



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la curcumina sobre la función mitocondrial en la insuficiencia renal experimental

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

Químico Omar Emiliano Aparicio Trejo

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. José Pedraza ChaverriFacultad de Química, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Roció Salceda Sacanelles.....Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dra Laura Escobar Perez.....Facultad de Medicina, UNAM.

Ciudad de México. 01 de Agosto del 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con *números de proyecto 220046 y 252008* y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con *número de proyecto IN201316* por la ayuda recibida para la elaboración de este trabajo.

Se agradece también al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por el apoyo recibido para presentación este proyecto en la XVIII Reunión de la rama de Bioenergética y Biomembranas de la Sociedad Bioquímica de México.

Dedicatorias personales.

A mis padres, gracias por su apoyo incondicional para llevar a cabo mis estudios, por su confianza y por ser un ejemplo de conciencia, trabajo y principios.

A Miriam mi pareja, por todo el amor, respeto y apoyo que me has dado durante todos estos años.

A mi familia: mi hermana, tíos, primos, abuelitos y abuelos, gracias por todo su apoyo y cariño.

Al Doctor Eduardo Molina y a la Doctora Edilia Tapia, por ser mis maestros cuando no tenían la obligación. Gracias por su orientación, por su apoyo experimental y por todo el tiempo que me dedicaron.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 209, gracias por su tiempo, por la orientación y por los momentos de diversión. Agradezco también a todos los compañeros e investigadores de los diferentes laboratorios en los que se me atendió y permitió trabajar.

Tabla de contenido

Agradecimientos	2
Índice de Abreviaturas	6
Resumen.....	8
1. Introducción.....	9
1.1. Fisiología renal.....	9
1.2. El transporte activo y la distribución mitocondrial en la nefrona.....	13
1.3. La enfermedad renal crónica.....	15
2. Antecedentes	18
2.1. Modelos de reducción de la masa renal en el estudio de la CKD y la nefrectomía 5/6.....	18
2.2. La disfunción mitocondrial, estrés oxidante y su papel en la nefropatía.	19
2.2.1. <i>Estrés oxidante en modelos de reducción de la masa renal.</i>	20
2.2.2. <i>Un sistema Nox-mitocondria.</i>	20
2.3. La curcumina y su papel en la atenuación del daño renal.	21
2.3.1. <i>La curcumina y su papel en la protección de la función mitocondrial.</i>	22
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivos.....	25
5.1. Objetivo general.....	25
5.2. Objetivos particulares	25
6. Metodología.....	26
6.1. Reactivos.	26
6.2. Modelo experimental.....	26
6.2.1. Nefrectomía 5/6.	27
6.3. Función renal.....	28
6.4. Estudios en los segmentos de la nefrona.....	30
6.5. Estudios en mitocondrias aisladas	33
6.6. Análisis estadístico.	38
7. Resultados.....	39
7.1. Función Renal.....	39
7.1.1. Marcadores de función renal.	39
7.1.2. Parámetros hemodinámicos.	40

7.1.3. Microscopía de luz.....	41
7.1.4. Capacidad antioxidante total de LMWA en riñón.	42
7.2. Estudios en los segmentos de la nefrona.....	45
7.2.1. Producción de superóxido.....	45
7.2.2. Actividad de las enzimas antioxidantes en los segmentos de la nefrona.	47
7.2.3. <i>Niveles de enzimas antioxidantes en túbulo proximal.</i>	48
7.2.4. <i>Proteína cinasa C y fosforilación de p47phox en túbulo proximal</i>	49
7.3. Estudios en mitocondrias aisladas	50
7.3.1. Producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias.....	50
7.3.2. MDA y actividad de las enzimas antioxidantes en la mitocondria.....	51
7.3.3. Respiración mitocondrial.	52
7.3.4. Actividad de complejos mitocondriales y potencial de membrana.....	53
7.3.5. Niveles de las subunidades de los complejos mitocondriales.	54
7.3.6. Niveles de las proteínas de dinámica mitocondrial.	55
7.3.7. Microscopia electrónica e inmunomicroscopía en túbulo proximal.....	56
8. Discusión.....	59
8.1. La función renal.....	59
8.2. El estrés oxidante en los segmentos de la nefrona.....	59
8.3. Función mitocondrial	61
8.4. Planteamiento de un sistema de aumento del estrés oxidante Nox-mitocondria.	63
9. Conclusiones.....	67
10. Perspectivas	68
11. Referencias	69
12. Anexos	74
12.1. Principales curcuminoides en el tumérico.	74
12.2. Enzimas antioxidantes.....	74
12.3. Voltamperogramas de posibles sustratos que contribuyen a la CAT-LMWA en plasma y riñón.....	75
12.4. Desglose de los voltamperograma y análisis estadístico correspondiente a riñón.	76
12.5. Desglose de los voltamperograma y análisis estadístico en plasma.....	78

Índice de Abreviaturas.

ANT	Tranlocador de nucleótidos de adenina del inglés <i>adenine nucleotide translocase</i> .
BSA	Albumina sérica bovina.
BUN	Nitrógeno ureico en sangre del inglés <i>blood urea nitrogen</i> .
CAT-LMWA	Capacidad antioxidante total de antioxidantes de bajo peso molecular.
CAT	Catalasa.
CCP	Carbonilo cianuro m-clorofenilhidrazona.
CKD	Enfermedad renal crónica del inglés <i>chronic kidney disease</i> .
CR	Control respiratorio mitocondrial.
CT	Túbulos colectores del inglés <i>collecting tubules</i> .
DHE	Dihidroetidio
DCT	Túbulo distal contorneado del inglés <i>distal convoluted tubule</i> .
DT	Túbulo distal del inglés <i>distal tubule</i> .
DPI	Cloruro de difeniliodonio.
Drp1	Proteína 1 relacionada con la dinamina del inglés <i>dynamin-related protein 1</i> .
DUB	Decilubiquinona.
ESRD	Enfermedad renal en etapa terminal del inglés <i>end stage renal disease</i> .
ETC	Cadena de transporte de electrones del inglés <i>electron transport chain</i> .
Fis1	Proteína 1 de fisión mitocondrial del inglés <i>mitochondrial fission 1 protein</i> .
GBM	Membrana basal glomerular del inglés <i>glomerular basement membrane</i> .
GFR	Tasa de filtración glomerular del inglés <i>glomerular filtration rate</i> .
GPx	Glutación peroxidasa.
GR	Glutación reductasa.
GSH	Glutación reducido.
GST	Glutación S-transferasa.
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
HRP	Peroxidasa de rábano del inglés <i>horseradish peroxidase</i> .
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetasulfónico
Keap1	Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch del inglés <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i> .
LMWA	Antioxidantes de bajo peso molecular inglés <i>low molecular weight antioxidants</i> .
MAP	Presión arterial media inglés <i>mean arterial pressure</i> .
MCB	Monochlorobimano.
MDA	Marcador de lipooxidación malondialdehído.
Mfn1	Mitofusina 1.
NBT	Nitroazul de tetrazolio del inglés <i>nitroblue tetrazolium</i> .
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NKCC2	Cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$.
Nos	Sintasa de óxido nítrico desacoplada.
Nox	NADPH oxidasa.
Nrf2	Factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2
Nx5/6	Nefrectomía 5/6.
Opa1	Proteína de atrofia óptica 1 del inglés <i>optic atrophy 1 protein</i> .
O₂^{•-}	Anión superóxido
PKC	Proteína cinasa c.
PT	Túbulo proximal del inglés <i>proximal tubule</i> .
PBS	Amortiguador de fosfatos salinos.

RBF	Flujo sanguíneo renal del inglés <i>renal blood flow</i> .
ROS	Especies reactivas de oxígeno del inglés <i>reactive oxygen species</i> .
RVR	Resistencia vascular renal del inglés <i>renal vascular resistance</i> .
snGFR	Filtración glomerular por nefrona del inglés <i>single nephron GFR</i> .
SOD	Superóxido dismutasa.
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TAL	Segmento grueso ascendente del asa de Henle del inglés <i>thick ascending loop of Henle</i> .
TDL	Segmento delgado descendente del asa Henle del inglés <i>thin descending loop of Henle</i> .
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa del inglés <i>tumor necrosis factor alfa</i> .
VDAC	Canal aniónico dependiente del voltaje del inglés <i>voltage dependent anion channel</i> .
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial.

Resumen.

El modelo de riñón remanente inducido por nefrectomía 5/6 (Nx5/6) es un modelo ampliamente utilizado para estudiar la progresión de la enfermedad renal crónica (CKD), que se caracteriza por pérdida progresiva de la función renal, estrés oxidante y un hipermetabolismo que lleva a un aumento en el consumo de oxígeno y ATP en la masa renal remanente. Sin embargo, las alteraciones en la función mitocondrial no se han caracterizado completamente en este modelo. Por otro lado, se ha demostrado que la curcumina (un antioxidante bifuncional extraído de la planta *cúrcuma longa*) es capaz de preservar la función mitocondrial en diversas nefropatías, mientras que en el modelo de nefrectomía se demostró que la posadministración disminuye el estrés oxidante y evita el aumento de la presión arterial sistémica.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si existen alteraciones sobre la función mitocondrial en el modelo de Nx5/6 a las 24 horas de estudio, su impacto sobre la pérdida de la función renal y valorar el efecto de la curcumina como pretratamiento sobre dichas alteraciones. Para esto se utilizó un modelo *in vivo* que consistió de 3 grupos de ratas Wistar macho: 1) Grupo sham o vehículo. 2) Grupo nefrectomizado (Nx5/6). 3) Grupo nefrectomizado con un pretratamiento de curcumina (60 mg/kg/día) por 7 días (Cur+Nx5/6).

Se encontró que la nefrectomía 5/6 (a las 24 horas) induce en la mitocondria un estrés energético, visto como la disminución en la actividad de los complejos I y V mitocondriales, el desplazamiento de la dinámica mitocondrial hacia la fusión mitocondrial y el incremento del estrés oxidante, a partir del aumento en la producción de peróxido mitocondrial, la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa y el aumento del marcador de lipoperoxidación malondialdehído. Esto lleva al desacoplamiento mitocondrial, que junto con el aumento en la producción de superóxido por parte de la NADPH oxidasa (Nox) y de la sintasa de óxido nítrico desacoplada (Nos), generan daños posteriores en las mitocondrias y en el riñón remanente. Este mecanismo implica un círculo vicioso de aumento del estrés oxidante que lleva a disminución de la tasa de filtración glomerular (GFR), cambios en la hemodinámica renal y al aumento en los marcadores de daño renal creatinina y nitrógeno ureico en sangre (BUN), permitiendo así el progreso de la CKD en este modelo.

Por su parte la preadministración de curcumina previno el desacoplamiento de la mitocondria (a partir de la preservación de las actividades de los complejos I y V), el desplazamiento de la dinámica mitocondrial hacia la fusión, el aumento del estrés oxidante en la mitocondria y el aumento de la producción de superóxido por la Nox y la Nos. Esto se tradujo en el mantenimiento de la GFR, la hemodinámica renal y menores niveles de los marcadores de daño renal, permitiendo así la preservación de la función renal en el modelo de Nx5/6.

1. Introducción.

1.1. Fisiología renal.

Los riñones se encuentran situados detrás del peritoneo a ambos lados de la columna vertebral, lugar donde son irrigados por una sola arteria renal recibiendo cerca del 21% del gasto cardíaco. Esta arteria entra a través del *hilio* en la superficie medial del riñón y se ramifica en un sistema de arteriolas, desembocando en las *arteriolas aferentes* las cuales regulan la entrada del flujo sanguíneo a la unidad funcional del riñón la *nefrona* (Brenner & Rector, 2011). Una persona adulta posee entre 1.5 a 2 millones de nefronas, 80% de las cuales se encuentran primariamente dentro de la capa externa del riñón “la corteza renal”, por lo que recibe el nombre de *nefronas corticales*, mientras que solo el 20% penetran a la región interna del riñón “la médula”, por lo cual reciben el nombre de *nefronas yuxtamedulares* (Silverthorn, 2009).

Cada nefrona está compuesta de un corpúsculo renal encargado del proceso de filtración y una serie de túbulos adjuntos que generan la orina a partir del filtrado. El corpúsculo renal está conformado por un entramado capilar “el *glomérulo*” y la esfera que lo encierra “la *capsula de Bowman*”. Por otro lado, la parte tubular de la nefrona está constituida por el túbulo proximal (PT), el segmento delgado descendente del asa Henle (TDL), el segmento grueso ascendente del asa de Henle (TAL) y el túbulo distal (DT) que desemboca en los túbulos colectores (CT). El glomérulo, los TP y TD se encuentran mayoritariamente en la corteza renal, mientras que el asa de Henle y los túbulos colectores se extienden hacia abajo en dirección a la médula (Lote, 2014). En el caso de las nefronas corticales, estas poseen asas de Henle cortas, las cuales sólo se extienden una distancia muy breve dentro de la médula. Por su parte las nefronas yuxtamedulares poseen asas de Henle largas, que penetran profundamente en la médula (ver diagrama 2).

Glomérulo.

El glomérulo tiene como principal función la filtración del plasma sanguíneo para producir un ultrafiltrado. El proceso de filtración del plasma es igual para los glomérulos corticales como para los yuxtamedulares y se lleva a cabo por el paso del líquido a través de 3 membranas que forman la barrera de filtración glomerular, la cual sirve como un tamiz de selección de moléculas por tamaño y carga. En orden cronológico de paso del filtrado, estas membranas son:

- 1) El endotelio fenestrado, conformado por células endoteliales que rodean los capilares, que forman poros con un diámetro de aproximadamente 70 a 100 nm (Brenner & Rector, 2011), que permite el paso de la mayoría de los componentes del plasma pero evitan el cruce de las células sanguíneas y moléculas cargadas negativamente. Esto debido a que su superficie se encuentra cargada negativamente por la presencia de una capa de glicoproteínas y glicosaminoglicanos conocida como *glicocálix* (Fogo et al., 2014).

- 2) La membrana basal glomerular (GBM), la cual es una capa densa acelular conformada principalmente por glicoproteínas, colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y proteoglicanos sulfatados (Lote, 2014) que le permiten repeler moléculas cargadas

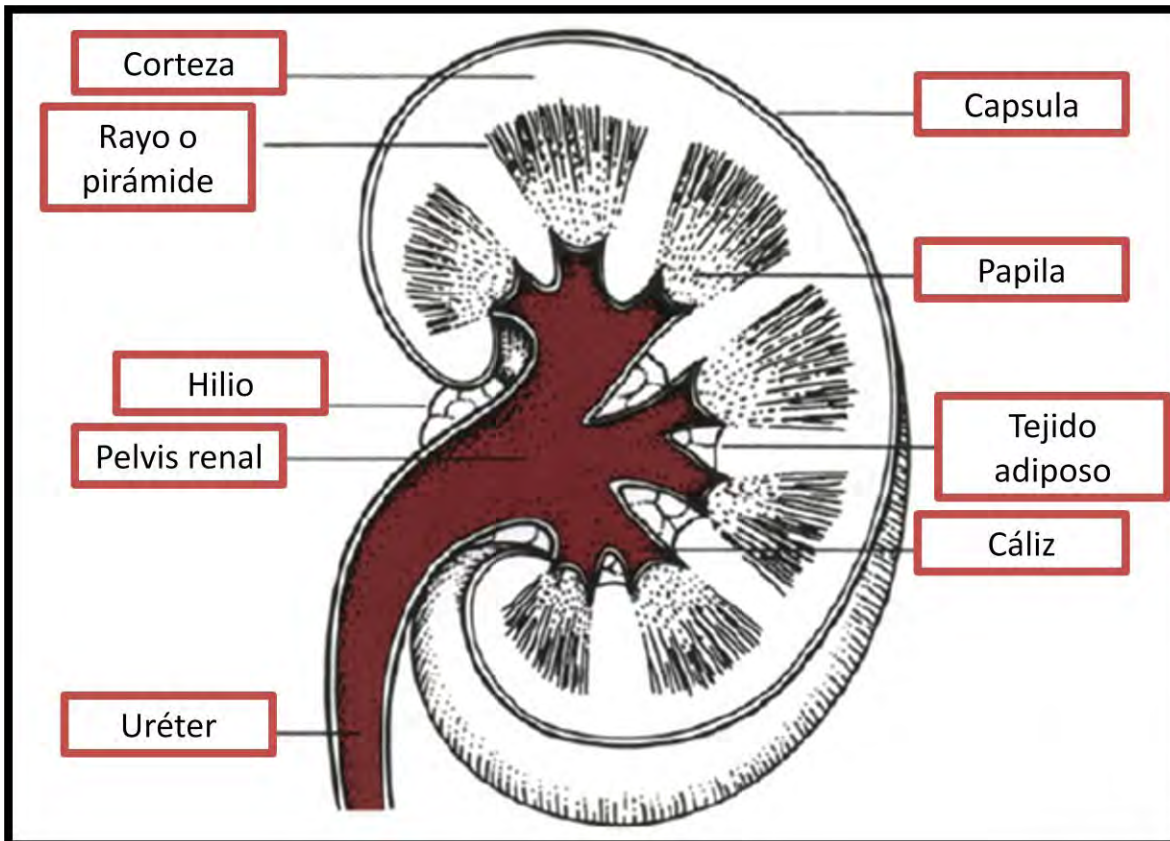


Diagrama 1. Rebanada longitudinal del riñón mostrando las principales características estructurales del mismo, las cuales se describen en el texto. Se puede apreciar la existencia de estructuras en forma de cono que se extienden desde la parte externa de la corteza hasta la papila, las cuales reciben el nombre de pirámides renales. Dichas pirámides están constituidas por segmentos tubulares de nefronas paralelas, lo que le genera la forma característica de rayo. (Lote, 2014).

negativamente. Además debido a sus pequeños espacios es capaz de retener moléculas mayores a 8 nm.

3) Las ranuras de filtración de los podocitos (las células del epitelio visceral de la cápsula de Bowman). Estas células se encuentran en contacto directo con la GMB y poseen prolongaciones del citoplasma que originan pequeñas extensiones conocidas como péndulos, los cuales se entrelazan entre sí y se enrollan alrededor de los capilares glomerulares, donde forman ranuras de filtración que van de 25 a 60 nm. Esta ranura está constituida por proteínas transmembranales como nefrina, NEPH1, podocina, FAT1, VE-cadherina, y P-cadherina (Jianghui & Madhumitha, 2013) que le dan las propiedades selectivas a esta membrana.

Túbulo proximal.

El fluido que entra al lumen de la nefrona a partir de la filtración glomerular posee una composición muy similar a la del plasma. Sin embargo, la orina final que deja los CT posee una osmolaridad y composición muy diferente a la del filtrado glomerular inicial, lo que implica que la composición de dicho filtrado se debe ver modificada en su trayecto tubular. Los dos fenómenos que ocurren durante el paso por los segmentos tubulares y que modifican la composición del filtrado se conocen como *reabsorción* y *secreción*. Tanto la reabsorción como la secreción hacen referencia al movimiento de solutos a través de los segmentos tubulares en una dirección específica, por un lado la reabsorción se refiere al movimiento del soluto del lumen tubular de vuelta a la sangre y por el otro la secreción hace referencia al movimiento de una sustancia directamente de la sangre al lumen del túbulo renal (por un proceso de endocitosis).

El líquido filtrado en los glomérulos pasa de la cápsula de Bowman al túbulo proximal, este representa el segmento más largo de la nefrona (la longitud de un túbulo proximal humano es generalmente de 12 a 25 mm y 8 mm en rata con un diámetro de 40 μm) y en conjunto constituyen la mayor parte de la corteza (Fogo et al., 2014). En él se efectúan la mayor parte de reabsorción de solutos que necesitan regresar al flujo sanguíneo como sodio, cloro, glucosa, aminoácidos, péptidos y bicarbonato. Además, lleva acabo la reabsorción del 60 al 70% del agua filtrada.

El TP está constituido por dos partes, la inicial contorneada o "*pars contorneada*" que está unida directamente al corpúsculo renal en la corteza y realiza la mayor parte de la reabsorción; y la parte recta "*pars recta*", que desciende en dirección a la medula (Lote, 2014). Sin embargo, morfológicamente tanto en humanos como en ratas se pueden distinguir tres segmentos: S1, S2 y S3. El primero de ellos el S1, ocupa las dos primeras partes de la *pars contorneada*, su epitelio se caracteriza por la presencia de un gran número de invaginaciones y procesos de la membrana basolateral que rodea a un gran número de mitocondrias de morfología alargadas y altamente empaquetadas. Mientras que en el lado luminal el borde de cepillo posee prolongaciones largas y bien desarrolladas. En este segmento al igual que en el resto de la *pars contorneada*, el transporte paracelular a través de las uniones estrechas es controlado por las proteínas de la familia de las claudinas, en especial claudina 2 se encuentra altamente expresada (Jianghui & Madhumitha, 2013).

Por su parte, el segundo segmento ocupa el resto de la *pars contorneada* y el inicio de la *pars recta*, se caracteriza morfológicamente por tener un borde cepillo más corto que el S1 y un menor número de invaginaciones y procesos de la membrana. Además, posee mitocondrias menos numerosas y de una morfología más circular con respecto al S1 y muestra una disminución significativa en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa con respecto al S1 (Brenner & Rector, 2011).

Por último, el S3 ocupa la porción restante de la *pars recta*, este posee una cantidad mucho menor de mitocondrias circulares, pero una gran cantidad de pequeños lisosomas y peroxisomas, así como una alta expresión de aquaporina 7. Sus invaginaciones y procesos de la membrana son mínimos y la longitud del borde cepillo es la más reducida de los 3 segmentos. Este segmento es la

parte encargada de secretar una gran cantidad de aniones y cationes orgánicos, por lo cual es a menudo dañado por la administración fármacos nefrotóxicos (Fogo et al., 2014).

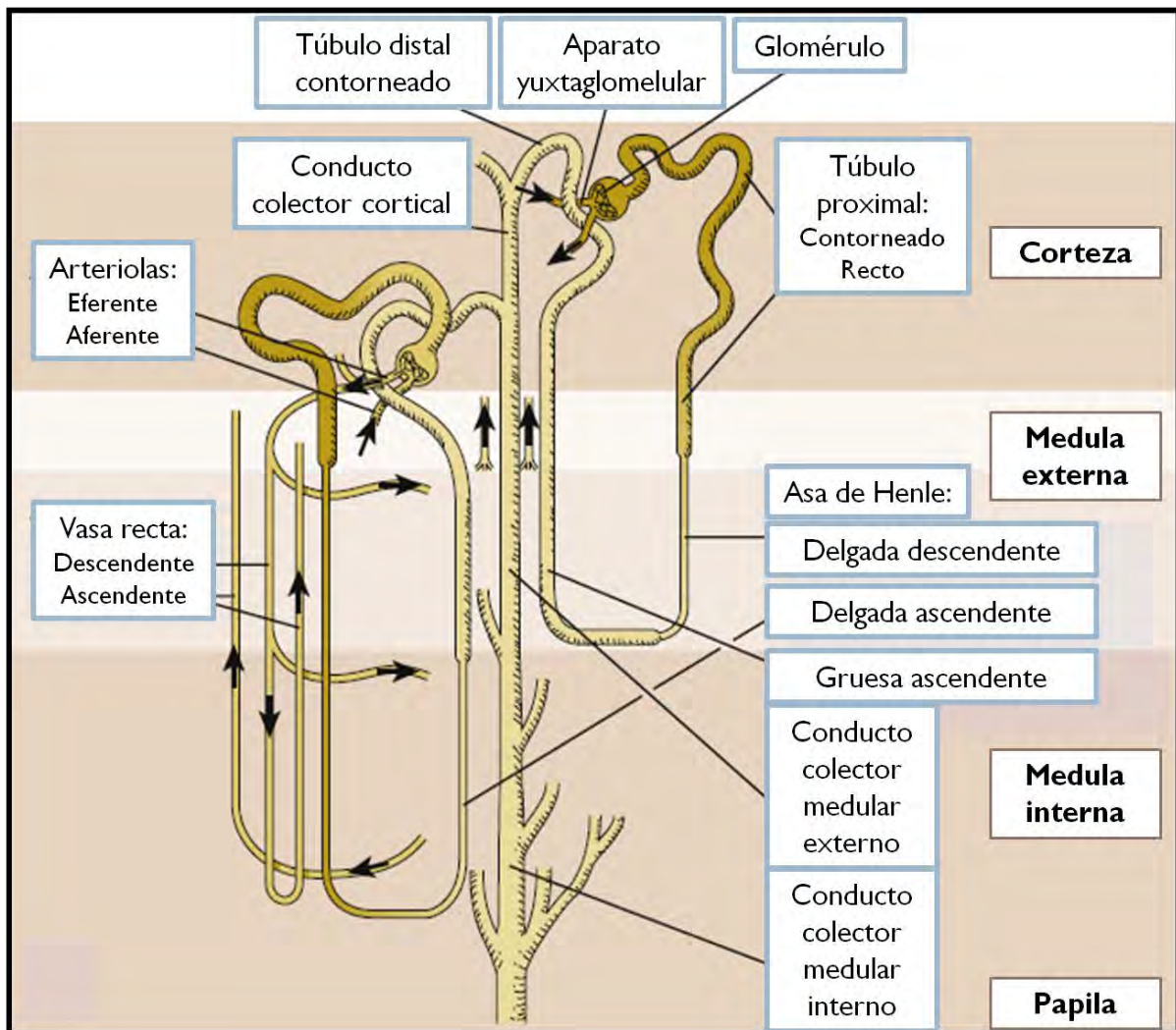


Diagrama 2. Estructura básica de “la nefrona”, la unidad funcional del riñón. Las flecha negras muestran el flujo que sigue el filtrado a través de la misma. En el esquema se pueden distinguir los dos tipos básicos de nefronas: A la derecha una nefrona cortical cuya asa de Henle desciende únicamente hasta la parte externa de la medula renal. A la izquierda encontramos una nefrona yuxtamedular, cuya asa de Henle desciende en la medula interna y en cuyo paralelo corre en dirección contraria al flujo del filtrado la red de capilares sanguíneos conocida como *vasa recta*. (Brenner & Rector, 2011)

Asa de Henle.

Desde el túbulo proximal el líquido desciende hacia el asa de Henle. En este punto el fluido que entra en el asa de Henle es isotónico con respecto al plasma, pero al llegar al túbulo distal es hipotónico con respecto al plasma, implicando que en el asa de Henle se produce el alto gradiente

osmótico que permite al agua ser removida a medida que atraviesan la médula renal. Para comprender este mecanismo se debe tener en cuenta lo siguiente:

- La rama descendente del asa de Henle no transporta activamente solutos, pero es permeable al agua, esto genera que a medida que el filtrado fluye a través de esta parte se hace más hiperosmótico. Así en la parte más profunda de la médula el asa alcanza unos 1,200 mOsm.
- Por su parte la rama ascendente del asa, es capaz de reabsorber activamente el sodio (por medio de la Na^+/K^+ -ATPasa y los transportadores de sodio), pero es impermeable al agua (debido a la ausencia de aquaporinas), por lo que el agua es incapaz de seguir el gradiente osmótico de Na^+ y los demás iones, llevando a la dilución del filtrado.
- Por último, paralelo al asa corre una red de capilares especializados conocidos como *vasa recta*, originados de la arteriola eferente y cuyo flujo va en dirección contraria al del líquido tubular.

En conjunto estos fenómenos generan que en el TDL el agua se elimina hacia los capilares de la *vasa recta*, mientras que con el flujo sanguíneo del capilar opuesto al del lumen tubular en el TAL, el sodio sale en dirección a la *vasa recta* permitiendo así al asa de Henle reabsorber casi 25% de Na^+ (Saladín, 2012). Este mecanismo se conoce como flujo a contracorriente.

Túbulo distal y túbulo colector.

La porción ascendente del asa de Henle es un continuo con el túbulo distal, por lo cual algunos autores lo consideran como parte del mismo (Lote, 2014). La parte inicial del TD es impermeable al agua y posee un transporte activo considerable, numerosas mitocondrias de morfologías alargadas y empaquetadas en procesos celulares, así como numerosos cuerpos vesiculares. El motor del transporte activo en este segmento es también la Na^+/K^+ -ATPasa luminal, mientras que el transporte de sodio a través de la parte apical se da principalmente por medio del $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransportador (NKCC2) (Brenner & Rector, 2011); aunque también lleva a cabo transporte paracelular de otros cationes como el calcio y el magnesio.

El siguiente segmento del túbulo distal es conocido como el túbulo distal contorneado (DCT). Las células epiteliales de este segmento contienen vastas invaginaciones, numerosas mitocondrias y cuerpos vesiculares. Este segmento media la reabsorción activa de calcio, ya que tiene la mayor actividad de la Ca^{2+} -ATPasa en toda la nefrona (Doucet & Katz, 1982). Finalmente la región conectora del túbulo distal desemboca en el tubo colector cortical, donde se lleva a cabo el control hormonal de la reabsorción de agua por medio de la hormona antidiurética.

1.2. El transporte activo y la distribución mitocondrial en la nefrona.

En el riñón los procesos de transporte activo son la fuerza motriz inicial que hace posible el movimiento de sustancias a través del epitelio tubular. Esto hace al riñón un órgano con una alta demanda energética, el cual utiliza aproximadamente el 7% del oxígeno total consumido por el cuerpo (Sekine & Endou, 2013).

Sin duda la mayor contribución al consumo de oxígeno renal está dada por el transporté activo de sodio. Dicho transporte depende linealmente del gasto de oxígeno (Kiil et al., 1961) y por tanto de la actividad mitocondrial para generar el gradiente electroquímico que hace posible la reabsorción de agua y los demás solutos. El transporte de sodio está regulado primordialmente por la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en la membrana basolateral, la cual libera 3 Na^+ al espacio extracelular al tiempo que internaliza 2 K^+ vía hidrólisis de una molécula de ATP. Sin embargo, la alta eficiencia de la reabsorción renal de sodio se debe además a la contribución del transporte paracelular mediado por claudinas (Jianghui & Madhumitha, 2013), que en conjunto permite a las nefronas reabsorber más del 99% del sodio filtrado (Lote, 2014).

Por otro lado, en cuanto a la distribución de la Na^+/K^+ -ATPasa, esta es heterogénea en los diversos segmentos de la nefrona. Las mediciones de la actividad de hidrólisis de esta enzima realizadas por Katz et al. (1979) muestran asimismo una mayor actividad en la parte contorneada del PT y del DT. Además, podemos encontrar otras ATPasas en la nefrona, como la Ca^{2+} -ATPasa, la H^+ -ATPasa y la H^+/K^+ -ATPasa, aunque sus niveles de expresión son bajos con respecto a las ATPasas de sodio. La Ca^{2+} -ATPasa posee una alta expresión en el segmento contorneado del DT, mientras que la H^+/K^+ -ATPasa se encuentra expresada constitutivamente a lo largo de los CT (Sekine & Endou, 2013).

Distribución mitocondrial y utilización preferencial de sustratos en la nefrona

La alta heterogeneidad en cuanto al gasto energético en la nefrona genera una variación en la contribución de la fosforilación oxidativa y la glucólisis, que varía de acuerdo al segmento. Como lo demostró Sekine y Edou (2013) existe una buena correlación entre el metabolismo aerobio y la densidad mitocondrial en cada segmento de la nefrona. Las investigaciones sobre la densidad mitocondrial (medido como volumen mitocondrial por unidad de volumen de citoplasma) realizadas por análisis estereoscópico, revelan las siguientes densidades: parte contorneada del PT 33%, parte recta del PT 22%, TDL 6 a 8%, parte medular del TAL 44%, DCT 33%, CT corticales 20%, y CT medulares 10%.

Cabe recordar que en tejidos como el músculo esquelético y cardiaco la actividad de la mitocondria no solo depende de la densidad de la mismas en dicho tejido, sino también del tipo y disponibilidad de sustratos (Goncalves et al., 2015). En el riñón si bien la demanda energética es predominantemente sostenida por la β -oxidación de ácidos grasos de cadena media (Lehir & Dubach, 1982), existe una preferencia de cada segmento de la nefrona por ciertos sustratos. En el caso del PT (con una alta densidad mitocondrial), existe una preferencia por los ácidos grasos (Harris et al., 1981) y por los cuerpos cetónicos (acetoacetato y β -hidroxibutirato), seguidos por el ácido láctico y los intermediarios del ciclo del ácido cítrico (Guder, Wagner, & Wirthensohn, 1986), siendo el aporte glucolítico casi inexistente a la producción de ATP en los segmentos S1 a S3 (Sekine & Endou, 2013).

Por otro lado, el TDL posee una densidad mitocondrial pobre y un aporte del metabolismo oxidativo limitado, siendo los sustratos preferidos el piruvato y la glucosa, y en menor medida el β -hidroxibutirato, la glutamina y el lactato (Sekine & Endou, 2013). Al contrario, en la parte ascendente del asa de Henle, el alto consumo de oxígeno genera un enriquecimiento mitocondrial

en dicho segmento, el cual oxida ácidos grasos, cuerpos cetónicos, glucosa, lactato, glutamato y glutamina pero no malato, succinato o citrato (Klein et al., 1981). Mientras que en la parte medular la glucólisis anaerobia toma una contribución mayor (Sekine & Endou, 2013).

El caso del DT es particular, si bien se sabe que posee una baja densidad mitocondrial fuera de la parte recta, la información del uso de sustratos es limitada, aunque los estudios realizados por Klein et al. (1981) sugieren que podría haber una buena contribución tanto del metabolismo oxidativo como de la vía glucolítica. Finalmente en el caso de los conductos colectores, los experimentos de privación de sustratos revelan que estos son capaces de mantener el contenido de ATP intracelular incluso después de 30 minutos de privación (Affairs & Orleans, 1998), sugiriendo que posee reservas endógenas de sustratos.

Como ya vimos, las demandas metabólicas difieren entre segmentos de la nefrona, sin embargo se sabe relativamente poco de la variación en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en los mismos. Los estudios recientes se han centrado en el uso de métodos de microscopía confocal de excitación multifotónica, la cual utilizando fluoróforos endógenos y exógenos en experimentos *in vivo* en roedores anestesiados (Hall et al., 2014). En estos experimentos se demostró que el $\Delta\Psi_m$ es marcadamente superior en los PT en comparación con los DT. Además, los ensayos de isquemia e inhibición con rotenona revelaron que al impedirse la respiración, rápidamente colapsa el potencial de membrana mitocondrial en los PT, no así en el DT (Hall et al., 2009). Estos resultados concuerdan con la mayor producción de ROS y la predominancia del metabolismo aerobio en el PT con respecto al DT.

1.3. La enfermedad renal crónica

Tradicionalmente el término de enfermedad renal crónica (CKD, por sus siglas en inglés) se ha utilizado para englobar una serie de trastornos que afectan a la estructura y la función renal (Levey & Coresh, 2012). Estos son resultado de una variedad de daños agudos y/o continuos que conducen a la pérdida inicial de nefronas y a una hiperfiltración glomerular adaptativa posterior, generando así daños a largo plazo, los cuales llevan a la pérdida progresiva de más nefronas y de la función renal. Durante las últimas décadas se han generado una amplia gama de diferentes definiciones, las cuales fueron unificadas por la iniciativa de la calidad en los resultados de las enfermedades renales (KDOQI, del inglés Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) de la fundación nacional del riñón americana. Ésta toma como principal parámetro de referencia a la tasa de filtración glomerular (GFR) (Shafi & Coresh, 2010) y establece a la CKD como: una GFR en humanos menor a 60 ml/ min/ 1.73 m² por más de 3 meses, que implica anomalías funcionales y estructurales en el riñón y que puede o no manifestarse por incremento en los marcadores de daño renal. La naturaleza progresiva de la enfermedad llevó a la KDOQI a clasificarla en 5 estadios tomando como parámetro la caída en la GFR, donde menos de 15 ml / min/ 1.73 m² se considera como estadio 5 o enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), punto en el que el paciente precisa de diálisis o trasplante para sobrevivir.

Si bien alteraciones genéticas (nucleares y mitocondriales) se han relacionado con la predisposición a desarrollar CKD (Jha et al., 2013), los estudios realizados en poblaciones

americanas han identificado a la hipertensión sistémica, la diabetes mellitus, la hiperlipidemia, la proteinuria, la obesidad, el tabaquismo y el uso indiscriminado de medicamentos como los principales factores de riesgo en la población (El Nahas & Aminu, 2005), (Shafi & Coresh, 2010) & (Morlans et al., 1990). Por otro lado, en países subdesarrollados las enfermedades infecciosas como la provocada por el virus de la hepatitis C, la malaria, la esquistosomiasis y la tuberculosis, siguen siendo un factor de riesgo importante para el desarrollo de falla renal (Hsu, 2012).

Panorama mundial y la CKD en México.

A nivel mundial, durante las últimas décadas el aumento en el número de pacientes con enfermedad renal crónica y por consiguiente con ESRD ha alcanzado proporciones epidémicas. De acuerdo con el “Global Burden of Disease study” realizado por la Organización Mundial de la Salud, la CKD pasó del lugar 27 en la lista de causas de muerte a nivel mundial en 1990 al lugar 18 en el año 2010 (Akinlolu, 2014). La incidencia y prevalencia de la CKD varía sustancialmente entre los países y regiones (El Nahas & Aminu, 2005). Además, se calcula que de entre los pacientes que reciben tratamiento para la ESRD, el 80% se encuentra en países desarrollados (Jha et al., 2013), dejando a los países en vías de desarrollo con una gran cantidad de pacientes sin tratamiento. En términos globales la incidencia más alta se encuentra en Taiwán con cerca de 418 casos por millón de habitantes, seguido por los Estados Unidos y la zona de Jalisco en México (Shafi & Coresh, 2010). Por otro lado, la mayor prevalencia también se encuentra en Taiwán, seguido de Japón y Estados Unidos, encontrándose la zona de Jalisco en el lugar 12 en el ranking mundial (Shafi & Coresh, 2010).

Los costos de la enfermedad son altos, debido a que los pacientes con CKD a menudo también presentan otras complicaciones como hipertensión, obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y accidentes cerebrovasculares (El Nahas & Aminu, 2005). Shafi & Coresh (2010) calcularon que en pacientes en el sistema estadounidense, los costos totales aumentan de un inicial de \$ 6701 al mes a más de \$ 14461 al inicio de la diálisis, limitando así el acceso al tratamiento a pacientes que no pueden costearlo.

Por su parte, México presentó el mayor incremento en el número de pacientes por millón de habitantes de América Latina en el periodo 2005- 2014 (Gallardo Vidal et al., 2015). De entre las principales causas probables en la población mexicana, se identificaron a la diabetes (52.6% de los casos) y la hipertensión arterial (35.2%), observándose la mayor prevalencia en el estado de Jalisco, seguido del Estado de México y el Distrito Federal (Méndez-Durán et al., 2014). Además, las tasas de mortalidad son alarmantes, ya que ésta enfermedad ocupa la octava causa de defunción en varones y la sexta en mujeres de entre 20 a 59 años (Méndez-Durán et al., 2010). Aunque las cifras podrían ser mayores, ya que se calcula que solo el 25% de los pacientes que requieren terapia de reemplazo renal pueden tener acceso a ella (Amato et al., 2005). En conjunto, la situación de la CKD en México, se esboza como un panorama alarmante y creciente que plantea un problema de salud por la gran cantidad de recursos económicos, de infraestructura y humanos necesarios para la atención y prevención de la mortalidad, por lo que el desarrollo de

tratamientos y estrategias que permitan prevenir o retrasar la pérdida de la función renal en la CKD toma un alta relevancia.

2. Antecedentes

2.1. Modelos de reducción de la masa renal en el estudio de la CKD y la nefrectomía 5/6.

En estudios *in vivo* se demostró que la reducción quirúrgica de grandes fragmentos de riñón (como el de nefrectomía 5/6 (Nx5/6)) generan cambios adaptativos, funcionales, hipertrofia e hiperfunción renal, los cuales llevan a una lesión mayor y producen un círculo vicioso de deterioro progresivo, el cual emula la CKD vista en la clínica (Lote, 2014). De acuerdo a la teoría unificada formulada por Taal & Brenner (2014), la pérdida progresiva de la función renal es lineal con respecto al tiempo y su naturaleza progresiva es atribuible más a un conjunto común de mecanismos que a la causa principal de la nefropatía. Por tal motivo, el modelo de riñón remanente inducido por nefrectomía 5/6 es un técnica ampliamente utilizada para estudiar la progresión de la CKD (Tapia et al., 2013). Este procedimiento consiste en la extirpación quirúrgica de un riñón acompañado de la ligazón de algunas de las arteriolas aferentes del restante, de tal modo que sólo un 1/6 de la masa renal queda funcional.

Este modelo lleva cambios adaptativos, como los relacionados a la hemodinámica glomerular, que aparecen casi de manera instantánea después de la cirugía. Se observa un aumento progresivo en la presión hidrostática y en la filtración glomerular por nefrona (snGFR), teniendo este un máximo entre la 1ª y la 4ª semana posteriores a la ablación, el cual es proporcional al número de nefronas perdidas (Taal & Brenner, 2014) & (Tapia et al., 2013). Además, como resultado de estos cambios, la actuación de factores vaso activos y factores tróficos, la nefrona sufre un reajuste de la retroalimentación túbulo-glomerular que lleva al desarrollo de un hipermetabolismo.

Por otro lado el alargamiento de las nefronas restantes (hipertrofia), llega a un máximo entre el 1º y 3º mes (Taal & Brenner, 2014). Este periodo de crecimiento es precedido por cambios tempranos como el aumento en la síntesis de DNA, RNA mensajero, RNA ribosomal y síntesis de los componentes lipídicos de la membrana, así como la supresión de los genes apoptóticos y aumentos transitorios en los niveles del factor de crecimiento insulínico tipo 1, el factor de crecimiento endotelial vascular, el factor de crecimiento epidérmico y la hormona de crecimiento (Sinuani et al., 2006); (Hauser et al., 2005); (Schwartz et al., 1993) & (Wolf & Ziyadeh, 1999). En el caso del PT, el crecimiento de la membrana basolateral va de la mano con un aumento en la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa y por tanto de los niveles la tasa de reabsorción de diversos solutos (particularmente notorio en las primeras 24 horas), conduciendo así a un aumento en el consumo de energía por nefrona a medida que la función renal va disminuyendo (Hayslett et al., 1968) & (Tabei et al., 1983). Debido a esto, no es de extrañar que los estudios por microscopia electrónica en conejos nefrectomizados reporten un aumento en el volumen mitocondrial (Norman et al., 1990), el cual se considera resultado del estado hipermetabólico generado por el incremento en la reabsorción de solutos y el crecimiento celular. Dicha explicación es conocida como hipótesis de la sobrecarga de solutos (Taal & Brenner, 2014) y plantea que la mitocondria debe sufrir cambios adaptativos debidos al estrés energético; sin embargo, esta hipótesis ha sido poco explorada en el modelo de Nx5/6.

2.2. La disfunción mitocondrial, estrés oxidante y su papel en la nefropatía.

El estrés oxidante es definido como un desbalance entre las ROS y los sistemas antioxidantes endógenos enzimáticos y/o no enzimáticos, a favor de los primeros (Gonzalez-Flecha, Cutrin, & Boveris, 1993). Ya que la mitocondria es considerada como una de las principales fuentes endógenas de producción de ROS en la célula, su función tiende a estudiarse cuando se habla de estrés oxidante en el riñón.

En condiciones normales (no patológicas) solo del 2-4% del oxígeno utilizado por la mitocondria genera superóxido principalmente por la actividad de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones (ETC), aunque también otras enzimas como las deshidrogenasas mitocondriales y el complejo II son una fuente importante del mismo (Gvozdjákoá, 2008). Por otro lado, la mitocondria es capaz de producir NO a través de la sintasa de óxido nítrico mitocondrial sensible a Ca^{2+} , el cual juega un papel importante en la producción de superóxido por la ETC, ya que es capaz de reaccionar con los grupos hemo, causando así la caída en el consumo de oxígeno (Gvozdjákoá, 2008). Para combatir la producción de ROS, la mitocondria cuenta con sistemas antioxidantes endógenos: la concentración de superóxido se mantiene lo más baja posible por medio de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD2), mientras que los peróxidos mitocondriales se eliminan por medio de peroxidases como la GPx y las peroxirredoxinas. Además algunas coenzimas y metabolitos como la ubiquinona, el ácido lipoico, el GSH y la vitamina E pueden servir como antioxidantes de bajo peso molecular (LMWA) (Schaffer, 2007).

Por otro lado, debido a que la función renal es altamente dependiente de la producción energética mitocondrial, se cree que las patologías mitocondriales en el riñón juegan un papel importante en el desarrollo de diversas enfermedades (Trujillo et al., 2014). En el caso de la CKD, los estudios realizados por Granata et al. (2009) demostraron altos niveles de estrés oxidante y desregulación de la maquinaria respiratoria en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con CKD. Clínicamente dentro de los segmentos tubulares, el PT parece particularmente más vulnerable al daño mitocondria, tendencia compartida por varios modelos *in vivo* de daño agudo como isquemia/ reperfusión, daño por cisplatino y por maleato, que muestran una mayor fragmentación mitocondrial en el PT con respecto a los demás segmentos (Hall et al., 2009). Así mismo en condiciones basales, los resultados obtenidos por Hall et al. (2014), al evaluar la producción superóxido mitocondrial en la corteza renal, revelaron una producción notablemente mayor en el PT en comparación con el DT.

Por su parte, en el caso del glomérulo se han descrito mitocondrias anormales en ratones tratados con aldosterona, así como disminución en el $\Delta\Psi_m$, la producción de ATP y elevadas concentraciones de ROS, que pueden ser abolidas por la administración de rotenona (inhibidor del Complejo I) (Zhu et al., 2011). Por otro lado, aunque numerosos estudios sostienen que la disfunción mitocondrial contribuye a la aparición y progresión de diferentes tipos de enfermedades renales tanto crónicas como agudas, solo unos pocos han trascendido a la relevancia clínica (Che et al. 2014).

2.2.1. Estrés oxidante en modelos de reducción de la masa renal.

En estados avanzados de la CKD, el modelo de Nx5/6 se caracteriza por una disminución en la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes SOD dependiente de cobre y zinc (Cu/Zn-SOD), Mn-SOD, glutatión peroxidasa (GPx) 2, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx), tioredoxina reductasa, glutatión S transferasa (GST), NADPH quinona oxidoreductasa, hemo oxigenasa-1, catalasa (CAT) y peroxirredoxina, así como el aumento en la producción de ROS y los marcadores de estrés oxidante (Kim & Vaziri, 2010), (Edilia Tapia et al., 2013), (Edilia Tapia et al., 2012) (Ghosh et al., 2009) & (Kim & Vaziri, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que en ratas nefrectomizadas entre los 15 a 30 días hay una reducción en la cantidad nuclear del factor Nrf2 (factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2), que se encarga de regular el estado redox celular mediante la inducción estimulada de los genes antioxidantes (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014), así como un aumento en la concentración de su represor la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1) en el citoplasma, los cuales correlacionan con la progresión del deterioro funcional renal (Kim & Vaziri, 2010) & (Edilia Tapia et al., 2012).

Se sabe que el aumento del estrés oxidante causa condiciones que favorecen el desarrollo de la CKD, en especial, los altos niveles de producción del anión superóxido conducen al avance de la hipertensión sistémica (Taal & Brenner, 2014). Así mismo, las ROS desencadenan procesos de inflamación por la activación de factores como NF- κ B y TNF- α (Ghosh et al., 2009) y la generación de patrones moleculares asociados al daño, que desencadenan procesos de fibrosis, los cuales aumentan el daño en la nefrona (Taal & Brenner, 2014). La importancia de las ROS en la progresión de la CKD, se resalta en los experimentos en los cuales la terapia con antioxidantes como la melatonina, la niacina, el ácido retinoico, ácidos grasos omega-3 y la curcumina, no sólo previenen el aumento en el estrés oxidante, sino también los cambios en la GFR, el aumento en la presión arterial sistémica, la hipertrofia, la fibrosis glomerular, la caída en la reabsorción renal de sodio atenuando la progresión de la CKD (An, Kim, Cho, & Vaziri, 2009); (Taal & Brenner, 2014); (Tapia et al., 2013) & (Tapia et al., 2012).

2.2.2. Un sistema Nox-mitocondria.

Las NADPH oxidasas (Nox(s)) son una familia de enzimas que representan una de las principales fuentes de generación de ROS en los sistemas biológicos, las cuales catalizan la transferencia de los electrones del NADPH al oxígeno para la formación del anión superóxido. Actualmente se conocen 7 homólogos de la Nox presentes en humanos: Nox1 a Nox5 y Duox1 a Duox2 (Brandes, Weissmann, & Schröder, 2014). En todos los casos, las subunidades catalíticas están presentes de manera basal, unidas a membrana, generalmente inactivas y requieren de la interacción con otras subunidades para su activación (Sedeek et al., 2013).

El riñón tiene una amplia distribución de las diversas subunidades e isoformas de la Nox, siendo la Nox4 la isoforma predominante. Esta se distribuye desde la vasculatura, el glomérulo, el aparato yuxtaglomerular, las células mesangiales y la mayor parte de los segmentos tubulares de la nefrona (Gill & Wilcox, 2006).

La producción de ROS provenientes de la Nox se ha implicado en la regulación de varios de los procesos fisiológicos del riñón como la retroalimentación túbulo-glomerular, ya que la producción del anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) por parte de la Nox en la mácula densa aumenta la retroalimentación túbulo-glomerular, directamente por la constricción de la arteriola aferente e indirectamente por la disminución del óxido nítrico (Sedeek et al., 2013). Además, estudios realizados en segmentos tubulares aislados demostraron que el $O_2^{\bullet -}$ producido por la Nox, interactúa con altas concentraciones de NO^{\bullet} en el TAL para formar $ONOO^-$, que inactiva a la $Na^+/K^+ATPasa$ (Gill & Wilcox, 2006), por lo que la NOX juega un papel de alta importancia en la regulación del transporte activo. Aunado a esto, diversos estudios han implicado a las distintas isoformas de la Nox en la génesis y desarrollo de la hipertensión. Watanabe et al. (2013) reportaron que las ROS derivadas de la Nox4 son mediadores del daño tubular, aumentando la expresión de citocinas proinflamatoria y factores profibróticos, en modelos de CKD. Por otro lado, Wang et al. (2015) encontraron que la delección de p47 phox (subunidad activadora de la Nox) protege a los ratones del aumento en la albuminuria y glomerulosclerosis en los modelos de daño por adriamicina y ablación renal. Así mismo, se ha sugerido que la angiotensina II es capaz de activar a la Nox, lo que contribuiría al desarrollo de la hipertensión sistémica (Garrido & Griendling, 2009), aunque el mecanismo de activación es complejo y aún no se entiende completamente.

Por otro lado, estudios realizados en células endoteliales humanas han demostrado que la activación de la Nox4 induce alteraciones en la morfología, el potencial de membrana y la producción de H_2O_2 mitocondriales, así como la inhibición específica del complejo I de la ETC (Kozielec et al., 2013). Esto llama la atención, puesto que la Nox4 se identificó como una proteína capaz de unirse a la membrana mitocondrial (Block, Gorin, & Abboud, 2009). Además, las ROS mitocondriales son capaces de activar a la proteína cinasa c (PKC) (Sedeek et al., 2013), que a su vez fosforila a p47phox, produciendo el aumento en la producción de superóxido por la Nox. Esto podría ligar a dos de las principales fuentes de especies reactivas en las nefropatías, en los modelos de progresión de la CKD como la Nx5/6.

2.3. La curcumina y su papel en la atenuación del daño renal.

La curcumina (diferuloilmetano) es el principal compuesto activo de la planta asiática *Curcuma longa*, la cual se ha usado ampliamente por diferentes culturas en diversos productos como en el curri, las mostazas, como colorante, agente aromatizante y en la medicina tradicional. El uso de curcumina es reconocido como seguro por la administración de alimentos y drogas (FDA) tanto en animales como en seres humanos (Tokaç et al., 2013).

La curcumina es un antioxidante bifuncional, cuya capacidad antioxidante directa es definida por su propiedad de reaccionar directamente con distintas ROS, mientras que su capacidad antioxidante indirecta se basa en su habilidad de inducir una sobre regulación de diversas enzimas antioxidantes y citoprotectoras vía el Nrf2 (Trujillo et al., 2013) & (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014).

En los últimos años se ha encontrado que la curcumina es capaz de ejercer efectos renoprotectores en diversos modelos experimentales de daño renal, tales como: la nefropatía diabética, la isquemia y reperfusión, el daño renal crónico por metales pesados y la nefrotoxicidad inducida por compuestos como gentamicina, adriamicina, cloroquina, nitrilotriacetato de hierro,

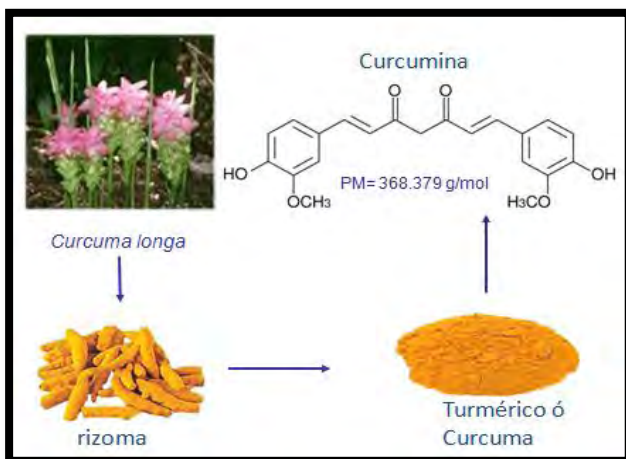


Figura 1. La *Curcuma longa*, es una planta de origen asiático de cuyas raíces se obtiene la especie conocida como Cúrcuma o Turmérico, esta es rica en una serie compuestos fenólicos antioxidantes conocidos como curcuminoides, de entre los cuales la curcumina demostró ser el más abundante (ver anexo 12.1).

fluoruro de sodio, cromo hexavalente y cisplatino (Trujillo et al., 2013). Dichas propiedades citoprotectoras se han asociadas a la preservación del balance redox celular y mitocondrial por su actividad como antioxidante bifuncional.

En el modelo de Nx5/6 se ha encontrado que la administración de curcumina en una dosis de 75 mg/kg/día por 8 días es capaz de disminuir los altos niveles de TNF α y reducir la activación NF- κ B, previniendo la inflamación (Ghosh et al., 2009). Además, en estudios recientes se demostró que la administración de curcumina en una dosis de 60 mg/kg por 37 días (7 días antes de la intervención quirúrgica y 30 días después de esta) atenúa de manera significativa el aumento en la proteinuria, la hipertensión sistémica,

la hiperfiltración, así como la esclerosis glomerular, la fibrosis intersticial, la inflamación intersticial, el aumento de la creatinina en plasma y el nitrógeno de ureico en sangre (BUN) generados por la Nx5/6 (Edilia Tapia et al., 2012). En ambos casos, dichos efectos están relacionados a la atenuación del estrés oxidante y al mejoramiento en la cantidad y actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GR, GST y SOD. Continuando con esta línea de investigación Tapia et al. (2013) demostraron que un postratamiento con curcumina de 120 mg/kg/día durante 30 días (del día 31 al 60 después de la cirugía), puede revertir la hipertensión glomerular y la hiperfiltración en ratas con Nx5/6. Lo que sugiere que la curcumina podría ser un agente terapéutico eficaz en la CKD, consiguiendo no sólo proteger contra el aumento del estrés oxidante, sino también atenuar los cambios en la hemodinámica e hipertrofia (Trujillo et al., 2013).

2.3.1. La curcumina y su papel en la protección de la función mitocondrial.

Se ha establecido que algunos antioxidantes y sus derivados son capaces de inducir protección y regulación sobre las mitocondrias (Natarajan & Parinandi, 2014). Sin embargo, el análisis de la acción de la curcumina como antioxidante directo está limitado por su baja biodisponibilidad, lo que dificultan su cuantificación en los tejidos (Anand & Kunnumakkara, 2007) y más aún en la mitocondria. Sin embargo, el desarrollo de curcuminoides selectivamente dirigidos a las mitocondrias permitió comprobar que los mismos tienen efectos reguladores sobre las

mitocondrias, ya que inducen la producción de ROS mitocondriales, una caída en el potencial de membrana mitocondrial, el arresto del ciclo celular y la apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama (Reddy et al., 2014).

Por otro lado, se sabe que el factor Nrf2, cuya activación es inducida por la curcumina, regula transcripcionalmente a la subunidad catalítica de la γ -glutamilcisteina ligasa (Natarajan & Parinandi, 2014), que es crucial para la síntesis *de novo* de GSH, el cual juega un papel clave en la regulación del balance redox mitocondrial. Igualmente, se ha encontrado que la curcumina aumenta indirectamente la expresión hepática de los genes de biogénesis mitocondrial en ratones obesos, al restaurar los niveles del factor nuclear respiratorio 1 y el factor A de transcripción mitocondrial, preservando así la actividad del complejo I y la producción de ATP (Kuo, Chang, Tsai, & Lee, 2012). Además en ratones alimentados con una dieta alta en ácidos grasos, la curcumina es capaz de disminuir los niveles mitocondriales del marcador de lipooxidación MDA (He et al., 2012).

Dentro de los modelos de daño renal, en el caso del inducido por dicromato de potasio, la curcumina como pretratamiento es capaz de prevenir la caída en el índice de control respiratorio (CR), las alteraciones en la retención de calcio, la caída en el potencial de membrana mitocondrial, la disminución en la actividad de la aconitasa, la disminución en la actividad de los complejos I a III de la ETC y en la actividad de la ATPsintasa (Molina-Jijón et al., 2011). Así mismo dentro del modelo de nefropatía inducida por maleato, la curcumina previno la caída en el CR, la disminución en la actividad del complejo I, así como el aumento del estrés oxidante (Tapia et al., 2014). Finalmente en el modelo de Nx5/6, Correa et al. (2013) demostraron que la curcumina en una dosis de 120 mg/kg/día tiene efectos cardioprotectores, relacionados con el mantenimiento de la función mitocondrial en corazón, preservando la actividad de la aconitasa y evitando la caída en el CR y el potencial de membrana. En conjunto todo esto nos sugiere que la curcumina es capaz de inducir protección sobre las mitocondrias en diversas nefropatías.

3. Justificación.

De acuerdo con la hipótesis de la sobrecarga, en el modelo de Nx5/6, el aumento en el consumo de ATP y la sobre activación del metabolismo, desencadenaría un estrés en las fuentes de producción de energía como la mitocondria, especialmente en el PT (Benipal & Lash, 2013). Este último, junto con el aumento del estrés oxidante (Vaziri et al., 2007) & (Benipal & Lash, 2011) podría dar lugar a la disfunción mitocondrial.

Recientemente, los estudios de proteómica realizados por Fedorova et al. (2013) (28 días después de la cirugía) en la corteza renal de ratas con Nx-5/6, revelaron una disminución de cerca del 50% en algunas proteínas mitocondriales. Sin embargo, proteínas relacionadas con la autofagia como LC3-II no mostraron cambios, esto sugiere que la acumulación de mitocondrias dañadas después de la Nx5/6 podría ser la causante del aumento en la producción de las ROS y por tanto contribuir a la progresión de la CKD. Además, se ha visto que la nefrectomía induce el desacoplamiento mitocondrial en otros órganos como el corazón (Correa et al., 2013) y el músculo esquelético (Barazzoni et al., 2010); (Yazdi et al., 2013) & (Tamaki et al., 2014). Si consideramos entonces, que las alteraciones en el transporte activo renal y la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa se hacen presentes desde tiempos cortos (24 horas) (Taal & Brenner, 2014), los intervalos de tiempo en los que la mitocondria responde a dichos cambios, deben estar dentro de los mismos periodos. Sin embargo la mayoría de los estudios se han centrado en intervalos de tiempo demasiado largos (28 a 60 días) (Tapia et al. 2012 & 2013). Por ello se requiere explorar intervalos de tiempos más cortos, los cuales nos permitan elucidar si existe disfunción mitocondrial y si esta se encuentra relacionada a la progreso de la CKD.

Por otro lado, Tapia et al. (2012, 2013) demostraron que la curcumina es capaz de revertir alteraciones hemodinámicas, glomerulares y del estrés oxidante en el modelo de Nx5/6. Además, se ha demostrado que la curcumina es efectiva para prevenir la disfunción mitocondrial en diversos modelos de nefropatía (Molina-Jijón et al., 2011); (Correa et al., 2013); (Tapia et al., 2014) & (Trujillo et al., 2014). Por lo que la curcumina, podría tener un papel protector en el daño por nefrectomía 5/6, relacionado con el mantenimiento de la función mitocondrial. Sin embargo, los efectos de la curcumina sobre la dinámica, bioenergética y la producción de ROS mitocondrial en las etapas iniciales de la Nx5/6 no han sido explorados todavía.

4. Hipótesis

A las 24 horas posteriores a la Nx5/6 se observarán alteraciones en los parámetros mitocondriales acompañados del aumento del estrés oxidante y disfunción renal, las cuales se atenuarán por la administración de curcumina.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar si existen alteraciones sobre la función mitocondrial de la masa renal remanente en el modelo de insuficiencia renal crónica experimental con Nx5/6 a las 24 horas de estudio y el efecto de la curcumina sobre dichas alteraciones.

5.2. Objetivos particulares

- Determinar si a las 24 horas después de la Nx5/6 aumenta el estrés oxidante y si este se asocia a la disfunción mitocondrial.
- Determinar si a las 24 horas después de la Nx5/6 hay alteraciones en la función renal y si se asocian al aumento del estrés oxidante.
- Evaluar si el pretratamiento con curcumina (60 mg/kg por 7 días) es capaz de prevenir las alteraciones inducidas por la Nx5/6.

6. Metodología.

6.1. Reactivos.

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.): adenosina 5'-difosfato de sodio (ADP), Amplex-red, antimicina A, L-arginina, carbonilo cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP), colagenasa de *Clostridium histolyticum* (tipo II), curcumina, citocromo c de corazón equino, D-glucosa, cloruro de difeniliodonio (DPI), dihidroetidio (DHE), D-manitol, decilubiquinona (DUB), la sal de sodio de hidrato de 2,6-diclorofenol (DCPIP), albumina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA), glutatión (GSH), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST), ácido glutámico, hexocinasa, peroxidasa de rábano (HRP), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico (HEPES), cloruro de manganeso tetrahidratado, ácido málico, monochlorobimano (MCB), nitroazul de tetrazolio (NBT), sal de potasio de nicotinamida dinucleótido fosfato oxidado y reducido (NADPH y NADP⁺), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), Percoll®, cianuro de potasio (KCN), rotenona, safranina O, ADN de testículo de salmón, succinato dibásico de sodio, fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄), fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄), glutamato de sodio, malato de sodio, dodecilsulfato de sodio (SDS), sacarosa, xantina y xantina oxidasa. El cloruro de calcio (CaCl₂) y la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) dihidratada se obtuvieron de JT Baker México (Edo. México, México). Los anticuerpos contra el tranlocador de nucleótidos de adenina (ANT), cóctel de anticuerpos OXPPOS, malondialdehído (MDA) y p47phox fosfo-serina 304/ NCF1 fueron adquiridos de Abcam (Cambridge, MA, EE.UU.). Mientras que los anticuerpos contra la proteína 1 relacionada con la dinamina (Drp1), proteína 1 de fisión mitocondrial (Fis1), la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), mitofusina 1 (Mfn1) y el canal anionico dependiente del voltaje (VDAC) a fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). El cóctel de inhibidores de proteasas se adquirió de Roche Applied Science (Mannheim, Alemania). Finalmente el polifruetosán se adquirió de Fresenius Kabi-Austria GmbH (Graz, Austria) y el pentobarbital sódico (SedalphorteMR) se compró de Salud y Bienestar Animal S.A. (Ciudad de México, México).

6.2. Modelo experimental

Como modelo experimental se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de entre 250 a 300 g de peso, las cuales se alimentaron durante todo el protocolo con alimento estándar para roedores y tuvieron libre acceso al agua. El protocolo experimental fue aprobado por los Comités de Bioética e Investigación de la Facultad de Química (FQ / CICUAL / 096/15) y se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Para la realización del modelo in vivo las ratas se dividieron aleatoriamente en 3 grupos de 7 individuos cada uno:

1. Vehículo (sham o control). Las ratas recibieron una dosis diaria de carboximetilcelulosa (vehículo) al 0.05% por 7 días, vía oral por administración intragástrica, al término de la cual se realizó una cirugía simulada.

2. Nx5/6. Correspondiente a las ratas que se sometieron a la intervención quirúrgica de nefrectomía 5/6 sin pretratamiento.
3. Cur+Nx5/6. Las ratas recibieron un pretratamiento por 7 días y vía oral de curcumina a 60 mg/kg/día suspendida en carboximetilcelulosa al 0.05%, al término del cual se sometieron a la intervención quirúrgica de Nx5/6.

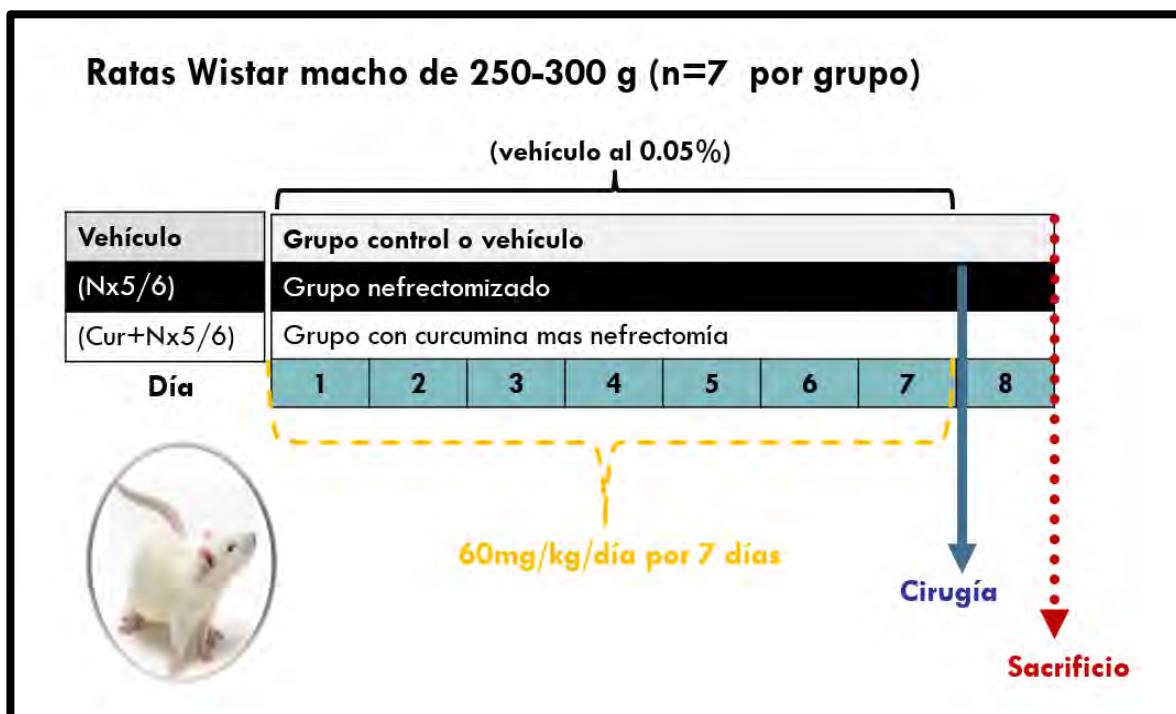


Figura 2. Modelo experimental *in vivo* resumido con los 3 grupos de trabajo utilizados.

6.2.1. Nefrectomía 5/6.

Para la realización de la cirugía, los animales se anestesiaron con una dosis única de 60 mg/kg de pentobarbital sódico, una vez determinada la ausencia de dolor por desaparición de reflejos en las extremidades, se procedió con la cirugía de Nx5/6. Este consistió en la ablación del riñón derecho y el infarto selectivo de aproximadamente 2/3 partes del riñón izquierdo por ligazón de las arterias renales.

Los grupos Nx5/6 y Cur-Nx5/6 se mantuvieron en un período de recuperación de 24 horas, finalizado el cual se procedió a sedar al animal con pentobarbital sódico (120 mg/Kg). Una vez verificado la ausencia del estímulo sensorial, se realizó la apertura de la cavidad abdominal y los riñones se extrajeron, para proceder de acuerdo a la prueba correspondiente. Para los análisis en plasma, se extrajo la mayor cantidad de sangre arterial posible, se centrifugó a 2,450 x g por 10 min, los plasmas se separaron y se guardaron a -40 °C para su uso posterior.

6.3. Función renal

6.3.1. Creatinina y BUN.

Como primeros marcadores de daño renal se determinó la creatinina en plasma y nitrógeno ureico en sangre (BUN) mediante el uso de estuches comerciales (Spinreact, Girona, España). El ensayo de la creatinina se basó en la reacción de la creatinina con el picrato en medio alcalino, la cual forma un complejo rojizo cuya intensidad puede ser seguida a 495 nm y es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. Por su parte la determinación de BUN se basó en la disminución de la absorbancia a 340 nm del NADH por acción coordinada de la glutamato deshidrogenasa y la ureasa, la cual es proporcional a la concentración de la urea total en la muestra¹.

6.3.2. Parámetros hemodinámicos y filtración glomerular.

Con el objetivo de determinar las alteraciones hemodinámicas en la masa renal remanente a las 24 horas posteriores a la cirugía, las ratas se anestesiaron vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (60 mg/kg) y se colocaron en una mesa homeotérmica (37°C). Una vez comprobada la ausencia de reflejos se cateterizaron la tráquea, ambas venas yugulares, ambas arterias femorales y la vejiga con catéteres de polietileno PE-240, PE-50 y PE-90, respectivamente. Para el mantenimiento del equilibrio de hidratación, las ratas se mantuvieron bajo una infusión de BSA isotónica (6 g/dL) durante la cirugía, seguida de una infusión fisiológica de solución salina isotónica (0.9%) a 2.2 ml/h.

La presión arterial media (MAP) se monitoreó por medio de un transductor de presión (Modelo MLT844, AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA) colocado en la arteria femoral y los datos se registraron por el sistema de adquisición de datos Power Lab (Advanced Instruments Inc., Needham Heights, MA, USA). El riñón izquierdo se expuso y se colocó en una capsula de lucita; para impedir la deshidratación de la superficie del mismo, se cubrió con un algodón empapado con solución salina. La medición del flujo sanguíneo renal (RBF) se realizó con una sonda de flujo ultrasónico de tiempo de tránsito de 2 mm (TS420, Transonic System, NY, NY, USA) colocada alrededor de la arteria renal izquierda, la cual se cubrió con gel de acoplamiento de ultrasonidos *Realizocon* para registrar. La resistencia vascular renal (RVR) se calculó por la fórmula $RVR = MAP/RBF$. Se tomó una muestra de sangre en microcapilares y se centrifugó en una centrifuga para micro hematocrito (MICRO-MB, Thermo IEC, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) y se leyó con un lector de microcapilares (Damon IEC Division, Needham Heights, MA, USA).

Para evaluar la tasa filtración glomerular (GFR) las ratas se infundieron con polifructosán al 5% en solución salina isotónica a una velocidad de 2.2 ml/h. Se dejó un período de 60 minutos para alcanzar el equilibrio y se obtuvieron muestras de plasma y orina, posteriormente, se recolectó la orina por un período de 30 minutos y se obtuvieron nuevamente muestras de plasma. El contenido de polifructosán se midió espectrofotométricamente a 450 nm en plasma y orina, para el cálculo de la GFR.

¹ Nota: Todas las determinaciones espectrofotométricas se realizaron utilizando un lector de microplacas Synergy-Biotek. (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

6.3.3. Estudios histológicos y microscopías electrónicas.

Los riñones se lavaron por perfusión con una solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) a pH 7.4, posteriormente se perfundieron y se sumergieron en una solución al 4% de glutaraldehído disuelto en cacodilato 1 mM, pH = 7.2. Se seleccionó la masa renal remanente y seccionó en pequeños fragmentos que se depositaron en tubos de vidrio, estos se fijaron por inmersión en la misma solución por 24 horas a 4°C. Los fragmentos de tejido se utilizaron para la tinción histológica de hematoxilina y eosina (H&E) y para microscopía electrónica, para lo cual se fijaron con un amortiguador de OsO₄ al 2%, se deshidrataron en soluciones de alcohol etílico graduales y se embebieron en resina *epon* (London Resin Company, London, Reino UK). Se colocaron secciones de 70 a 90 nm en rejillas de cobre y se contrastaron con sales de plomo y uranio para examinarse con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Espiritu (Hillsboro, Oregón, USA). Para la inmunomicroscopía electrónica, fragmentos pequeños de la corteza renal se fijaron durante 2 horas a 4 °C con paraformaldehído al 4% en tampón Sörensen, pH=7.4 y se embebieron en resina hidrosoluble LR-White. Se montaron secciones delgadas de 70 a 90 nm en rejillas de níquel y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo de conejo anti-Mfn1. Después de un lavado exhaustivo, se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas con IgG de cabra anti-conejo conjugado con partículas de oro 5 nm (diluido 1/20). Las rejillas se contrastaron con sales de uranio y se analizaron en el mismo microscopio electrónico.

6.3.4. Evaluación de la capacidad antioxidante total en tejido renal y plasma.

La evaluación de la capacidad antioxidante total correspondiente a antioxidantes de bajo peso molecular (CAT-LMWA) se realizó por voltamperometría cíclica (CV). En el caso del tejido, los riñones se perfundieron con PBS pH=7.2 y se homogenizaron 200 mg de muestra en amortiguador PBS. El homogeneizado se centrifugó a 10,000 g por 5 minutos y el sobrenadante se decantó y midió directamente. Todos los experimentos se realizaron utilizando una celda de tres electrodos, empleando un electrodo de trabajo de carbono vítreo de 0.3 cm de diámetro, un electrodo de Ag/AgCl (KCl saturado) como referencia (Bioanalytical Systems, USA) y un alambre de platino como contraelectrodo, a una velocidad de 100 mV/s. Un potencióstato/galvanostato Autolab PGSTAT-302-N se utilizó para todos los experimentos.

Los plasmas se midieron de manera directa y los resultados se verificaron por el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). En este método, el radical artificial 2,2'-azobis-(2-aminopropano)-dihidrocloruro (AAPH) oxida a la fluoresceína de forma que esta pierde su fluorescencia, de esta forma las sustancias antioxidantes presentes en el plasma disminuirían la pérdida de dicha fluorescencia. Veinticinco microlitros de cada muestra se mezclaron con 150 µl de solución de fluoresceína 40 nM y 25 µl de AAPH 153 mM. La señal de fluorescencia se midió a 485-535 nm en intervalos de 1 min por 90 min. Los valores de CAT se calcularon bajo comparación con una curva estándar de Trolox y se expresaron como µM de equivalentes Trolox (TE).

6.4. Estudios en los segmentos de la nefrona

6.4.1. Aislamiento de glomérulos, túbulos proximales y túbulos distales

El aislamiento de los segmentos de la nefrona se realizó por el método descrito por [Trujillo et al. \(2014\)](#). Los riñones se extrajeron, la masa renal remanente se disectó, lavó y picó sobre un caja petri enfriada con hielo, el homogeneizado resultante se pasó a través de un tamiz de acero inoxidable con un tamaño de poro de 117 micras (cat. no. 8321A44; Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) al aplicar una suave presión con el fondo de un matraz de vidrio. Posteriormente, el tamiz se enjuagó varias veces con amortiguador KBS (solución de Krebs-bicarbonato) frío: NaCl 110 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 1.2 mM, MgSO₄ 0.7 mM, KH₂PO₄ 2 mM, acetato de sodio 10 mM, glucosa 5.5 mM, alanina 5 mM, y 0.5 g/L de BSA, pH 7.4. El tejido restante en el tamiz está enriquecido en glomérulos, se recolectó en amortiguador KBS frío, se centrifugó durante 10 min a 20,000 x g, a continuación el sobrenadante se decantó y el botón correspondiente a la parte enriquecida en glomérulo se resuspendió en KBS a 4°C.

Por su parte los túbulos renales se aislaron por gradiente de Percoll. Los fragmentos de riñón se colocaron en 15 ml de KBS enfriado con hielo, se picaron y lavaron 3 veces para después resuspenderse en 10 ml de KBS, con 15 mg de colagenasa y 0.5 ml BSA al 10%. Las muestras se incubaron en un baño de agua durante 20 min a 37 °C para la digestión, a continuación la suspensión tisular se agitó suavemente para dispersar fragmentos de tejido y se filtró para eliminar las fibras de colágeno. Luego se centrifugó suavemente para remover la colagenasa, el botón se resuspendió en 10 ml de KBS frío, este procedimiento de lavado se repitió 3 veces. Finalmente el botón se resuspendió en 30 ml de una mezcla recién preparada de Percoll y KBS fría (1:1, v/v). La suspensión se centrifugó a 1,071 x g por 30 min, lo que resultó en la formación de 3 bandas, la segunda de las cuales está enriquecido con túbulos distales y la tercera con proximales. El contenido de cada fracción se confirmó por la observación microscopía de luz.

6.4.2. Producción de anión superóxido por Nox, Nos desacoplada y xantina oxidasa (XO).

La detección de la producción del anión O₂•⁻ se realizó por el método fluorescente para homogenizados de riñón descrito por [Satoh et al. \(2005\)](#). Dicha prueba utiliza la oxidación fluorogénica del dihidroetidio a etidio (Eth) como una medida indirecta de la producción de superóxido. Los aislados de glomérulos, PT y DT se homogeneizaron en 500 µl de PBS y los homogeneizados resultantes se sometieron a una centrifugación de 800 x g por 10 min a 4°C, para eliminar fragmentos de células parcialmente rotas. Las alícuotas resultantes se usaron inmediatamente para la realización de la medición.

Veinte microgramos por muestra se incubaron con DHE 0.02 mM, DNA de testículo de salmón 0.5 mg/mL y el sustrato correspondiente (NADH 1.125 mM para Nox, L-arginina 1.125 mM para Nos y xantina 1.125 mM para XO) y se llevaron a 200 µl con amortiguador RKB. Se llevó a cabo una repetición aparte con el inhibidor respectivo (DPI 1.125 mM para Nox, L-NAME 1 mM para Nos, alopurinol 1.125 mM para la XO). El ensayo se realizó a 37 °C durante 30 minutos, la fluorescencia

del Eth-DNA se midió a 480-610 nm y la intensidad de fluorescencia de cada muestra se normalizó con respecto a la cantidad de proteína total.

6.4.3. Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes.

Catalasa. La actividad de CAT se realizó por medio del método basado en el seguimiento de desaparición de H_2O_2 30mM por absorbancia a 240 nm al adicionar la muestra, como se muestra en la figura 3. Los datos se expresaron como la constante de primer orden (k) sobre los mg de proteína utilizados.

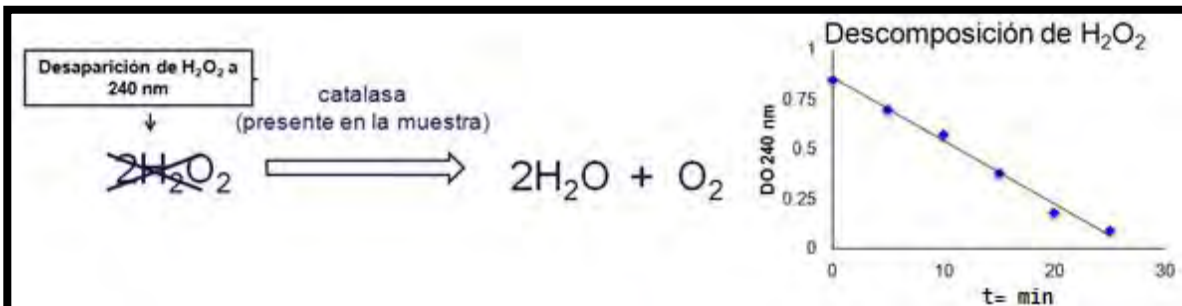


Figura 3. Esquema utilizado para determinar la actividad de la enzima catalasa en homogenados. Se considera la desaparición de la absorbancia (DO) a 240 nm al adicionar la muestra como una medida directa de la actividad de esta enzima.

Glutación Reductasa. La evaluación de actividad de la GR se realizó mediante la medición de la desaparición de NADPH a 340 nm usando GSSG como sustrato (ver figura 4). Para esto se preparó una mezcla de reacción con EDTA 1mM, NADPH 1mM y GSSG 1mM, en amortiguador de fosfatos 100mM pH=7.4. El ensayo se inició por la adición de la muestra a 313 μ L de mezcla reacción, con lecturas cada minuto durante 3 min. La unidad de GR se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 mol de NADPH/min, los datos se expresaron como U/mg de proteína utilizados.

Glutación peroxidasa. Su actividad se midió siguiendo la

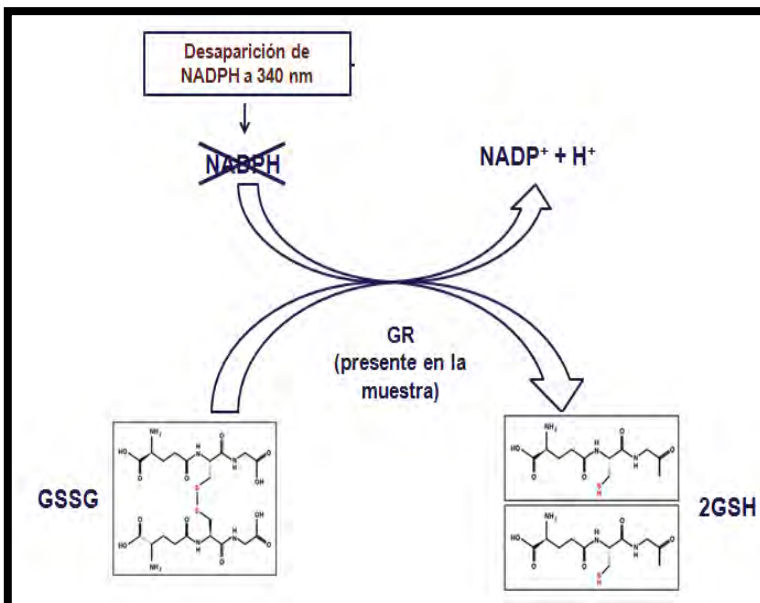


Figura 4. Esquema utilizado para determinar la actividad de la enzima glutación reductasa (GR) en homogenados. La GR utiliza el NADPH para reducir glutación-al glutación oxidado (GSSG) a GSH, por tanto la desaparición de la absorbancia a 340 nm del NADPH se considera como una medida de la actividad de la GR en la muestra.

desaparición del NADPH en una reacción acoplada a la GR como se muestra en la figura 7. Para esto se preparó una mezcla de reacción con EDTA 1mM, azida de sodio 1mM, GSH 1mM, NADPH 0.2mM y GR 1U/ml en PBS 50 mM. La muestra se adiciona a 300 μ L de mezcla de reacción y el ensayo se inició por la adición 30 μ L de una solución 1.25 mM de H_2O_2 . Las lecturas se realizaron cada 30 s por 3 minutos. Una unidad (U) de GPx se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 mol de NADPH en un minuto, los datos se expresaron como U/mg de proteína utilizados.

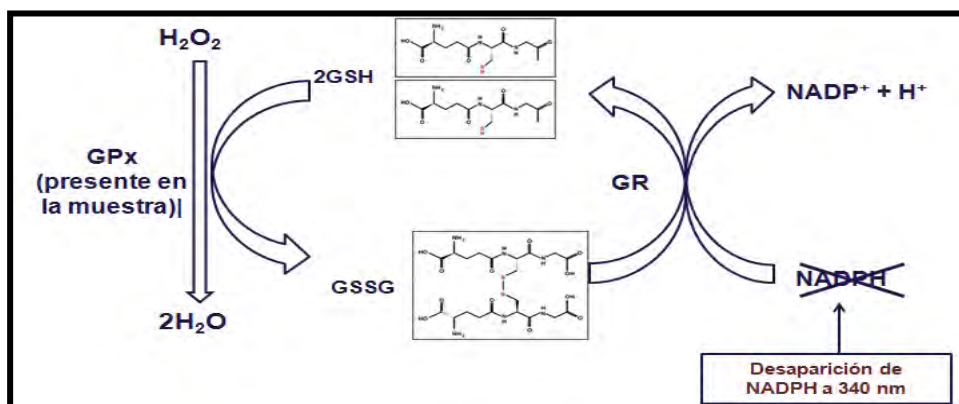


Figura 5. Esquema utilizado para determinar la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en homogenados. La GPx reduce al H_2O_2 al oxidar el glutatión (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), mientras que la glutatión reductasa (GR) en una reacción acoplada utiliza el NADPH para volver a reducir al GSSG a GSH, por lo que la desaparición de la absorbancia a 340 nm del NADPH se considera como una medida de la actividad de la GPx en la muestra.

Glutatión-S-transferasa. La actividad de la GST se determinó a partir del aumento en la absorbancia a 340 nm del aducto formado por el GSH y el 1-cloro-2,4 CDNB (ver figura 6). La reacción de inicio por adición de la muestra a 330 μ L de mezcla de reacción (GSH 5 mM, CDNB 1mM en PBS 50mM, pH= 7.2) y se realizaron lecturas cada minuto por 3 minutos. Se definió una unidad de GST (U) como la cantidad de enzima que conjuga 1 mol de CDNB con GSH en 1 minuto, los datos se expresaron como U/mg de proteína usados.

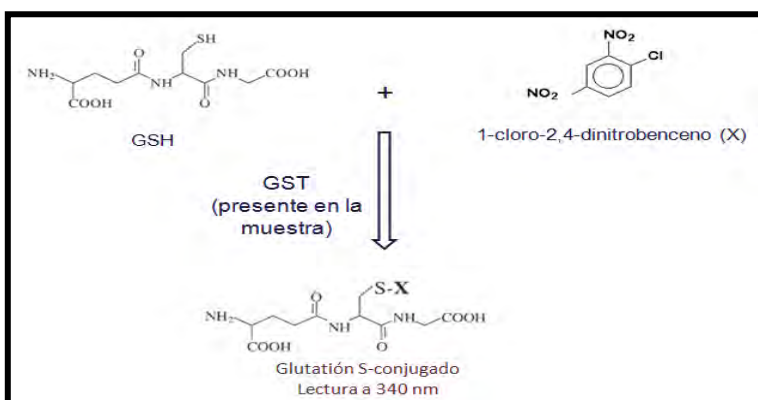


Figura 6. La glutatión S-transferasa (GST) cataliza la reacción de conjugación entre el GSH y el 1-cloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB), el aducto resultante absorbe a 340 nm, por lo que se considera el aumento de la absorbancia a esta λ como una medida de la actividad de la GST en la muestra.

Superóxido dismutasa. La actividad de la SOD se determinó espectrofotométricamente a 560 nm utilizando nitroazul de tetrazolio (NBT) como indicador (figura 7). Para esto se preparó una mezcla de reacción con 9 mL de xantina 0.3 mM, 4.5 mL de NBT 150 μ M, 4.5 mL de EDTA 0.6 mM y 2.25 mL de Na_2CO_3 400 mM. La muestras se adicionaron a 332 μ L de mezcla de reacción y la cinética se inició por adición de 30 μ L XO (5 mg/mL en NH_4SO_2 2M), se dejó incubar por 15 minutos, se adicionó 132 μ L de CuCl_2 para parar la reacción y se determinó la absorbancia a 560 nm, lo mismo se realizó con un control positivo sin muestra. Se definió una unidad de SOD (U) como la cantidad de enzima que evita la oxidación de 1 mol de NBT por minuto (en comparación del control positivo), los resultados se expresaron como U/mg proteína usados.

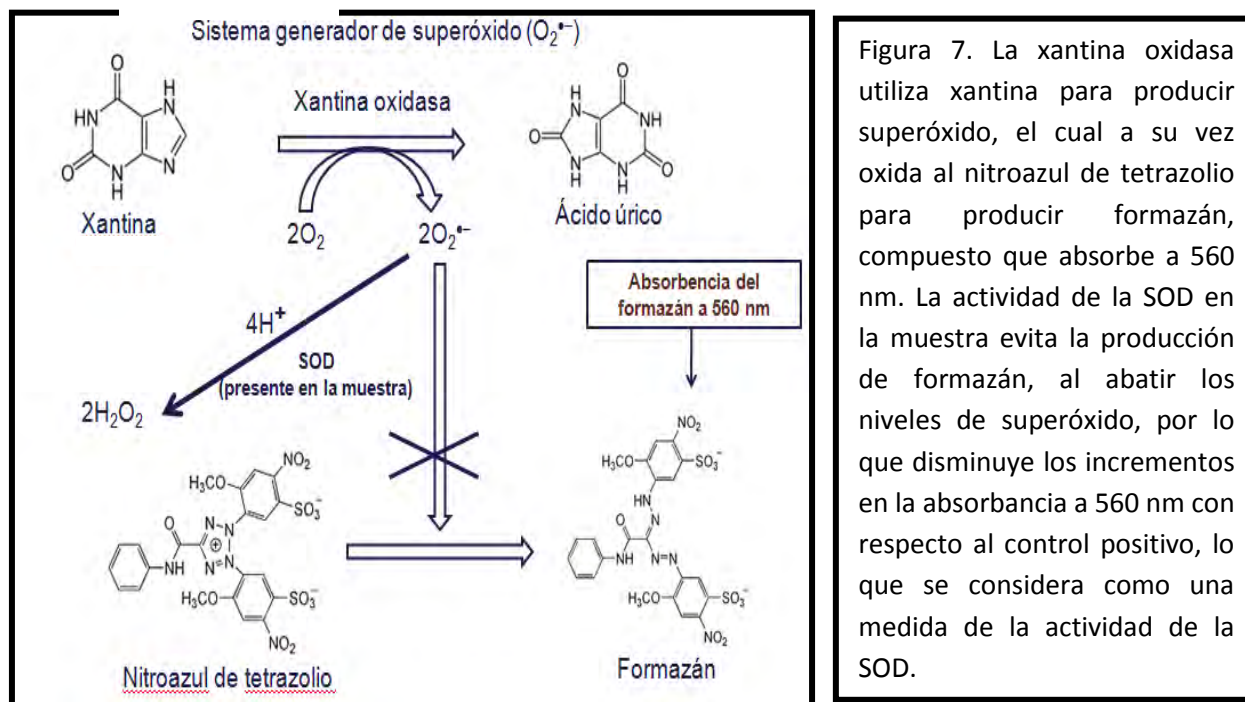


Figura 7. La xantina oxidasa utiliza xantina para producir superóxido, el cual a su vez oxida al nitroazul de tetrazolio para producir formazán, compuesto que absorbe a 560 nm. La actividad de la SOD en la muestra evita la producción de formazán, al abatir los niveles de superóxido, por lo que disminuye los incrementos en la absorbancia a 560 nm con respecto al control positivo, lo que se considera como una medida de la actividad de la SOD.

6.5. Estudios en mitocondrias aisladas

6.5.1. Aislamiento de mitocondrias.

La mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial con gradientes de Percoll, utilizando el método descrito por [Granados-Castro et al., \(2013\)](#). Para esto, primero se eliminó las cápsulas y la parte necrótica. La masa renal remanente se enfrió inmediatamente por inmersión en una solución de medio de aislamiento "A" (D-manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, EDTA 1 mM, HEPES 5 mM, BSA al 0,1%, pH = 7.4) a 4°C. El tejido se lavó para eliminar la sangre y se cortó en pequeñas piezas, las cuales se añadieron a 2 ml de medio de aislamiento "A" en un homogenizador y se homogeneizó por 4 stocks con un mortero de teflón. El homogeneizado se centrifugó durante 5 minutos a 2,500 x g a 4°C y el sobrenadante se volvió a centrifugar 10 minutos a 12,000 x g a 4°C. El botón (pellet) resultante se resuspendió en 12% de percoll con medio de aislamiento "A". Dicha solución se colocó cuidadosamente sobre una cama de 1.5 ml de percoll al 24% con el medio de aislamiento "A", generándose 2 fases, para después centrifugarse a 15,000 x g durante 15 min sin

freno. Finalmente la fracción enriquecida corresponde a la parte inferior del tubo, esta se resuspendió en medio de aislamiento sin BSA (medio "B") y se centrifugó de nuevo a 12,000 x g durante 5 min como lavado. El pellet resultante se resuspendió en 80 µl de medio de aislamiento B y la proteína se cuantificó por el método de Bradford.

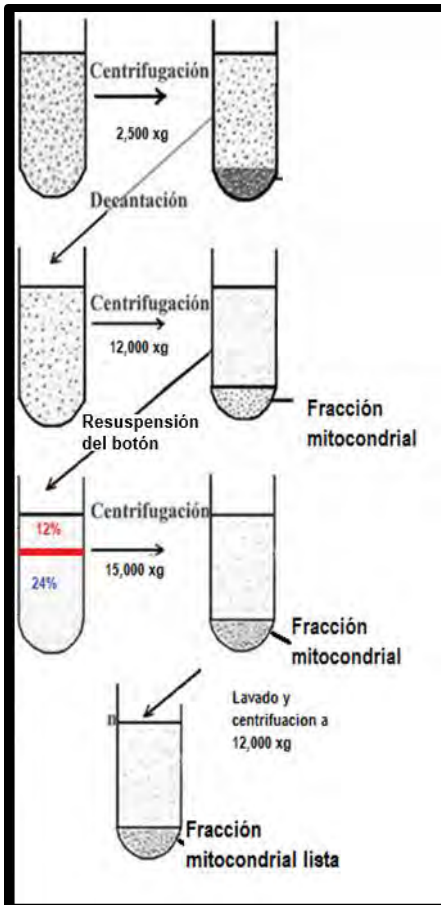


Figura 8. Resumen de la metodología empleada para el aislamiento de mitocondrias por centrifugación diferencial y gradiente de percoll.

6.5.2. Respiración mitocondrial cerrada (oximetría)

La determinación del consumo mitocondrial de O_2 se realizó utilizando un microelectrodo de tipo Clark con microcámara a agitación y temperatura constante de 37°C (Strathkelvin Instruments, Motherwell, NL, Escocia). Los aislados mitocondriales (15 a 30 µg de proteína total) se cargaron en la cámara con 100 µl de medio de respiración (sacarosa 200 mM, KCl 25 mM, K_2HPO_4 2 mM, HEPES 5 mM, 0.1% de BSA libre de ácidos grasos y $MgCl_2$ 5 mM, pH= 7.2). La cadena respiratoria se inició por adición de los sustratos respiratorios succinato 0.7 M con rotenona 1 µg/ml o con una mezcla 0.125 M/ 0.75 M de glutamato y malato de sodio respectivamente. El estado 3 de la respiración se estimuló por la adición de ADP como reactivo limitante en una concentración de 200µM, mientras que el estado 4 se definió como la tasa respiración una vez que la pendiente se reduce al acabarse el ADP disponible. Las velocidades de respiración se expresaron en ng-átomos de oxígeno /minutos /mg de proteína (ngatm/min/mg) y el control respiratorio mitocondrial (CR) se calculó como el cociente estado 3 / estado 4.

6.5.3. Potencial de membrana mitocondrial.

La evaluación de los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial se realizó de manera indirecta por el método descrito por [Fernández-Rojas et al. \(2015\)](#) utilizando los cambios en la fluorescencia a 525-575 nm del colorante catiónico safranina O (10 mM). La reacción se llevó a cabo con 15 µg de mitocondrias frescas en 155 µl de medio de respiración suplementado con ADP 200 µM y 1 µg/uL rotenona. Se incubó la placa en el interior del espectrofotómetro a 37 °C durante 3 min y se leyó la fluorescencia de línea de base. La reacción se inició por la adición de succinato 0.5 M, la disminución de la fluorescencia se midió durante 3 min cada 30 s. Finalmente la disipación del potencial mitocondrial se siguió durante 3 min cada 30 s por la restitución de la fluorescencia al adicionar FCCP 0.2 µM. Se reportó la diferencia entre las unidades arbitrarias de fluorescencia con FCCP menos las unidades arbitrarias de fluorescencia con succinato y basales, dividida entre la cantidad de proteína mitocondrial en mg (ΔUAF / mg de proteína).

6.5.4. Actividad de los complejos mitocondriales.-

Se determinó utilizando la metodología descrita por [Granados-Castro et al. \(2013\)](#). La actividad del complejo I y II se determinó por desaparición de la absorbancia del decilubiquinol a 600 nm. Mientras que la actividad del complejo III se evaluó por el aumento en la absorbancia del citocromo c a 550 nm y finalmente la actividad del complejo IV se evaluó por la disminución la absorbancia a 550 nm del citocromo c, en experimentos por separado. Las técnicas se describen a continuación:

Complejo I

La medición se realizó utilizando placas de 96 pozos, cada pozo contenía: BSA 3.5 mg/ml, 2,6-DCPIP 67 μ M, antimicina A 1 μ M, NADH 0.2 mM, KCN 0.2 mM y 5 μ g de proteína mitocondrial, los cuales se llevaron a un volumen a 300 μ l con PBS 30 mM, pH=7.4. Para cada muestra se realizó un duplicado al cual se le adicionó rotenona 13 μ M como inhibidor, ambos pozos se incuban simultáneamente 5 min a 37°C. A continuación se adicionaron 6 μ l de DuB 3.12 mM en cada pozo para dar inicio a la reacción, la placa se agitó por 5 s y se realizó una cinética con lecturas cada 20 s por 3 min. La actividad total de la enzima se calculó como la actividad sin inhibidor menos la actividad enzimática con inhibidor presente. La actividad (A) se calcula como:

$$A = \frac{(\Delta Abs/min)(1000)}{(mg\ prot * \epsilon_{DCPIP})}$$

Siendo ϵ_{DCPIP} el coeficiente de extinción molar del DCPIP= 19.1 mM⁻¹cm⁻¹

Complejo II

La técnica se realizó en placas de 96 pozos, cada uno con: BSA 5 mg/ml, DCPIP 67 μ M, antimicina A 1 μ M, succinato 15 mM, KCN 0.2 mM y 5 μ g de proteína mitocondrial, este se llevó a un total de 300 μ l con PBS 30 mM, pH=7.4. Para cada muestra se efectuó un duplicado al cual se le adicionó malonato 10 mM como inhibidor, ambos pozos se incubaron simultáneamente durante 5 min a 37°C. La reacción se inició por adición de 6 μ l DuB 3.12 mM, la placa se agitó por 5 s y se realizó una cinética de 3 min con lecturas cada 20 s. La actividad de la enzima total se calculó como la actividad sin inhibidor menos la actividad con inhibidor.

Complejo III

En cada pozo se colocó: BSA a 0.4 mg/ml, tween 220 μ M, rotenona 1 μ M, KCN 0.4 mM, MgCl₂ 0.6 mM, EDTA 0.1 mM, citocromo oxidado 17 μ M y 1.25 μ g de muestra y se llevó un volumen de 300 μ l con PBS 30 mM, pH=7.4. A cada muestra se le realizó un duplicado a cual se le adicionó antimicina A 30 μ M como inhibidor, ambos pozos se incuban simultáneamente 8 min a 37°C. Se adicionaron 5 μ l DuBH₂ 3.12 mM para dar inicio a la reacción, la placa se agitó por 5 s y se realizó una cinética de 3 min cada 15 s. La actividad total de la enzima se calculó como la actividad sin inhibidor menos la actividad enzimática con inhibidor presente, donde la actividad de la enzima se calculó como:

$$A = \frac{(\Delta Abs/min)(1000)}{(mg\ prot * \epsilon_{cit\ c\ red})}$$

Siendo $\epsilon_{cit\ c\ red}$ el coeficiente de extinción molar del citocromo c reducido= $18.5mM^{-1}cm^{-1}$

Complejo IV

En cada pozo se colocaron: BSA 0.4 mg/ml, tween 220 μM y citocromo reducido 34 μM , los cuales se llevaron a un volumen de 300 μl PBS 30 mM, pH=7.4. Para cada muestra se efectuó un duplicado al cual se le adicionó KCN 0.25 mM como inhibidor específico. Ambos pozos se incubaron simultáneamente 8 min a 37°C y a continuación se agregó 7.5 μl proteína mitocondrial para comenzar la reacción. La placa se agitó por 5 s y se realizó una cinética de 3 min cada 15 s (para ver la oxidación del citocromo C a 550 nm). La actividad total de la enzima se calculó como la actividad sin inhibidor menos la actividad enzimática con inhibidor presente.

6.5.5. Actividad de la ATP sintasa (CV).

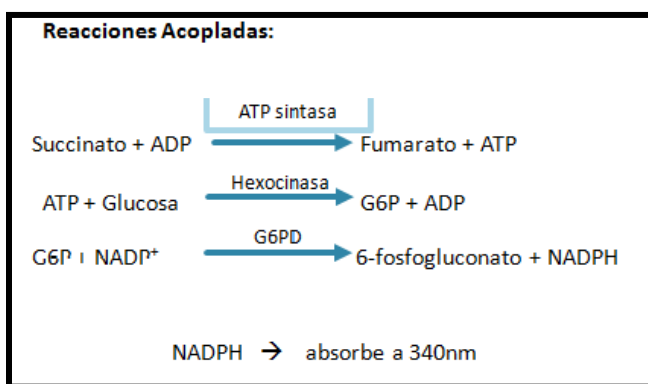


Figura 9. Reacciones acopladas utilizadas para determinar de manera indirecta la actividad de la ATP sintasa, el aumento de la absorbancia a 340nm es directamente proporcional a la actividad de la misma. G6PDH = glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

La actividad de la ATP sintasa se midió de manera indirecta utilizando el ensayo detallado por [Cano-Ramírez et al. \(2012\)](#). Este mide la tasa de síntesis NADPH a 340 nm y la relaciona con la actividad de la ATP sintasa, al acoplarlo a las reacciones de la hexocinasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, como se muestra en la figura 9.

En cada pozo se colocaron succinato 14 mM, hexocinasa 4 U/ml, G6PDH 2 U/ml, glucosa 20 mM, NADP⁺ 1.4 mM, 20 μg de mitocondria fresca y se ajustó a 300 μl con PBS 40 mM, pH = 7.4. La reacción se inició con 200 mM de ADP y se siguió por 3 min cada 30 s, se utilizó oligomicina 40 μM como inhibidor específico, la cual se preincubo por 3 min y se siguió la cinética con oligomicina por 3 min cada 30 s. La actividad de la enzima total se calculó como la actividad sin inhibidor menos la actividad enzimática con inhibidor presente. La actividad de la enzima se calculó como:

$$A = \frac{(\Delta Abs/min)(1000)}{(mg\ prot * \epsilon_{NADPH})}$$

Siendo ϵ_{NADPH} el coeficiente de extinción molar del NADPH= $6.22 mM^{-1}cm^{-1}$

6.5.6. Producción de H₂O₂ por la mitocondria.

Para determinar la producción de H₂O₂ mitocondrial se utilizó la técnica descrita por [Fernández-Rojas et al. \(2015\)](#), la cual se basa en la oxidación del Amplex red en presencia del H₂O₂ para producir resorufina, compuesto cuya fluorescencia puede ser seguida utilizando a 530-590 nm. Por tanto la fluorescencia en la muestra es proporcional a la cantidad de peróxido en la misma.

En placas de 96 pozos se añadió 15 µg de proteína de aislado mitocondrial fresco a 0.1 mM Amplex red y HRP 10 U/mL y se llevó a un volumen final de 200 µl con medio de respiración. Se corrió una cinética basal de 3 min con lectura cada 20 s, la cual se consideró como la producción de H₂O₂ mitocondrial basal sin sustrato. En un experimento por separado se adicionó 10µL de succinato o malato/glutamato (0.42mM) en cada pozo, y se corrió una cinética de 3 min con lectura cada 20 s, la cual se consideró como la producción de H₂O₂ por mitocondria en presencia de sustrato. Finalmente para determinar la producción de peróxido con la presencia de inhibidores específicos de los complejos de la ETC se repitió la producción de H₂O₂ de la mitocondria con sustrato, pero con la adición de 10 µM de los inhibidores rotenona, DPI, antimicina A y las combinaciones: rotenona+ antimicina A y DPI+ antimicina A. Las curvas de calibración se realizaron por medio de cinéticas (3 minutos con lectura cada 20 s) con adiciones crecientes de 5 µl de una solución conocida de H₂O₂ 20 nM en las condiciones deseadas.

Para la cuantificación de la producción del H₂O₂, se graficaron las lecturas fluorometricas obtenidas en la cinética correspondiente en función del tiempo en minutos. Se obtuvo la pendiente (m) en UAF/min, está se dividió entre los miligramos de proteína empleada y la pendiente obtenida para la curva tipo, como muestra la siguiente ecuación:

$$\frac{m_{muestra}}{m_{curva\ tipo} * proteina} = \frac{\left(\frac{UF}{min}\right)}{\left(\frac{UF}{nmol\ de\ H_2O_2}\right)(mg_{proteina})} = \frac{nmol\ de\ H_2O_2}{min * mg_{proteina}}$$

6.5.7. La actividad de las enzimas antioxidantes y MDA en aislados de mitocondria.

Para evaluar la magnitud del estrés oxidante en mitocondrias recién aisladas, se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx, además se determinó de manera semicuantitativa la cantidad de malondialdehído (MDA) como marcador de peroxidación lipídica vía western blot (WB). Los métodos para la evaluación de la actividad enzimática se describieron de manera detallada en la sección de evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes.

6.5.8. Extracción de proteína y western blot (WB).

Las alícuotas de PT y mitocondrias se centrifugaron a 1,071 x g por 10 min, el botón se resuspendió en solución amortiguadora de radioinmunoprecipitación (Tris-HCl 40 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, glicerol al 10%, Tritón X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 0.5% y SDS al 0.2%, pH = 7.6), las muestras se incubaron durante 30 min a 4 °C y se rompieron por sonicación (30 s, 3

veces) a baja intensidad, se centrifugaron a 14,000 x g por 40 min a 4 °C y se tomaron los sobrenadantes, en los cuales se cuantificó la proteína total.

Para los WB, las muestras se desnaturalizaron por ebullición durante 10 min y se diluyeron en amortiguador Laemmli (1:5) con urea 5 M. Las proteínas se cargaron en geles de SDS-poliacrilamida al 12%, con patrones de peso molecular en el primer carril y se corrieron por 2 horas. Al término, se transfirió a membranas de fluoruro de polivinilideno (Amersham Biosci, Uppsala, Suecia) por transferencia en húmedo, estas se bloquearon por incubación durante 1 h con leche en polvo descremada al 5% y Tween 20 al 0.4 % en PBS. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios apropiados, se lavaron con PBS /Tween al 0.4% y se incubaron 2 horas con el anticuerpo secundario correspondiente. Después de un lavado de 5 min, las membranas se revelaron por quimioluminiscencia utilizando un kit (Amersham ECLTM prime Western blotting detection reagent), la densidad de la banda se cuantificó por densitometría utilizando un equipo EC3 Imaging System (UVP Bioluminescence Systems, Cambridge, UK).

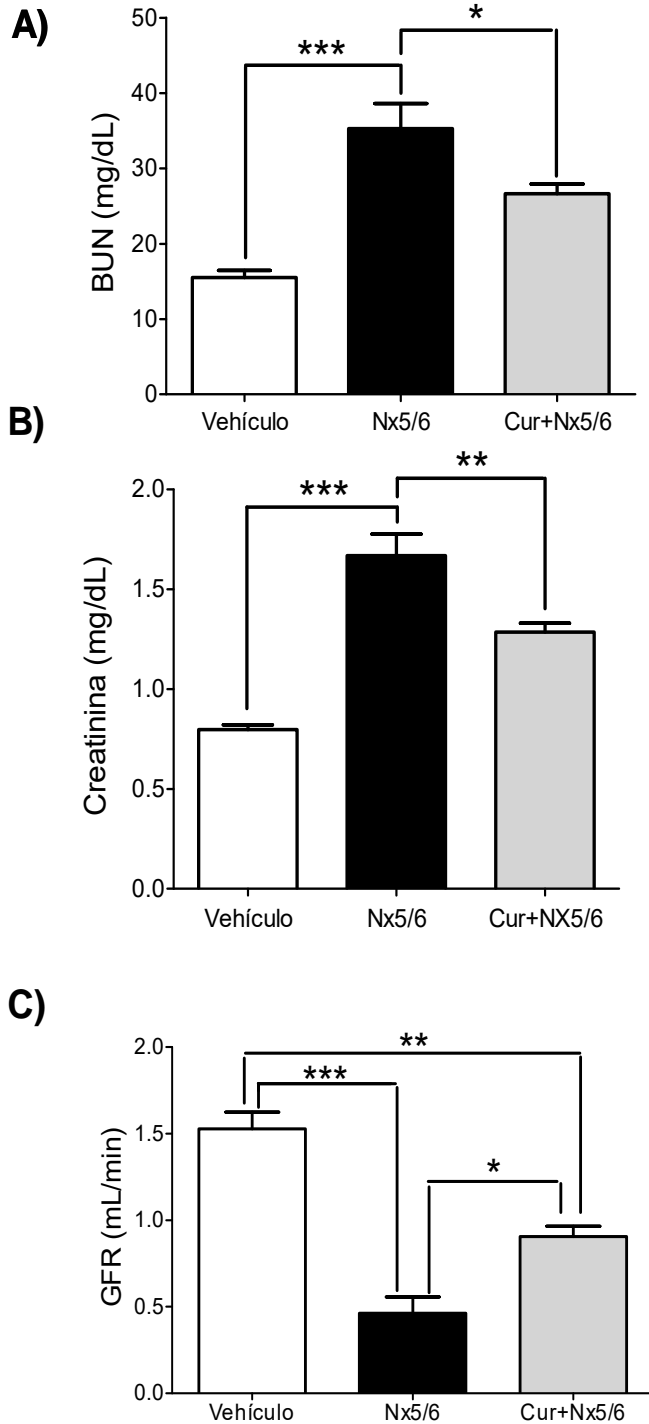
6.6. Análisis estadístico.

Los datos se analizaron por medio de una ANOVA de una vía seguida de una prueba de Bonferroni. La significancia estadística fue definida como $p < 0.05$. En todos los casos los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media (SEM).

7. Resultados.

7.1. Función Renal.

7.1.1. Marcadores de función renal.



Los niveles de BUN y creatinina en plasma se evaluaron como marcadores de daño renal. Como se observa en la figura 10A y 10B, se encontró un incremento significativo de ambos marcadores 24 hrs después de la operación en las ratas nefrectomizadas, el cual se previene significativamente por la administración de curcumina como pretratamiento.

La generación de daño renal a 24 horas por la nefrectomía se confirmó por la caída en la GFR en el grupo Nx5/6, mientras que efecto protector del pretratamiento con curcumina se observó por la prevención de dicha caída en el grupo Cur+Nx5/6 (figura 10 C).

Figura 10. **(A)** Determinación del nitrógeno ureico en sangre (BUN); **(B)** creatinina en plasma y **(C)** tasa de filtración glomerular (GFR). Los datos se presentan como la media \pm SEM. $n=7$. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

7.1.2. Parámetros hemodinámicos.

Veinte cuatro horas después de la cirugía las ratas nefrectomizadas presentaron una disminución significativa en el RBF así como un aumento de la RVR con respecto al control, ambas alteraciones se previnieron significativamente por la preadministración de curcumina (figura 11A y B). Sin embargo a 24 horas no se encontraron alteraciones en la MAP y el hematocrito en ninguno de los grupos (figura 11C y D).

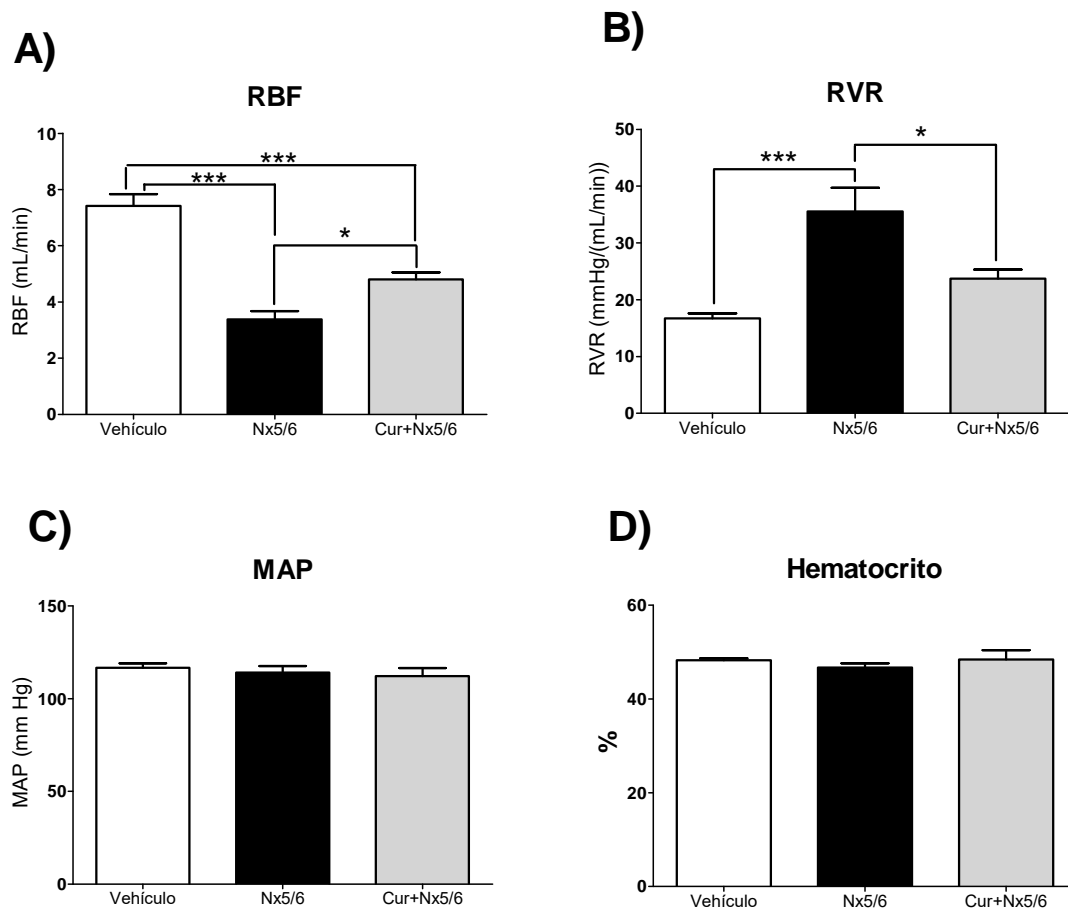


Figura 11. **(A)** Determinaciones del flujo sanguíneo renal (RBF); **(B)** la resistencia vascular renal (RVR); **(C)** la presión arterial media (MAP) y **(D)** el hematocrito 24 horas después de la cirugía. Los datos se presentan como la media \pm SEM. $n=7$. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

7.1.3. Microscopía de luz.

El análisis por microscopía de luz utilizando como colorantes eosina y hematoxilina reveló extensa áreas con necrosis isquémica en el grupo nefrectomizado junto con algunas zonas de tejido bien preservado, las cuales mostraron numerosas células epiteliales de los túbulos contorneados proximales con un gran número de vacuolas citoplasmáticas pequeñas y medianas y núcleos hipercromáticos (figura 12B). Por su

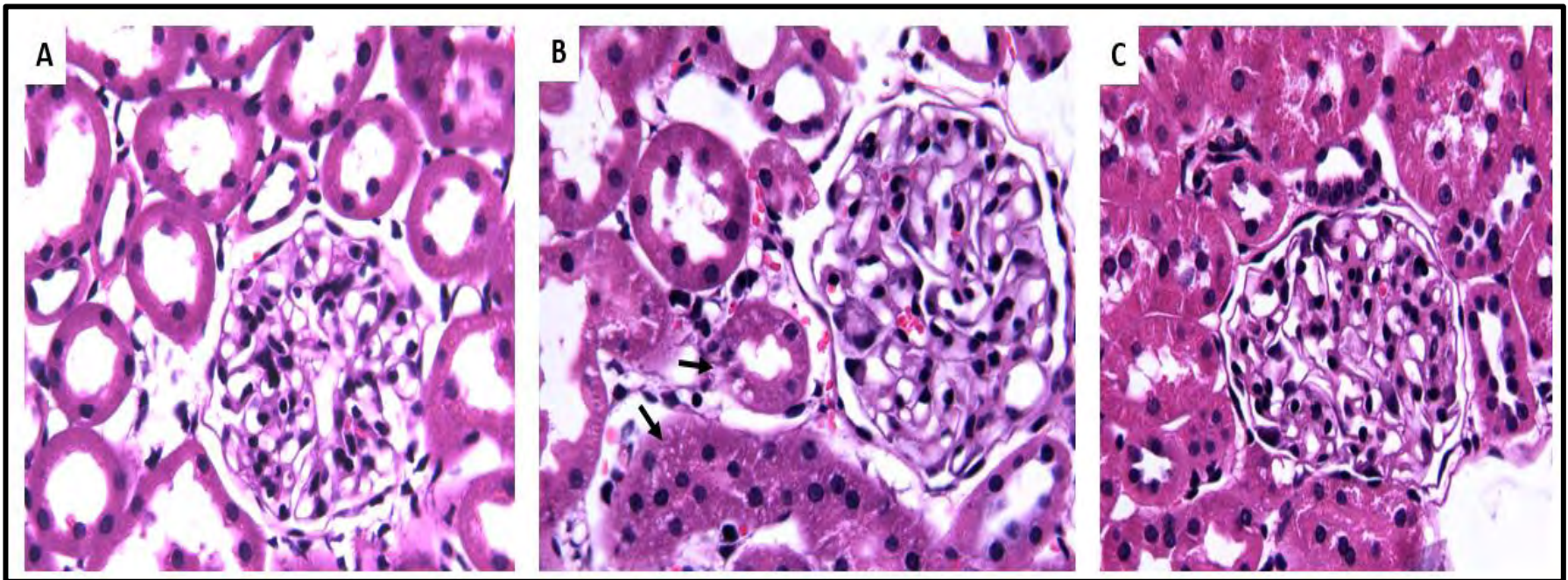


Figura 12. Micrografías representativas de las áreas de tejido bien preservado en la corteza renal de cada uno de los grupos experimentales. (A) Apariencia histológica normal de la corteza renal de una rata control (vehículo). (B) Células epiteliales de túbulos proximales contorneados en una rata el grupo Nx5/6, estas muestran numerosas vacuolas citoplasmicas (flechas negras). (C) Túbulos proximales contorneados en corteza renal, pertenecientes a una rata del grupo nefrectomizado con pretratamiento con curcumina, se observan una menor cantidad de vacuolas citoplasmáticas. Todas las micrografías fueron tomadas a una magnificación de 400x.

parte el grupo nefrectomizado pretratado con curcumina mostró también extensas áreas de necrosis isquémica, junto con zonas de tamaño mediano de tejido bien conservado en la corteza renal, las cuales presentaron una menor cantidad de túbulos contorneados proximales con vacuolas citoplasmática (figura 12C).

7.1.4. Capacidad antioxidante total de LMWA en riñón.

En los voltamperogramas de riñón, se encontraron variaciones importantes en altura y forma de

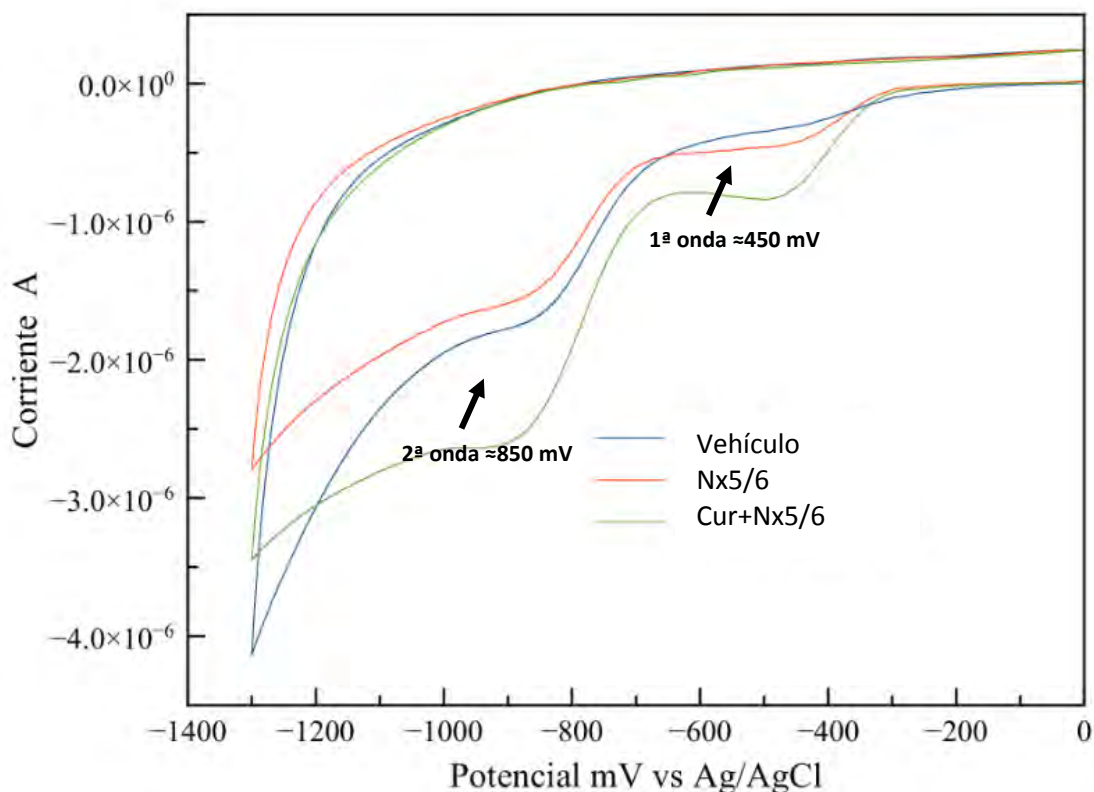


Figura 13. Voltamperogramas promedio de homogenizado de riñón en medio PBS y de los diferentes grupos, se observa una caída significativa en la CAT- LMWA (vista como la disminución del área bajo la curva) en los riñones en el grupo nefrectomizado, la cual se previene por la preadministración de curcumina (n=7).

las ondas observadas en aproximadamente 450 y 850 mV (figura 13). Mismas que se asemejan mucho a las formas y potenciales del ácido úrico y ácido lipoico determinados en medio de PBS (ver anexo 11.4), lo cual nos indicaría la posible contribución de los mismos a la CAT en riñón. En el caso de las ratas nefrectomizadas se puede apreciar como ambas ondas tienden a disminuir disminuyendo así la CAT-LMWA. Por el contrario en las ratas con pretratamiento esta aumenta inclusive por arriba del control, sugiriendo una mayor CAT-LMWA en el grupo con curcumina (el desglose de los voltamperogramas y la cuantificación puede verse en el anexo 12.4).

Capacidad antioxidante total de LMWA plasma.

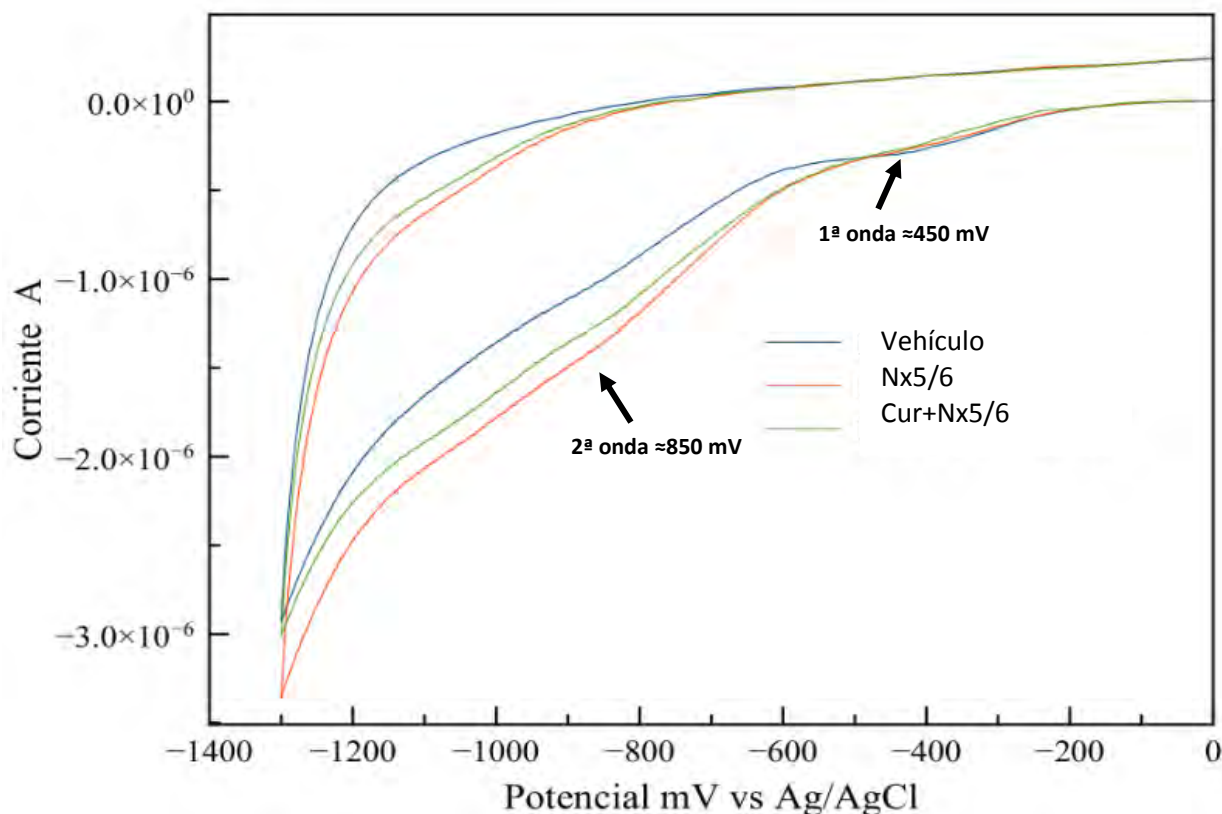


Figura 14A. Voltamperogramas promedio de plasmas de los diferentes grupos (n=7), se observa un aumento significativo en la CAT- LMWA en el grupo nefrectomizado con respecto al control, dicho aumento es prevenido parcialmente por la preadministración de curcumina.

Los voltamperogramas obtenidos en plasma presentaron dos ondas no muy bien definidas cercanas a 400 y 850 mV. Como se aprecia en la figura 14A se encontraron variaciones importantes en la altura de la onda de aproximadamente 850 mV, sin observarse alteraciones en la onda de 450 mV. Interesantemente se aprecia un aumento en la amplitud del voltamperograma en ratas nefrectomizadas indicando una mayor CAT-LMWA en el plasma de este grupo, dicha tendencia es revertida por la curcumina (el desglose y cuantificación de los voltamperogramas en plasma puede verse por separado en el anexo 11.5).

Para confirmar los resultados obtenidos por CV se decidió evaluar la capacidad antioxidante total por el método de ORAC. Los datos obtenidos se presentan en la figura 14B. Al igual que con CV se aprecia un aumento significativo de la TAC en el plasma de ratas nefrectomizadas con respecto al control, sin embargo a diferencia de lo obtenido por CV, en este método no se pudo observar una disminución de la CAT por la administración de curcumina.

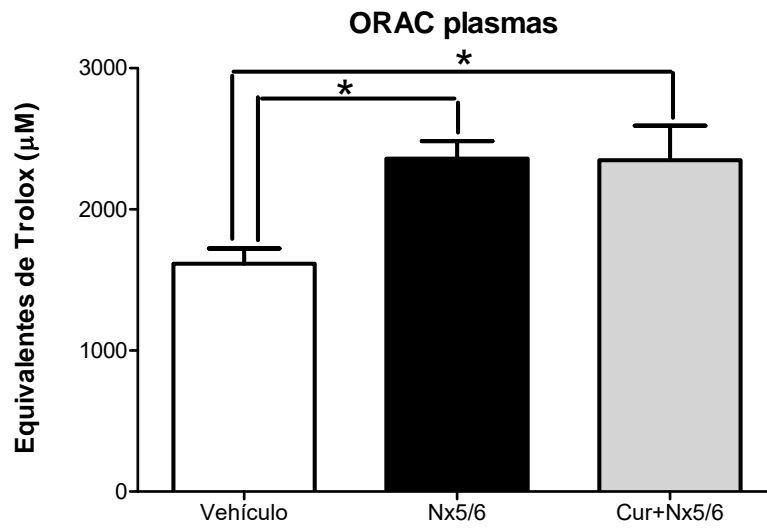


Figura 14B. Capacidad antioxidante total (CAT) en las muestras de plasmas de los diferentes grupos por medio del método de ORAC. Los datos se presentan como la media \pm SEM. $n=7$. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. $*p<0.05$,

7.2. Estudios en los segmentos de la nefrona

7.2.1. Producción de superóxido.

Con el objetivo de evaluar el aumento del estrés oxidante a 24 horas después de la cirugía en los principales segmentos de la nefrona, se determinó la producción de superóxido por la Nox y la NOS en cada segmento. Los resultados en homogenizados de glomérulos muestran un aumento

NADPH oxidasa

Sintasa de óxido nítrico

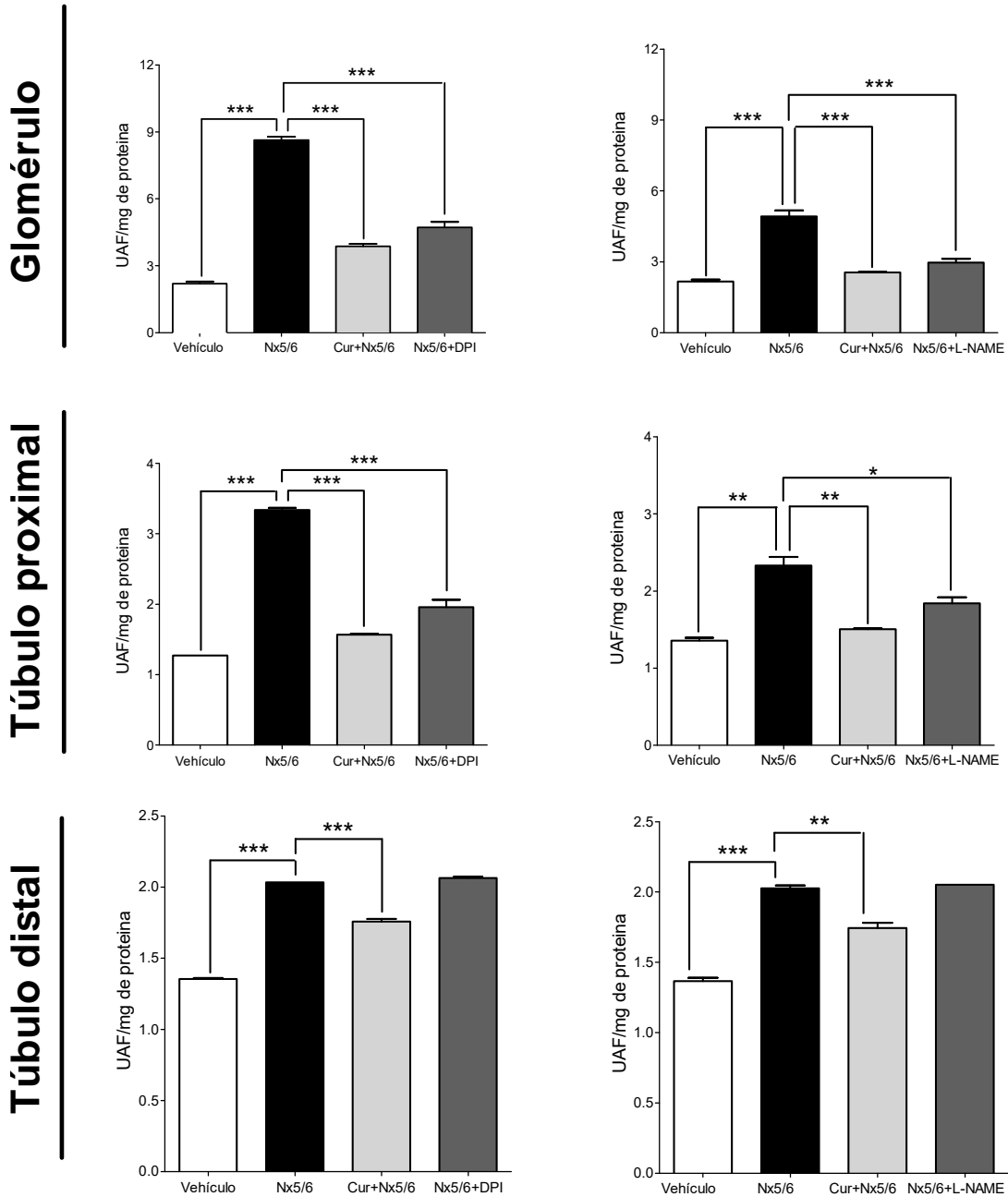


Figura 15. Producción del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) medida como el aumento en las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) sobre los mg de proteína empleados, en los segmentos aislados de la nefrona por la sintasa de óxido nítrico (Nos) y la NADPH oxidasa (Nox), la producción específica de superóxido fue probada utilizando un inhibidor específico para cada enzima, cloruro de difeniliodonio (DPI) para la Nox y L-N^G-nitroarginina metil ester (L-NAME) para la Nos. Los datos se presentan como la media \pm SEM. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. n= 6-5. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

en la producción de superóxido por parte de ambas enzimas en el grupo nefrectomizado. Dicho aumento es casi 2 veces mayor en el caso de la Nox con respecto a la Nos, además, en ambos casos la utilización del inhibidor específico demostró que el anión superóxido proviene de la actividad de estas enzimas. Así mismo, la curcumina previno dicho aumento parcialmente en el caso de la Nox y totalmente para la Nos.

En el caso del túbulo proximal, al igual que en glomérulo, el aumento en la producción de superóxido es mayor en el caso de la Nox en comparación a la Nos en las ratas nefrectomizadas. La comprobación con el inhibidor específico de cada enzima, arrojó resultados similares a los del glomérulo, por lo que también en el PT podemos afirmar que la mayor parte de la producción observada efectivamente corresponde a la actividad de la enzima evaluada en cada caso. Igualmente en este segmento el pretratamiento con curcumina fue capaz de prevenir casi totalmente los aumentos en la producción de superóxido.

Finalmente en el caso del túbulo distal, los resultados obtenidos revelaron un ligero aumento en la producción del radical superóxido en el grupo nefrectomizado con respecto al control. Sin embargo los inhibidores específicos de la Nox y la Nos, no fueron capaces de disminuir la fluorescencia, por lo que podemos especular que la producción de dicho superóxido procede de otra fuente endógena. Como se muestra en la figura 16, la inhibición específica con alopurinol (inhibidor específico de la xantina oxidasa) reveló que el superóxido en este segmento proviene principalmente de la XO.

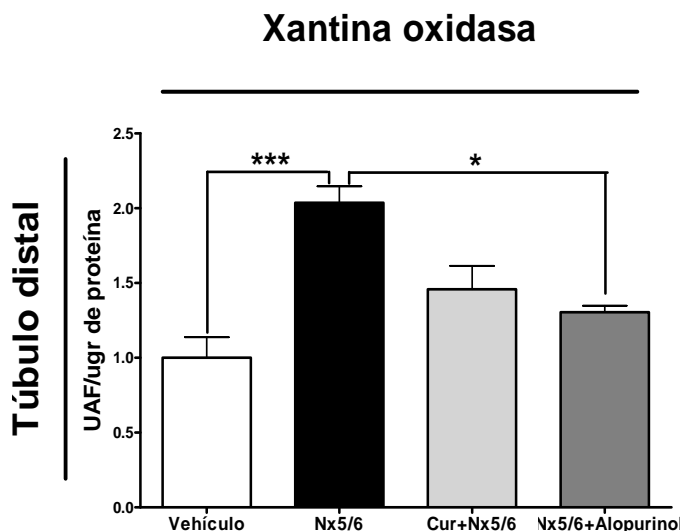


Figura 16. Producción del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en túbulo distal atribuible a la xantina oxidasa (XO), medida como el aumento en las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) sobre los mg de proteína empleados. La producción específica de superóxido fue probada utilizando alopurinol como inhibidor específico. Los datos se presentan como la media \pm SEM. n=6. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. *p<0.05, ***p<0.001.

Sorprendentemente el

pretratamiento con curcumina también previno parcialmente el aumento en la producción de superóxido, aunque en menor medida con respecto a los dos segmentos anteriores.

7.2.2. Actividad de las enzimas antioxidantes en los segmentos de la nefrona.

Los datos obtenidos, revelan que a 24 horas posteriores a la nefrectomía ha disminuido la actividad de todas las enzimas antioxidantes en todos los segmentos evaluados, lo que concuerda con el aumento en la producción superóxido por las enzimas prooxidantes encontrado anteriormente. Sin embargo, el pretratamiento con curcumina solo fue capaz de prevenir parcialmente la caída en las actividades de la catalasa y GR en el glomérulo; catalasa, GR y SOD en túbulo proximal; y catalasa, GST y SOD en túbulo distal (tabla 2).

Segmento de la nefrona	Enzima antioxidante	Vehículo	Nx5/6	Cur+Nx5/6
Glomérulo	<i>Catalasa</i>	0.136± 0.010	0.046± 0.008*	0.129± 0.005 ⁺
	<i>GR</i>	0.009± 0.001	0.004± 0.001*	0.007± 0.001* ⁺
	<i>GPx</i>	0.337± 0.005	0.191± 0.008*	0.204± 0.006*
	<i>GST</i>	0.079± 0.004	0.029± 0.001*	0.031± 0.002*
	<i>SOD</i>	16.2± 0.7	6.9± 0.4*	8.7± 0.7*
Túbulo proximal	<i>Catalasa</i>	0.109± 0.004	0.003± 0.001*	0.020± 0.001* ⁺
	<i>GR</i>	0.068± 0.005	0.019± 0.001*	0.032± 0.002* ⁺
	<i>GPx</i>	0.299± 0.007	0.085± 0.008*	0.090± 0.008*
	<i>GST</i>	0.097± 0.002	0.021± 0.003*	0.022± 0.002*
	<i>SOD</i>	15.5± 0.9	5.1± 0.9*	9.8± 1.2* ⁺
Túbulo distal	<i>Catalasa</i>	0.037± 0.001	0.008± 0.001*	0.029± 0.003 ⁺
	<i>GR</i>	0.054± 0.003	0.016± 0.002*	0.028± 0.002*
	<i>GPx</i>	0.233± 0.006	0.114± 0.007*	0.153± 0.015*
	<i>GST</i>	0.024± 0.001	0.010± 0.001*	0.019± 0.001* ⁺
	<i>SOD</i>	13.1± 1.4	3.9± 0.9*	10.1± 0.8 ⁺

Tabla 2. Actividad de las enzimas antioxidantes en aislados de los segmentos de la nefrona: (GR) glutatión reductasa; (GPx) glutatión peroxidasa; (GST) glutatión S-transferasa; (SOD) superóxido dismutasa y catalasa. La actividades de la SOD, GR, GPx y GST se expresaron como U *mg de proteína⁻¹, donde U= unidades internacionales; la actividad catalasa se expresa como k*mg de proteína⁻¹ donde k= constante de primer orden (véase metodología para el desglose). Los valores se presentan como la media ± SEM. n=6. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. *p <0.05 vs vehículo; +p <0.05 vs Nx5/6.

7.2.3. Niveles de enzimas antioxidantes en túbulo proximal.

Ya que el túbulo proximal es segmento de la nefrona que contiene la mayor densidad mitocondrial

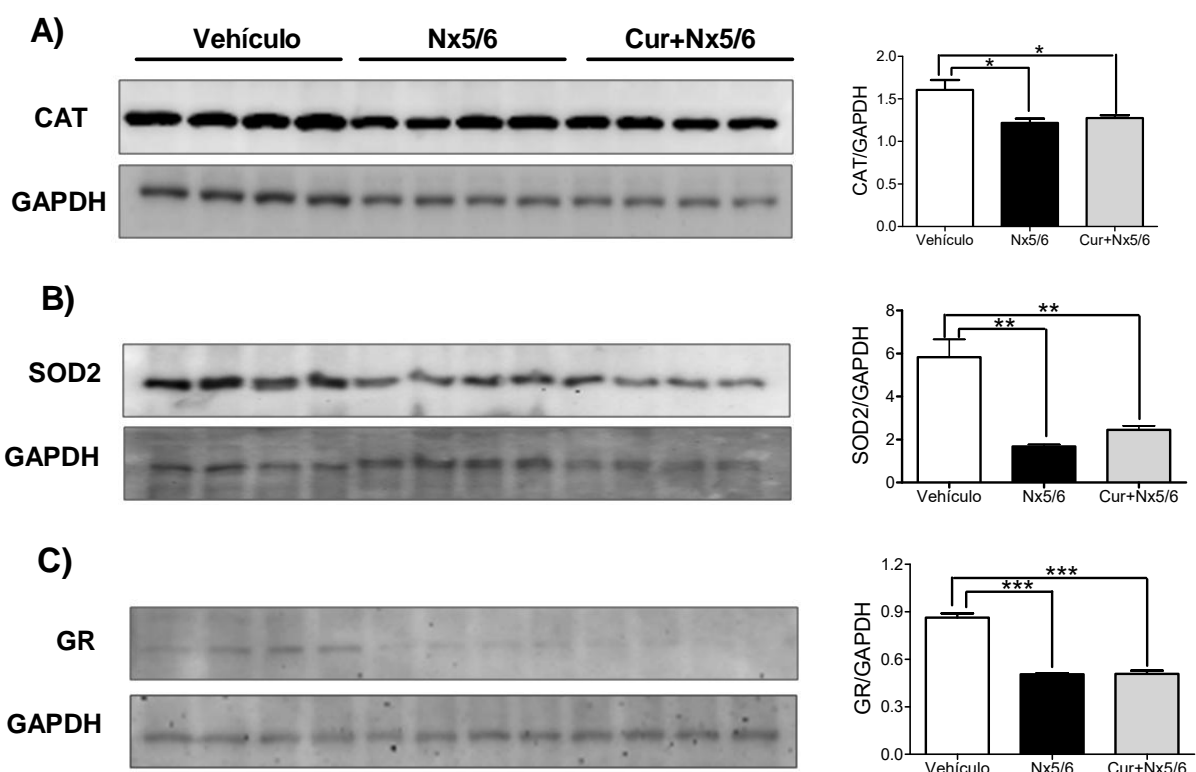


Figura 17. Western blot y su cuantificación en homogenados de túbulos proximales aislados de las enzimas: **(A)** catalasa, **(B)** superóxido dismutasa 2 (SOD2); y **(C)** glutatión reductasa (GR). Se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. Los datos se presentan como la media ± SEM. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. n=4. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

y para determinar si los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes observados se relacionaban con cambios en los niveles proteicos de las mismas, se evaluaron los niveles de las enzimas que protegieron parcialmente su actividad con el pretratamiento de curcumina (catalasa,

SOD2 y GR) por WB. Como se observa en la figura 22, en todos los casos los niveles de proteína disminuyeron significativamente en las ratas nefrectomizadas, al igual que en el caso de sus actividades, sin embargo no se observó un aumento significativo de los mismos con el pretratamiento con curcumina.

7.2.4. Proteína cinasa C y fosforilación de p47phox en túbulo proximal.

Ya que se ha reportado que el aumento en el estrés oxidante lleva a la activación de la proteína cinasa c (PKC) en su isoforma beta 2 y al aumento en los niveles de expresión de la misma en nefropatías agudas, se procedió a evaluar los niveles de la misma vía WB. Sin embargo la cuantificación por densitometría no reveló cambios significativos entre los grupos (figura 18A). Por otro lado, la evaluación de la fosforilación en la serina 304 de la subunidad p47phox de la Nox, la cual es realizada por varias isoformas de la PKC y lleva a la activación de la Nox, mostró un aumento significativo en el grupo nefrectomizado con respecto al control, el cual es prevenido por la preadministración de curcumina (figura 18B), concordando con los datos de actividad de producción de superóxido.

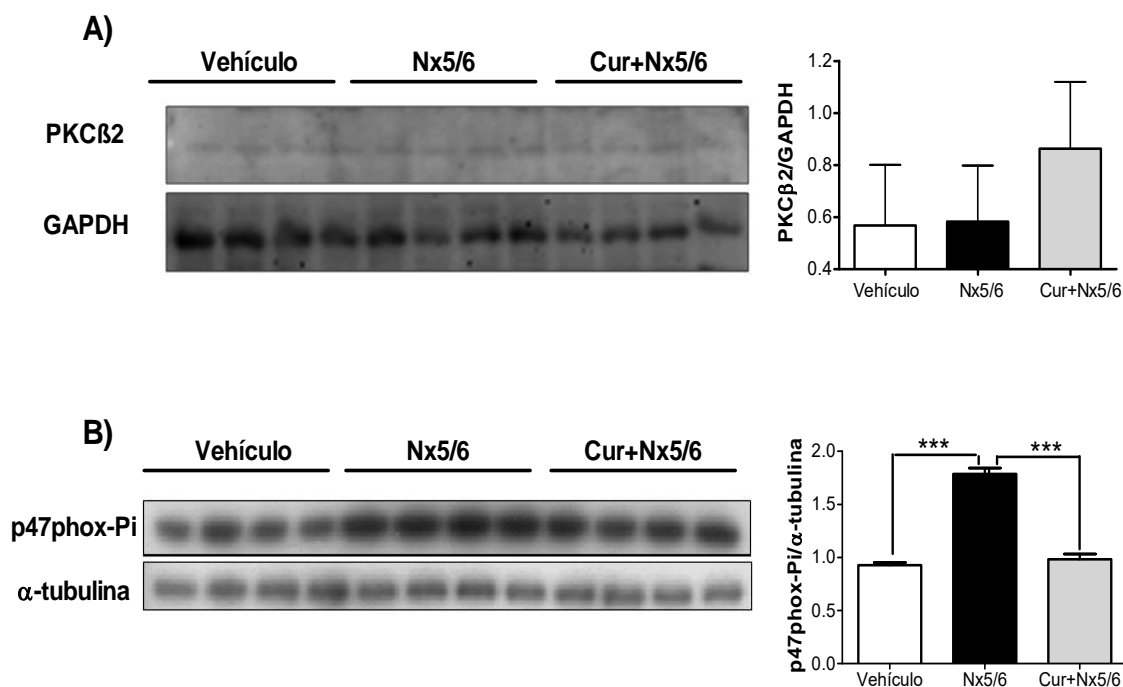
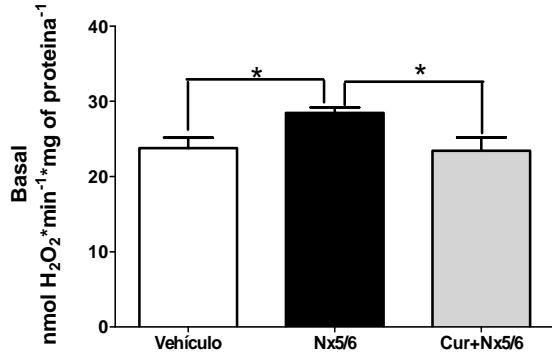


Figura 18. **(A)** Western blot en homogenados de túbulo proximal de la proteína cinasa C β2 (PKCβ2) y **(B)** de la subunidad de la Nox p47phox fosforilada en la serina 304, junto con sus cuantificaciones por densitometría. Se utilizó α-tubulina como control de carga. Los datos se presentan como la media ± SEM. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. n=4. ***p<0.001.

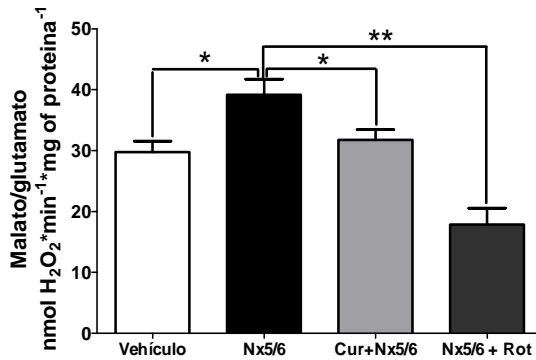
7.3. Estudios en mitocondrias aisladas

7.3.1. Producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias.

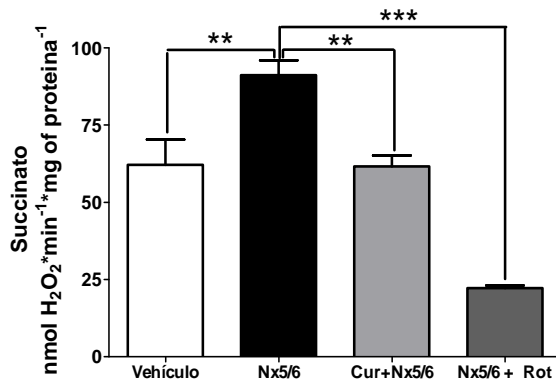
A)



B)



C)



La evaluación de la producción de H_2O_2 en mitocondrias aisladas, se realizó en condiciones basales (sin la presencia de sustrato) y alimentando la respiración con malato/glutamato y con succinato. Tanto en condiciones basales como con la adición de ambos sustratos, la nefrectomía indujo un aumento significativo en la producción de H_2O_2 con respecto al grupo control, siendo esta más evidente con succinato. El uso de inhibidores específicos de los complejos respiratorios mostró que la producción de peróxido solo se abate significativamente con la adición de rotenona (figuras 19B y 19C). Por otro lado la curcumina fue capaz de evitar el aumento en la producción de H_2O_2 en todos los casos.

Figura 19. Producción de H_2O_2 en mitocondrias aisladas (A) sin la presencia de sustrato (en condiciones basales), (B) alimentando la cadena de transporte de electrones con malato/glutamato y (C) con succinato. Los datos se presentan como la media \pm SEM. $n=5$. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

7.3.2. MDA y actividad de las enzimas antioxidantes en la mitocondria.

La evaluación del estrés oxidante y sistemas antioxidantes enzimáticos en mitocondrias aisladas mostro una disminución significativa en las actividades de la SOD (figura 20A) y la GPx (figura 20B), así como un aumento en la peroxidación lipídica medida por MDA (figura 20C y 20D) en el grupo Nx5/6. Dichas alteraciones se previnieron totalmente en el caso del MDA y parcialmente en el caso de las actividades por la preadministración de curcumina, confirmando así el efecto protector.

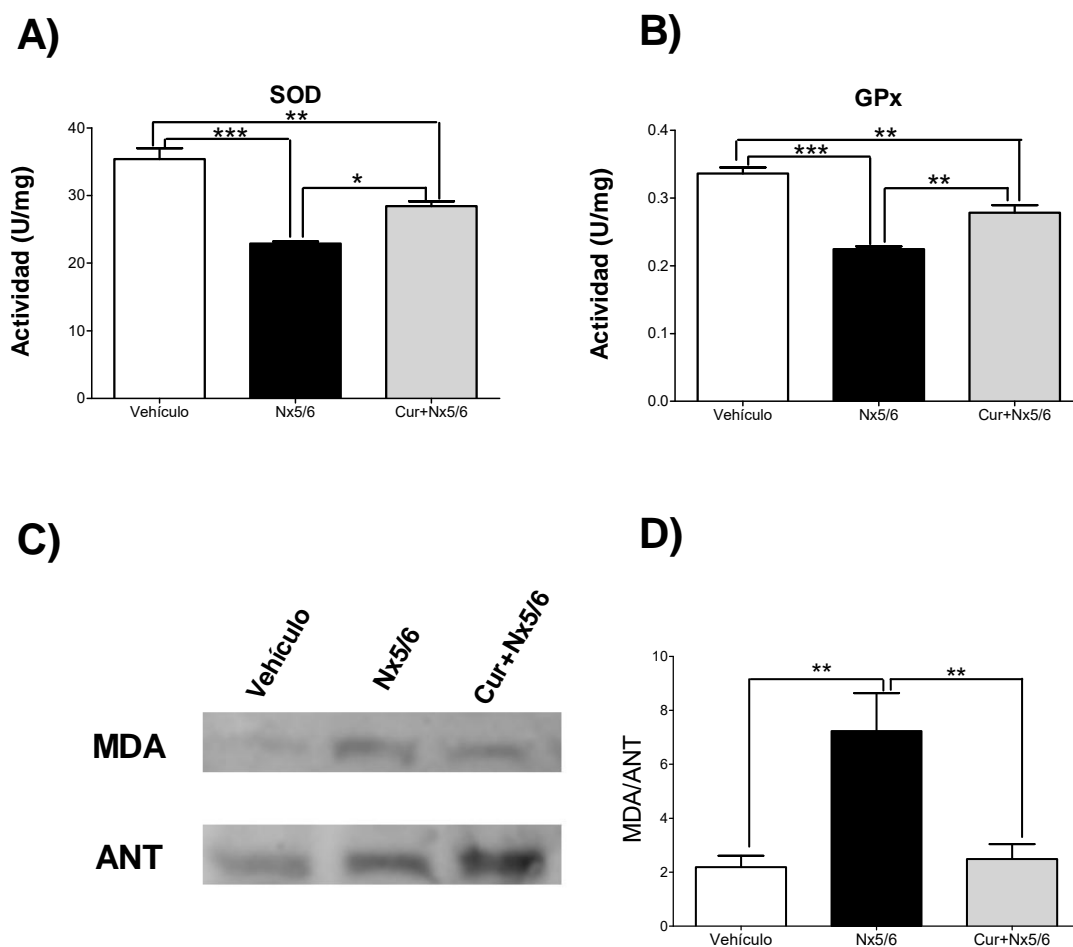


Figura 20. **(A)** Actividad de las enzimas antioxidantes SOD y **(B)** GPx en mitocondrias aisladas (n=6) La actividades de la SOD y GPx se expresaron como U sobre mg de proteína usados (U/mg), donde U= unidades internacionales (ver métodos para el desglose). **(C)** Marcador de estrés oxidante malondialdehído (MDA) en mitocondrias aisladas evaluado por western blot y **(D)** su cuantificación por desitometría (n=4), se utilizó el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) como control de carga. Los datos se presentan como la media \pm SEM. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

7.3.3. Respiración mitocondrial.

En el caso de la respiración alimentada por malato/ glutamato las mitocondrias de las ratas nefrectomizadas presentaron una disminución en el estado 3 y un aumento en el estado 4, así como una menor relación ADP/O e CR con respecto al control, confirmando la presencia de daño mitocondrial en nuestro modelo. La curcumina en la dosis utilizada previno estas alteraciones (figura 21). Por otro lado en el caso de la respiración alimentada por succinato, no se encontraron variaciones significativas entre los diversos grupos (datos no mostrados).

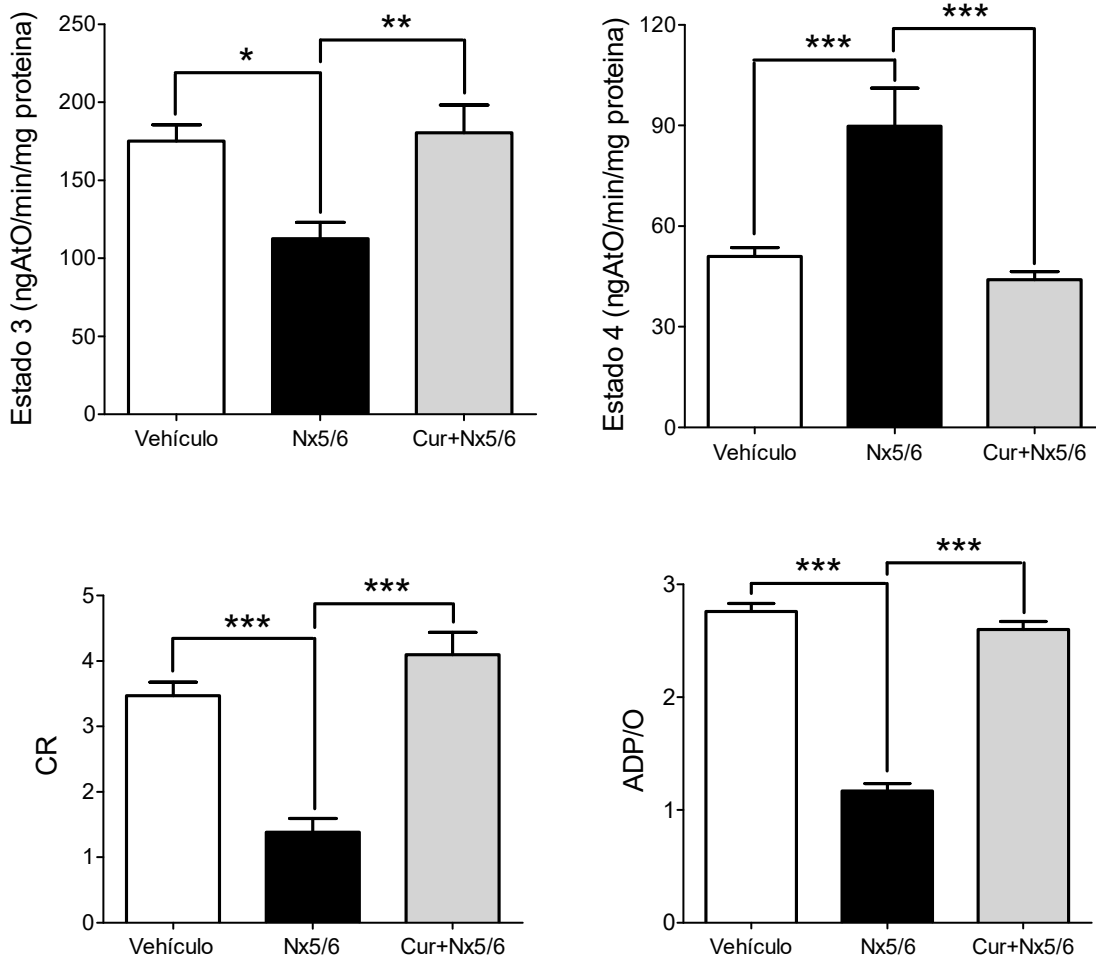


Figura 21. Determinación de los parámetros mitocondriales estado 3, estado 4, relación ADP/O e índice de control respiratorio (CR) usando malato-glutamato como sustrato. Los datos se presentan como la media \pm SEM. n=7. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

7.3.4. Actividad de complejos mitocondriales y potencial de membrana.

La actividad de los complejos mitocondriales reveló una caída significativa en las actividad de los complejos I y V (ATP sintasa) en ratas nefrectomizadas (figuras 22A y 2B), concordando con lo obtenido en oximetría, mientras que las actividades de los complejos II, III y IV no se vieron afectadas por la nefrectomía (datos no mostrados). En las ratas pretratadas con curcumina estas disminuciones fueron atenuadas significativamente. Por otro lado no se observaron cambios significativos en el potencial de membrana entre los diferentes grupos (figura 20C).

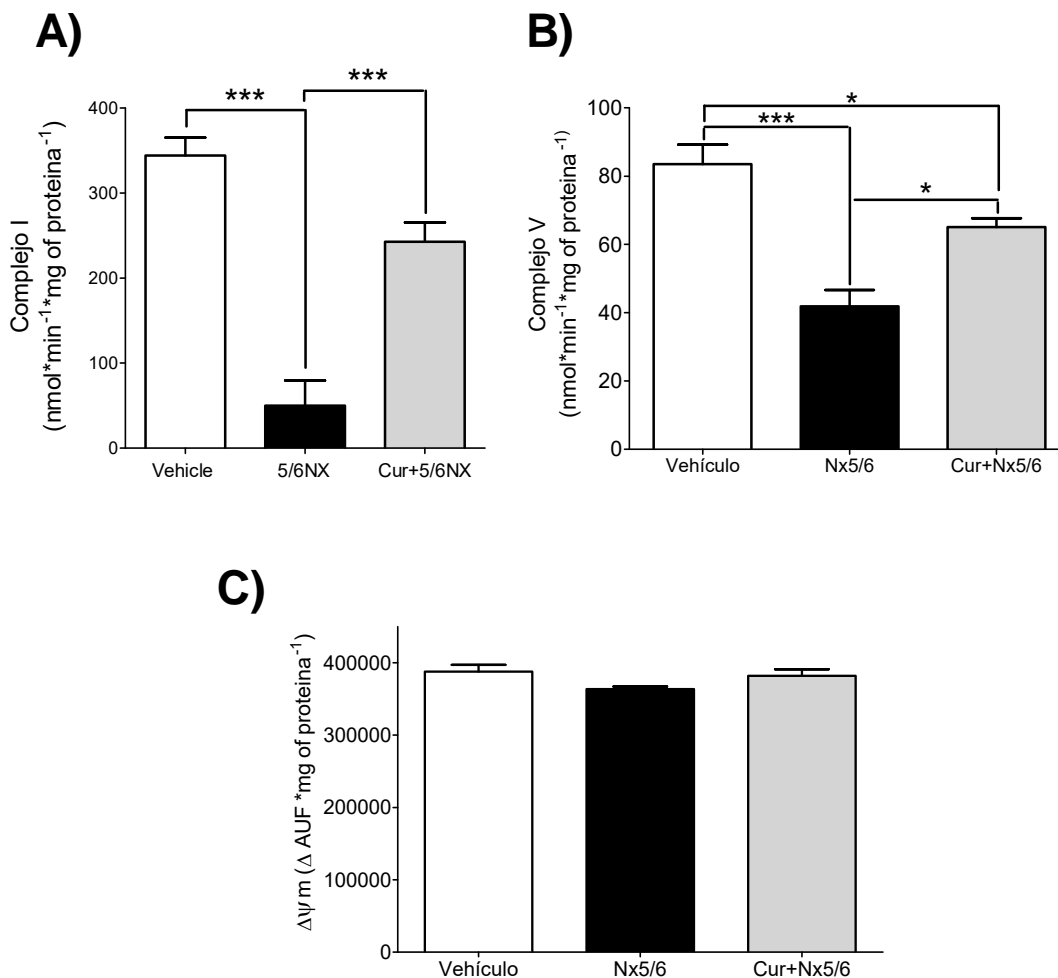
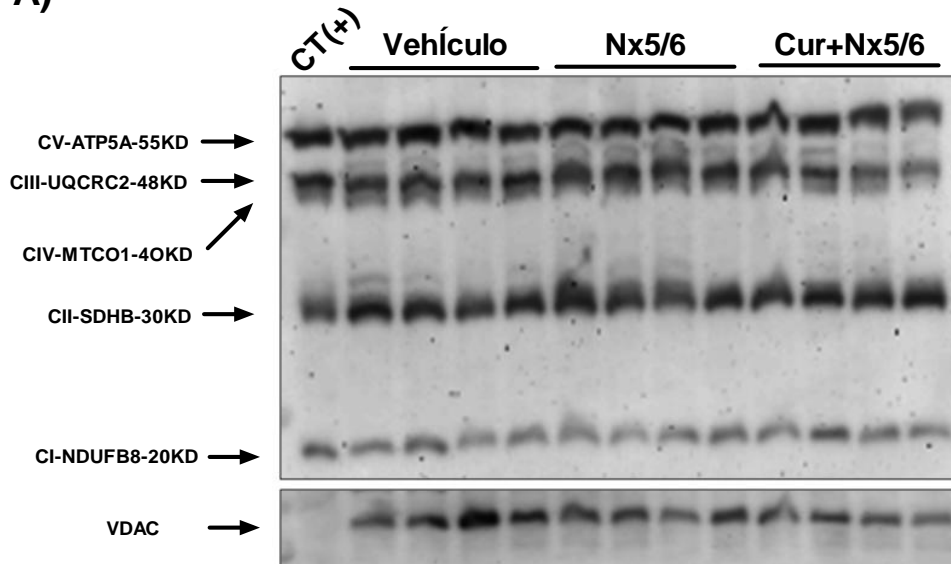


Figura 22. **(A)** Actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial; **(B)** ATP sintasa o complejo V y **(C)** evaluación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por safranina en mitocondrias aisladas de riñón. Los datos se presentan como la media \pm SEM. $n=7$. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

7.3.5. Niveles de las subunidades de los complejos mitocondriales.

Para determinar, si los cambios observados en la actividad mitocondrial estaban relacionados con cambios en los niveles de proteínas de la cadena respiratoria, se determinó en mitocondrias aisladas

A)



B)

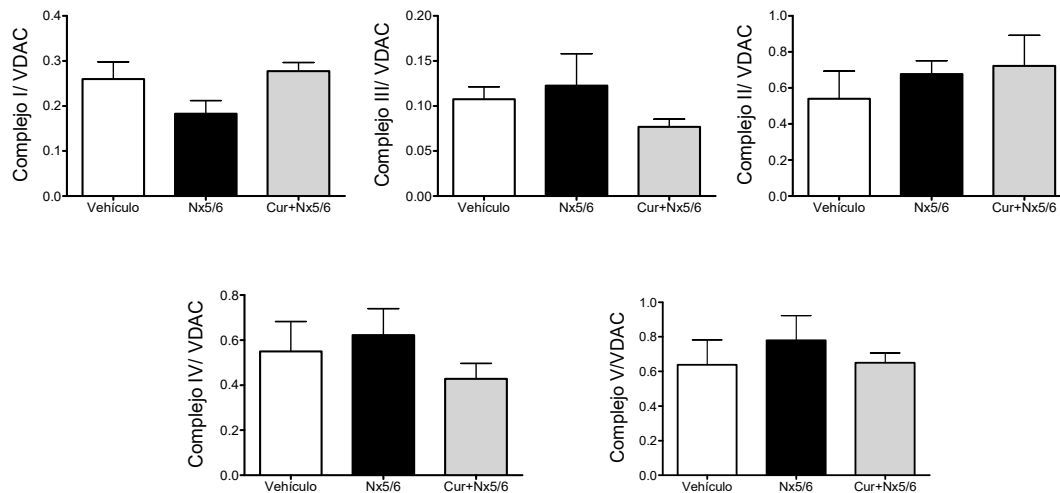


Figura 23. **(A)** Western blot y **(B)** cuantificación por densitometría de algunas de las subunidades de los complejos mitocondriales: subunidad 5 α de la ATPsintasa (ATP5A) (CV), subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (MTCO1) del CIV, subunidad 2 del complejo citocromo b-c1 (UCRC2) del CIII, subunidad hierro-azufre de la succinato deshidrogenasa (SDHB) del CII y subcomplejo 1- β (ubiquinona) de la NADH deshidrogenasa (NDUFB8) del CI. Se utilizó al canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC) como control de carga. Los datos se presentan como la media \pm SEM. $n=4$. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

vía WB algunas de las subunidades de los complejos mitocondriales, utilizando el cóctel de anticuerpos OXPHOS (Abcam, Cambridge, Reino Unido) corriéndose en el mismo gel el control de mitocondrias de corazón bovino (CT+) proporcionado por la compañía (figura 23A). El análisis por densitometría no reveló diferencias significativas entre los grupos para ninguna de las subunidades analizadas (figura 23B).

7.3.6. Niveles de las proteínas de dinámica mitocondrial.

Para determinar si los cambios en la bioenergética repercutían en un desplazamiento de la dinámica mitocondrial, se procedió a evaluar por WB el contenido de las proteínas de fusión

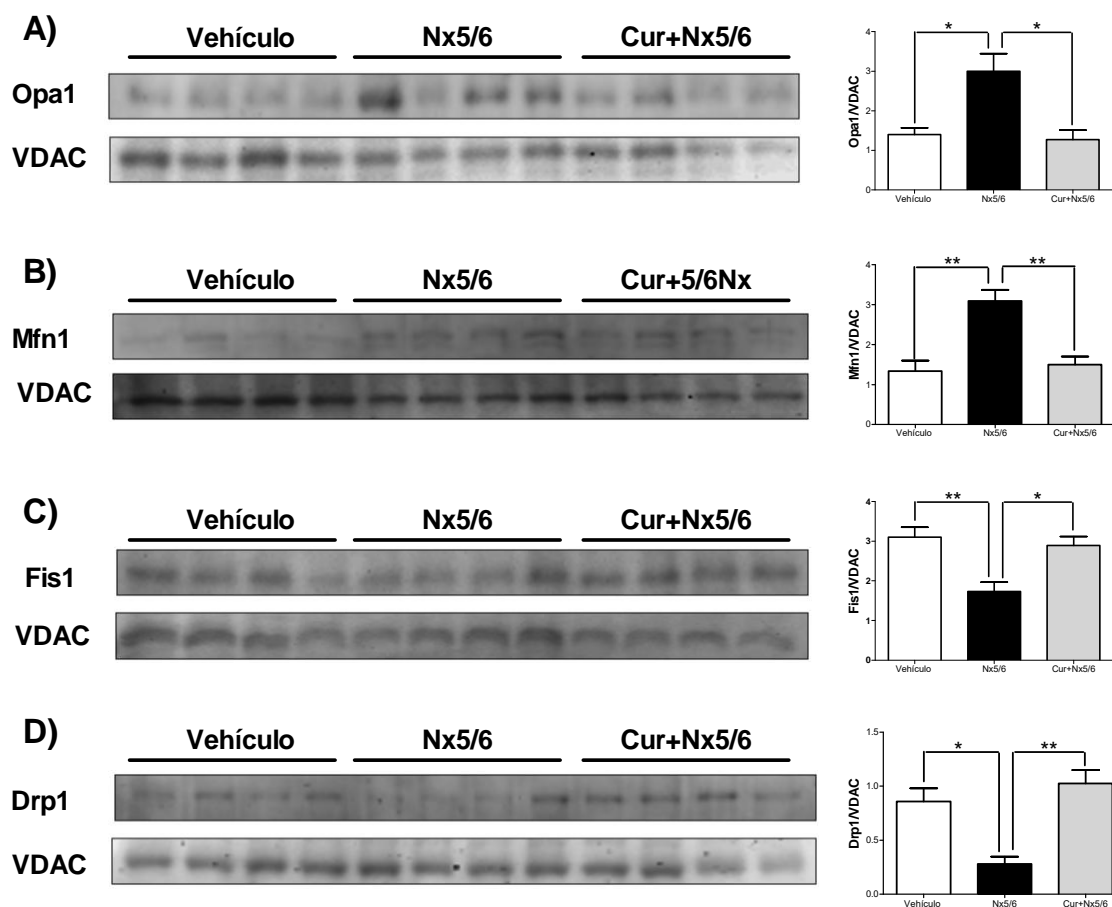


Figura 24. Western blot y cuantificación por densitometría de algunas de las proteínas de fusión mitocondrial **(A)** proteína atrófica óptica 1 (Opa1), **(B)** mitofusina 1 (Mfn1); y de fisión mitocondrial **(C)** proteína de fisión mitocondrial (Fis1) y **(D)** proteína 1 relacionada a la dinamina (Drp1) en aislados de mitocondrias. Se utilizó al canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC) como control de carga. Los datos se presentan como la media \pm SEM. n=4. Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. *p<0.05, **p<0.01.

mitocondrial Mfn1 y Opa1 y a las proteínas de fisión Drp1 Y Fis1. Las ratas nefrectomizadas mostraron un aumento significativo de los marcadores de fusión (figura 24A y 24B) acompañado por una caída en los marcadores de fisión (figura 24C y 24D) con respecto al control, por lo cual la

dinámica mitocondrial se estaría desplazando hacia la fusión en este grupo. Por su parte el pretratamiento con curcumina previno de manera significativa el aumento en los marcadores de fusión y la disminución de los marcadores de fisión.

7.3.7. Microscopía electrónica e inmunomicroscopía en túbulo proximal

Con el objetivo de evaluar los cambios a nivel ultra estructural en la mitocondria, se tomaron células epiteliales del túbulo contorneado proximal de las áreas de tejido conservado para su evaluación por microscopía electrónica de transmisión. Las mitocondrias del grupo control vehículo mostraron una morfología normal (figura 25A). Por su parte, el grupo nefrectomizado mostró mitocondrias más grandes en comparación con el grupo control, con una tenue desaparición de las crestas mitocondriales (figura 25B). Mientras que las mitocondrias del grupo Cur+Nx5/6 también mostraron mitocondrias más grandes que el grupo control pero con crestas muy bien conservada (figura 25C).

Por su parte, con el objetivo de reforzar los datos de dinámica mitocondrial obtenidos por WB, se procedió a evaluar los niveles de la proteína de fusión Mfn1 por inmunomicroscopía electrónica. La cual mostró, una mayor cantidad de innumeraje en el grupo Nx5/6 con respecto al control, situada principalmente en las membranas internas y/o externas de las mitocondrias (figura 25E). Por su parte, las ratas del grupo pretratado con curcumina, mostraron mitocondrias con una cantidad menor de marcaje (figura 25F), lo cual es congruente con los datos obtenidos por WB.

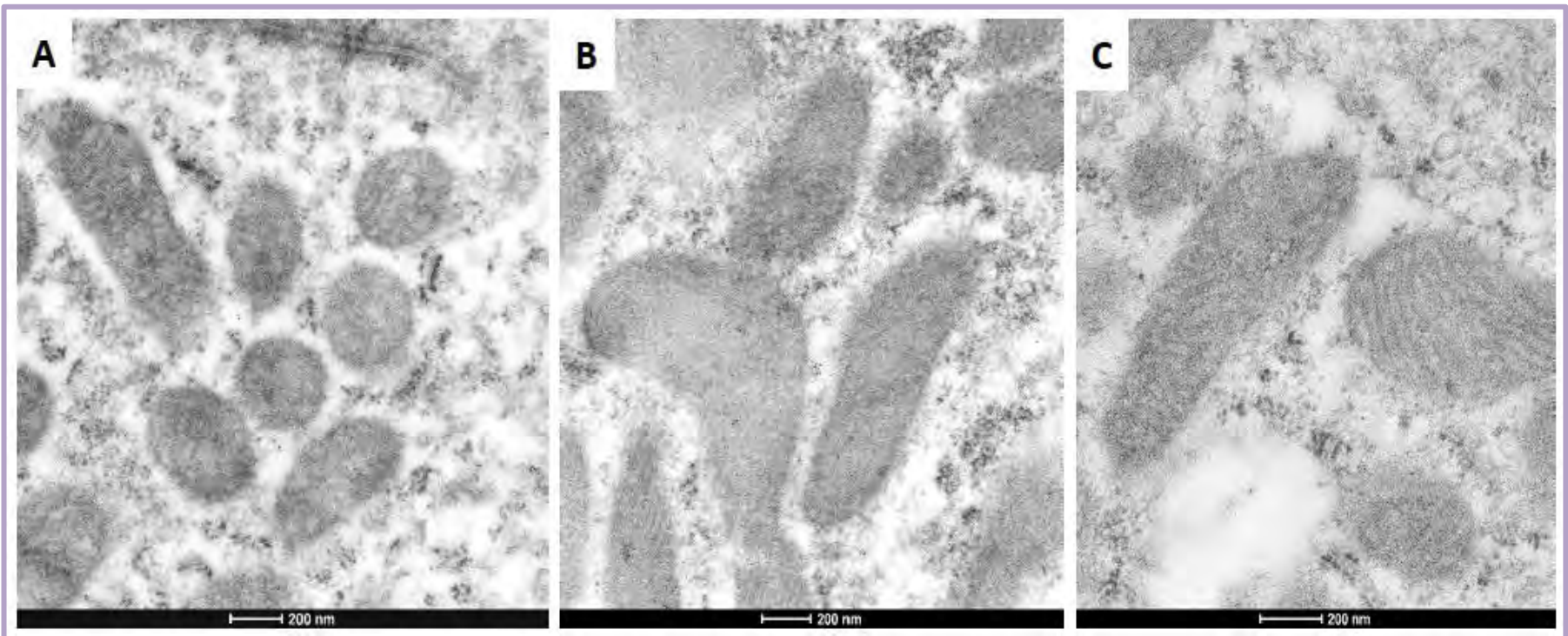


Figura 25.I. Micrografías representativas de microscopía electrónica convencional. **(A)** Mitocondrias de células epiteliales del túbulo proximal contorneado de ratas control (vehículo), las cuales muestran una estructura normal. **(B)** Mitocondrias de células epiteliales del túbulo contorneado proximal del grupo nefrectomizado (Nx5/6), con una morfología larga e irregular y una crestas mitocondriales menos definida. **(C)** Mitocondrias de células epiteliales del túbulo contorneado proximal del grupo nefrectomizado con pretratamiento con curcumina (Cur+Nx5/6), se observan mitocondrias alargadas pero con crestas bien conservadas.

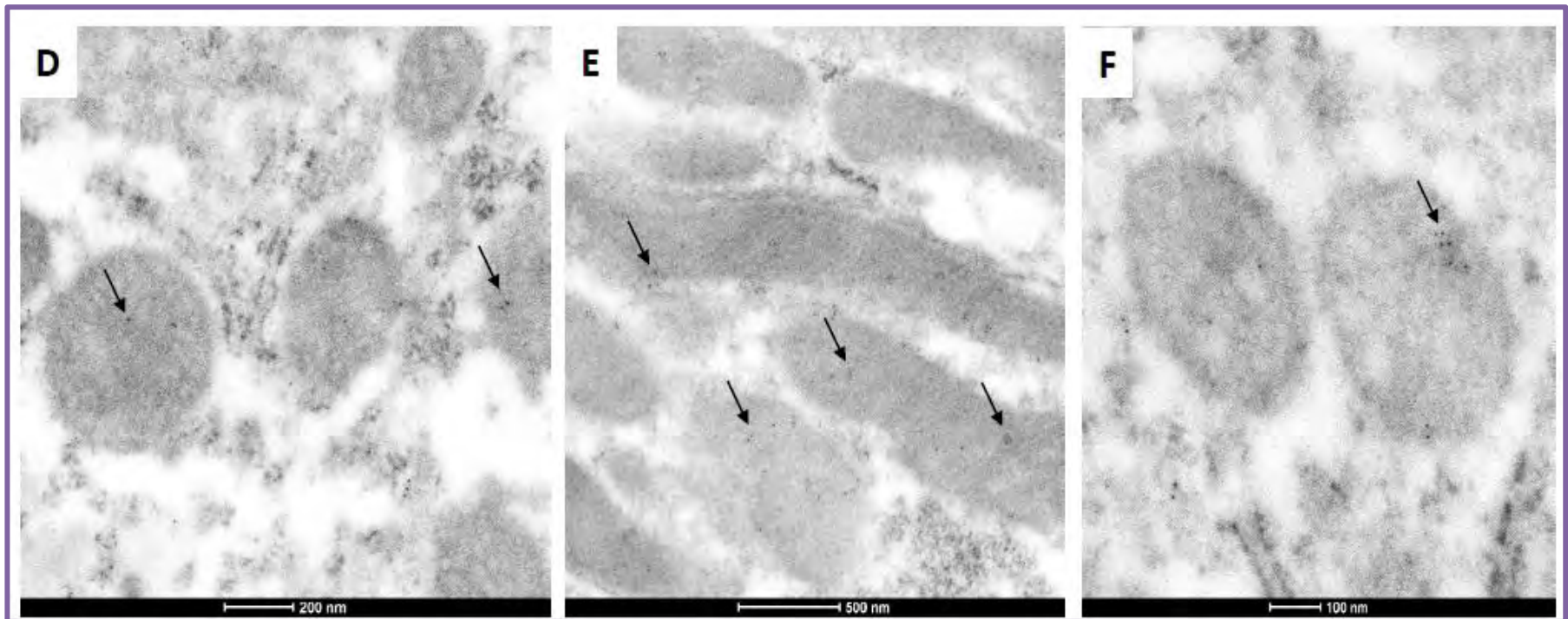


Figura 25.ii. Micrografías representativas de inmunomicroscopía electrónica **(D)** en las células tubulares de los túbulos contorneados proximales de los riñones de los animales de control, las mitocondrias muestran una cantidad inmunomarcaje muy pequeño correspondiente a proteína de fusión mitocondrial Mfn1 (puntos negros marcados por las flechas). **(E)** Por el contrario, las células tubulares epiteliales del grupo nefrectomizado, muestran varias mitocondrias con numerosos puntos negros que correspondientes a la proteína Mfn1 detectada por anticuerpos específicos marcados con oro (flechas). **(F)** Por ultimo las células epiteliales del grupo nefrectomizado pretratado con curcumina muestran mitocondrias con una menor cantidad de la marca para Mfn1.

8. Discusión

8.1. La función renal.

Los resultados obtenidos a 24 horas posteriores a la cirugía revelaron un aumento en las concentraciones de BUN y creatinina en plasma (figura 10), corroborando así la presencia de daño en la masa renal remanente en las ratas nefrectomizadas. Esto se confirmó por la disminución de la GFR, la cual hace evidente una depreciación significativa de la capacidad del riñón para realizar su función. Como lo discutimos anteriormente, en este modelo la disminución de la GFR total es progresiva y correlaciona con la pérdida progresiva de nefronas funcionales (Guyton & Hall, 2011), lo que genera en las restantes un incremento compensatorio en la filtración glomerular por nefrona (snGFR), aumento del flujo sanguíneo glomerular y de la presión glomerular. Estas alteraciones en conjunto llevan a una mayor presión sobre las nefronas restantes, aumento de la presión sobre los capilares glomerulares, lo que genera mayores daños a las barreras de filtración. Dichos cambios hemodinámicos son ocasionadas en parte por alteraciones en el estado de relajación de la vasculatura, especialmente por el aumento en la resistencia de las arteriolas eferentes (Taal & Brenner, 2014), esto es congruente con el aumento en la RVR observado a las 24 horas en el grupo nefrectomizado y la disminución en el RBF total (figura 11).

En este modelo, a tiempos mayores de 15 a 60 días se ha descrito un incremento en la presión arterial sistémica (Edilia Tapia et al., 2013 & 2012) equivalente al presentado en pacientes con ESRD, al cual se le atribuyen las altas tasas de mortalidad debido a fallas cardiovasculares observadas la clínica (Correa et al., 2013). Sin embargo, 24 horas la MAP en el grupo Nx5/6 permaneció invariable con respecto al control (figura 11). Esto sugiere que a 24 horas de la cirugía la masa renal remanente mantiene aún la autorregulación de la presión arterial sistémica.

Por su parte, la curcumina fue capaz de prevenir el aumento en los marcadores de daño renal BUN y creatinina, además de evitar de manera parcial la caída en la GFR (figuras 10A-C), mostrándonos que inclusive como pretratamiento, la curcumina es efectiva en mantener la función renal. Debe resaltarse que las ratas de grupo Cur+Nx5/6 mostraron también menores disfunciones hemodinámicas (aumento de RVR y disminución del RBF) y menores alteraciones histológicas (figura 12), indicándonos en conjunto una menor presión sobre las nefronas restantes, lo que se traduce en un menor daño glomerular y por tanto en una disminución en la velocidad de progresión de la CKD, lo cual es concordante con los estudios de post administración a tiempos largos (Tapia et al., 2013 & 2012).

8.2. El estrés oxidante en los segmentos de la nefrona

Como se describió en los antecedentes, el aumento de la producción de ROS por fuentes no mitocondriales, especialmente por parte de la Nox, es capaz de generar estrés oxidante y disfunción mitocondrial (Daiber, 2010). En el caso de la Nos, un aumento en la producción de óxido nítrico, en combinación con altos niveles del anión superóxido da lugar a la formación del peroxinitrito, este lleva a una disminución en las actividades de distintas enzimas mitocondriales

relacionadas al metabolismo energético, por medio de modificaciones pos traduccionales como la S-nitrosilación (Hess et al., 2005). Por otro lado, se ha asociado la sobreexpresión de la Nox4 y Nox2 con el desarrollo de procesos de fibrosis y de inflamación en el riñón, así como o al deterioro funcional del mismo en diferentes patologías tanto agudas como crónicas (Sedeek et al., 2013).

Por estas razones y debido a que el modelo de nefrectomía 5/6 se caracteriza por un aumento del estrés oxidante (Tapia et al., 2013 & 2012), fue imperativa la evaluación de la producción de superóxido por estas dos enzimas en los segmentos de la nefrona. Esta producción mostró elevarse de manera diferencial en los distintos segmentos de la nefrona en el grupo Nx5/6 con respecto al control, siendo de mayor magnitud en el túbulo proximal y el glomérulo, aunque también se observó un aumento significativo de la misma en el túbulo distal en las ratas nefrectomizadas, aunque de mucha menor magnitud (figuras 15 & 16). Aunado a esto, tanto en túbulo proximal como en el glomérulo se observó una mayor contribución de la Nox con respecto a la Nos en la formación de radical superóxido en el grupo Nx5/6 (figuras 15), en ambos casos esto se acompañó de una caída en la actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos con respecto al grupo control, sin embargo esta última fue mucho más marcada en el PT (tabla 2).

Dado la alta densidad mitocondrial descrita en el PT y la mayor susceptibilidad de las mismas a sufrir desacoplamiento y cambios en el potencial de membrana (Hall et al., 2009), podríamos especular que las alteraciones observadas en la mitocondria pudiesen generar una producción de especies reactivas de mayor magnitud en este segmento con respecto a los demás. Esto llevaría a una mayor producción de superóxido por la Nox (figura 15), vía la activación por modificación postraduccional de alguna de las isoformas de la proteína quinasa C por las ROS (ya que no se observó aumento en los niveles de proteína de la PKC β II (figura 18A)), lo que resultaría en la fosforilación observada de la p47hox (figura 18B) y mayores niveles de estrés oxidante.

Por su parte, el túbulo distal no solo presentó un aumento menos marcado en la producción de superóxido (figura 15), sino también una menor caída en los sistemas antioxidantes enzimáticos. Como lo esperábamos esto sugiere que el daño es menor en dicho segmento, lo cual concordaría con la idea de que los segmentos más ricos en mitocondrias y con mayor dependencia del metabolismo aerobio son los más afectados. Cabe destacar que la aplicación de inhibidores específicos para la Nos y la Nox no disminuyó la fluorescencia en los ensayos (figura 15), implicando así que dichas enzimas no son las principales fuentes de producción de superóxido en el DT. Por ello se procedió a realizar la inhibición con alopurinol (figura 16), un inhibidor específico de la enzima xantina oxidasa, esta reveló que dicha enzima es la principal productora de superóxido en el DT en ratas nefrectomizadas.

En cuanto a la TAC correspondiente LMWA en homogenados de riñón completo, la administración de la curcumina como pretratamiento no solo atenuó la caída en la capacidad antioxidante total de LMWA, sino que también la aumentó con respecto al control (figura 13). Este incremento podría ser una primera manera de atenuar la disminución de la capacidad antioxidante enzimática en el riñón, previniendo así un mayor daño. Si esto fuera cierto, la preservación de la capacidad

antioxidante total en tejido renal explicaría el por qué la caída en el área bajo la curva se atenuó en el grupo pretratado con curcumina, con respecto al grupo nefrectomizado (figura 14).

Si bien la preadministración de curcumina por 7 días abatió significativamente la producción de superóxido en todos los segmentos de la nefrona, contrario a lo esperado, no se encontró una recuperación significativa en las ratas con pretratamiento en la expresión de las enzimas catalasa, SOD2 y GR en el túbulo proximal (figura 17), enzimas que recuperaron de manera parcial sus actividades en el túbulo proximal con la preadministración de curcumina. Esto indicaría que el efecto protector de la curcumina como preadministración está más ligada a su capacidad como antioxidante directo que a su efecto como antioxidante indirecto, como lo demostró la recuperación de la TAC-LMWA en homogenados de riñón evaluada por CV (figura 13), aunque cabe resaltar que esta última se le ha dado una mayor importancia en modelos de posadministración como los desarrollados por [Tapia et al. \(2012\)](#).

8.3. Función mitocondrial

La evaluación de la respiración en mitocondrias aisladas de riñón total reveló un desacoplamiento de las mitocondria, evidenciado por una disminución significativa del estado 3, el CR y el cociente ADP/O así como un aumento en el estado 4 durante la respiración inducida por malato/glutamato en las ratas nefrectomizadas con respecto al control (figura 21). Por otro lado no se observaron variaciones significativas en la respiración alimentada por succinato. La evaluación de la actividad de los complejos mitocondriales en dichas muestras, reveló una caída significativa en la actividad de los complejos I y V en el grupo de Nx5/6 (figura 22B & C), por lo que podemos atribuir el desacoplamiento observado en la respiración inducida por malato/glutamato a una caída en la actividad de los complejos I y V.

[Benipal & Lash \(2011\)](#) & [Fedorova et al. \(2013\)](#) sustentándose en la hipótesis de la sobrecarga han planteado que la reducción de la masa renal, genera un hipermetabolismo desencadenado por el aumento en la tasa de reabsorción y la actividad de la $\text{Na}^+/\text{ATPase}$ ([Katz et al., 1979](#)), esto lleva a condiciones de estrés en las fuentes de producción energética. En el caso de la mitocondria este estrés ocasionaría la sobreactivación de la cadena de transporte de electrones y el aumento en la producción de ROS por la misma, así como el aumento del estrés oxidante en la misma, llevando a una posterior disminución en la eficiencia de producción de ATP y al aumento el consumo total de oxígeno en las nefronas restantes observado las 3 semanas de la cirugía ([Nath et al., 1990](#)).

Los datos obtenidos en nuestro estudio no sólo concuerda con la hipótesis de la sobrecarga, sino que también explican la reducción en la producción de ATP a partir de la caída en las actividades de los complejos I y V mitocondriales. Al mismo tiempo, esta disfunción mitocondrial lleva al aumento de la producción de ROS por la mitocondria, como lo muestran los mayores niveles de producción de peróxido en las ratas nefrectomizadas (figura 19). [Benipal & Lash \(2011\)](#) plantearon que la sobreexpresión de transportadores de GSH en la membrana plasmática, observada a 10 días después de uninefrectomía, conduce al aumento de los niveles de glutatión en las mitocondrias como una medida de defensa contra el estrés oxidante en la misma, previniendo así la disminución en la actividad de la enzima aconitasa (usada como marcador de estrés oxidante en

la mitocondria). Esto concordaría con los mayores niveles de MDA y la disminución en las actividades de las enzimas antioxidantes en la mitocondria encontradas en el grupo Nx5/6 encontrado en nuestro modelo (figura 2)..

Por otro lado, la curcumina fue capaz de prevenir el desacoplamiento mitocondrial, visto como el aumento del estado 4, la caída en el estado 3, en el CR y en la relación ADP/O), al amortiguar la caída de las actividades del complejo I y V, esto se explica en parte ya que la curcumina previno el aumento del estrés oxidante en la mitocondria (visto como la disminución en los niveles de MDA) y a la preservación de las actividades de SOD y GPX mitocondriales, evitando además el aumento en la de producción de peróxido de hidrógeno por la misma.

[Fedorova et al. \(2013\)](#) han planteado que existe una correlación ente el hipermetabolismo y el aumento en el área mitocondrial en la nefrona, fenómenos que se estarían dando entre los primeros días y la segunda semana posteriores a la nefrectomía. Este aumento del área mitocondrial, es mayor en el túbulo proximal y tiene un pico en el mismo a los 5 días posteriores a la cirugía ([Johnson & Amendola, 1968](#)) ([Norman et al., 1990](#)). Sin embargo los datos de los niveles de los subcomplejos de las proteínas de la cadena respiratoria por WB evaluados en este trabajo, no revelaron cambios significativos entre los diferentes grupos (figura 23), sugiriendo así que las alteraciones observadas no se deben a cambios en los niveles de expresión de las proteínas mitocondriales. Dichos resultados junto con los análisis de hibridación DNA en la primera semana ([Norman et al., 1990](#)) y de proteómica ([Fedorova et al., 2013](#)) a 28 días, muestran que no hay indicios de biogénesis mitocondrial en este modelo. Esto nos llevó a hipotetizar que los fenómenos de dinámica mitocondrial y más específicamente la fusión mitocondrial, podrían ser los responsables del aumento en el área mitocondrial observado en el PT.

La evaluación por WB de las proteínas de fusión mitocondrial (Mfn1 y Opa1) y de fisión mitocondrial (Fis1 y Drp), reveló un aumento de las primeras en el grupo Nx5/6 sin alteraciones significativas en las segundas (figura 24), señalando así un aumento en la fusión mitocondrial, el cual es prevenido por la pre administración de curcumina. Esto fue comprobado por microscopía electrónica, donde se observaron un mayor número de fenómenos de fusión mitocondriales en los PTs de la masa renal remanente en el grupo nefrectomizado, ratificado por la localización de la proteína Mfn1 en la mitocondria por inmunomicroscopia electrónica (figura 25B & D). Por otro lado, se ha descrito que la autofagia, fenómeno relacionado con la mitofagia y el reemplazo de las mitocondrias dañadas, está detenida en este modelo ([Fedorova et al., 2013](#)) a cuatro semanas. En conjunto esto nos permitiría sugerir que la nefrectomía lleva a un aumento temprano de la fusión mitocondrial en un intento por restituir la pérdida de la función mitocondrial generada por el desajuste energético, ocasionando así el acumulamiento de mitocondrias dañadas. Por su parte la preadministración de curcumina, previno la fusión mitocondrial, vista como la disminución en los marcadores de fusión y la inmunolocalización de Mfn1 en la mitocondria, al mantener la integridad de las mismas (figura 25F).

Se sabe desde hace tiempo, que las modificaciones postraduccionales por ROS o sus derivados son capaces de alterar el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones ([Holmström &](#)

Finkel, 2014) por modificación covalente de sus cisteínas (Cys). De entre los complejos mitocondriales el complejo I y IV parecen ser los más susceptibles a dichas modificaciones, las cuales tienden a disminuir sus actividades de manera significativa (Piantadosi, 2012). Kang et al. (2012) demostraron que tanto en miocitos *in vivo* como en células HL *in vitro*, en respuesta al aumento en el estrés oxidante el complejo I mitocondrial puede sufrir modificaciones postraduccionales tanto irreversibles y como reversibles (específicamente en las subunidades 51 y 75 kDa), las cuales están mediadas por mecanismos dependientes de las ROS y radicales tiol. Estas modificaciones llevan a la caída de la actividad del complejo I y al aumento en la producción de ROS por el mismo, este aumento solo es reducido significativamente con el uso de rotenona o anticuerpos específicos contra cisteínas que bloquean el sitio de unión a la ubiquinona en el complejo I. Además, por medio del uso de proteómica estructural y modelado molecular, fueron capaces de demostrar que la modificación inducida por el estrés oxidante en la Cys 727 en la subunidad 75 KDa (cerca al sitio de unión de la ubiquinona) es la responsable del aumento en la producción de ROS. En nuestro trabajo, el aumento en el estrés oxidante en todos los segmentos de la nefrona, la caída en los sistemas antioxidantes y la mayor producción de peróxido en el grupo nefrectomizado podría indicar que el aumento inicial en el estrés oxidante lleva a la modificación postranscripcional en el complejo I respiratorio, induciendo la caída en su actividad y el aumento en la producción de ROS por la mitocondria, sin embargo estudios de proteómica más complejos son necesarios para confirmar esta hipótesis. Sin embargo, una evidencia que apoya esta teoría es el hecho de que solamente la adición de rotenona fue capaz de reducir la producción mitocondrial de H₂O₂, cuando se alimenta la ETC con malato/glutamato y también con succinato (figura 19B & C).

Por último, la evaluación indirecta del potencial mitocondrial en mitocondrias de riñón completo, no presentó variación significativa del mismo (figura 22C). La explicación a este fenómeno la podríamos encontrar en los estudios de microscopía confocal de excitación multifotónica realizados por Hall et al. (2014 & 2009), donde se demostró que ante retos como isquemia-reperfusión e hipoxia el potencial de membrana mitocondrial se colapsa rápidamente en los PT no así en los DT. Los autores además sugieren que esto podría deberse a diferencias en la actividad de hidrólisis ATP por parte de la ATP sintasa y a las diferencias metabólicas entre los dos segmentos. Tomando en cuenta dichos datos, en nuestro modelo la nefrectomía generaría respuestas distintas en el potencial de membrana (tal y como lo hizo en la producción de superóxido por la Nox) en cada segmento de la nefrona, lo que pudiese enmascarar los cambios entre los diferentes grupos.

8.4. Planteamiento de un sistema de aumento del estrés oxidante Nox-mitocondria.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la nefrectomía indujo el colapso de los sistemas antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos y el aumento en la producción de superóxido por la Nos y Nox en la nefrona a las 24 h. Estos cambios fueron diferenciales en los segmentos evaluados de la nefrona, siendo el aumento del estrés oxidante y por tanto el daño mayor en el túbulo proximal.

Se ha relacionado una sobre regulación en los niveles de las subunidades de la Nox a la progresión del deterioro renal por estrés oxidante en modelos de reducción de la masa renal (Kim & Vaziri, 2010) & (Vaziri et al., 2007). Asimismo, se ha reportado que aumentos en la producción de superóxido por la Nox son capaces de inducir disfunción mitocondrial (Daiber, 2010). Dentro de las distintas isoformas de la Nox, la sobre expresión de la Nox4 (isoforma predominante en el riñón) es capaz de disminuir la actividad del complejo I mitocondrial, aumentar la producción H_2O_2 por la misma y propiciar la ruptura de la red mitocondrial en células de músculo liso (Koziet et al., 2013). Aunado a esto la sobre activación sostenida de las isoformas Nox4 y Nox2 se ha relacionado con la degeneración en la CKD en modelos de daño renal (Sedeek et al., 2013). Más específicamente en modelos de nefrectomía 5/6 se ha reportado un aumento de entre el 20 al 40% en los niveles de las subunidades gp91phox, p22phox y p47phox de la Nox a las 8 semanas de la nefrectomía, el cual correlacionó con mayores niveles de proteinuria y creatinina en plasma (Vaziri et al., 2007) & (Gorin, 2013). Dichos datos concuerdan con los aumentos observados en la producción de superóxido por la Nox, siendo nosotros hasta donde sabemos los primeros en reportar que inclusive a 24 horas ya existe un incremento en la producción de superóxido, el cual además fue diferencial en la nefrona. Por su parte la preadministración de curcumina fue capaz de evitarlo, así como el desacoplamiento mitocondrial, el incremento en la producción de peróxido por la mitocondria, el incremento en los niveles de MDA, además de que preservó las actividades de la SOD y GPx mitocondriales, apoyando la teoría de que la sobreactivación de la Nox puede ser la causante del desajuste mitocondrial.

Por otro lado, se ha visto que las ROS mitocondriales son capaces de llevar a una rápida activación de las distintas isoformas de la Nox, por la activación de cinasas como las PKC- β y ϵ . Estas isoformas poseen motivos estructurales sensibles a modificación covalente por las ROS, los cuales llevan a la activación de la cinasa, permitiendo así la fosforilación de la subunidad activadora p47phox y la translocación de la misma a la membrana, lo que desemboca en la activación de la Nox (Rathore, Zheng, & Niu, 2008) & (Wenzel et al., 2008). Aunado a esto, dentro del modelo de daño renal inducido por cisplatino, se sabe que éste lleva al aumento en los niveles de la PKC- β II en el túbulo distal, generando la activación de la Nox. Asimismo, la postadministración de curcumina fue capaz de revertir esta sobreexpresión de la PKC β 2, evitando así la producción de superóxido por la Nox en ese modelo (Trujillo et al., 2016).

En nuestro modelo, la evaluación PKC- β II por WB en el túbulo proximal no mostró cambios significativos entre los grupos. Esto podría sugerir que la activación de la Nox a tiempos tempranos no está relacionada con el aumento en los niveles de expresión de la PKC β 2, sino más bien con la activación por modificación covalente vía ROS de la misma. Igualmente, podemos considerar que el tiempo evaluado (24 horas) fue demasiado corto para observar cambios en la cantidad de proteína de esta enzima. Para ratificar esta hipótesis se evaluó la fosforilación de la serina 304 (S304) de la subunidad p47phox de la Nox, modificación que además se ha vinculado con la activación de las PKC- β y ϵ por ROS (Cosentino-Gomes, Rocco-Machado, & Meyer-Fernandes, 2012), la cual resulta en un cambio conformacional de esta subunidad, permitiendo su unión a las otras subunidades de la Nox y la activación de la misma (Brandes et al., 2014). El análisis por WB

reveló que dicha fosforilación aumenta significativamente en el grupo nefrectomizado, sugiriendo que la misma está involucrada en generar la activación de la Nox en el túbulo proximal, lo que conduce a aumento de la producción de ROS y posiblemente también a la disfunción mitocondrial.

Para integrar los resultados obtenidos se propone el modelo presentado en el esquema graficado de la figura 25. En este y de acuerdo con la hipótesis de la sobre carga, la nefrectomía 5/6 induce modificaciones en el metabolismo renal en la masa renal remanente como resultado del aumento compensatorio de la $snGFR$ y la reabsorción renal. Estas alteraciones llevan a un estrés energético que junto con el aumento del estrés oxidante en la mitocondria conduce a la caída de las defensas antioxidantes de la mitocondria y a la pérdida en la actividad de los complejos I y V mitocondriales (posiblemente por modificaciones post-transcripcional inducidas por las ROS), llevando al desacoplamiento mitocondrial, una mayor producción de ROS por la misma y a la fusión mitocondrial como un mecanismo compensatorio. Así mismo, estas ROS mitocondriales podrían llevar a la activación de alguna de las isoformas de la PKC, que fosforila en la S304 a la subunidad p47phox, permitiendo su translocación a la membrana y la activación de la Nox, produciendo el incremento en la producción de superóxido, lo que genera daños posteriores en las mitocondrias y los segmentos de la nefrona. En conjunto este mecanismo desemboca en un círculo vicioso de aumento del estrés oxidante, lo que genera mayor daño en las nefronas remanentes y la modificación posterior de la hemodinámica renal, dando lugar a un mecanismo de progresión de la CKD por la disfunción mitocondrial en el modelo de nefrectomía 5/6.

Además, el aumento del estrés oxidante en la nefrona ocasionado por la nefrectomía, es diferencial a lo largo de la misma, siendo de mayor magnitud en el túbulo proximal. En este segmento el sistema Nox-mitocondria planteado podría tener una importante contribución en la génesis y progresión del daño, dada la alta densidad mitocondrial y los altos niveles de expresión de las Nox.

Por su parte, la preadministración de curcumina fue capaz de prevenir el aumento en el estrés oxidante, inhibiendo la producción de superóxido en todos los segmentos de la nefrona al evitar la fosforilación de p47phox (posiblemente al evitar la activación de la PKC) y evitando la caída en los sistemas antioxidantes no enzimáticos en el riñón. Debido a que la curcumina evitó el aumento del estrés oxidante en toda la nefrona y en especial en el túbulo proximal, fue capaz de prevenir el desacoplamiento de la mitocondria inducido por este aumento. Esto gracias a la preservación de la actividad del complejo I y V, lo que se refleja en una disminución de la producción de peróxido de hidrógeno por la misma, la conservación de las actividades de la SOD Y GPx en la mitocondria, el mantenimiento de las crestas mitocondriales y menores niveles de MDA en la misma. Al mantenerse la integridad de la función mitocondrial, la curcumina previene a su vez la fusión mitocondrial y la activación del bucle degenerativo de incremento en la producción de ROS Nox-mitocondria, lo que se tradujo en una disminución del daño y la preservación de la función renal.

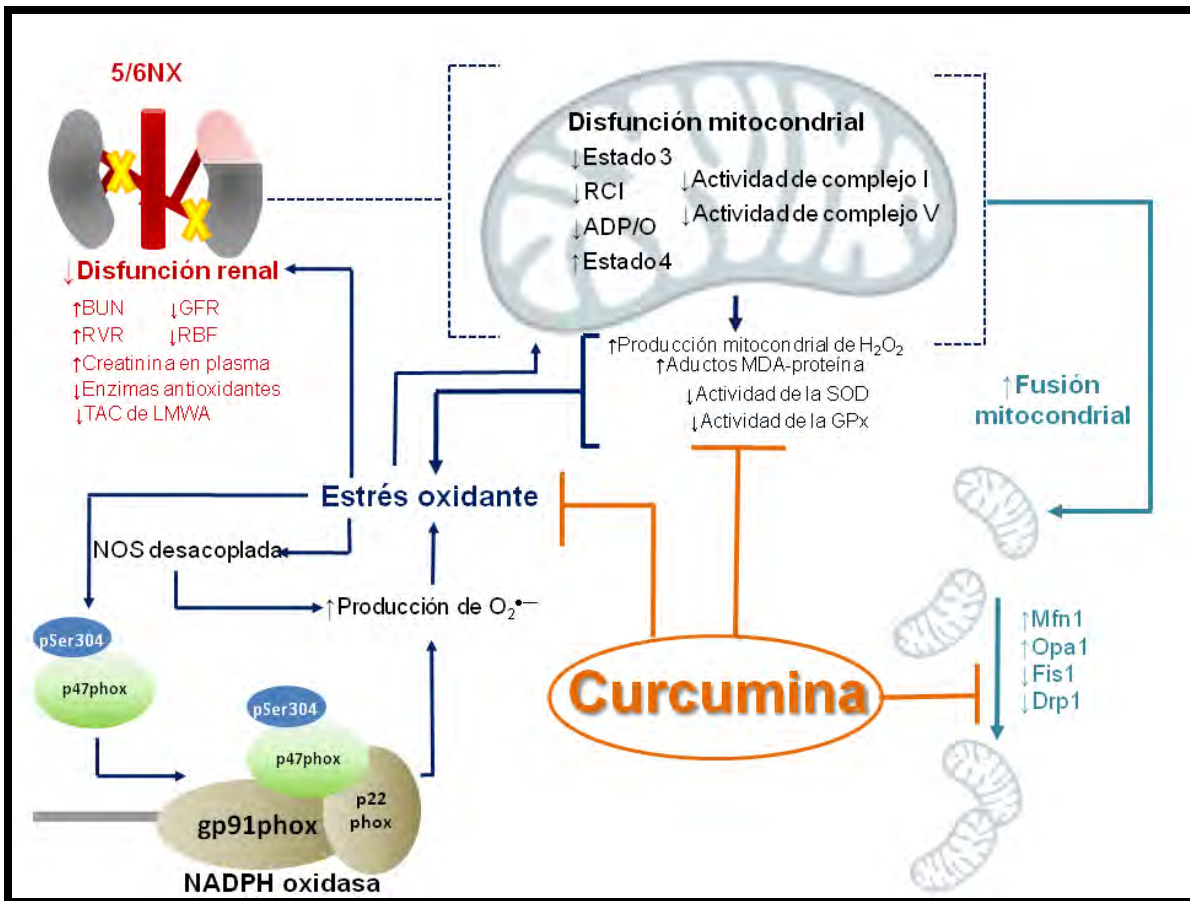


Figura 25. Resumen gráfico. Veinticuatro horas después de la Nx5/6, el pretatamiento con curcumina fue capaz de aminorar en las mitocondrias las alteraciones tempranas en el bioenergética inducidas por la Nx5/6. Las cuales se caracterizan por la disminución de estado 3, el índice de control respiratorio (RCI), la relación ADP/O y el aumento de estado 4 en la respiración alimentada por malato/glutamato, como resultado de la disminución en la actividad de los complejos I y V mitocondriales.

Además, la curcumina evitó el aumento del estrés oxidante en la mitocondria, que se caracterizó por el aumento en la producción de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) mitocondrial, los altos niveles de (MDA) y la disminución de las actividades de la superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en la misma. Este podría estar relacionado al aumento del estrés oxidante en la nefrona (confirmado por el aumento en la producción del anión superóxido (O₂^{•-}) por la NADPH oxidasa (Nox), ya que el peróxido mitocondrial podría activar a alguna isoforma de la proteína cinasa C, lo que explicaría la fosforilación observada en el serina 304 (pSer304) de la subunidad p47phox, generando un círculo vicioso de aumento del estrés oxidante por la Nox y la mitocondria.

Por último, la curcumina también evita el aumento de fusión mitocondrial, inducido por la Nx5/6 y evidenciado por la microscopía electrónica y aumento en los niveles de los marcadores de fusión: mitofusina 1 (Mfn1) y de atrofia óptica 1 (OPA1); y por disminución de la expresión de los marcadores de: proteína de fisión mitocondrial 1 (Fis1) y proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp1).

Gracias a todo esto, la curcumina fue capaz de preservar la función renal, lo que se evidenció al aminorar el aumento del nitrógeno ureico en sangre (BUN), la resistencia vascular renal (RVR) y la creatinina plasmática; así como la disminución en la tasa de filtración glomerular (GFR), el flujo sanguíneo renal (RBF), la actividad de las enzimas antioxidantes y la capacidad antioxidante total (TAC) de antioxidantes de bajo peso molecular (LMWA). Por lo que la curcumina podría ser una alternativa terapéutica prometedora.

9. Conclusiones.

- El pretratamiento con curcumina disminuye la inducción temprana de alteraciones en la dinámica, la bioenergética y el estrés oxidativo mitocondrial generados por la nefrectomía 5/6. Esto puede asociarse a la preservación de la función renal.
- La disfunción mitocondrial contribuye a la modificación de los parámetros renales y hemodinámicos, llevando a la generación de un daño posterior en las nefronas remanentes, lo que contribuiría a la progresión de la CKD en este modelo.
- El sistema Nox-mitocondria podría tener una contribución importante en la génesis y progresión de la CKD inducida por nefrectomía 5/6, a través de un circuito degenerativo de promoción de la producción de ROS.

10.Perspectivas

- El tratamiento con curcumina podría ser una alternativa viable para disminuir y/o prevenir la progresión de la enfermedad renal crónica en pacientes. Para confirmar esto sería necesario primero realizar estudios clínicos en pacientes.
- Se plantea realizar estudios de proteómica en mitocondrias aisladas de riñón, con el objetivo de profundizar en el mecanismo por el cual el pretratamiento con curcumina induce la protección en la mitocondria.
- Se plantea también realizar estudios en tiempos cercanos a las 24 horas (posteriores a la nefrectomía), para profundizar en los mecanismos que permiten la recuperación de la función mitocondrial.

11. Referencias

- Affairs, V., & Orleans, N. (1998). Metabolic support of collecting duct transport, *53*, 408–415.
- Akinlolu, O. (2014). Addressing the global burden of chronic kidney disease through clinical and translational research. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, *125*(1), 229–43; discussion 243–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4112688&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Amato, D., Alvarez-Agular, C., Limones-Castañeda, R., Rodriguez, E., Avila-Diaz, M., Arreola, F., ... Panigua, R. (2005). Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population. *Kidney International*, *68*, 11–17. Retrieved from <http://www.nature.com/articles/4496424>
- An, W. S., Kim, H. J., Cho, K.-H., & Vaziri, N. D. (2009). Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *297*(4), F895–903. <http://doi.org/10.1152/ajprenal.00217.2009>
- Anand, P., & Kunnumakkara, A. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular ...*, *4*(6), 807–818. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp700113r>
- Barazzoni, R., Zhu, X., Deboer, M., Datta, R., Culler, M. D., Zanetti, M., ... Marks, D. L. (2010). Combined effects of ghrelin and higher food intake enhance skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity and AKT phosphorylation in rats with chronic kidney disease. *Kidney International*, *77*(1), 23–8. <http://doi.org/10.1038/ki.2009.411>
- Benipal, B., & Lash, L. H. (2011). Influence of renal compensatory hypertrophy on mitochondrial energetics and redox status. *Biochemical Pharmacology*, *81*(2), 295–303. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.10.010>
- Benipal, B., & Lash, L. H. (2013). Modulation of mitochondrial glutathione status and cellular energetics in primary cultures of proximal tubular cells from remnant kidney of uninephrectomized rats. *Biochemical Pharmacology*, *85*(9), 1379–88. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.013>
- Block, K., Gorin, Y., & Abboud, H. E. (2009). Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(34), 14385–90. <http://doi.org/10.1073/pnas.0906805106>
- Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology & Medicine*, *76*, 208–26. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046>
- Brenner Rector. (2011). Anatomy of the Kidney. *Taal: Brenner and Rector's The Kidney, 9th Ed.*, 1–111. <http://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6193-9.10002-8>
- Cano-Ramírez, D., Torres-Vargas, C. E., Guerrero-Castillo, S., Uribe-Carvajal, S., Hernández-Pando, R., Pedraza-Chaverri, J., & Orozco-Ibarra, M. (2012). Effect of glycolysis inhibition on mitochondrial function in rat brain. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *26*(5), 206–211. <http://doi.org/10.1002/jbt.21404>
- Che, R., Yuan, Y., Huang, S., & Zhang, A. (2014). Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *306*(4), F367–78. <http://doi.org/10.1152/ajprenal.00571.2013>
- Correa, F., Buelna-Chontal, M., Hernández-Reséndiz, S., R García-Niño, W., J Roldán, F., Soto, V., ... Zazueta, C. (2013). Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease. *Free Radical Biology & Medicine*, *61*, 119–29. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.017>
- Cosentino-Gomes, D., Rocco-Machado, N., & Meyer-Fernandes, J. R. (2012). Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(9), 10697–10721. <http://doi.org/10.3390/ijms130910697>
- Daiber, A. (2010). Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1797*(6-7), 897–906. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.032>
- Doucet, A., & Katz, A. I. (1982). High-affinity Ca-Mg-ATPase along the rabbit nephron. *American Journal of Physiology*, *242*, F346–F352.
- El Nahas, A. M., & Aminu, K. B. (2005). Chronic kidney disease: the global challenge. *The Lancet*. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)70199-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)70199-9)
- Fedorova, L. V., Tamirisa, A., Kennedy, D. J., Haller, S. T., Budnyy, G., Shapiro, J. I., & Malhotra, D. (2013). Mitochondrial impairment in the five-sixth nephrectomy model of chronic renal failure: proteomic approach. *BMC Nephrology*, *14*(1), 209. <http://doi.org/10.1186/1471-2369-14-209>

- Fernández-Rojas, B., Rodríguez-Rangel, D. S., Granados-Castro, L. F., Negrette-Guzmán, M., León-Contreras, J. C., Hernández-Pando, R., ... Pedraza-Chaverri, J. (2015). C-phycocyanin prevents cisplatin-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *406*(1-2), 183–197. <http://doi.org/10.1007/s11010-015-2436-9>
- Fogo, A. B., Cohen, A. H., Colvin, R. B., Jennette, J. C., & Alpers, C. E. (2014). *Fundamentals of Renal Pathology*. (Springer, Ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-39080-7>
- Gallardo Vidal, L. S., Rodríguez Méndez, A. J., Burgos Ochoa, M., Martínez Martínez, M. L., García Solís, P., Villagrán Herrera, M. E., & Pérez Baza, A. M. (2015). Utilidad de un modelo de predicción para la enfermedad renal crónica en una unidad de primer nivel de atención. *Nefrología*, (x x), 3–5. <http://doi.org/10.1016/j.nefro.2015.10.010>
- Garrido, A. M., & Griendling, K. K. (2009). NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *302*(2), 148–58. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2008.11.003>
- Ghosh, S. S., Massey, H. D., Krieg, R., Fazalbhoy, Z. a, Ghosh, S., Sica, D. a, ... Gehr, T. W. B. (2009). Curcumin ameliorates renal failure in 5/6 nephrectomized rats: role of inflammation. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *296*(5), F1146–57. <http://doi.org/10.1152/ajprenal.90732.2008>
- Gill, P., & Wilcox, C. (2006). NADPH oxidases in the kidney. *Antioxidants & Redox Signaling*, *8*(2). Retrieved from <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2006.8.1597>
- Goncalves, R. L. S., Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V, Hey-Mogensen, M., & Brand, M. D. (2015). Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(1), 209–27. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.619072>
- Gonzalez-flecha, B., Cutrin, J. C., & Boveris, A. (1993). Time Course and Mechanism of Oxidative Stress and Tissue, *91*(February), 456–464.
- Gorin, Y. (2013). Nox4 as a potential therapeutic target for treatment of uremic toxicity associated to chronic kidney disease. *Kidney International*, *83*(4), 541–3. <http://doi.org/10.1038/ki.2012.434>
- Granados-Castro, Luis Fernando Rodríguez Rangel, D. S., Monta, M., Ramos, C., & Pedraza-Chaverri, J. (2013). Wood smoke exposure induces a decrease in respiration parameters and in the activity of respiratory complexes I and IV in lung mitochondria from guinea pigs. *Environmental ...*, 1–11. <http://doi.org/10.1002/tox>
- Granata, S., Zaza, G., Simone, S., Villani, G., Latorre, D., Pontrelli, P., ... Pertosa, G. (2009). Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC Genomics*, *10*, 388. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-10-388>
- Guder, W. G., Wagner, S., & Wirthensohn, G. (1986). Metabolic fuels along the nephron : Pathways and intracellular mechanisms of interaction GlutamineW, *29*.
- Gvozdjákoá, A. (2008). *Mitochondrial Medicine. Mitochondrial metabolism, disease diagnosis an therapy*. (Springer, Ed.).
- Hall, A. M., Rhodes, G. J., Sandoval, R. M., Corridon, P. R., & Molitoris, B. A. (2014). In vivo multiphoton imaging of mitochondrial structure and function during acute kidney injury. *Kidney International*, *83*(1), 72–83. <http://doi.org/10.1038/ki.2012.328>
- Hall, A. M., Unwin, R. J., Parker, N., & Duchon, M. R. (2009). Multiphoton imaging reveals differences in mitochondrial function between nephron segments. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, *20*(6), 1293–302. <http://doi.org/10.1681/ASN.2008070759>
- Harris, S. I., Balaban, R. S., Barrett, L., & Mandel, L. J. (1981). Mitochondrial respiratory capacity and Na⁺- and K⁺-dependent adenosine triphosphatase-mediated ion transport in the intact renal cell. *Journal of Biological Chemistry*, *256*(20), 10319–10328.
- Hauser, P., Kainz, A., Perco, P., Bergmeister, H., Mitterbauer, C., Schwarz, C., ... Oberbauer, R. (2005). Transcriptional response in the unaffected kidney after contralateral hydronephrosis or nephrectomy. *Kidney International*, *68*(6), 2497–2507. <http://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00725.x>
- Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, *39*(4), 199–218. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>
- Hayslett, J. P., Kashgarian, M., & Epstein, F. H. (1968). Functional correlates of compensatory renal hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation*, *47*(4), 774–799. <http://doi.org/10.1172/JCI105772>

- He, H.-J., Wang, G.-Y., Gao, Y., Ling, W.-H., Yu, Z.-W., & Jin, T.-R. (2012). Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. *World Journal of Diabetes*, 3(5), 94. <http://doi.org/10.4239/wjd.v3.i5.94>
- Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H. E., & Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(2), 150–166. <http://doi.org/10.1038/nrm1569>
- Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(6), 411–21. <http://doi.org/10.1038/nrm3801>
- Hsu, C. (2012). *Epidemiology of Kidney Disease. Brenner&Rector's the Kidney* (Ninth Edit, Vol. 1). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6640-8.00009-9>
- Jha, V., Garcia-Garcia, G., Iseki, K., Li, Z., Naicker, S., Plattner, B., ... Yang, C. W. (2013). Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives. *The Lancet*, 382(9888), 260–272. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60687-X](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60687-X)
- Jianghui Hou, Madhumitha Rajagopal, A. S. L. Y. (2013). NIH Public Access, (1), 479–501. <http://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183705.Claudins>
- Johnson, H. A., & Amendola, F. (1968). Mitochondrial Proliferation in Compensatory Growth of the Kidney. *Medical Research Center Journey*, 35–45.
- Kang, P. T., Zhang, L., Chen, C. L., Chen, J., Green, K. B., & Chen, Y. R. (2012). Protein thiyl radical mediates S-glutathionylation of complex i. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(4), 962–973. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.025>
- Katz, A. I., Doucet, A., & Morel, F. (1979). Na-K-ATPase activity along the rabbit, rat, and mouse nephron. *Am J Physiol*, 237(2), F114–20. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=223456
- Kiil, F., Aukland, K., & Refsum, H. (1961). Renal sodium transport and oxygen consumption. *The American Journal of Physiology*, 201, 511–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13755902>
- Kim, H. J., & Vaziri, N. D. (2010). Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 298(3), F662–71. <http://doi.org/10.1152/ajprenal.00421.2009>
- Klein, K., Maw-Song, W., Torikai, S., Warren, D. D., & Kurakawa, K. (1981). Substrate oxidation by isolated single nephron segments of the rat. *Kidney International*, 20, 29–35. Retrieved from <http://www.nature.com/ki/journal/v20/n1/abs/ki1981100a.html>
- Kozieł, R., Pircher, H., Kratochwil, M., Lener, B., Hermann, M., Dencher, N. a, & Jansen-Dürr, P. (2013). Mitochondrial respiratory chain complex I is inactivated by NADPH oxidase Nox4. *The Biochemical Journal*, 452(2), 231–9. <http://doi.org/10.1042/BJ20121778>
- Kuo, J.-J., Chang, H.-H., Tsai, T.-H., & Lee, T.-Y. (2012). Positive effect of curcumin on inflammation and mitochondrial dysfunction in obese mice with liver steatosis. *International Journal of Molecular Medicine*, 30(3), 673–9. <http://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1049>
- Lehir, M., & Dubach, U. (1982). Peroxisomal and Mitochondrial Beta-Oxidation in the Rat Kidney: Distribution of Fatty Acyl-Coenzyme A Oxidase and 3-Hydroxyacyl-Coenzyme A Dehydrogenase Activities along the Nephron. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*.
- Levey, A. S., & Coresh, J. (2012). Chronic kidney disease. *The Lancet*, 379(9811), 165–180. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60178-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60178-5)
- Lote, C. (2014). *Principles of renal physiology*. (Springer, Ed.) (4th ed.). Springer New York. Retrieved from <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4614-3785-7.pdf>
- Méndez-Durán, A., Francisco Méndez-Bueno, J., Tapia-Yañez, T., Montes, A. M., & Aguilar-Sánchez, L. (2010). Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Dialisis Y Trasplante*, 31(1), 7–11. [http://doi.org/10.1016/S1886-2845\(10\)70004-7](http://doi.org/10.1016/S1886-2845(10)70004-7)
- Méndez-Durán, A., Pérez-Aguilar, G., Ayala-Ayala, F., Ruiz-Rosas, R. A., González-Izquierdo, J. D. J., & Dávila-Torres, J. (2014). Panorama epidemiológico de la insuficiencia renal crónica en el segundo nivel de atención del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Diálisis Y Trasplante*, 35(4), 148–156. <http://doi.org/10.1016/j.dialisis.2014.08.001>
- Molina-Jijón, E., Tapia, E., Zazueta, C., El Hafidi, M., Zatarain-Barrón, Z. L., Hernández-Pando, R., ... Pedraza-Chaverri, J. (2011). Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. *Free Radical Biology*

& *Medicine*, 51(8), 1543–57. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.018>

- Morlans, M., Laporte, J. R., Vidal, X., Cabeza, D., & Stolley, P. D. (1990). End-stage renal disease and non-narcotic analgesics: a case-control study. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 30(5), 717–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2271370>
- Natarajan, V., & Parinandi, N. L. (2014). *Mitochondrial Function in Lung Health and Disease*. (V. Natarajan & N. L. Parinandi, Eds.) (Vol. 15). New York, NY: Springer New York. <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-0829-5>
- Nath, K. A., Hostetter, H., Karl, A., Croatt, A. J., & Thomas, H. (1990). Oxygen consumption and oxidant stress in surviving nephrons. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 90(f134), 1354–1362.
- Norman, J. T., Hwang, S., Fine, L. G., Nephrology, D., Bradley, T., & Am, J. (1990). Hypertrophy of renal of renal mitochondria. *Journal of American Society of Nephrology*, 1(5), 822–827.
- Piantadosi, C. A. (2012). Regulation of mitochondrial processes by protein S-nitrosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(6), 712–721. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.03.008>
- Rathore, R., Zheng, Y., & Niu, C. (2008). Hypoxia activates NADPH oxidase to increase i and i through mitochondrial ROS–PKC ϵ signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radical Biology & ...*, 45(9), 1223–1231. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.012>.Hypoxia
- Reddy, C. A., Somepalli, V., Golakoti, T., Kanugula, A. K., Karnewar, S., Rajendiran, K., ... Kutala, V. K. (2014). Mitochondrial-targeted curcuminoids: a strategy to enhance bioavailability and anticancer efficacy of curcumin. *PLoS One*, 9(3), e89351. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0089351>
- Saladín, K. S. (2012). *Anatomía y Fisiología, La unidad entre Forma y Función*.
- Satoh, M., Fujimoto, S., Haruna, Y., Arakawa, S., Horike, H., Komai, N., ... H, N. K. N. A. D. P. (2005). NAD (P) H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy, 1144–1152. <http://doi.org/10.1152/ajprenal.00221.2004>.
- Schaffer, S. W. (2007). *Mitochondria. The Dynamic Organelle*. (Springer, Ed.).
- Schwartz, M. M., Churchill, M., Bidani, a, & Churchill, P. C. (1993). Reversible compensatory hypertrophy in rat kidneys: morphometric characterization. *Kidney International*, 43(3), 610–4. <http://doi.org/10.1038/ki.1993.89>
- Sedeek, M., Nasrallah, R., Touyz, R. M., & Hébert, R. L. (2013). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 24(10), 1512–8. <http://doi.org/10.1681/ASN.2012111112>
- Sekine, T., & Endou, H. (2013). *Solute Transport, Energy Consumption, and Production in the Kidney. Seldin and Giebisch's The Kidney* (Fifth Edit, Vol. 2). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-381462-3.00006-9>
- Shafi, T., & Coresh, J. (2010). *Chronic Kidney Disease: Definition, Epidemiology, Cost, and Outcomes. Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation* (3rd ed.). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0987-2.00001-7>
- Silverthorn, D. U. (2009). *Fisiología humana : Un enfoque integrado*. (M. Panamericana, Ed.) (4th ed.). Buenos Aires.
- Sinuani, I., Averbukh, Z., Gitelman, I., Rapoport, M. J., Sandbank, J., Albeck, M., ... Weissgarten, J. (2006). Mesangial cells initiate compensatory renal tubular hypertrophy via IL-10-induced TGF- β secretion: effect of the immunomodulator AS101 on this process. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 291(2), F384–94. <http://doi.org/10.1152/ajprenal.00418.2005>
- Taal, M. W., & Brenner, B. M. (2014). *Adaptation to Nephron Loss and Mechanisms of Progression in Chronic Kidney Disease. Brenner & Rector's The Kidney* (Ninth Edit). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6193-9.10051-X>
- Tabei, K., Levenson, D. J., & Brenner, B. M. (1983). Early enhancement of fluid transport in rabbit proximal straight tubules after loss of contralateral renal excretory function. *Journal of Clinical Investigation*, 72(3), 871–881. <http://doi.org/10.1172/JCI111058>
- Tamaki, M., Miyashita, K., Wakino, S., Mitsuishi, M., Hayashi, K., & Itoh, H. (2014). Chronic kidney disease reduces muscle mitochondria and exercise endurance and its exacerbation by dietary protein through inactivation of pyruvate dehydrogenase. *Kidney International*, 85(6), 1330–9. <http://doi.org/10.1038/ki.2013.473>
- Tapia, E., Sánchez-Lozada, L. G., García-Niño, W. R., García, E., Cerecedo, a, García-Arroyo, F. E., ... Pedraza-Chaverri, J. (2014). Curcumin prevents maleate-induced nephrotoxicity: Relation to hemodynamic alterations, oxidative stress, mitochondrial oxygen consumption and activity of respiratory complex I. *Free Radical Research*, 48(11), 1342–54. <http://doi.org/10.3109/10715762.2014.954109>

- Tapia, E., Soto, V., Ortiz-Vega, K. M., Zarco-Márquez, G., Molina-Jijón, E., Cristóbal-García, M., ... 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. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 269039. <http://doi.org/10.1155/2012/269039>
- Tapia, E., Zatarain-Barrón, Z. L., Hernández-Pando, R., Zarco-Márquez, G., Molina-Jijón, E., Cristóbal-García, M., ... Pedraza-Chaverri, J. (2013). Curcumin reverses glomerular hemodynamic alterations and oxidant stress in 5/6 nephrectomized rats. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 20(3-4), 359–66. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.11.014>
- Tokaç, M., Taner, G., Aydın, S., Ozkardeş, A. B., DüNDAR, H. Z., Taşlıpınar, M. Y., ... Basaran, N. (2013). Protective effects of curcumin against oxidative stress parameters and DNA damage in the livers and kidneys of rats with biliary obstruction. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 61, 28–35. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.015>
- Trujillo, J., Chirino, Y. I., Molina-Jijón, E., Andérica-Romero, A. C., Tapia, E., & Pedraza-Chaverri, J. (2013). Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biology*, 1(1), 448–456. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2013.09.003>
- Trujillo, J., Granados-Castro, L. F., Zazueta, C., Andérica-Romero, A. C., Chirino, Y. I., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). Mitochondria as a Target in the Therapeutic Properties of Curcumin. *Archiv Der Pharmazie*, 1–12. <http://doi.org/10.1002/ardp.201400266>
- Trujillo, J., Molina-jij, E., Medina-campos, O. N., & Rodr, R. (2014). Superoxide Anion Production and Expression of gp91phox and p47phox are Increased in Glomeruli and Proximal Tubules of Cisplatin-Treated Rats. *MOLECULAR TOXICOLOGY*. <http://doi.org/10.1002/jbt>
- Trujillo, J., Molina-Jijón, E., Medina-Campos, O. N., Rodríguez-Muñoz, R., Reyes, J. L., Loredó, M. L., ... Pedraza-Chaverri, J. (2016). Curcumin prevents cisplatin-induced decrease in the tight and adherens junctions: relation to oxidative stress. *Food Funct.*, (OCTOBER). <http://doi.org/10.1039/C5FO00624D>
- Vaziri, N. D., Bai, Y., Ni, Z., Quiroz, Y., Pandian, R., & Rodriguez-Iturbe, B. (2007). Intra-renal angiotensin II/AT1 receptor, oxidative stress, inflammation, and progressive injury in renal mass reduction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(1), 85–93. <http://doi.org/10.1124/jpet.107.123638>
- Wang, H., Chen, X., Su, Y., Paueksakon, P., Hu, W., Zhang, M.-Z., ... Pozzi, A. (2015). P47(Phox) Contributes To Albuminuria and Kidney Fibrosis in Mice. *Kidney International*, 87(5), 948–962. <http://doi.org/10.1038/ki.2014.386>
- Watanabe, H., Miyamoto, Y., Honda, D., Tanaka, H., Wu, Q., Endo, M., ... Maruyama, T. (2013). p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney International*, 83(4), 582–92. <http://doi.org/10.1038/ki.2012.448>
- Wenzel, P., Mollnau, H., Oelze, M., Schulz, E., Wickramanayake, J. M. D., Müller, J., ... Daiber, A. (2008). First evidence for a crosstalk between mitochondrial and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in nitroglycerin-triggered vascular dysfunction. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(8), 1435–47. <http://doi.org/10.1089/ars.2007.1969>
- Wolf, G., & Ziyadeh, F. N. (1999). Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney International*, 56(2), 393–405. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00590.x>
- Yazdi, P. G., Moradi, H., Yang, J.-Y., Wang, P. H., & Vaziri, N. D. (2013). Skeletal muscle mitochondrial depletion and dysfunction in chronic kidney disease. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 6(7), 532–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3731184&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Zhu, C., Huang, S., Yuan, Y., Ding, G., Chen, R., Liu, B., ... Zhang, A. (2011). Mitochondrial dysfunction mediates aldosterone-induced podocyte damage: a therapeutic target of PPAR γ . *The American Journal of Pathology*, 178(5), 2020–31. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.01.029>

12. Anexos

12.1. Principales curcuminoides en el tumérico.

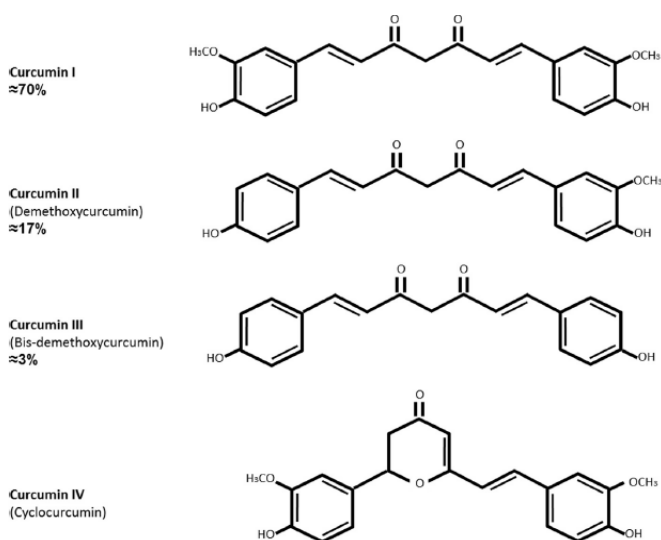


Figura 27. Estructura y abundancia proporcional de los principales curcuminoides en el polvo obtenido de la raíz de la planta *cúrcuma longa* (tumérico). De los cuales la curcumina 1 (conocida popularmente como solo como curcumina) ha demostrado ser la biológicamente más activa. Figura obtenida con permiso de Trujillo et al., (2013)

12.2. Enzimas antioxidantes

Tabla 3. Principales enzimas antioxidantes y reacciones que catalizan para llevar a cabo su función protectora.

Proteína	Función protectora
Glutación S-transferasa (GST)	Conjuga y reduce oxidantes como peróxidos. $RX + GSH \rightarrow RSG + HX$
Glutación reductasa (GR)	Regenera GSH (Glutación reducido) a partir de GSSG. (forma oxidada del glutatión) $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$
Glutación peroxidasa (GPx)	Descompone H_2O_2 a agua. $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$

Catalasa (CAT)	Descomponen H₂O₂. $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Superóxido dismutasa (SOD)	Convierte superóxido en H₂O₂. $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

12.3. Voltamperogramas de posibles sustratos que contribuyen a la CAT-LMWA en plasma y riñón.

Todos los voltamperogramas siguientes fueron realizados utilizando un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y un electrodo de carbón activado como electrodo de trabajo, a una velocidad de barrido de 100mV/s.

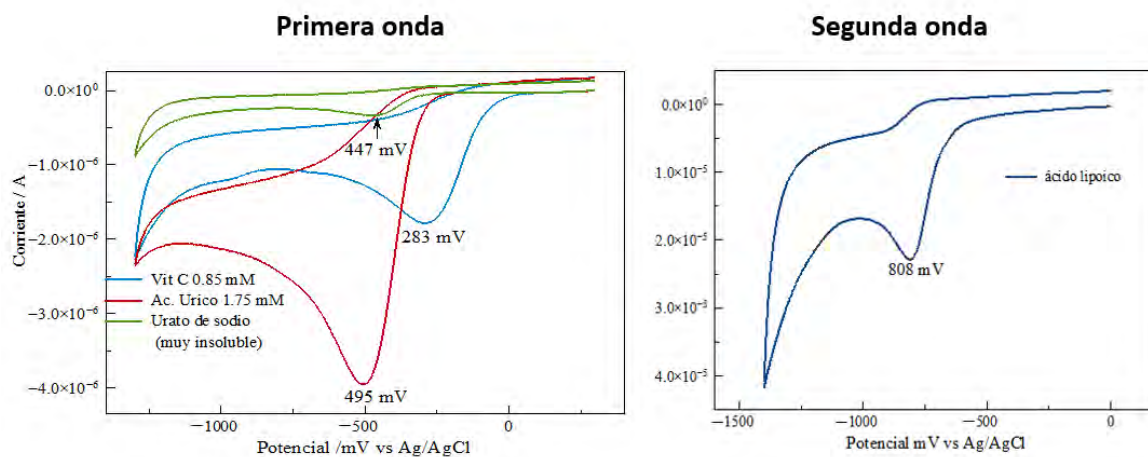


Figura 28. Voltamperogramas representativos de los posibles constituyentes de las dos ondas observadas en plasma y riñón. Se desglosan de acuerdo a la onda a la que podrían pertenecer. Todos los trazos fueron obtenidos en medio PBS. Vit C= vitamina C. Ac. Úrico = ácido úrico.

Curcuminoides.

Debido a la insolubilidad en agua de los curcuminoides los voltamperogramas fueron corridos en acetonitrilo, utilizando como electrolito soporte Bu_4NClO al 1%.

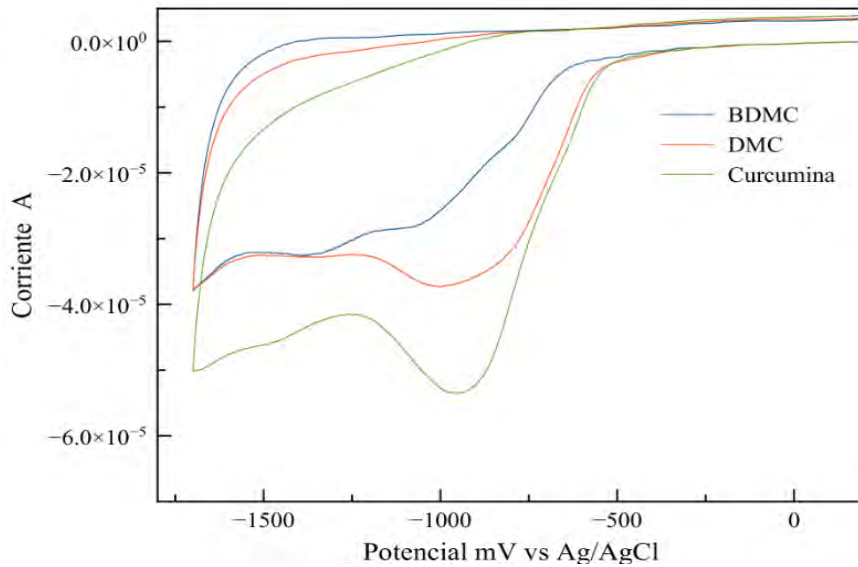


Figura 29. Voltamperogramas de los principales curcuminoides en acetonitrilo. Desmetoxicurcumina (DMC). Bisdesmetoxicurcumina (BDMC).

12.4. Desglose de los voltamperograma y análisis estadístico correspondiente a riñón.

Cada muestra fue medida por triplicado, se presenta en las siguientes graficas el promedio ponderado de las mismas. Para el análisis de la capacidad antioxidante total se procedió a calcular la integral (el área bajo la curva. Debido a que se observaron variaciones en la primera onda ($\approx 450\text{mV}$) y segunda onda ($\approx 850\text{ mV}$), se calculó además por separada el área correspondiente a cada onda. Se observó que en el grupo nefrectomizado disminuye significativamente la capacidad antioxidante total correspondiente a LMWA, dicha disminución puede asociarse directamente a una caída en las concentraciones de los componentes correspondientes a la segunda onda, (ya que solamente esta presentó una variación significativa con respecto al control) Por otro lado la administración de curcumina no solo ayudó a prevenir la disminución la capacidad antioxidante total del riñón, sino que también mejoró la misma aumentando la contribución tanto de la primera como de la segunda onda.

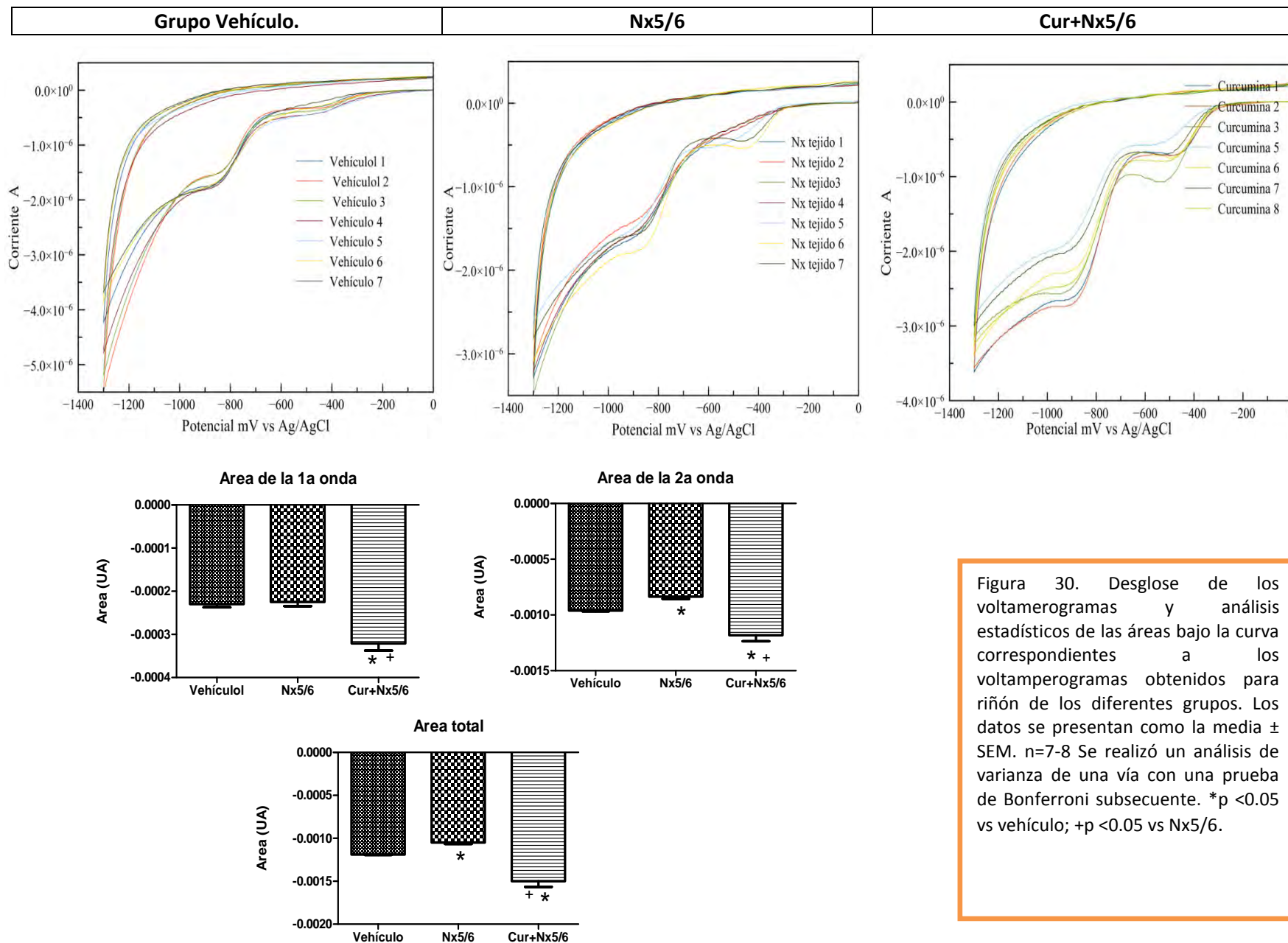


Figura 30. Desglose de los voltamogramas y análisis estadísticos de las áreas bajo la curva correspondientes a los voltamogramas obtenidos para riñón de los diferentes grupos. Los datos se presentan como la media \pm SEM. $n=7-8$ Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni subsecuente. * $p < 0.05$ vs vehículo; + $p < 0.05$ vs Nx5/6.

12.5. Desglose de los voltamperograma y análisis estadístico en plasma.

Se realizó el cálculo del área bajo la curva correspondiente a cada uno de los voltamperogramas obtenidos, así como de la primera y segunda respectivamente. Contrario a lo esperado se encontró un aumento significativo en la capacidad antioxidante total de LMWA en plasmas de ratas nefrectomizadas con respecto a los controles, misma que es disminuida por la administración de curcumina, dichos aumentos pueden ser atribuidos principalmente a la contribución de la segunda onda. Por otro lado, la curcumina no fue capaz de disminuir de manera significativa la contribución el aumento en la segunda onda.

