos por el mismo grupo (Fig 14a).

Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes

1) Análisis por tratamiento

2) Análisis por patología

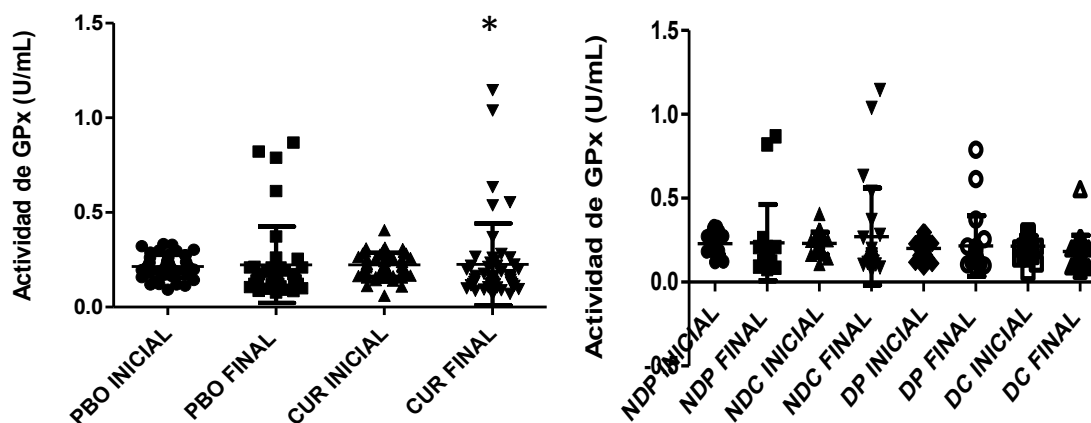


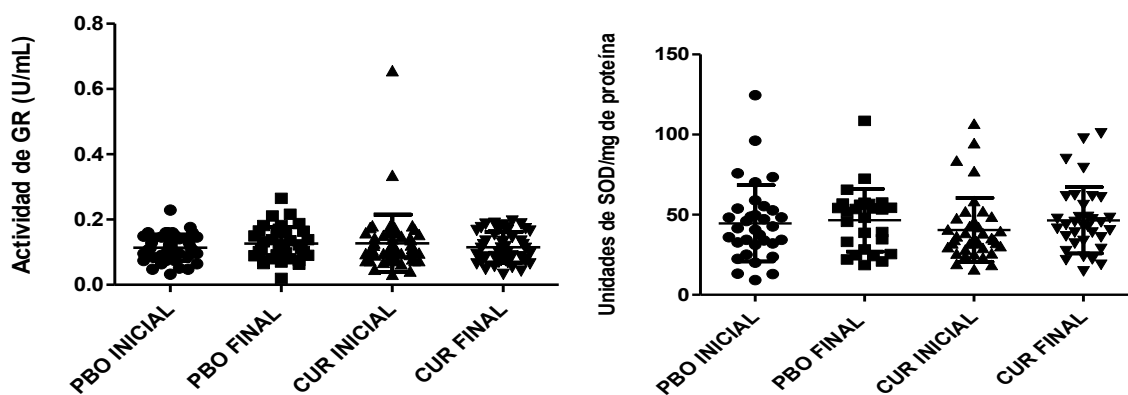
Figura 14a. Actividad GPx en plasma. Los resultados se presentan como la media \pm EEM, n= 98. (a) *p<0.05 CUR FINAL vs CUR INICIAL. (b) *p<0.05 DC FINAL vs DC INICIAL.

b) Efecto de la curcumina sobre la actividad de GR en plasma; SOD y CAT en eritrocitos.

El tratamiento con curcumina es capaz de inducir la actividad de enzimas antioxidantes como GR (CUR inicial 0.13 ± 0.09 , CUR final 0.11 ± 0.05), SOD (CUR inicial 40.47 ± 19.90 , CUR final 46.46 ± 20.67) y CAT (CUR inicial 0.15 ± 0.10 , CUR final 0.15 ± 0.09) mediante la activación de la vía de Nrf2, para prevenir el daño causado por ERO. Sin embargo no se observó ningún cambio significativo en la actividad de estas enzimas en ninguno de los grupos de estudio bajo las condiciones experimentales utilizadas ni el periodo de exposición al tratamiento con curcumina (Fig. 14b).

1) Actividad de GR en plasma

2) Actividad de SOD en eritrocitos



3) Actividad de CAT en eritrocitos

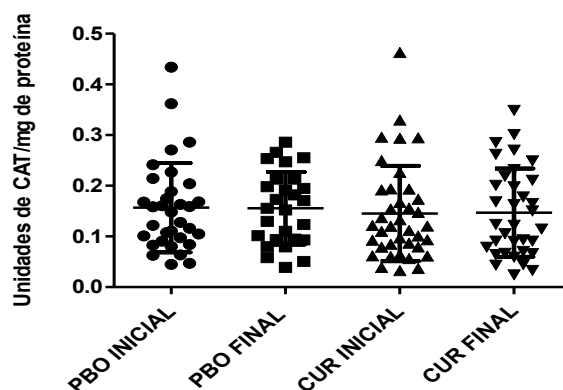


Figura 14b. (1) Actividad glutatión reductasa (GR) en plasma; (2) superóxido dismutasa (SOD) y (3) catalasa (CAT) en eritrocitos. Los resultados se presentan como la media \pm EEM, n=98.

6.2.2.4 Efecto de la curcumina sobre la inducción del factor de transcripción Nrf2

Para la evaluación de la activación del factor de transcripción Nrf2 se seleccionaron de manera aleatoria 38 pacientes. El tratamiento oral de curcumina indujo Nrf2 ligeramente en algunos pacientes (CUR inicial 0.12 ± 0.10 , CUR final 0.15 ± 0.18), sin embargo estos cambios no fueron significativos, comparados con el grupo PBO (PBO inicial 0.14 ± 0.15 , PBO final 0.11 ± 0.15) (Fig. 15).

Efecto de la curcumina sobre la inducción del factor de transcripción Nrf2

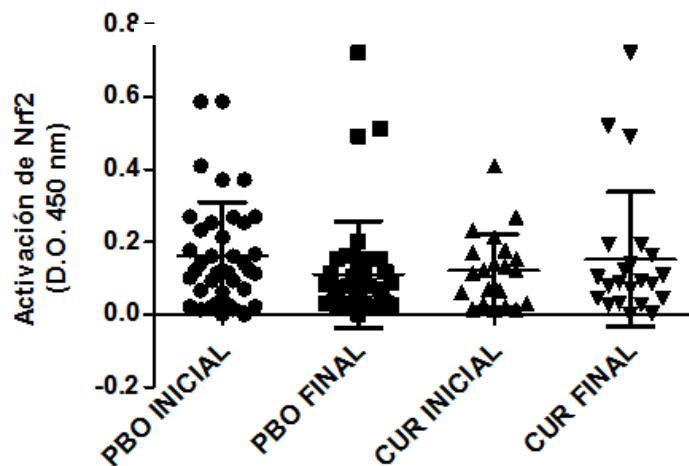


Figura 15. Activación de Nrf2 en núcleos Los resultados se presentan como la $\text{media} \pm \text{EEM}$, $n=98$, no se encontraron diferencias significativas.

VII. DISCUSIÓN

Actualmente los padecimientos metabólicos han adquirido una gran relevancia a nivel mundial, debido al constante estrés bajo el que se encuentra la población, la mala alimentación y la predisposición genética. Dentro de las más importantes se encuentra la DM, que está asociada con altos niveles de glucosa y resistencia a la insulina. (Altuve *et al.*, 2014). Una de las complicaciones más graves de este padecimiento es la ERC, la cual puede generar un daño irreversible a nivel tisular hasta requerir la terapia de sustitución de la función renal y en casos más severos genera complicaciones cardiovasculares e incluso la muerte del paciente. Debido

al aumento en la prevalencia de la ERC en México, la búsqueda de terapias adyuvantes para atenuar su progresión y disminuir los costos generados a nivel sector salud público y privado son puntos clave en la investigación (Guía de Práctica Clínica, 2009).

Durante la primera etapa de este estudio, se evaluó el perfil bioquímico de los sujetos en los grupos de estudio, donde se incluyeron los valores de glucosa, triglicéridos, colesterol, urea y creatinina; así como los parámetros antropométricos: género, edad, IMC, PAS-PAD y marcadores de estrés oxidante para evaluar su asociación con la ERC.

Es importante destacar que los sujetos en los grupos de estudio presentaban sobrepeso, indicado por los niveles de IMC reportados durante la primera etapa los cuales oscilan entre 26.6 y 29.6 Kg/m². En diversos estudios se ha encontrado que la presencia de obesidad en pacientes no diabéticos puede desencadenar en el desarrollo del síndrome nefrótico, el cual está caracterizado por la presencia de proteinuria y glomerulosclerosis (King y Loeken, 2004). La glomerulosclerosis es la principal causa de disminución de la VFG durante la ERC, debida a que el factor de crecimiento transformante beta (TFG-β) induce apoptosis, el desprendimiento de la membrana glomerular y la expansión del mesangio, los cuales reducen el volumen de la superficie de filtración glomerular y por consiguiente, la VFG disminuye conforme al desarrollo de la ERC en sus diferentes estadios (López Hernández y López-Novoa, 2012).

Los niveles de glucosa en los grupos C-DM y NEF-DM (139 y 131 mg/dL, respectivamente), aumentaron comparados con el grupos CTRL o sujetos normoglucémicos (92 mg/dL). Esta anomalía en las concentraciones de glucosa en ayuno, son propias de la patología de la DM. En estudios recientes se ha encontrado que los altos niveles de glucosa están directamente asociados al desarrollo de la progresión de la ERC (Guía de práctica clínica, 2009).

Los valores de triglicéridos en todos los grupos se encuentran aumentados, debido posiblemente, al resultado del desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto

energético, además es importante señalar que durante el transcurso de este estudio la dieta no fue un parámetro controlado a pesar de que los pacientes que cursan con ERC requieren de una dieta baja en ingesta de sal, grasas y purinas (Guía de práctica clínica, 2009). La ERC está relacionada con los frecuentes cambios en la concentración de urea y creatinina. Con respecto a los valores de urea, se encontró que las alteraciones en la función renal están asociadas al aumento de este parámetro, lo cual es consistente con lo encontrado en los grupos NEF y NEF-DM (77 y 90 mg/dL, respectivamente) ya que estos se encuentran por encima de los valores de referencia (15-45 mg/dL) (López-Cervantes *et al.*, 2009).

El estrés oxidante juega un papel importante en el desarrollo de diversos padecimientos. En diversos estudios se ha demostrado que la producción de ERO en altas concentraciones de glucosa incrementa de manera significativa en pacientes con DM y nefropatías de etiología diabética (King y Loeken, 2004), este incremento es considerado como un mediador de la progresión a la intolerancia de la glucosa y el desarrollo de sus complicaciones (Bandeira *et al.*, 2012).

Autores como Aouacheri y colaboradores (2014) han encontrado que en los pacientes con DM existe una deficiencia mayor entre el sistema de defensa antioxidante natural y la producción de ERO. Los pacientes con DM y sus complicaciones presentan un estado de estrés oxidante más severo que las personas sanas. Los resultados obtenidos durante la primera etapa de este estudio concuerdan con lo antes descrito (Gugliucci y Menini, 2014).

Los ensayos de evaluación de atrapamiento de radicales libres y ERO en la primera etapa, indican que los pacientes de los grupos C-DM y NEF-DM disminuyen de manera significativa en la capacidad de atrapamiento del radical DPPH con respecto al grupo control, probablemente ocasionado por los altos niveles de glucosa que favorecen la producción de ERO, mientras que el ensayo de ORAC no se encontraron cambios significativos en ninguno de los grupos de estudio.

La concentración de MDA en plasma fue evaluada como un índice de la oxidación de lípidos y marcador de daño renal. Los resultados obtenidos indican que debido al estado hiperglucémico de los sujetos del grupo C-DM la concentración plasmática de MDA aumenta significativamente con respecto al grupo CTRL y por consiguiente existe un aumento en la peroxidación de lípidos de membrana, así mismo la concentración de MDA en el grupo NEF aumenta significativamente con respecto al grupo CTRL debido al daño renal desarrollado en sujetos que cursan con nefropatías de etiología no diabética proteinúrica (Bandeira *et al.*, 2012).

Los altos niveles de glucosa en estos pacientes generan efectos negativos, ya que se ha encontrado que la hiperglucemia en la DMT2 conduce a una inhibición de la actividad de las enzimas antioxidantes como la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, GPx y GR como resultado del déficit en el estado redox de estos pacientes. La elevación de la actividad de enzimas como SOD y CAT así como el agotamiento de la concentración de GSH se han descrito ampliamente en pacientes con DM (Aouacheri *et al.*, 2014).

En la primera etapa, se encontró que la actividad de GPx disminuye significativamente en los grupos NEF y NEF-DM comparado con el grupo CTRL y en el grupo NEF-DM con respecto al grupo C-DM, afectando de igual manera a GSH, lo cual puede estar asociado a que GPx está involucrada de manera directa en el ciclo para regenerar GSH. Los resultados en la actividad de la enzima SOD demuestran un ligero aumento en los sujetos del grupo C-DM lo cual es consistente con estudios previos en los cuales se considera a este aumento como un mecanismo de defensa celular para revertir los daños generados por estrés oxidante, sin embargo este mecanismo no ha sido del todo explicado (Bandeira *et al.*, 2012).

Se observó además que la actividad de SOD disminuye significativamente en el grupo NEF con respecto al CTRL y en el grupo NEF y NEF-DM con respecto al grupo C-DM como consecuencia del daño celular generado por estrés oxidante. De manera consistente la actividad de la enzima CAT en el grupo C-DM aumenta con respecto al grupo CTRL y NEF-DM con respecto al grupo NEF y disminuye

significativamente en los grupos NEF y NEF-DM con respecto al CTRL y al grupo C-DM, probablemente por la misma razón antes mencionada.

Para la segunda etapa de este estudio se seleccionaron de manera aleatoria a 98 sujetos de la primera etapa, los cuales se dividieron en el grupo controlado con placebo y el grupo con curcumina. En este estudio el objetivo más importante fue observar los efectos generados tras la suplementación oral de 4 g de curcumina después de cada comida durante un período de 8 semanas en pacientes que cursan con ERC proteinúrica de cualquier etiología. Se evaluó el perfil bioquímico y marcadores de estrés oxidante para comparar los resultados obtenidos al finalizar el estudio.

Los resultados obtenidos del perfil bioquímico y antropométrico de la segunda etapa, no presentaron cambios significativos al finalizar el tratamiento con curcumina, pero sí una tendencia a disminuir la concentración de glucosa en los grupos CUR inicial y CUR final (116.06 ± 62.57 y 106.20 ± 40.71 , respectivamente).

Los grupos con alto riesgo para desarrollar ERC incluyen pacientes que cursan con diabetes e hipertensión (Flores *et al.*, 2009). El estudio clínico del paciente diabético para clasificarlo como nefrópata es la proteinuria (KDOQI, 2007).

Los hallazgos en la fase dos del estudio, revelaron que el tratamiento con curcumina no modifica los niveles de proteinuria en los grupos evaluados, la proteinuria se presenta debido a una anormalidad en la membrana glomerular. Sin embargo se ha demostrado que en la nefropatía diabética, la administración con curcumina es capaz de atenuar la proteinuria mediante el bloqueo de señalización de citocinas pro-inflamatorias como la IL-8 y el TGF- β que regulan la proliferación, diferenciación, adhesión, migración y otras funciones en muchos tipos de células (Khajehdehi *et al.*, 2011).

Para la evaluación de la capacidad de atrapamiento de radicales libres y ERO en la segunda etapa, el tratamiento con curcumina, no indujo cambios significativos en estos ensayos. Sin embargo, en estudios *in vivo* con curcumina, se ha

demostrado que este antioxidante es capaz de atrapar el radical DPPH en plasma de pacientes con DM y nefropatías (Ak y Gülçin, 2008).

La concentración de MDA disminuye de manera significativa en el grupo CUR final con respecto al grupo CUR inicial, después del tratamiento con curcumina, lo cual demuestra que la curcumina es capaz de atenuar significativamente la peroxidación lipídica y el deterioro de los lípidos de membrana celular ocasionados por la producción de ERO en sujetos que cursan con ERC (Ayala *et al.*, 2014).

La actividad de GPx en el grupo CUR final aumenta significativamente respecto al grupo CUR inicial y en el grupo DC final con respecto al grupo DC inicial. La enzima GPx es capaz de reducir peróxidos lipídicos como MDA y otros hidroperóxidos orgánicos considerados como productos altamente citotóxicos (El-Bahr, 2014). Por otro lado Yarru y colaboradores (2009) demostraron el efecto positivo de la suplementación de curcumina en aves que fueron alimentadas con aflatoxina B1, la cual brindó una mayor protección antioxidante en hígado mediante la inducción de la expresión del gen que codifica para la enzima GPx.

Los resultados encontrados en estos estudios son consistentes con nuestros resultados ya que se observó una disminución en los niveles de MDA mediado por el aumento significativo en la actividad de GPx en plasma después del tratamiento con curcumina. Se requiere de un nivel óptimo de GPx para mantener una respuesta protectora contra el H₂O₂ bajo condiciones fisiológicas normales (Goyal *et al.*, 2011). Haciendo una comparación del estado inicial y final de esta enzima es posible observar la contribución de la nefropatía con la inhibición de esta enzima, así como su inducción mediada por la suplementación de curcumina.

Las concentraciones elevadas de SOD se encuentran por una variante de SOD extracelular (EC-SOD) en la DM comparada con los grupos control (Bandeira *et al.*, 2012). El aumento en la actividad de SOD sugiere la presencia de un mecanismo de defensa debido a la exacerbada producción de ERO, lo cual a su vez requerirá una mayor actividad de la enzima CAT. En este escenario se ha descrito a la hiperglucemia como un generador de ERO (Yang *et al.*, 2009).

Debido al mecanismo de acción bifuncional de la curcumina, se ha informado que ésta puede proteger a las células del estrés oxidante indirectamente induciendo a Nrf2 (Tapia *et al.*, 2013). El Nrf2 es el encargado de regular la expresión de genes de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPx, GR y glutatión-s-transferasa (GST) (Dinkova-Kostova y Talalay, 1999), sin embargo bajo las condiciones en las que se realizaron este estudio no se encontraron diferencias significativas en la actividad de las enzimas SOD, CAT y GR

La activación del factor de transcripción Nrf2 se evaluó en 38 pacientes de la segunda etapa, los cuales fueron seleccionados de manera aleatoria. El tratamiento oral de curcumina indujo Nrf2 ligeramente en algunos pacientes (CUR inicial 0.12 ± 0.10 , CUR final 0.15 ± 0.18), sin embargo bajo las condiciones del estudio estos cambios no fueron significativos, comparados con el grupo PBO (PBO inicial 0.14 ± 0.15 , PBO final 0.11 ± 0.15). Choi y colaboradores (2014) encontraron que Nrf2 es capaz de brindar protección antioxidante a células renales mediante la regulación positiva de un arreglo de genes antioxidantes que atenúan la producción de citocinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión mediante el uso de activadores naturales de Nrf2, los cuales han demostrado su capacidad antioxidante y antiinflamatoria en el curso de la ERC los cuales prometen ser una estrategia eficaz para el mejoramiento y retardo de la progresión del daño renal. Dentro de estos activadores naturales de Nrf2 se encuentran la curcumina, el sulforafano, el ácido nordihidroguayarático (NDGA), el resveratrol y los aldehídos cinámicos.

Finalmente, es importante mencionar que la duración del estudio, la dosis administrada de curcumina, el apego al tratamiento y la falta de control del régimen alimenticio de los sujetos de estudio no permitió observar los efectos renoprotectores esperados de la suplementación con curcumina. El control de los estudios clínicos resulta más complicado que en los estudios *in vivo* e *in vitro* por lo que se requiere de un mayor control en estudios realizados con pacientes. En México la educación al paciente sobre el apego al tratamiento, apego al régimen alimenticio y posibles reacciones adversas relacionadas a medicamentos,

suplementos alimenticios y dispositivos médicos han sido un problema latente ya que desgraciadamente no existe una cultura de retroalimentación del médico o del farmacéutico clínico para guiar al paciente al uso racional de medicamentos. La Secretaría de Salud ha lanzado campañas a favor de la farmacovigilancia y del uso racional de medicamentos, sin embargo estas campañas son muy recientes y requieren de mayor difusión para que estas lleguen tanto a médicos, farmacéuticos y a pacientes en general.

VIII. CONCLUSIONES

- En pacientes con DM y nefropatía de etiología diabética la actividad de enzimas antioxidantes como CAT y SOD se encuentra sobreexpresada probablemente como un mecanismo de atenuación del daño generado por estrés oxidante.
- Los hallazgos en este estudio sugieren que la administración oral con curcumina en pacientes con nefropatía proteinúrica disminuye la concentración de MDA e induce la actividad de la enzima GPx en plasma.
- Bajo las condiciones en las que se realizó el estudio (dosis de curcumina administrada, duración del estudio, control del tratamiento y apego de los pacientes al tratamiento) la administración de curcumina no modificó los parámetros bioquímicos, antropométricos y otros marcadores de estrés oxidante evaluados.
- La curcumina en este estudio no fue capaz de incrementar la activación del factor de transcripción Nrf2 mediante la vía Keap1/Nrf2/ARE.

XIX. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de la curcumina en pacientes con ERC a mayor dosis, tiempo de exposición y control estricto del régimen alimenticio.
- Evaluar si el uso de otros antioxidantes como sulforafano y NDGA (ácido norhidroguayarático) atenúan la progresión a la fase terminal de la ERC.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi HE (1982). Catalase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (volume III), 3a ed., Weinheim, Verlag Chemie, 273-286.

Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H (2007). Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 595(3):1-75.

Ak T, Gülçin I (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact* 174(1):27-37.

Altuve M, Severeyn E, Wong S (2014). Adaptation of five indirect insulin sensitivity evaluation methods to three populations: Metabolic syndrome, athletic and normal subjects. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2014:4555-4558.

Andresen M, Regueira T, Leighton F (2006). Estrés oxidativo en el paciente crítico. *Rev Méd Chile* 134:649-56.

Aouacheri O, Saka S, Krim M, Messaadia A, Maida I (2014). The Investigation of the oxidative stress-related parameters in type 2 Diabetes Mellitus. *Can J Diabetes* doi: 10.1016/j.jcjd.2014.03.002.

Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* 26(5):196.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014:360438.

Bandeira S de M, Guedes G da S, da Fonseca LJ, Pires AS, Gelain DP, Moreira JC, Rabelo LA, Vasconcelos SM, Goulart MO (2012). Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Longev* 2012:819310.

Barnett AH, Bain SC, Bouter P, Karlberg B, Madsbad S, Jervell J, Mustonen J (2004). Diabetics exposed to telmisartan and enalapril study group. *Angiotensin-*

receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 351(19):1952-61.

Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49(2 Suppl 1):3-8.

Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev* 94(2):329-54.

Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubiña P, Lahera V, Luño J (2008). Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* 1(111):S4-9.

Cárdenas-Rodríguez N, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverrí J (2008). Glutathión Peroxidasas: Una Familia de Enzimas Capítulo 13. Radicales Libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Editado por: Konigsberg Fainstein M. Editorial El Manual Moderno ISBN:978-970-729-321-2).

Céspedes-Cabrera T, Sánchez-Serrano D (2000). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev Cubana Cardiol* 14(1):55-60.

Céspedes Miranda E, Castillo Herrera J (2008). La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso. ¿Realidad o mito? *Rev Cubana Invest Biom* 27(2):1-13.

Choi BH, Kang KS, Kwak MK (2014). Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease. *Molecules* 19(8):12727-59.

Chuengsamarn S, Rattanamongkolgul S, Luechapudiporn R, Phisalaphong C, Jirawatnotai S (2012). Curcumin extract for prevention of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 35(11):2121-7.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17(10):1195-214.

Correa F, Buelna-Chontal M, Hernández-Reséndiz S, R García-Niño W, J Roldán F, Soto V, Silva-Palacios A, Amador A, Pedraza-Chaverrí J, Tapia E, Zazueta C (2013). Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease. *Free Radic Biol Med* 61C:119-29.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P (1999). Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 20(5):911-4.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1:S128-38.

Dolphin D, Poulson R, Avramovic O (1989). *Glutathione: Chemical, Biochemical and Metabolic Aspects, Vols. A and B*, J. Wiley and Sons.

Doonan R, McElwee JJ, Matthijssens F, Walker GA, Houthoofd K, Back P, Matscheski A, Vanfleteren JR, Gems D (2008). Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 22(23):3236-41.

El-Bahr, Sabry (2014). Effect of curcumin on gene expression and activities of hepatic antioxidant enzymes in rats intoxicated with aflatoxin B1. *Phytother Res*. DOI 1472-6882/14/111

Fernández Checa JC, García Ruiz C (2008). *Glutathión Capítulo 16. Radicales Libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. Editado por: Konigsberg Fainstein M. Editorial El Manual Moderno ISBN:978-970-729-321-2.

Flores JC, Alvo M, Borja H, Morales J, Vega J, Zúñiga C, Müller H, Münzenmayer J (2009). Clinical guidelines on identification, management and complications of chronic kidney disease. *Sociedad Chilena de Nefrología. Rev Med Chil* 137(1):137-77.

Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 11(10):1176-83.

Goel A, Jhurani S, Aggarwal BB (2008). Multi-targeted therapy by curcumin: how spicy is it?. *Mol Nutr Food Res* 52(9):1010-30.

Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB (2009). Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 75(4): 787-809.

González-Reyes S, Guzmán-Beltrán S, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J (2013). Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats. *Oxid Med Cell Longev* 2013:801418.

Goyal R, Singhai M, Faizy AF (2011). Glutathione peroxidase activity in obese and nonobese diabetic patients and role of hyperglycemia in oxidative stress. *J Midlife Health* 2(2):72-6.

Greenwald RA (1990). Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med*. 8(2):201-9.

Gugliucci A, Menini T (2014). The Axis AGE-RAGE-Soluble RAGE and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. *Adv Exp Med Biol* 824:191-208.

Guía de Práctica Clínica. Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Renal Crónica Temprana (2009). México; Secretaría de Salud.

Guía de Práctica Clínica. Prevención, Diagnóstico y Tratamiento del sobrepeso y la obesidad exógena. Actualización (2011). México; Secretaría de Salud.

Guía de Práctica Clínica. Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la hipertensión arterial en el primer nivel de atención. Actualización (2014). México; Secretaría de Salud.

Guías Latinoamericanas de Práctica Clínica sobre la Prevención, Diagnóstico y tratamiento de los Estadios 1-5 de la Enfermedad Renal Crónica. Fundación Mexicana del Riñón (2012). México; ISBN: 978-607-95852-1-1

Gupta SC, Prasad S, Kim JH, Patchva S, Webb LJ, Priyadarsini IK, Aggarwal BB (2011). Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat Prod Rep* 28(12):1937-55.

Guzmán Grenfell AM, Velázquez González A, Sierra Vargas MP (2006). Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 14(4):227-32.

Halliwell B, Gutteridge J (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Biosciences Oxford Cuarta edición, 888 páginas, ISBN 978-0-19-856869-8

Hernando A, Aljama G, Egido J, Lamas L, Praga M, Serrón M (2008). *Nefrología clínica*, Editorial Médica Panamericana, 3ª edición, México.

Holt PR, Katz S, Kirshoff R (2005). Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: a pilot study. *Dig Dis Sci* 50(11):2191-3.

Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem* 50(16):4437-44.

KDOQI (2007). *Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease*. *Am J Kidney Dis*. 2007 49(2 Suppl 2):S12-154.

Khajehdehi P, Pakfetrat M, Javidnia K, Azad F, Malekmakan L, Nasab MH, Dehghanzadeh G (2011). Oral supplementation of turmeric attenuates proteinuria, transforming growth factor- β and interleukin-8 levels in patients with overt type 2 diabetic nephropathy: a randomized, double-blind and placebo-controlled study. *Scand J Urol Nephrol* 45(5):365-70.

Kim MK, Choi GJ, Lee HS (2003). Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. *J Agric Food Chem* 51(6):1578-81.

King GL, Loeken MR (2004). Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol* 122(4):333-8.

Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Zák A (2014). Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha)* 60(4):153-67.

Koren E, Kohen R, Ginsburg I (2010). Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells. *Exp Biol Med* 235:689-699.

Lawrence RA, Burk RF (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 425(3):503-9.

Le Lay S, Simard G, Martinez MC, Andriantsitohaina R (2014). Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxid Med Cell Longev* 2014:908539.

Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, Nahas ME, Jaber BL, Jadoul M, Levin A, Powe NR, Rossert J, Wheeler DC, Lameire N, Eknoyan G (2007). Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int.* 72(3):247-59.

López-Cervantes M, Rojas-Russell ME, Tirado-Gómez LL, Durán-Arenas L, Pacheco-Domínguez RL, Venado-Estrada AA (2009). Enfermedad renal crónica y su atención mediante tratamiento sustitutivo en México. México, D.F.: Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México ISBN 978-607-02-1298-7.

López-Hernández FJ, López-Novoa JM (2012). Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res* 347(1):141-54.

Martin HL, Teismann P (2009). Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J* 23(10):3263-72.

Medeiros MH (2008). Daño al DNA Capítulo 08. Radicales Libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Editado por: Konigsberg Fainstein M. Editorial El Manual Moderno ISBN:978-970-729-321-2.

Méndez-Durán A, Méndez-Bueno JF, Tapia-Yáñez T, Muñoz Montes A, Aguilar-Sánchez L (2010). Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Dial Traspl* 31(1):7-11.

Moreillon JJ, Bowden RG, Deike E, Griggs J, Wilson R, Shelmadine B, Cooke M, Beaujean A (2013). The use of an anti-inflammatory supplement in patients with chronic kidney disease. *J Complement Integr* 10(1):143-52.

Niki E (2008). Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors* 34(2):171-80.

Niki E (2014). Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochim Biophys Acta* 1840(2):809-17.

Oberley LW, Spitz DR (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 105:457-64.

Olay-Fuentes G, Díaz- Piedra P, Hernández-Gómez R, Cervantes-Villagrana D, Presno-Bernal JM, Alcántara-Gómez LM (2013). Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. *Rev Latinoamer Patol Clin*, 60(1):43-51.

Olivares-Corichi IM, Medina-Navarro R, Torres-Ramos YD, Montes-Cortés DH (2006). Daño a proteínas por estrés oxidante: Lipoproteína de baja densidad e insulina. *Rev Endocrinol Nutr* 14(4):237-40.

Ozcelik B, Lee JH, Min DB(2003). Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci* 68(2):487-490.

Rahman I, Kode A, Biswas SK (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 1(6):3159-65.

Reddy RC, Vatsala PG, Keshamouni VG, Padmanaban G, Rangarajan PN (2005). Curcumin for malaria therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 326(2):472-4.

Repetto-Jiménez M, Repetto-Kuhn G (2009). *Toxicología fundamental. Capítulo 6: Mecanismos de toxicidad.* ISBN: 978-84-7978-898-8

Rouse M, Younès A, Egan JM (2014). Resveratrol and curcumin enhance pancreatic β -cell function by inhibiting phosphodiesterase activity. *J Endocrinol* 223(2):107-17.

Small DM, Coombes JS, Bennett N, Johnson DW, Gobe GC (2012). Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 17(4):311-21.

Srinivas L, Shalini VK, Shylaja M (1992). Turmerin: a water soluble antioxidant peptide from turmeric (*Curcuma L.*). *Arch Biochem Biophys* 292(2):617-23.

Stefanson AL, Bakovic M (2014). Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals. *Nutrients* 6(9):3777-801.

Tapia E, Soto V, Ortiz-Vega KM, Zarco-Márquez G, Molina-Jijón E, Cristóbal-García M, Santamaría J, García-Niño WR, Correa F, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J (2012). Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxid Med Cell Longev* 2012:269039.

Tapia E, Zatarain-Barrón ZL, Hernández-Pando R, Zarco-Márquez G, Molina-Jijón E, Cristóbal-García M, Santamaría J, Pedraza-Chaverri J (2013). Curcumin

reverses glomerular hemodynamic alterations and oxidant stress in 5/6 nephrectomized rats. *Phytomedicine* 20(3-4):359-66.

Timme-Laragy AR, Goldstone JV, Imhoff BR, Stegeman JJ, Hahn ME, Hansen JM (2013). Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo. *Free Radic Biol Med* 65(11):89-101.

Tiryaki BS, Tasliyurt T, Yelken BM, Sahin S, Kutluturk F, Koseoglu HI, Ozturk B, Yilmaz A, Sahin S (2014). Evaluation of oxidative stress using exhaled breath 8-isoprostane levels on chronic kidney disease. *Niger J Clin Pract* 17(3):356-60.

Trujillo J, Chirinio YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero C, Tapia E, Pedraza-Chaverri J (2013). Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: recent findings. *Redox Biol* 1(1):448-56.

Trujillo J, Granados-Castro LF, Zazueta C, Andérica-Romero AC, Chirino YI, Pedraza-Chaverri J (2014). Mitochondria as a target in the therapeutic properties of curcumin. *Arch Pharm (Weinheim)* 347(12):873-84

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160(1):1-40.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84.

Yang Z, Laubach VE, French BA, Kron IL (2009). Acute hyperglycemia enhances oxidative stress and exacerbates myocardial infarction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase during reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 137(3):723-9.

Yarru LP, Settivari RS, Gowda NK, Antoniou E, Ledoux DR, Rottinghaus GE (2009). Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes

associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. *Poult Sci* 88(12):2620-7.

Yoshida Y, Umeno A, Shichiri M (2013). Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. *J Clin Biochem Nutr* 52(1):9-16.

Zachara BA, Gromadzińska J, Wasowicz W, Zbróg Z (2006). Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. *Acta Biochim Pol* 53(4):663-77.

ANEXO I.

Valores de Referencia de parámetros bioquímicos y antropométricos		
IMC (kg/m²) (Guía Práctica Clínica, 2011).	Normal	18.5-24.99
	Sobrepeso	≥25.0
	Preobeso	25.0-29.99
	Obeso	≥30.0
	Obeso Tipo I	30.0-34.99
	Obeso Tipo II Obeso Tipo III	35.0-39.99 ≥40.0
PAS (mmHg) (Guía Práctica Clínica, 2014).	Óptima	<120
	Normal	120-129
	Normal Alta	130-139
	Hipertensión Leve	140-159
	Hipertensión Moderada	160-179
	Hipertensión Grave	>180
PAD (mmHg) (Guía Práctica Clínica, 2014).	Óptima	<80
	Normal	80-84
	Normal Alta	85-89
	Hipertensión Leve	90-99
	Hipertensión Moderada	100-190
	Hipertensión Grave	>190
Glucosa (mg/dl) (Olay-Fuentes <i>et al.</i> , 2013).	Mujeres	70-115
	Hombres	74-106
Triglicéridos (mg/dl) (Olay-Fuentes <i>et al.</i> , 2013).	Mujeres	80-150
	Hombres	70-200
Colesterol (mg/dl) (Olay-Fuentes <i>et al.</i> , 2013).	Mujeres	160-200
	Hombres	155-195
Urea (mg/dl) (Olay-Fuentes <i>et al.</i> , 2013).	Mujeres	17.1-56
	Hombres	19.0-58
Creatinina (mg/dl) (Olay-Fuentes <i>et al.</i> , 2013).	Mujeres	0.6-1.1
	Hombres	0.7- 1.3

Tabla 5. Valores de Referencia de parámetros bioquímicos y antropométricos de la población mexicana