



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

BIOQUÍMICA

**“Efecto del sulforafano en el daño oxidativo y renal inducidos por el
antineoplásico cisplatino en modelo animal”**

TESIS

Que presenta:

Q.F.B. RAFAELA NATIVIDAD COSÍO VITAL

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA

Director de Tesis:

Dr. José Víctor Calderón Salinas

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 25 del Departamento De Bioquímica Del Centro De Investigación Y De Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. José Víctor Calderón Salinas

El presente trabajo fue realizado *parcialmente* con el apoyo del donativo número 395163 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México.

Gracias a la beca de maestría otorgada con el número de registro de becario 338599 por el CONACYT.

DEDICATORIA

A la memoria de Rufina Santos Gallegos, siempre conmigo.

A Nora Hilda Vital Santos por darme la vida y todo tu amor, gracias por ser mi amiga incondicional.

A María Naturaleza Isaura Cossío Vital porque he crecido en muchos sentidos, tomada de tu mano.

A Juan Francisco de León Malacara por elegir compartir su vida con la mía y apoyarme tanto en esta etapa de mi carrera con amor y paciencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las personas que han contribuido para lograr este paso en mi formación académica.

Al Dr. José Víctor Calderón Salinas, por su apoyo, paciencia, enseñanzas, para que pudiera realizar este proyecto.

A los profesores del Departamento de Bioquímica y a la maestra Gloria Angélica Moreno.

A mis asesores. Dr. Jesús Valdés Flores y Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, por sus valiosos comentarios.

A la Q.F.I. Margarita Rosas Flores, auxiliar de investigación del laboratorio 25 de departamento de Bioquímica, por el apoyo y asesoría técnicos que me brindó durante la realización de este proyecto y especialmente por su amistad.

A Priscila González y Angélica González por su colaboración y su gran calidad humana.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios.

De manera general al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados unidad Zacatenco

A mis compañeros y amigos: Lorena Palacio, Ricardo Martínez, Francisco Sandoval, Adriana Rebollar, Ericka Martínez, Rogelio Salazar, Carla Villanueva, Mireille de León, Alfredo Vázquez, Fátima Vázquez, Nadia Vanegas, Alonso Camargo y Olga Flores.

Mis amigos del alma: Francisco Javier Lozano Saucedo y Alma Guadalupe Luna Carrillo.

A mis maestras: María Antonia (Toñita) y Liliana Cantú, a quienes les tengo un cariño muy especial.

A todas estas personas especiales, que confiaron en mis aptitudes más que yo misma... Gracias Infinitas.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| Cáncer..... | 3 |
| Quimioterapia..... | 3 |
| Daño oxidativo en la quimioterapia | 4 |
| La oxidación y los agentes oxidantes | 4 |
| Especies reactivas | 4 |
| Radicales libres | 5 |
| Especies reactivas de oxígeno | 5 |
| Daños por radicales libres | 6 |
| Mecanismos de defensa antioxidante..... | 7 |
| El estrés oxidativo | 10 |
| Apoptosis | 11 |
| Eriptosis | 11 |
| Cisplatino | 12 |
| Mecanismos de la nefrotoxicidad de cisplatino | 14 |
| Sulforafano | 16 |
| Morfología de Riñones | 18 |
| ANTECEDENTES | 20 |
| JUSTIFICACIÓN | 25 |
| HIPÓTESIS | 26 |
| OBJETIVOS | 26 |
| Objetivos específicos..... | 26 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 26 |
| Reactivos..... | 27 |
| Equipo | 27 |
| Fundamentos de los métodos y protocolos..... | 27 |
| Protocolo empleado para la obtención de muestras | 27 |
| Urinilazer..... | 28 |
| Proteínas en orina..... | 28 |
| Glucosa en orina | 28 |

| | |
|--|----|
| Creatinina | 28 |
| Urea..... | 29 |
| Ácido úrico..... | 29 |
| Alanino aminotransferasa | 30 |
| Aspartato aminotransferasa | 31 |
| Fosfatasa alcalina | 32 |
| Determinación de Proteínas por el método de Lowry | 33 |
| Lipoperoxidación. | 34 |
| Superóxido Dismutasa | 37 |
| Catalasa..... | 38 |
| Método de Drabkin's..... | 39 |
| Capacidad antioxidante total | 40 |
| Determinación de externalización de fosfatidilserina por unión a Anexina V-FITC mediante citometría de flujo..... | 41 |
| RESULTADOS | 43 |
| DISCUSIÓN | 49 |
| CONCLUSIÓN..... | 57 |
| PERSPECTIVAS..... | 58 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 59 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 64 |

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad multifactorial, que tiene una alta morbi-mortalidad a nivel mundial y en ascenso, frecuentemente para su tratamiento se usa el cisplatino. El cisplatino tiene múltiples efectos secundarios negativos; el mayor efecto colateral de esta terapia y factor limitante para su uso es la nefrotoxicidad. Se ha propuesto que parte de los efectos tóxicos pueden deberse a estrés oxidativo. En el presente estudio se evaluaron los efectos *in vivo* del sulforafano contra la toxicidad por estrés oxidativo inducidos por el antineoplásico cisplatino en el riñón de rata. Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar con un peso de 250 gramos. Los cuales se dividieron en 4 grupos. Grupo 1, es el grupo control a las que se administró: DMSO y NaCl al 0.9 %; Grupo 2, tratado sólo con sulforafano 1 mg/kg/3 dosis/i.p; Grupo 3, es el grupo tratado con una dosis de 9 mg/kg/i.p. de cisplatino y sulforafano 1 mg/kg/3 dosis/i.p. (24 h y 30 min antes y 24 h después de la administración de cisplatino) y; Grupo 4, es el grupo tratado con cisplatino a una dosis de 9 mg/kg/i.p. Los animales fueron sacrificados 72 horas después de la administración de cisplatino. Se determinaron creatinina, urea, ácido úrico, fosfatasa alcalina, las alanino y aspartato transaminasas, como marcadores de daño renal y toxicidad en el plasma. Se realizó la determinación de proteínas y glucosa en orina. Se determinaron: la lipoperoxidación, la actividad de superóxido dismutasa y catalasa; así como la capacidad antioxidante total, en eritrocitos, plasma y tejidos. Se evaluó la externalización de fosfatidilserina en eritrocitos. El tratamiento con cisplatino causó daño renal glomerular y tubular, estrés oxidativo, caracterizado por la menor capacidad antioxidante total en plasma y riñón, y por la menor actividad de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa en eritrocitos. Además de una oxidación a lípidos en plasma y eritrocitos. El tratamiento con sulforafano no causó daño renal, y produjo una mayor actividad de SOD en eritrocitos y una mayor capacidad antioxidante total en plasma, así como mayor lipoperoxidación en plasma y en eritrocitos. El tratamiento con sulforafano no protege contra el daño glomerular o tubular inducido por el tratamiento con cisplatino, ni contra el estrés oxidativo inducido por cisplatino, dado que no disminuyó la lipoperoxidación, ni aumentó la actividad de catalasa inducidas por cisplatino en plasma y eritrocitos, aun cuando protegió contra la disminución de la actividad de SOD y generó una mejor respuesta antioxidante total en plasma y riñón. Los efectos antioxidantes del sulforafano con respecto a la TAC en plasma y riñón y la mayor actividad de SOD en eritrocitos no fue suficiente para evitar el daño oxidativo inducido por cisplatino.

ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease, which has a high morbidity and mortality worldwide and is on the rise, cisplatin is frequently used for its treatment. Cisplatin has multiple negative side effects; The greatest side effect of this therapy and limiting factor for its use is nephrotoxicity. It has been proposed that part of the toxic effects may be due to oxidative stress. In the present study we evaluated the in vivo effects of sulforaphane against oxidative stress toxicity induced by the antineoplastic cisplatin in the rat kidney. Male rats of the Wistar strain with a weight of 250 grams were used. Which were divided into 4 groups. Group 1, is the control group to which it was administered: DMSO and 0.9% NaCl; Group 2, treated only with sulforaphane 1 mg / kg / 3 doses / i.p; Group 3 is the group treated with a dose of 9 mg / kg / i.p. of cisplatin and sulforaphane 1 mg / kg / 3 doses / i.p. (24 h and 30 min before and 24 h after the administration of cisplatin) and; Group 4 is the group treated with cisplatin at a dose of 9 mg / kg / i.p. The animals were sacrificed 72 hours after the administration of cisplatin. Creatinine, urea, uric acid, alkaline phosphatase, the alanine and aspartate transaminases were determined as markers of renal damage and plasma toxicity. The determination of proteins and glucose in urine was carried out. The following were determined: lipoperoxidation, superoxide dismutase and catalase activity; as well as the total antioxidant capacity, in erythrocytes, plasma and tissues. The externalization of phosphatidylserine in erythrocytes was evaluated. The treatment with cisplatin caused glomerular and tubular renal damage, oxidative stress, characterized by the lower total antioxidant capacity in plasma and kidney, and by the lower activity of antioxidant enzymes SOD and catalase in erythrocytes. In addition to an oxidation to plasma lipids and erythrocytes. Treatment with sulforaphane did not cause kidney damage, and produced greater SOD activity in erythrocytes and a greater total antioxidant capacity in plasma, as well as greater lipoperoxidation in plasma and erythrocytes. Treatment with sulforaphane does not protect against glomerular or tubular damage induced by treatment with cisplatin, nor against oxidative stress induced by cisplatin, since lipoperoxidation did not decrease, nor did catalase activity induced by cisplatin in plasma and erythrocytes, even when it protected against the decrease in SOD activity and generated a better total antioxidant response in plasma and kidney. The antioxidant effects of sulforaphane with respect to CT in plasma and kidney and the increased activity of SOD in erythrocytes was not sufficient to avoid oxidative damage induced by cisplatin.

INTRODUCCIÓN

El cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II) es un agente utilizado en la terapia contra diversos tipos de cáncer que ha demostrado ser muy eficaz, pero tiene como limitante la nefrotoxicidad que produce, se ha propuesto que algunos de los efectos secundarios están asociados a estrés oxidante (Chen, 2007 y Miller, 2010).

Cáncer

El cáncer comprende a toda una familia de enfermedades, cuyo origen se establece en células alteradas que tienen como principal característica un crecimiento anormal dado por modificaciones en los mecanismos de proliferación y muerte celular (Ruddon, 2007.) (Brown *et al*, 2005). El cáncer es una enfermedad multifactorial. Cualquier célula puede evolucionar a un estado de malignidad por afectaciones en el ADN que pueden ser heredables o epigenéticos. La exposición a radiaciones UV, agentes tóxicos, carcinógenos químicos contribuyen al desarrollo del cáncer mediante la estimulación de la proliferación celular. Los virus también causan cáncer en los seres humanos y otras especies (Cooper, 2012).

El cáncer es una fuente de mortalidad significativa y creciente en todo el mundo, con un aumento estimado de 19 millones de nuevos casos de cáncer por año. Más de la mitad de los casos de cáncer y su mortalidad se producen en países de bajos y medianos ingresos y se espera que estas proporciones aumenten en 2025 (Block *et al*, 2016).

Los tratamientos actuales del cáncer se basan principalmente en la intervención quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia (Hu *et al*, 2015).

Quimioterapia

La quimioterapia es la administración de sustancias químicas, con la finalidad de producir muerte celular; sin embargo, los medicamentos quimioterapéuticos tradicionales a menudo dañan las células sanas y causan toxicidad para el paciente. Las células afectadas con mayor frecuencia por la quimioterapia son las células de las líneas sanguíneas, los epitelios que se encuentran en la boca, el estómago y el

intestino, así como la piel y los folículos pilosos; lo que provoca recuentos sanguíneos bajos, afecciones bucales, náuseas, diarrea y pérdida del cabello (Hu *et al*, 2015).

Daño oxidativo en la quimioterapia

Las enzimas antioxidantes junto con otros antioxidantes celulares tienen un papel preponderante en la reducción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno y mantienen un estado estable de óxido-reducción celular. Las especies reactivas que se generan durante la quimioterapia consumen oxidan a estos antioxidantes (Chen *et al*, 2007).

La oxidación y los agentes oxidantes

Químicamente la oxidación de un compuesto es la pérdida de electrones, de hidrógenos o la ganancia de oxígeno en una molécula. La reducción de un compuesto es exactamente lo contrario; es decir, la ganancia de electrones, de hidrógenos o la pérdida de oxígeno. En tal sentido, un agente oxidante es una molécula que se reduce al reaccionar con la molécula a la cual oxida. Este par óxido-reductor es necesario químicamente y esencial para entender la biología de los daños oxidativos en el organismo (Quintanar y Calderón, 2009). Las macromoléculas de importancia biológica (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos) son moléculas nucleofílicas que tienen electrones susceptibles de compartir, es decir, tienen electrones en orbitales superficiales que pueden ser capturados (oxidación) o compartidos en una reacción nucleofílica para formar compuestos o aductos. Los oxidantes son compuestos electrofílicos, especies que tienen gran avidez por los electrones y que tienen facilidad para reaccionar con macromoléculas nucleofílicas, muchas de ellas de la mayor importancia biológica (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Especies reactivas

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), son un subgrupo de moléculas oxidantes, que como su nombre lo indica son altamente reactivas. Los radicales libres en particular y las especies reactivas en general, participan en algunas funciones biológicas (proliferación celular, diferenciación celular, fagocitosis,

metabolismo, reacciones inflamatorias) y se encuentran involucradas en diversas patologías (Quintanar y Calderón, 2009).

Radicales libres

En forma general, los radicales libres son una especie química (atómica o molecular) capaz de tener una existencia independiente por si solos, que contenga uno o más electrones desapareados ocupando un orbital externo, ya sea por la ganancia o pérdida de un electrón, de un radical o por la ruptura homolítica de una molécula (Hansberg, 2002); sin embargo, son muy reactivos ya que tienden a reducirse, es decir, sustraen un electrón de átomos o moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su propia estabilidad. Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear a su electrón libre, la molécula estable que pierde el electrón se oxida y deja a otro electrón desapareado, lo que la convierte a su vez en un radical libre, iniciándose y después propagándose de la misma manera, generando así una reacción en cadena. Radicales y especies reactivas tienen diferentes vidas medias, siempre muy bajas, pero algunas de ellas suficientes para permitir que algunas moléculas puedan difundir y actuar en orgánulos o células vecinas (Calderón y Quintanar, 2009).

Especies reactivas de oxígeno

Las principales son el oxígeno molecular (O_2), el ozono (O_3) y el oxígeno en singulete (O_2^1), así como las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas; esto es, el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el hidroperóxido (HO_2^{\bullet}) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$). Estas especies son producto de la ruptura homolítica o de la excitación de los electrones del O_2 y son más reactivos que el O_2 en su estado basal (Halliwell, 2007). Estas ERO son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al organismo mediante reacciones de óxido-reducción, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por factores patológicos (Quintanar y Calderón, 2009).

Otros radicales libres

Entre los que se encuentran los radicales libres de nitrógeno; tales como, el óxido nítrico (NO^{\bullet}) y el dióxido nítrico (NO_2^{\bullet}). El NO^{\bullet} es un radical muy reactivo y de

importancia fisiológica que puede oxidar y dañar, pero es esencial en funciones biológicas complejas como son la neurotransmisión y neuroregulación del sistema nervioso, así como en procesos de agregación plaquetaria y coagulación sanguínea, con el O_2 genera $NO_2\cdot$ y con el $O_2\cdot$ forma peroxinitrito ($ONOO^-$). Este tipo de ERN son capaces de generar daño oxidativo y muerte celular. Existen otros radicales libres que tienen diferente naturaleza como el ión hipoclorito ($ClO\cdot^-$) y el radical triclorometilo ($\cdot CCl_3$) este último producido durante el metabolismo del CCl_4 por el citocromo P450 (Quintanar y Calderón, 2009).

Daños por radicales libres

Los radicales libres producidos en cantidades moderadas en los organismos pueden ser neutralizados por el propio sistema. Ante un determinado insulto oxidativo, los organismos suelen adaptarse rápidamente. En general, una agresión oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir posteriormente condiciones más oxidantes. Sin embargo, las ERO que se producen y escapan a los sistemas de defensa, producen continuamente daños irremediables a los carbohidratos, al ADN, a las proteínas y a los lípidos que alcanzan. Las consecuencias de las reacciones de los radicales libres con los diferentes compuestos celulares pueden ser muy variadas, pero siempre de importancia biológica y con consecuencias irremediables a corto, mediano o largo plazo (Quintanar y Calderón, 2009).

- Daño al ADN. Los radicales libres pueden causar entrecruzamiento de proteínas-ADN, intercambio de cromátides hermanas, daño a la estructura de la desoxirribosa fosfato, oxidación de las bases nitrogenadas, conversión de bases, aperturas de anillos, liberación de bases, rompimiento de cadenas. Debido al mayor ambiente oxidativo de la mitocondria, el ADN mitocondrial generalmente presenta un mayor número de modificaciones que el ADN nuclear. Los radicales libres y en general las agresiones oxidativas modifican las bases nitrogenadas, lo que induce mutaciones y carcinogénesis, ya sea por la pérdida de expresión o por la síntesis de una proteína alterada (Quintanar y Calderón, 2009).
- Daño a las proteínas. Los daños producidos por radicales libres en términos generales marcan las proteínas para su degradación. El reconocimiento de los

sitios oxidados o halogenados o bien la exposición de regiones hidrofóbicas determinan la ubiquitinación de las proteínas y su degradación en el proteosoma. Las ERO pueden inducir en el extremo la fragmentación de proteínas, pero además existen una serie de alteraciones que pueden modificar notablemente su función, modificando con ello el metabolismo, la estructura, el transporte, los receptores, las proteínas reguladoras y los inmunorreguladores, entre otros.. (Quintanar y Calderón, 2009).

- Daño a los lípidos. La oxidación de los lípidos membranales provoca pérdida de la permeabilidad, la fluidez y la integridad de las membranas (la plasmática y de los orgánulos celulares). Los ácidos grasos polinsaturados de las membranas celulares y las lipoproteínas son particularmente susceptibles al ataque del radical hidroxilo $\bullet\text{OH}$, del oxígeno singulete (O_2^1) y del hidroperoxilo ($\text{HO}_2\bullet$). Con esta reacción se forma un radical lipídico que después de un rearrreglo molecular (dieno conjugado), puede reaccionar con el oxígeno para originar el radical peroxilo ($\text{R-OO}\bullet$). Este a su vez puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana, formando otros radicales lipídicos, transformándose el mismo en hidroperóxido (R-OOH). El hidroperóxido, en presencia de varios complejos metálicos, se puede descomponer en más radicales, incluyendo entre ellos al $\bullet\text{OH}$, lo que provoca un fenómeno de expansión del daño y propagación de la peroxidación (Quintanar y Calderón, 2009).
- Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como glucosa, manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas y generar productos de glicación avanzada los cuales se pueden unir a las proteínas y dañarlas como proteínas glicadas (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Mecanismos de defensa antioxidante

Para evitar que se desborde el insulto oxidativo, las células y los organismos aeróbicos requieren generar y mantener defensas antioxidantes de manera óptima e incrementarlas acorde al tamaño de la agresión (Quintanar y Calderón, 2009). En forma

general se conocen como mecanismos antioxidantes a los sistemas encargados de proteger a las células de los efectos de los radicales libres, reaccionando con ellos o convirtiéndolos en especies menos reactivas mediante acción enzimática.

Los antioxidantes son moléculas nucleofílicas que se comportan como compuestos muy susceptibles para que los oxiden las especies reactivas (electrofilicas); es decir, ofrecen electrones a las especies reactivas para evitar que estas ataquen a las macromoléculas nucleofílicas necesarias para la función y estructura celular (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos). Una vez que los radicales libres reaccionan con los antioxidantes se reducen parcialmente o se unen en forma de aductos, reduciendo su reactividad y oxidando al antioxidante (Quintanar y Calderón, 2009).

Los mecanismos homeostáticos antioxidantes con los que el organismo enfrenta el daño oxidativo son específicos, afines, numerosos y diversos; reflejando la necesidad de hacer frente a la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas; también son numerosos los compartimientos donde actúan en el organismo y en las células. Se pueden clasificar de diversas formas, la siguiente se basa en las líneas de defensa del organismo:

- **Macromoléculas que acomplejan especies reactivas y evitan su acción.** Por ejemplo, proteínas que acumulan o transportan metales de transición, como la transferrina y la ceruloplasmina o como el oxígeno, la hemoglobina y la mioglobina.
- **Enzimas antioxidantes** con gran afinidad para catalizar con altas velocidades la reacción de reducción parcial de una especie reactiva. Por ejemplo: la superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 ; la glutatión peroxidasa (GPx) que es una enzima dependiente de selenio y cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o lipoperóxidos (L-OOH); la glutatión sulfhidril transferasa (GST) que cataliza el ataque nucleofílico del cosustrato GSH sobre el centro electrófilo de un gran número de oxidantes y la catalasa (CAT) que reduce el H_2O_2 a H_2O .

- **Cosustratos antioxidantes**, son empleados por las enzimas para poder reducir parcialmente a los radicales libres y las especies reactivas. Por ejemplo; el glutatión y el NADPH.
- **Enzimas que regeneran sustratos o cosustratos antioxidantes**. Por ejemplo, las enzimas que regeneran al glutatión reducido, la vitamina E y el NADPH. El glutatión se mantiene casi todo en forma reducida principalmente a través de glutatión reductasa (GR), una flavoenzima que gracias a la oxidación del NADPH cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). La vitamina E al actuar como antioxidante se oxida a tocoferilquinona, para continuar su trabajo antioxidante se requiere que se reduzca nuevamente a vitamina E, tal reducción la pueden llevar a cabo el ascorbato (vitamina C) o el glutatión con la catálisis de las enzimas tocoferilquinona reductasa o una GPx, respectivamente. El ascorbato se oxida a deshidroascorbato y se puede reducir a ascorbato con NADPH o con GSH por enzimas tales como la deshidroascorbato reductasa o por la glutatión peroxidasa (GPx). El NADPH se regenera principalmente a través de la vía de las pentosas a partir del NADP⁺ por acción de la deshidrogenasa de la glucosa-6-P y la deshidrogenasa de gluconato-6-P; sin embargo, en algunas células la enzima málica/NADP⁺ que oxida malato a piruvato puede contribuir a la formación de NADPH o bien obtenerse a partir de la isocitrato deshidrogenasa citosólica dependiente de NADP⁺ que cataliza la reacción de isocitrato a α -cetoglutarato.
- **Antioxidantes exógenos**. Son antioxidantes que provienen de la dieta, tales como la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), el β -caroteno (provitamina A), el cobre, el selenio, el zinc, el manganeso, los polifenoles, los licopenos, los flavonoides, la quercitina, la hespiridina, las catequinas y los taninos (Dragsted, 2008).
- **Antioxidantes endógenos** Ejemplos de estos antioxidantes en los organismos son: el glutatión, el NADPH, la albúmina, el ácido úrico, la coenzima Q, la bilirrubina y la melatonina (Formán *et al*, 2009).
- **Sistema de reparación**. Son sistemas que tratan de recuperar la función de las macromoléculas dañadas, reparar el daño establecido o destruir la

macromolécula que pudiera causar daño a la economía celular. Hay mecanismos de reparación específicos que sustituyen las bases mal apareadas, oxidadas, desaminadas o que añaden la base faltante y otros que degradan un tramo de nucleótidos en una hebra alrededor de la región alterada, posteriormente una polimerasa de ADN y una ligasa de ADN reparan el tramo. (Quintanar y Calderón, 2009).

El uso extensivo de sistemas de reparación o el intenso daño al ADN puede inducir el proceso de apoptosis, que visto de esta manera sería la muerte por “suicidio” cuando la reparación es imposible o el daño fue extensivo, protegiendo al órgano y al organismo de daños locales y sistémicos, incluyendo el desarrollo de células cancerosas (Monaghan *et al*, 2009).

El estrés oxidativo

En las células y en los organismos en condiciones normales se mantiene un balance entre la producción de radicales libres y especies reactivas con los sistemas antioxidantes; de manera tal, que la toxicidad por oxidación es limitada, aún este limitado daño es parcialmente responsable del envejecimiento natural de las células y los organismos. Sin embargo, se considera que la agresión oxidativa alcanza niveles patológicos cuando se rompe el balance entre la agresión oxidativa y la eficiencia de los sistemas amortiguadores antioxidantes (Dar y Barzilai, 2009); lo cual se puede producir por un déficit de antioxidantes o por un incremento en la producción de las especies reactivas. De igual manera cuando se reduce la agresión oxidativa, se reduce la eficiencia total del sistema amortiguador antioxidante, evitando así gastos energéticos excesivos y una condición reductora muy elevada en la célula que comprometa las acciones oxidantes de importancia para el funcionamiento celular (Quintanar y Calderón, 2009).

La respuesta de la célula o el organismo a la agresión oxidativa implica no sólo cambios cinéticos y moleculares de enzimas, cosustratos, cofactores y moléculas antioxidantes, sino también el encendido de genes y los cambios de la expresión de

proteínas, todo este fenómeno se conoce como estrés oxidativo (Quintanar y Calderón, 2006).

Apoptosis

La también llamada muerte celular programada, es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada; este fenómeno implica una programación celular, genéticamente regulada, para que la célula muera sin causar daño en la organización de los tejidos a que pertenece; es decir es un proceso ordenado, la célula muere sin causar una reacción inmunológica o inflamatoria que afecte a las células vecinas y con ello mantener la integridad del tejido (Quintanar y Calderón, 2006).

En la apoptosis, los productos monoméricos de la degradación de proteínas y del ADN (aminoácidos y nucleótidos) se liberan en un proceso controlado que permite que sean captados y reutilizados por células vecinas. La apoptosis permite, así, que el organismo elimine una célula que ya no se necesita o que es potencialmente peligrosa sin desperdiciar sus componentes (Nelson, 2015).

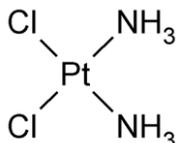
Hasta el año 2001, se pensaba que la apoptosis era un fenómeno de células nucleadas y que no podía encontrarse en células sin núcleo, como los eritrocitos. Los trabajos de Berg y de Bratosin indicaron que la apoptosis se podía presentar en células sin núcleo, sus trabajos permitieron demostrar lo que posteriormente se llamaría eriptosis y que estos autores nombraron como “apoptosis de células anucleadas” o “muerte celular programada de los eritrocitos” (Bratosin, 2001).

Eriptosis

La eriptosis es un tipo de apoptosis que sucede en el eritrocito. Este fenómeno recientemente se ha caracterizado y estudiado bajo este enfoque. La eriptosis comparte mecanismos propios de las etapas finales de la apoptosis, incluyendo la activación de proteasas, la externalización de fosfatidilserina y la formación de microvesículas apoptóticas. La eriptosis es importante para evitar la hemólisis, así como las respuestas inflamatorias o inmunológicas en la destrucción de los eritrocitos.

La función principal de los eritrocitos es la de transportar hemoglobina. Ésta a su vez cumple con dos funciones importantes: transportar el oxígeno del aparato respiratorio a los tejidos periféricos y transportar desde estos el CO₂ hasta los pulmones para ser eliminado en el proceso ventilatorio (Quintanar y Calderón, 2006).

Cisplatino



H₆Cl₂N₂Pt *cis*-diaminodichloroplatino(II)

Es una molécula formada por un átomo de platino, rodeada por dos átomos de cloro y dos grupos amonio en posición cis, tiene un peso molecular de 301.1 gramos.

Michel Peyrone sintetizó por primera vez el cisplatino y su estructura fue descrita por Alfred Werger en 1893. En 1965 se demostró la capacidad del cisplatino para inhibir la división celular (Rosenberg *et al* 1965). Después, se descubrió su actividad citotóxica en *Escherichia Coli*, pero hasta 1971 se utilizó por primera vez en pacientes. Y finalmente en 1978 la FDA (Federal Drug Administration) aprueba el cisplatino para su uso clínico en la terapia de una variedad de tumores sólidos (Karasawa, 2015 y Kelland, 2007).

El cisplatino es un agente quimioterapéutico del cáncer ampliamente utilizado y muy eficaz en el tratamiento de muchos tipos de cánceres sólidos: de cabeza, cuello, lengua, testículo, ovario, pecho, entre otros (Miller *et al*, 2010).

Los efectos secundarios indeseables incluyen ototoxicidad, gastrotoxicidad, hepatotoxicidad, mielosupresión, así como algunas reacciones alérgicas, aunque el principal efecto que limita la dosis por cisplatino es la nefrotoxicidad. A pesar de intensos esfuerzos durante las últimas décadas para encontrar alternativas menos tóxicas pero igualmente eficaces, cisplatino sigue siendo ampliamente prescrito (Miller

et al, 2010). En la actualidad se considera al cisplatino como uno de los quimioterapéuticos más potentes para el tratamiento de cáncer a nivel mundial.

Manifestaciones renales del tratamiento con cisplatino

| | |
|-------------------------------|--|
| Lesión renal aguda | Bollis 1997, Golstein 1983. |
| Hipomagnesemia | Schilsky 1979, Lam 1986, Ries 1986, Sutton 1991, Parffit 1980. |
| Acidosis tubular renal distal | Swainson 1985. |
| Hipocalcemia | Suh <i>et al</i> 1973, Connor 1972. |
| Hiperuricemia | Nanji <i>et al</i> 1985 |
| Proteinuria transitoria | De Conti 1973 |
| Deficiencia de eritropoyetina | Wood <i>et al</i> 1995 |
| Falla renal crónica | Madias 1978, Jackson 1984, Brillet 1994. |

Existen algunos factores que aumentan el riesgo de nefrotoxicidad causada por cisplatino: dosis, frecuencia, dosis acumulativa, edad, sexo, tabaquismo, daño renal preexistente, entre otros (Miller *et al*, 2010).

Mecanismos de la nefrotoxicidad de cisplatino

El cisplatino es eliminado del cuerpo por el riñón mediante filtración glomerular y secreción tubular. Estudios previos en cortes de riñón, células del epitelio renal en cultivo, y segmentos del túbulo proximal aislados, han evidenciado el transporte basolateral a apical de cisplatino. Y también se han identificado dos diferentes transportadores de membrana capaz de transportar el cisplatino al interior de las células: Ctr 1 y OCT 2 (Miller *et al*, 2010 y Karasawa, 2015). Ctr 1 es un transportador de cobre el cual también ha demostrado mediar la captación de cisplatino en células de mamífero, incluyendo células de cáncer de ovario. Ctr1 es altamente expresado en el riñón adulto y se localiza en la membrana basolateral del túbulo proximal. En estudios in vitro en células de riñón han demostrado que la baja regulación de Ctr1 produce una baja captación de cisplatino y por lo tanto menor toxicidad, sugiriendo así que Ctr 1 es importante para el mecanismo de captación de Cisplatino en estas células. El OCT2 por sus siglas en inglés Organic Cation Transporter, también transporta el cisplatino al interior de las células. Estudios in vitro e in vivo demostraron la importancia de este transportador en la captación de Cisplatino y la toxicidad producida. El “knockout” y los

polimorfismos del gene OCT2 redujeron significativamente la toxicidad in vivo (Miller *et al*, 2010).

En un ambiente acuoso, los ligandos cloro del cisplatino son reemplazados por moléculas de agua generando un electrófilo cargado positivamente, este electrófilo reacciona con sitios nucleofílicos en las macromoléculas intracelulares para formar aductos con proteínas, ADN o ARN. El cisplatino se une al ADN formando entrecruzamientos ya sea intracatenarios o intercatenarios, provocando así que se detenga la síntesis de ADN y la replicación de células. Otras líneas de investigación sugieren que es más importante el daño al ADN mitocondrial y otros objetivos mitocondriales que el daño al ADN nuclear en la muerte celular inducida por cisplatino. El cisplatino al ser hidrolizado se acumulará preferencialmente cerca de la membrana de la mitocondria, que está cargada negativamente. Esta observación puede explicar la particular sensibilidad del túbulo proximal del riñón a la toxicidad por cisplatino, dado que este segmento del riñón exhibe una de las más altas densidades de mitocondrias en riñón. La energética mitocondrial es trastornada por cisplatino y puede contribuir a la nefrotoxicidad. Los ácidos grasos son el mayor recurso de energía para el túbulo proximal, el sitio primario del daño a riñón. El cisplatino inhibe la oxidación de los ácidos grasos en riñón de rata y en células del túbulo proximal en cultivo. Afecta los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y su función (Miller *et al*, 2010).

Varias vías apoptóticas han sido implicadas en la muerte celular epitelial renal inducida por cisplatino, incluyendo la vía extrínseca activada a través de los receptores de muerte, receptores TNF o Fas, la vía mitocondrial o intrínseca, y mediante el estrés del retículo endoplásmico. Cisplatino incrementa la actividad de caspasa 8 y 3. El factor de necrosis tumoral alfa estimula la respuesta inflamatoria en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino, aunque aún no está claro su papel (Miller, 2010).

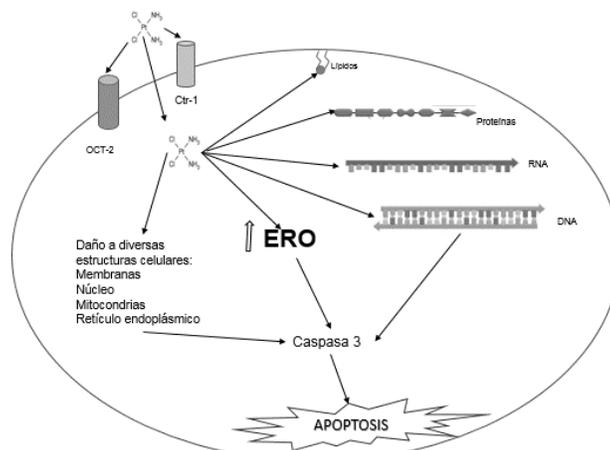


Figura 1. Muerte celular inducida por cisplatino. El cisplatino entra a las células del epitelio renal vía transportadores OCT2 y Ctr1, forma aductos con biomoléculas, causa daño a los ADNs nuclear y mitocondrial, produce especies reactivas de oxígeno que a su vez producen la activación de vías mitocondriales y no mitocondriales de apoptosis y necrosis (Basado en Miller, 2010).

Sulforafano



1-Isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano

Fórmula: C₆H₁₁NOS₂ Peso molecular: 177.29 Densidad: 1.18 g/mL

Es un líquido ligeramente amarillo, los isotiocianatos son compuestos lipofílicos, reactivos, volátiles, amargos y de mal olor. Es un isotiocianato dietario que es sintetizado a partir de un precursor encontrado en los vegetales del orden Brassicales y de la familia Cruciferae como brócoli, col, repollo y rábano. El glucosinolato: 4-metilsulfinilbutil (glucorafanina) se convierte en el isotiocianato: 1-Isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano (sulforafano) por la acción enzimática de la β-tioglicosidasa (mirosinasa) (Figura 2). Los isotiocianatos se conjugan con glutatión por acción de la Glutatión S transferasa, luego es metabolizado por la γ-glutamiltanspeptidasa (GTP), cisteínglicinasa (CGasa), y acetil transferasa (AT), de manera secuencial para formar ácidos mercaptoúricos (Figura 3), finalmente se excreta formando un conjugado de N-

acetilcisteína-SUL en la orina. El remanente de SUL se elimina aproximadamente en 24 horas (Shapiro *et al*, 2001).

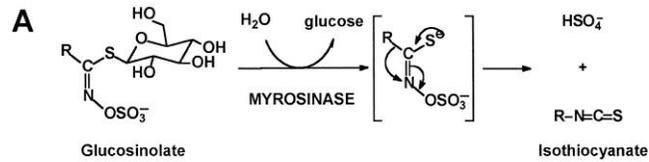


Figura 2. Reacción de hidrólisis de la glucorafanina por la mirosinasa para formar sulforafano. (Shapiro, 2006)

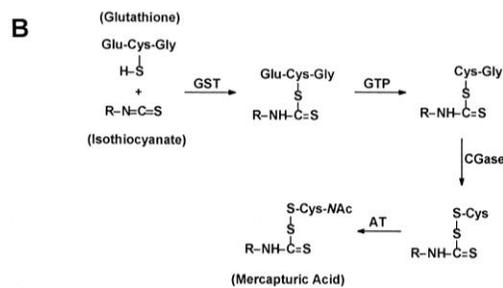


Figura 3. Metabolismo del sulforafano (Shapiro, 2006)

Estudios sugieren que el sulforafano afecta el dímero de Keap1-Nrf2. Las enzimas antioxidantes que se reconocen como el mecanismo primario de defensa contra agresiones oxidantes, tales como: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión transferasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, entre otras, son reguladas por mecanismos que involucran factores de transcripción nuclear como el Nrf2. Nrf2 se localiza en el citoplasma unido a una proteína (Keap 1), la separación del dímero provoca la translocación de Nrf2 al núcleo celular, en donde se une al elemento de respuesta antioxidante, lo que lleva a la síntesis de enzimas antioxidantes. Se ha propuesto que el sulforafano puede disociar el dímero Nrf2-Keap, por esta razón se ha considerado como antioxidante indirecto; aunque para este compuesto también se han encontrado resultados contradictorios en el establecimiento de la homeostasis celular de las ERO, ya que el metabolismo del sulforafano incluye la conjugación con el glutatión, disminuyendo sus concentraciones y aumentando el estrés oxidante (REB, 2015).

Morfología de Riñones

El **riñón** es un órgano par situado en la parte alta de la región retroperitoneal, a ambos lados, provisto de un conducto excretor, el uréter, que desemboca en la vejiga urinaria. Está formado por una serie de estructuras vasculares y epiteliales que funcionan en relación estrecha y que lo convierten en el órgano primordial del sistema urinario. Este sistema es el encargado de formar la orina y de eliminarla del cuerpo. Además de desempeñar este papel esencial, el riñón tiene la capacidad de producir la eritropoyetina, la renina o las prostaglandinas, que tienen gran influencia sobre el control de la tensión arterial, el metabolismo óseo o la formación de glóbulos rojos. Cada riñón está irrigado por una arteria renal que se origina de la aorta. La **nefrona** es la unidad estructural y funcional del riñón y comprende un elemento filtrante (corpúsculo renal de Malpighi) y un túbulo renal (Figura 4).

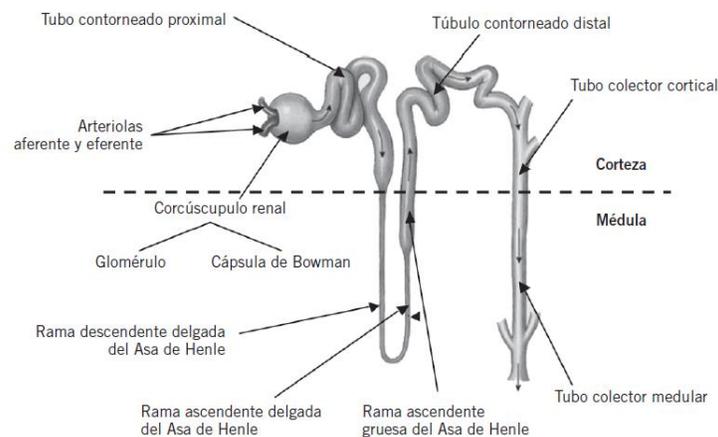


Figura 4. Morfología de la nefrona (Rodríguez Fernández, 2013).

Existe un espacio dentro de la cápsula, espacio de Bowman, hacia donde pasa el líquido filtrado procedente del glomérulo. El túbulo renal comienza con el túbulo proximal que inicialmente forma varias espiras, seguida de una porción recta. El siguiente segmento es la rama delgada descendente del asa de Henle, que posee una morfología en horquilla, comenzando en su final con un ascenso paralelo a la rama descendente. El corpúsculo renal y los túbulos contorneados se encuentran en la corteza renal; en cambio, el asa de Henle y la mayor parte de los túbulos colectores se sitúan en la médula renal. La barrera de filtración glomerular es una barrera molecular situada entre la sangre y el espacio urinario capaz de evitar el paso de la mayoría de

las proteínas plasmáticas, pero que permite el paso del agua, de pequeñas moléculas de soluto y de iones.

Una función básica del riñón es la formación de orina para su eliminación a través del sistema excretor urinario. Dos procesos distintos determinan esta formación: la filtración de líquido a través de los capilares glomerulares hacia el espacio de Bowman y la modificación del volumen y de la composición del filtrado glomerular en los túbulos renales. El ultrafiltrado glomerular es modificado en los túbulos renales por dos procesos: la reabsorción y la secreción tubulares.

- Reabsorción tubular: recuperación de solutos y de la mayor parte del agua filtrada en los glomérulos desde el fluido tubular hacia la sangre de los capilares peritubulares.
- Secreción tubular: adición de solutos al fluido tubular desde la sangre de los capilares peritubulares o desde las células tubulares.

El complejo equilibrio entre estos dos procesos; posibilita la formación de orina con unas características determinadas y mantiene estable la composición del medio interno. (Rodríguez Fernández, 2013).

ANTECEDENTES

La producción de especies reactivas de oxígeno ha sido implicada en la toxicidad celular causado por cisplatino. Al respecto, se ha sugerido que el daño se podría mitigar mediante la eliminación de radicales usando: quelantes de hierro, enzimas de actividad antioxidante como la SOD y CAT, o algunos otros elementos y antioxidantes clásicos (selenio, magnesio, vitamina E, vitamina C, glutatión); también se ha propuesto el uso de sustancias de origen natural: licopeno, resveratrol, naringenina, curcumina, cannabidiol, cilastatina, melatonina, etc. Los cuales han sido estudiados ampliamente, pero en los productos de origen natural con valor nutricional y beneficios a la salud (nutracéuticos) aún hay mucho por explorar.

Se cree que el consumo de brócoli y otros vegetales crucíferos, juega un papel importante y benéfico para la salud por la reducción del riesgo de cáncer y otras enfermedades crónicas degenerativas. Se le atribuye este beneficio gracias a su alto contenido de glucosinolatos, como la glucorafanina, precursor del sulforafano (Shapiro *et al.* 2006). El sulforafano es un compuesto que se ha promovido como citoprotector y contra el cáncer, es de rápida absorción, tiene un alto porcentaje de biodisponibilidad, no tóxico, la administración oral en ratas alcanza una concentración máxima en el plasma en una hora, y según estudios en humanos voluntarios se encontraron resultados muy similares (Hanlon *et al.*, 2009).

En 2010 Guerrero y colaboradores evaluaron si el sulforafano tenía efecto nefroprotector contra los efectos del cisplatino. Preincubaron células LLC-PK1 (epitelio renal porcino) con sulforafano en una concentración de 0.5-5 μM por 24 h y provocaron muerte celular con cisplatino 40 μM (figura 5). Se demostró una mayor viabilidad celular en presencia de sulforafano y fue asociada al factor de transcripción Nrf2, ya que en experimentos con sondas fluorescentes encontraron la translocación de Nrf2 del citoplasma hacia el núcleo después del tratamiento con sulforafano (figura 6).

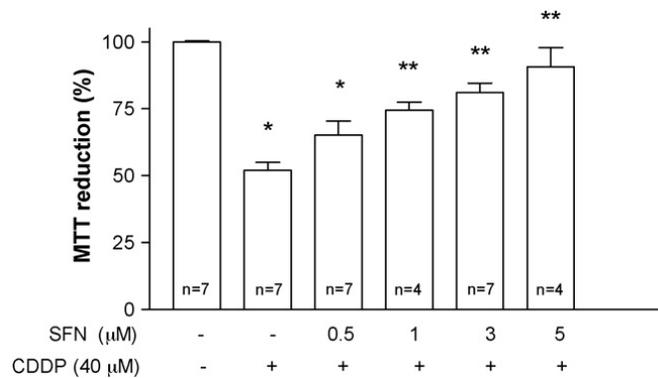


Figura 5. El SUL provoca menor muerte celular inducida por CIS. Las células fueron tratadas con SUL (0-5 μM) por 24 horas y después con CIS (40 μM) por 24 horas más. La viabilidad celular fue determinada usando el ensayo de reducción de MTT. Datos expresados como la media \pm SEM. * $p < 0.001$ vs. CT; ** $p < 0.001$ vs. CIS (Guerrero, 2010).

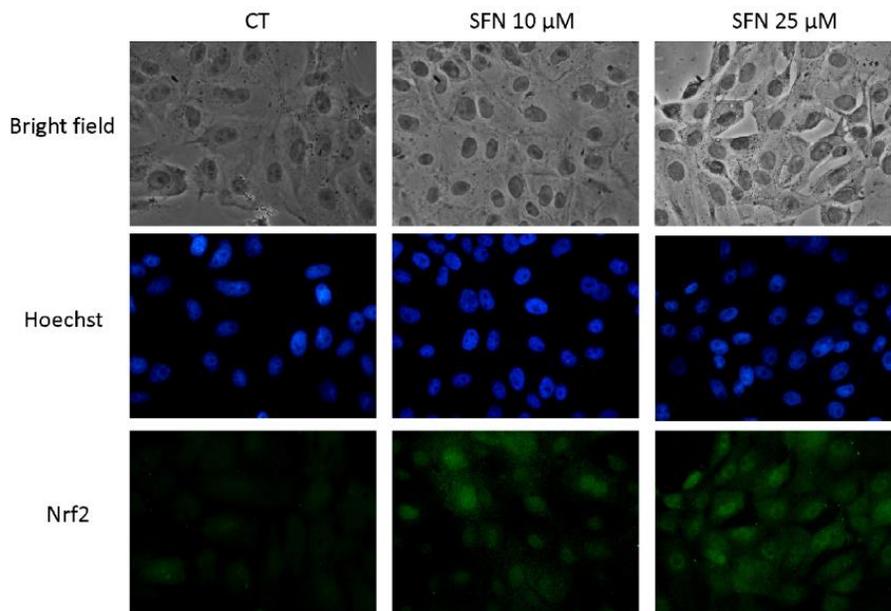


Figura 6. SUL induce la translocación de Nrf2 en células LLC- PK1. Las células fueron incubadas con SUL (10 y 25 μM) por 3 horas. La translocación nuclear del Nrf por el tratamiento con SUL fue determinada por tinciones inmunofluorescentes y contrastadas con Hoechst 33258 (Guerrero, 2010).

En agosto de 2010 demostraron que con 10 y 25 μM , en células LLC-PK1, el sulforafano previene el incremento en la producción de ROS, evita la disminución de la actividad de NQO1 (quinona oxidoreductasa de NADPH) y de la actividad de γ GCL (gama glutamil cisteinil ligasa), y produce una mayor concentración de GSH (Figura 7).

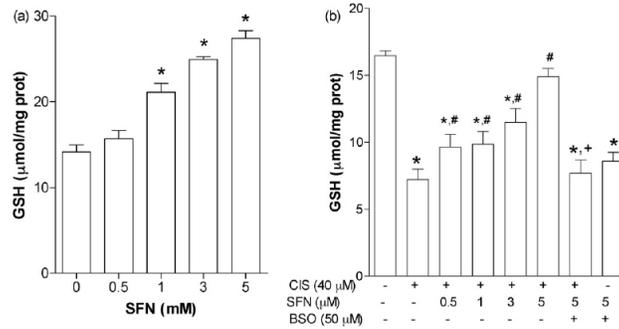


Figura 7. Efecto del sulforafano (a) en la concentración de GSH y en la menor concentración de GSH inducida por cisplatino (b) Las células del epitelio renal LLC-PK1 fueron incubadas (a) o preincubadas con SUL (0-5 μM) por 24 h y después incubadas con 40 μM de CIS por 24 h (b). Los datos son expresados como la media \pm ES n=3. CT: control. *p < 0.005 vs. CT, #p < 0.005 vs. CIS+SUL (5 μM).

En células H9C2 el sulforafano (10 μM) mostró protección contra la muerte celular inducida por doxorubicina (1 μM), un antineoplásico cuya toxicidad está asociada a estrés oxidativo, sulforafano indujo la expresión de la enzima hemo-oxigenasa activada por el factor transcripcional Nrf-2 y consecuentemente la cantidad de ERO fue menor (Bo Li et al, 2015).

Modelo animal

En estudios *in vivo* en ratas wistar con una dosis aguda única de CIS 7.5 mg/kg/i.p. y SUL 500 $\mu\text{g/kg/i.v.}$ en 2 dosis (24 horas antes y después del tratamiento con cisplatino). Los animales fueron sacrificados 72 horas después de la inyección con cisplatino. El sulforafano demostró atenuar: la disfunción renal (figura 8), estrés y daño oxidativo, depleción de GSH (figura 9), y la disminución de enzimas antioxidantes (figura 10): catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa (Guerrero et al, 2010).

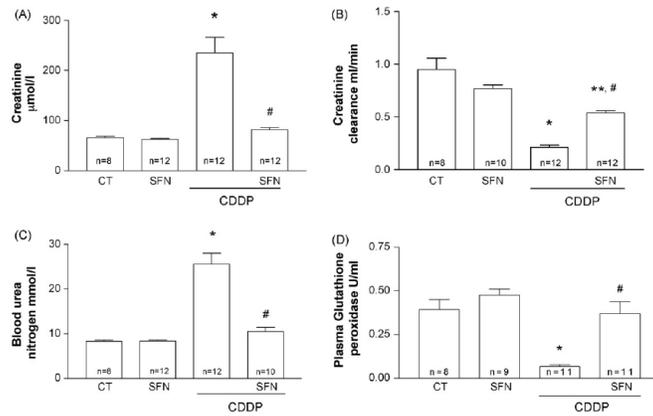


Figura 8. Marcadores de nefrototoxicidad en los grupos de ratas estudiados. (A) Creatinina en suero, (B) Aclaramiento de la creatinina, (C) BUN y (D) Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en plasma. * $p < 0.001$ vs. CT and SFN (sulforafano). ** $p < 0.001$ vs. CT; # $p < 0.001$ vs. CDDP(cisplatino). Los datos son expresados como la media \pm ES (Guerrero et al, 2010).

En el grupo tratado con cisplatino, produjo una concentración de creatinina y nitrógeno ureico tres veces mayor, y un menor aclaramiento de la creatinina, lo cual fue prevenido con el tratamiento de sulforafano en el grupo tratado con cisplatino y sulforafano. Además, el tratamiento con sulforafano evitó la disminución de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en plasma inducido por cisplatino. En este trabajo también encontraron que el tratamiento con sulforafano fue capaz de evitar el incremento de la excreción urinaria de proteínas totales y la N- acetil glucosaminidasa inducido por cisplatino.

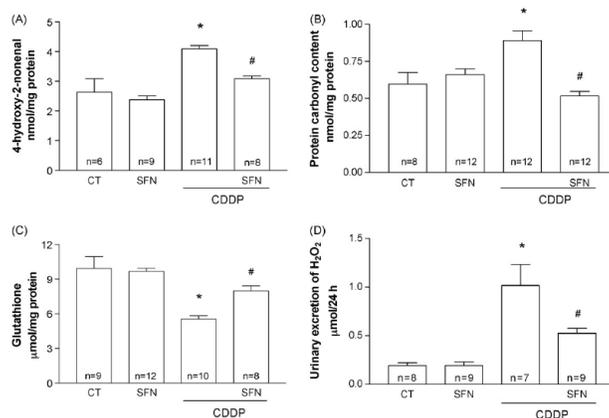


Figura 9. Marcadores de estrés oxidativo en los grupos de ratas estudiados. (A) 4-HNE, (B) Carbonilación de proteínas, (C) Glutatión y (D) excreción urinaria de H₂O₂. * $p < 0.05$ vs. CT y SUL; # $p < 0.001$ vs. CDDP(cisplatino). Los datos son expresados como la media \pm ES (Guerrero et al, 2010).

El cisplatino provocó mayores niveles de proteínas carboniladas, de 4- hidroxí-2- nonenal y excreción urinaria de H₂O₂, y menor concentración de glutatión, estos cambios fueron evitados por el cotratamiento con sulforafano.

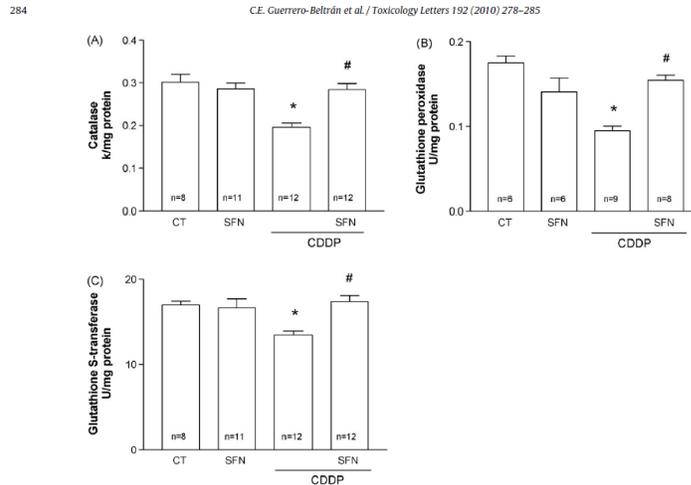


Fig. 10. Renal antioxidant enzymes in the groups of rats studied. Activity of (A) CAT, (B) GPx and (C) GST. * $p < 0.001$ vs. CT and SFN; # $p < 0.001$ vs. CDDP. Values are mean \pm SEM.

Figura 10. Enzimas antioxidantes en riñón de los grupos de ratas estudiados. Actividad de (A) CAT, (B) GPx y (C) GST. * $p < 0.001$ vs. CT y SUL; # $p < 0.001$ vs. CDDP(cisplatino). Los datos son expresados como la media \pm ES (Guerrero et al, 2010).

La actividad renal de Catalasa, Glutatión peroxidasa y Glutatión S Transferasa resultaron menores en el grupo de ratas tratadas con cisplatino, estos cambios fueron evitados por el tratamiento con sulforafano en el grupo cisplatino-sulforafano.

En 2011 Gaona y colaboradores evaluaron el efecto del sulforafano en dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{i.p.}$ durante 3 días. 24 horas antes, 30 minutos antes y 24 horas después de la administración de CIS 10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{i.p.}$ en ratas wistar que fueron sacrificadas 3 días después de la inyección con cisplatino. Para evaluar el daño midieron el estrés oxidativo (lipoperoxidación y GSH) así como actividad de algunas enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión reductasa, glutatión transferasa y superóxido dismutasa) (figura 11) y marcadores de daño renal (ALT y AST) (figura 12).

Effect of SFN pretreatment on CIS-induced hepatic oxidant stress and decrease in the activity of antioxidant enzymes.

| | Control | CIS | CIS + SFN | SFN |
|---|--------------|---------------------------|----------------------------|--------------|
| Lipid peroxidation (nmol MDA + 4-HNE/mg) | 105 ± 4.9 | 143 ± 9.2 [*] | 96 ± 11.1 ^{**} | 103 ± 8.3 |
| Protein carbonyl content (nmol carbonyl/mg) | 5.6 ± 0.11 | 6.2 ± 0.11 [*] | 5.7 ± 0.16 ^{**} | 5.5 ± 0.12 |
| GSH content (μmol/mg) | 47.4 ± 5.1 | 27.9 ± 3.5 [*] | 45.1 ± 4.8 ^{**} | 43.1 ± 1.1 |
| Catalase (k/mg) | 1.58 ± 0.24 | 1.11 ± 0.07 [*] | 1.88 ± 0.13 ^{**} | 1.63 ± 0.30 |
| Glutathione reductase (U/mg) | 0.08 ± 0.009 | 0.04 ± 0.004 [*] | 0.08 ± 0.007 ^{**} | 0.07 ± 0.012 |
| Glutathione peroxidase (U/mg) | 1.0 ± 0.08 | 0.4 ± 0.07 [*] | 0.9 ± 0.10 ^{**} | 0.9 ± 0.08 |
| Glutathione S-transferase (U/mg) | 7.0 ± 0.69 | 2.9 ± 0.79 [*] | 7.9 ± 1.79 ^{**} | 8.6 ± 0.43 |
| Superoxide dismutase (U/mg) | 69.1 ± 7.9 | 39.5 ± 5.9 [*] | 66.5 ± 11.3 ^{**} | 63.8 ± 4.2 |

SFN, sulforaphane; CIS, cisplatin; MDA, malondialdehyde; 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; mg, milligrams of protein; GSH, reduced glutathione; U, units; k, constant first-order reaction. Data represent mean ± SEM, n = 4.

^{*} p < 0.05 vs. control.

^{**} p < 0.05 vs. CIS.

Figura 11. Efecto del pretratamiento con sulforafano sobre el estrés oxidativo y la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas inducidos por cisplatino (Gaona et al, 2011).

Effect of SFN pretreatment on CIS-induced decrease in liver weight and liver ratio and increase in the activity of ALT and AST in blood serum.

| | Control | CIS | CIS + SFN | SFN |
|------------------|--------------|--------------------------|---------------------------|--------------|
| Body weight (g) | 266 ± 32.4 | 219 ± 21.9 | 235 ± 9.6 | 255 ± 22.2 |
| Liver weight (g) | 11.66 ± 1.66 | 6.66 ± 0.66 [*] | 9.33 ± 0.66 ^{**} | 11.33 ± 0.88 |
| Liver ratio (%) | 4.4 ± 0.10 | 3.0 ± 0.15 [*] | 3.9 ± 0.31 ^{**} | 4.4 ± 0.07 |
| ALT (U/L) | 37.7 ± 1.10 | 68.1 ± 8.01 [*] | 43.2 ± 2.91 ^{**} | 34.8 ± 2.51 |
| AST (U/L) | 36.5 ± 0.80 | 65.5 ± 3.40 [*] | 41.4 ± 3.16 ^{**} | 34.6 ± 3.40 |

SFN, sulforaphane; CIS, cisplatin; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. Data represent mean ± SEM, n = 4.

^{*} p < 0.05 vs. control.

^{**} p < 0.05 vs. CIS.

Figura 12. Efecto del pretratamiento con sulforafano sobre la disminución del peso y relación con el peso del hígado y el incremento de la actividad de las enzimas ALT y AST en suero inducidos por cisplatino.

JUSTIFICACIÓN

El riñón es un órgano blanco de daños crónicos por el cisplatino y la insuficiencia renal suele ser el causante de la muerte de personas expuestas crónicamente al cisplatino por quimioterapia, razón por la cual se discontinúa el tratamiento. Actualmente no hay terapias disponibles para prevenir la nefrotoxicidad; se han reportado las propiedades de algunos alimentos para promover tal protección; como miel, brócoli, espárragos, acelgas, espinacas, chía, curcumina, entre muchos otros. Así como selenio, magnesio, vitamina C, vitamina E, glutatiión, resveratrol, cannabidiol, cilastatina, amifostina, melatonina, apocinina, etc. En este estudio nos enfocamos al sulforafano, ya que este compuesto ha demostrado tener un efecto protector y antioxidante en algunos ensayos en modelos celulares y se ha propuesto que es capaz de activar al Elemento de Respuesta Antioxidante. Por lo cual se plantea la posibilidad de disminuir o prevenir efectos adversos ocasionados relacionados al daño oxidativo por el agente quimioterapéutico cisplatino.

HIPÓTESIS

El sulforafano protege de los efectos citotóxicos ocasionados por la quimioterapia con cisplatino, disminuyendo el estrés oxidativo.

OBJETIVOS

Evaluar el efecto del sulforafano, en la nefrotoxicidad y estrés oxidativo inducidos por el antineoplásico cisplatino en un modelo animal, con el fin de mejorar estrategias para atenuar o prevenir la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos.

Objetivos específicos

- Generar un modelo de exposición aguda en ratas Wistar con una sola dosis de cisplatino.
- Establecer un esquema de protección antioxidante con el sulforafano.
- Estudiar los efectos citoprotectores del sulforafano contra la toxicidad renal producida por cisplatino.
- Evaluar el daño renal inducido por cisplatino y si el sulforafano tiene efecto protector (Marcadores de nefrotoxicidad).
- Estudiar los efectos antioxidantes del sulforafano en el daño oxidativo inducido por cisplatino (SOD y CAT algunos de los productos de la vía Nrf2). Así como la capacidad antioxidante total.
- Estudiar los efectos del sulforafano sobre la eriptosis inducida por cisplatino.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El trabajo experimental se apegó a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales del laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) con el protocolo Cinvestav 0166-03.

Las ratas utilizadas fueron machos de la cepa Wistar (bioterio del Cinvestav UPEAL) con un peso 236 ± 10 gramos de peso corporal, con libre acceso a agua y alimento, hasta las 12 horas antes del sacrificio.

Las cuales se dividieron en 4 grupos:

Grupo 1: CON, a las cuales se les administró DMSO y NaCl al 0.9 %.

Grupo 2: SUL, a las que se les administró Sulforafano en DMSO (500 µg/ml) en 3 dosis diarias (1 mg/ kg de peso).

Grupo 3: CIS, a las que se les administró una dosis de 9 mg/kg de Cisplatino en NaCl al 0.9 %.

Grupo 4: SUL y CIS, a las que se les administró una dosis de 9 mg/kg de Cisplatino en NaCl al 0.9 % y Sulforafano en DMSO (1 mg/kg de peso) en 3 dosis: 24 horas antes y después de la administración de Cisplatino y 30 minutos antes de la administración de Cisplatino.

Reactivos

Cisplatin Lote MKBV3446V, DL-sulforaphane S4441 Lote SLBP3064B Sigma-Aldrich. Kits para determinaciones bioquímicas SPINREACT (úrea, creatinina, ácido úrico, FAL, ALT y AST). Reactivos de grado analítico.

Equipo

Espectrofotómetro UV/Visible modelo BECKMAN DU-650, Citómetro de flujo Fluorescence activated cell sorter (FACSCalibur).

Fundamentos de los métodos y protocolos.

Protocolo empleado para la obtención de muestras

Procedimiento

Se pesaron las ratas. Se administró la anestesia de acuerdo al peso, ketamina 30 mg /xilacina 5mg por kg de peso del animal. Una vez que el animal entró en un estado de inconsciencia, se hizo la apertura de la cavidad peritoneal. Se obtuvo la sangre por punción cardíaca con jeringa con heparina y se alícuotó en tubos de 1.5 ml que contenían 20 µl de heparina (2000 U/ml). Se realizó la disección abdominal para obtener ambos riñones y se lavaron con PBS frío. Los riñones se almacenaron individualmente inmediatamente después de la extracción -70 °C. Se separó el plasma en alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf para efectuar las diferentes determinaciones, guardar una alícuota a 4 °C y las demás a -20 °C. Se guardaron alícuotas de sangre total.

Urinilazer

Se utilizó el analizador de orina URINILAZER-30, basado en el principio de fotometría de reflectancia, con el uso de tiras reactivas para la detección semicuantitativa de los analitos presentes en orina; tales como proteínas y glucosa entre otros.

Proteínas en orina

La proteinuria, es el primer indicio de la existencia de una posible enfermedad de los riñones. La prueba está basada sobre el principio de error de proteínas de un indicador de pH (azul de tetrabromofenol). El área de reacción es más sensible a la albúmina.

Glucosa en orina

Se llama glucosuria a la presencia de glucosa en la orina a niveles elevados. La prueba está basada sobre la reacción de la Glucosa Oxidasa/Peroxidasa específica.

Creatinina

La creatinina es el resultado de la degradación de la creatina o fosfocreatina, componente de los músculos y puede ser transformada en ATP, fuente de energía para las células (Nelson, 2015), la creatinina filtra libremente por el glomérulo (pequeñas cantidades son reabsorbidas y también secretadas por los túbulos renales). La medición de la creatinina tiene utilidad para la evaluación de la función renal.

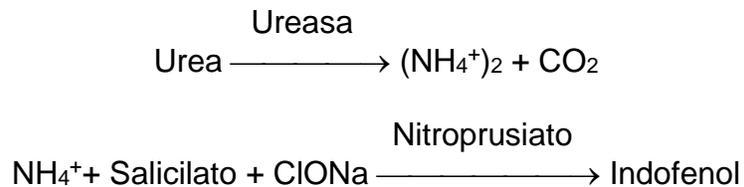
El ensayo de la creatinina está basado en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino descrito por Jaffé. La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo. El intervalo de tiempo escogido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra ensayada.

Reactivos: Ácido pícrico 17.5 mmol/L, hidróxido sódico 0.29 mol/L, patrón acuoso de Creatinina 2 mg/dL. **Procedimiento** Se mezcló 50 µl de muestra en 500 µl de reactivo de trabajo. Se leyó la absorbancia a 492 nm (A_1) al cabo de 30 segundos y al cabo de 90 segundos (A_2) de la adición de la muestra.

Urea

La urea es el resultado final del metabolismo de las proteínas; se forma en el hígado a partir de su destrucción. Puede aparecer la urea elevada en sangre (uremia) en dietas con exceso de proteínas, enfermedades renales, insuficiencia cardiaca, hemorragias gástricas y obstrucciones renales.

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, presente en la muestra, en amoníaco (NH_4^+) y anhídrido carbónico (CO_2). Los iones amonio reaccionan con salicilato e hipoclorito (ClONa), en presencia del catalizador nitroprusiato, para formar un indofenol verde:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de urea en la muestra ensayada.

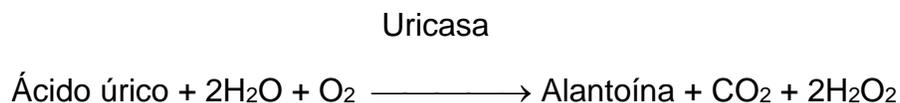
Reactivos Tampón: EDTA (2 mmol/L), salicilato sódico (400 mmol/L), nitroprusiato sódico (10 mmol/L). R2: Hipoclorito sódico (140 mmol/L) hidróxido de sodio (150 mmol/L). Ureasa 30000 U/L. Patrón primario acuoso de Urea 50 mg/dL.

Procedimiento: El espectrofotómetro (580 nm) se ajustó a cero frente a agua destilada.

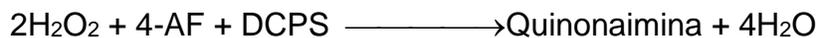
Ácido úrico

El ácido úrico y sus sales son el producto final del metabolismo de las purinas. En una insuficiencia renal progresiva hay una retención en sangre de urea, creatinina y ácido úrico. Niveles altos de ácido úrico son indicativos de patología renal.

El ácido úrico es oxidado por la uricasa a alantoína y peróxido de hidrógeno ($2\text{H}_2\text{O}_2$) que en presencia de peroxidasa, 4- aminofenazona (4-AF) y 2-4 Diclorofenol Sulfonato (DCPS) forma un compuesto rosáceo:



Peroxidasa

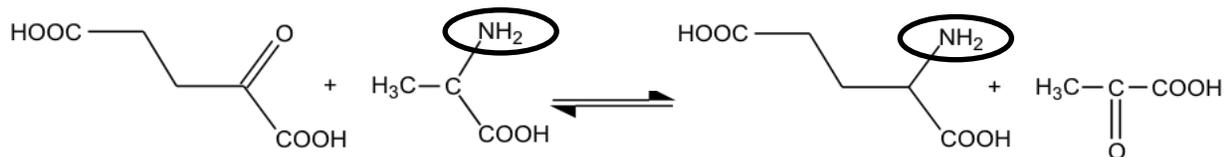


La intensidad de quinonaimina roja formada es proporcional a la concentración de ácido úrico presente en la muestra ensayada.

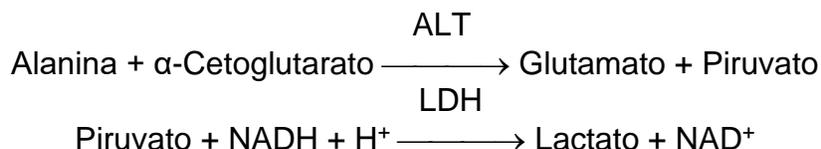
Reactivos: Tampón: Fosfatos pH 7.4 (50 mmol/L), diclorofenol Sulfonato (DCPS) (4 mmol/L). Enzimas: uricasa (60 U/L), peroxidasa (POD 660 U/L), ascorbato oxidasa (200 U/L) y 4 - aminofenazona (4-AF) (1 mmol/L). Patrón primario acuoso de ácido úrico (6 mg/dL). **Procedimiento:** Se ajustó el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada a 520 nm. 1 ml de reactivo de trabajo con 25 μL de patrón o muestra, e incubar 10 min a temperatura ambiente 15-25 $^\circ\text{C}$. Se leyeron las absorbancias (A) del patrón y la muestra, frente al blanco de reactivo.

Alanino aminotransferasa

La ALT es una enzima intracelular, se encuentra principalmente en las células del hígado y el riñón.



La ALT cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH:



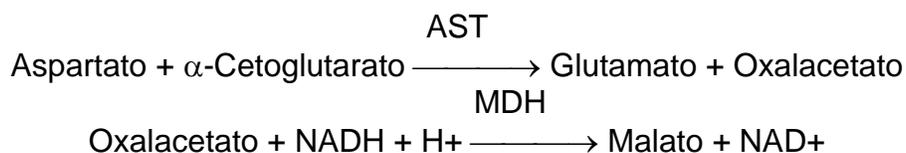
La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada.

Reactivos: Tampón: TRIS pH 7.8 (100 mmol/L), L-Alanina (500 mmol/L). Substrato: NADH (0.18 mmol/L), Lactato deshidrogenasa (LDH) (1200 U/L) α -Cetoglutarato (15 mmol/L). **Preparación** Reactivo de trabajo se preparó disolviendo un comprimido de sustrato en 15 mL de tampón. **Procedimiento:** Se ajustó el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada a una longitud de onda de 340 nm. Se mezclaron 50 μ L de muestra el 0.5 ml de RT e incubó 1 minuto. Se leyeron las absorbancias cada minuto durante 3 minutos y se calculó el promedio de la diferencia de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$) **Unidades:** La unidad internaciones (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

Aspartato aminotransferasa

La AST es una enzima intracelular, se encuentra en niveles altos en el músculo del corazón, las células del hígado, las células del músculo esquelético y en menor cantidad en otros tejidos. Aunque un nivel elevado de AST en suero no es específico de enfermedad hepática se emplea principalmente para su diagnóstico y seguimiento, junto con otras enzimas como la ALT y FAL.

La AST cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra ensayada.

Reactivos: Tampón: TRIS pH 7.8 (80 mmol/L), L-Aspartato (200 mmol/L). Sustrato: NADH (0.18 mmol/L), lactato deshidrogenasa (LDH) (800 U/L), malato deshidrogenasa (LDH) (600 U/L), α -Cetoglutarato (12 mmol/L). **Preparación:** Reactivo de trabajo se preparó disolviendo el sustrato en 15 mL de solución tampón. **Procedimiento:** Se

ajustó el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada a una longitud de onda de 340 nm. Se mezcló 50 µL de muestra el 0.5 ml de RT e incubó 1 minuto. Se leyó la absorbancia (A) inicial de la muestra, y cada minuto durante 3 minutos. Se calculó el promedio de la diferencia de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

Fosfatasa alcalina

Las fosfatasas alcalinas son enzimas que se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta su presencia en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. Tiene importancia clínica tanto su aumento como su disminución de los niveles en plasma.

La FAL cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato a pH 10.4 liberando p-nitrofenol y fosfato, según la siguiente reacción:



La velocidad de formación del p-Nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra ensayada.

Reactivos: Tampón: Dietanolamina (DEA) pH 10.4 (1 mmol/L), cloruro de magnesio (0.5 mmol/L). Sustrato: p-Nitrofenilfosfato (10 mmol/L). **Preparación:** Se mezcló: Tampón + Sustrato. 4:1. **Procedimiento:** Se ajustó el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada a 405 nm. Se mezclaron 20 µL de muestra el 1.2 ml de RT e incubó 1 minuto. Se leyeron las absorbancias cada minuto durante 3 minutos y se calculó el promedio de la diferencia de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$). **Cálculos:** $\Delta A/\text{min} \times 3300 = \text{U/L de FAL}$

Para el control de calidad de los ensayos: se utilizaron sueros controles multiparamétricos para ensayos de bioquímica clínica los cuales son reconstituidos a partir de un liofilizado de sueros humanos normal y patológico, siguiendo las instrucciones del proveedor. Sirve para controlar la exactitud o la precisión de las técnicas tanto manuales como automatizadas.

Determinación de Proteínas por el método de Lowry

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas. Este método consta de dos etapas. Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} - proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. La reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

Preparación de reactivos Solución A :10 g de Carbonato de Sodio Na_2CO_3 , 2 g de Hidróxido de Sodio NaOH , 0.134 g Tartrato de Sodio y Potasio. Se aforó a 500 ml H_2O destilada. Solución B: 0.5 gramos de Sulfato de cobre CuSO_4 en con 100 ml de H_2O destilada protegido de la luz. Al momento del ensayo se preparó la solución C: 50 ml de solución A con 1 ml de solución B.

Procedimiento: Se agregaron 200 μl de muestra preparada previamente en disolución con PBS, 1:300 para plasma, 1:500 para riñón. 1 ml de Solución C, reposo de 10 minutos, 100 μl de solución Folin 1:1 con agua destilada, se guardó reposo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se hicieron las lecturas a 660nm. Para la curva de calibración se preparó en tubos: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μl de solución de Albúmina de Suero Bovina BSA (1mg/ml) y se completaron con PBS hasta 200 μl .

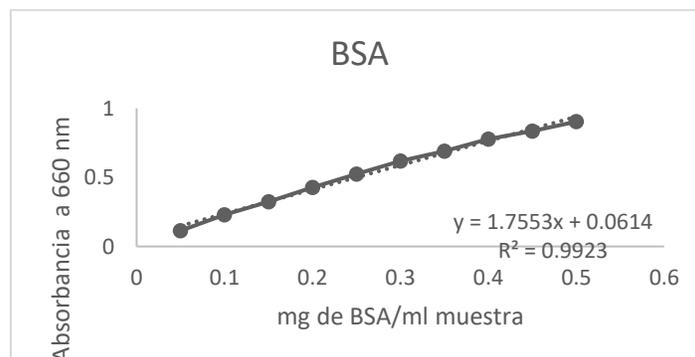


Figura 13. **Curva Patrón de Albúmina Sérica Bovina.** La gráfica muestra los valores de absorbancia a 660 nm, obtenidos para 10 diluciones a partir de una solución de albúmina sérica bovina (1 mg/ml). Los valores graficados representan el promedio de las tres lecturas para cada concentración evaluada.

Se calculó la cantidad de proteína presente en la muestra utilizando la ecuación de la recta obtenida de la curva patrón y considerando los factores de dilución.

Lipoperoxidación.

El malondialdehído ha sido ampliamente estudiado como producto de lipoperoxidación y como indicador de estrés oxidativo. La reacción se considera un método muy sensible para la determinación de la peroxidación lipídica en tejidos, eritrocitos y plasma que básicamente consta de los siguientes pasos: precipitación de las proteínas, liberación de MDA unido a las proteínas, reacción con el TBA (ácido tiobarbitúrico), determinación de los complejos MDA-TBA por análisis espectrofotométrico.

En tejido y plasma.

Procedimiento: 250 μ l de muestra homogenada de riñón 1:10 en KCl o plasma, 100 μ l de SDS al 8.1 %, 750 μ l de ácido acético al 20 % (pH 3.5), 750 μ l de TBA al 0.8 %, 150 μ l H₂O, se calentó durante 60 minutos a 95°C, se agregaron 500 μ l de H₂O, se añadieron 2.5ml de la mezcla n-butanol:piridina (15:1 v:v), se vortexeó vigorosamente y finalmente se centrifugó a 3000 rpm por 25 minutos, se midió la absorbancia de la capa orgánica a 532 nm (Ohkawa *et al*, 1978).

Curva patrón de TMP

El TMP tiene un peso molecular de 164.20 g/mol y una densidad de 0.997 g/ml. Se diluyeron 165 μ l TMP en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del stock de 0.01M. De la solución stock se tomaron 0.5 ml con concentración 0.01 M y se aforó a 100 ml para obtener una concentración final de 50 μ M. Se prepararon las siguientes concentraciones por triplicado para realizar la curva patrón:

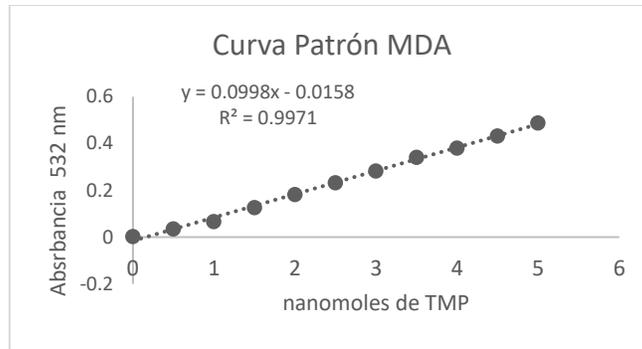


Figura 14. **Curva Patrón TMP.** Valores de absorbancia a 532 nm. Los puntos representan el promedio de las 3 determinaciones para cada concentración evaluada.

La concentración de equivalentes de MDA se obtuvo a partir de la ecuación de la recta. En el caso de las muestras de órganos se consideró la cantidad de proteína por ml de homogenado para obtener los nmoles equivalentes de MDA/mg de proteína.

Determinación de Malondialdehído en eritrocitos.

Procedimiento: 200 μ l de paquete globular (eritrocitos lavados 3 veces con PBS) para los blancos se utiliza 200 μ l de PBS, 800 μ l de PBS (8.1 g de NaCl, 2.302 Na₂HPO₄, 0.194 NaH₂PO₄, aforado a 1 litro, pH a 7.4), 25 μ l de BHT 40 mM, 500 μ l de TCA (tricloroacético) al 30% en agua destilada, se incubaron 2 horas en el cuarto frío, protegidas de la luz, se centrifugó a 3000 RPM durante 15 minutos, se tomó 1 ml de sobrenadante en otro tubo y agregó posteriormente: 75 μ l de EDTA 0.1M y 250 μ l TBA al 1% en NaOH 0.05 N a 40 °C, se taparon los tubos con esferas de cristal para evitar su evaporación, se puso en un recipiente a ebullición durante 15 minutos, se midieron las absorbancias de inmediato a 532 y 600nm y restaron las absorbancias de 532-600 nm para efectuar el cálculo correspondiente (Sushil *et al*, 1989).

Cálculos

Absorbancia=Concentración*Coeficiente de extinción molar de MDA*longitud de la celda

$(C * VT) / 0.2 = \text{nm de MDA/ml de muestra}$

Donde

C: Concentración de MDA, se hicieron las equivalencias de moles a nanomoles

A: Diferencia de las absorbancias de 532-600 nm

E: Coeficiente de extinción molar. $1.56 \cdot 10^5 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$

VT: Volumen Total de la muestra (2.02 ml, considerando las dos mezclas de reacción).

Superóxido Dismutasa

La enzima superóxido dismutasa es uno de los mecanismos de defensa más importante del cuerpo frente al daño ocasionado por los radicales libres, actuando como un potente antioxidante, cataliza la dismutación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los aniones superóxido, generados por la conversión de la xantina a ácido úrico y peróxido de hidrógeno debido a la actividad de la xantina oxidasa (XOD), reducen el azul de nitrotetrasolium a cristales de formazán solubles en agua, los cuales pueden medirse mediante absorbancia a 560 nm. La SOD disminuye la concentración del anión superóxido por lo que el porcentaje de inhibición de la reacción de reducción puede determinarse como una medida de la actividad SOD (Yi Sun, 1988). Se usó esta técnica para eritrocitos lisados (1:10 en agua destilada), plasma y tejidos homogenados en PBS (1:10)

Mezcla de Reacción. Cálculo para 40-80 tubos: 40 ml de Xantina (0.3 mmol/litro), 20 ml de EDTA, (0.6 mmol/litro), 20 ml de NBT (150 μ mol/litro), 12 ml Na_2CO_3 (400 mmol/litro) pH a 10.2, 6 ml de albúmina 1 mg/ml **Procedimiento:** 100 μ l de muestra (plasma, tejido homogenado o eritrocitos lisados), se agregó 300 μ l de cloroformo y 500 μ l de etanol a 4°C, se vortexeó rigurosamente 1 minuto, hasta formarse un precipitado, se centrifugó a 16900 g y 60 minutos, el sobrenadante se diluye 1:100 para eritrocitos 1:10 para plasma o tejido en PBS, tomar 250 μ l de la dilución y agregar 1.225 ml de la mezcla de reacción. 25 μ l de Xantina Oxidasa 10 nM (en NH_3SO_4 (2M) frío). Incubó 20 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con 1 ml de $CuCl_2$ 0.8 mmol/litro. La producción de formazán se determinó a 560 nm.

Curva patrón SOD

A partir de la solución stock de SOD se prepararon diluciones de 0 a 300 ng/mL para la curva patrón. Los valores de absorbancia se utilizaron para calcular el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs blanco}} * 100$$

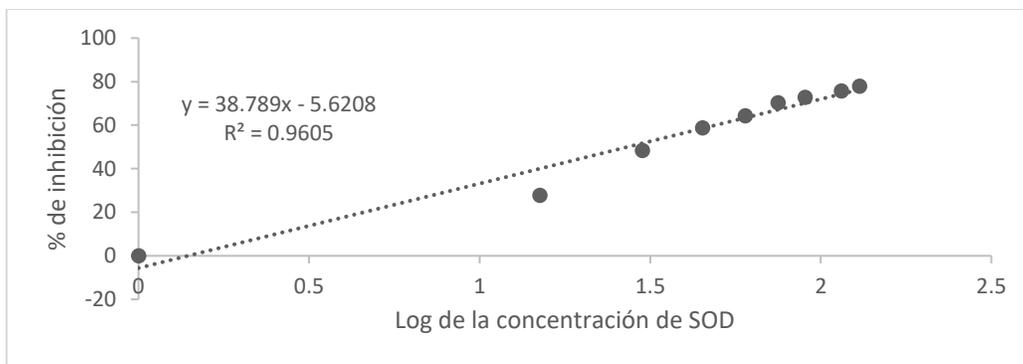


Figura 15. Valores de porcentaje de inhibición contra el logaritmo de la concentración de SOD. Los puntos representan el promedio de las 3 determinaciones para cada concentración que se evaluó, las muestras se procesaron de acuerdo a la técnica de Sun *et al.*

A partir del porcentaje de inhibición, y con la ecuación de la recta resultante de la curva patrón, se determinó la actividad de SOD. En el caso de tejidos, se consideró el factor de dilución y la cantidad de proteína presente en el ensayo.

Catalasa

La actividad de la enzima antioxidante catalasa se determinó por el método de Hugo Aebi. La descomposición de H_2O_2 fue monitoreada directamente por la disminución de la absorbancia a 240 nm. La diferencia en la absorbancia por unidad de tiempo es una medida de la actividad de la catalasa.

Catalasa



Amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7: Solución A: 6.81 g de KH_2PO_4 en 1 L en H_2O destilada. Solución B: 8.9 g de $NaHPO_4 \cdot 2H_2O$ en 1 L. Se mezclaron las soluciones A y B en proporción 1:1.5 (V/V). **Peróxido de Hidrógeno 30 mM:** 0.17 ml de peróxido de hidrógeno (30%) en 50 ml de amortiguador de fosfatos. **Procesamiento en tejido:** Se hizo la dilución 1:250 del homogenado al 10% en PBS 1% Tritón 100X (peso/volumen) de riñón, se tomó 1 ml de muestra directamente a la celda, iniciando la reacción con 0.5 ml de solución de peróxido de hidrógeno 30 mM, se leyeron las absorbancias inicial y final (1 minuto) a 240 nm. **Procedimiento en eritrocitos:** Se determinó el contenido de hemoglobina en sangre total con el método de Drabkin's, se lavaron los eritrocitos con NaCl al 0.9% 3 veces, se preparó un stock hemolizado 1:4 del paquete globular con agua destilada, se hizo una dilución 1:500 de este hemolizado con el buffer de fosfatos,

se tomó 1 ml de la dilución de muestra directamente a la celda, iniciando la reacción con 0.5 ml de solución de peróxido de hidrógeno, siguiendo la disminución de la absorbancia inicial y cada 15 segundos durante 60 segundos a 240 nm (Aebi,1984).

Cuantificación de actividad de catalasa

$$K = \left(\frac{2.3}{\Delta t}\right) \log \frac{A_i}{A_f} \left(\frac{FD}{mg \text{ Hb o Proteína}}\right)$$

Método de Drabkin's.

El reactivo de Drabkin's es usado para la determinación colorimétrica cuantitativa de la concentración de hemoglobina en sangre. El procedimiento está basado en la oxidación de la hemoglobina y sus derivados a metahemoglobina en la presencia de ferricianuro de potasio alcalino. La metahemoglobina reacciona con el cianuro de potasio para formar cianometahemoglobina, el cual tiene una máxima absorción a 540 nm.

Procedimiento: Para preparar la solución de Drabkin's se reconstituyó el contenido del vial del reactivo de Drabkin's en 1 litro de agua destilada, se agregó después 500 µl de la solución Brij L23 al 30 %, almacenó en frasco ámbar, protegido de la luz y en refrigeración. Se usaron 10 µl de sangre total con heparina o agua para los blancos, que se mezclan en 2.5 ml de la solución de Drabkin's, mezclando muy bien, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-26 °C), y se leyeron las absorbancias a 540 nm.

Curva de calibración: De una solución estándar de cianometahemoglobina que contenía 80 mg/dL se prepararon los estándares de trabajo mezclando las cantidades que se indican:

| | | | | |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Estándar (ml) | 0 | 0.5 | 1 | 1.5 |
| Solución Drabkin's (ml) | 1.5 | 1 | 0.5 | 0 |
| Cianometahemoglobina (mg/ dL) | 0 | 40 | 80 | 120 |

Se ajustó a cero en el espectrofotómetro a 540 nm con el tubo 1 y con los valores de absorbancia de los tubos 2-4 se graficó la curva de los valores de absorbancia en el eje de las Y; y en X, la concentración de la cianometahemoglobina (mg/ml).

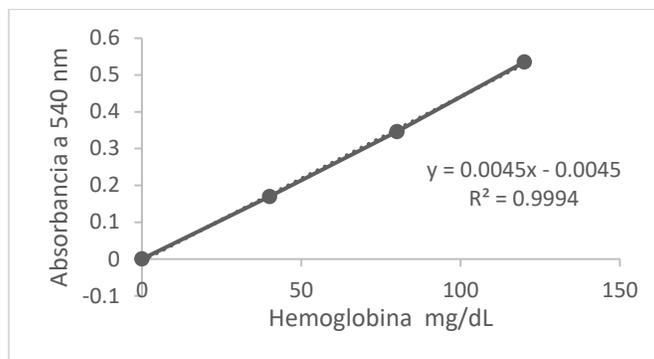


Figura 16. Curva patrón para la determinación de hemoglobina en sangre total.

Capacidad antioxidante total

La técnica, se basa en el principio de la formación del radical catión 2,2'-azino-di(3-etilbenzotiazohín sulfonato) (ABTS) debido a la acción de la metamioglobina/H₂O₂. Este radical presenta una coloración verde azulada que se mide a 600 nm. La presencia de antioxidante en la mezcla produce una supresión de la formación del radical y por ende de la coloración, siendo la misma proporcional a la actividad antioxidante. El método utiliza el Trolox (derivado sintético de la vitamina E) como patrón (Kambayashi *et al*, 2009).

Preparación de muestras

Para la determinación de la capacidad antioxidante total en plasma se utilizó una dilución 1:50 en PBS. En el caso de los órganos fue necesario hacer un homogenado 10% en PBS (peso/volumen), en una dilución 1:5 (1:50 final) en PBS.

Soluciones: Amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.2: 8.1 g de NaCl, 2.302 g de Na₂HPO₄, 0.194 g de NaH₂PO₄. **Mioglobina 18 µM** 32 mg de mioglobina en 100 ml de PBS, **Solución de ABTS 3 mM:** Se pesaron 0.01646 g de ABTS, se disolvieron en 10 ml de PBS, **Solución de H₂O₂ 2.5 mM** De una solución al 30 % de H₂O₂ (8.82 M), tomar 28.5 µl y aforar a 100 ml con PBS. **Trolox 2500 µM PM 250.3 g/mol** Pesar

0.01564 g y en 25 ml de PBS. Al momento de usarse se diluyó 1:10 para una concentración final de 250 μM .

Procedimiento. En cada pozo de la placa colocar: 90 μl de amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.2, 50 μl de mioglobina, 20 μl de ABTS, 20 μl de muestra biológica o trolox como patrón, se mezcló por vibración e incubó a 25°C durante 3 min. Se inició la reacción agregando 20 μl de H_2O_2 . Y se leyeron las absorbancias una vez transcurridos exactamente 5 minutos a una longitud de onda de 600 nm.

Curva patrón de trolox.

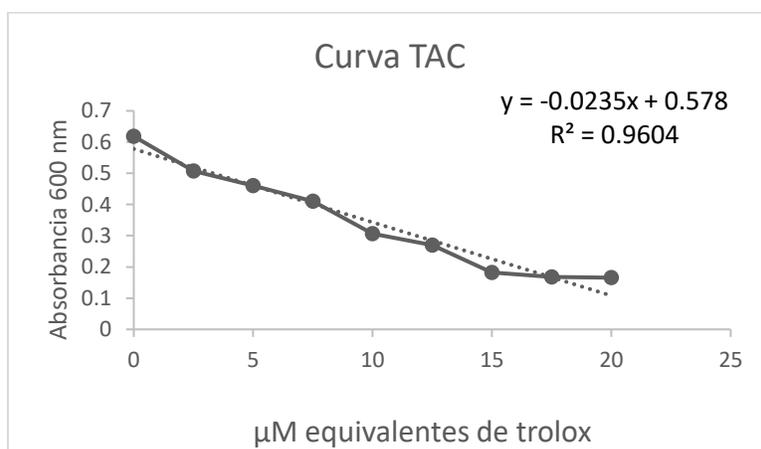


Figura 17. **Curva patrón de trolox.** Valores de absorbancia promedio (600nm). Los puntos representan el promedio de las 3 determinaciones por concentración evaluada.

Cuantificación de capacidad antioxidante total

$$\mu\text{M equivalentes trolox} = (\text{Absorbancia} - 0.578) / -0.0235$$

Los valores de equivalentes trolox para el plasma se multiplicaron por los respectivos factores de dilución, y considerando los mg de proteína presente en la muestra en el caso de los tejidos.

Determinación de externalización de fosfatidilserina por unión a Anexina V-FITC mediante citometría de flujo.

La correlación entre el estrés oxidativo y la externalización de fosfatidilserina sugiere que el estrés oxidativo induce a la eritosis (Calderón *et al.* 2011). La fosfatidilserina,

un fosfolípido que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, se transloca a la cara externa de la membrana durante la apoptosis. Este ensayo es utilizado para la detección de la etapa temprana de la apoptosis en eritrocitos (eritosis). La Anexina V-FITC se une a la fosfatidilserina con buena especificidad en presencia de CaCl_2 sólo en la cara externa de las células ya que no es permeable. El conjugado Anexina V-FITC puede ser usado para la detección de apoptosis por citometría de flujo.

Procedimiento 1 ml de sangre heparinizada fresca no hemolizada, se hicieron 3 lavados con 1 ml de PBS frío, centrifugando 5 minutos a 5000 RPMs, desechando el sobrenadante por succión. Se hizo una dilución de eritrocitos lavados 1:50 en PBS, se agregaron 200 μl de la dilución 1:50 a cada tubo, se centrifugaron todos los tubos 1 min. a 3000 RPM, se retiró el PBS y se guardó el pellet formado. A los blancos se agregaron 200 μl de PBS y se guardó en frío. A las muestras con AV (Con Anexina) y SA (Sin Anexina) se agregaron 200 μl de buffer de unión (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2), centrifugó 1 minuto a 3000 RPM y se retiró el sobrenadante. A las muestras con AV y SA agregaron se 200 μl de buffer de unión nuevamente. A las muestras AV se puso 1 μl de Anexina V-FITC e incubó 5 minutos protegidos de la luz, se centrifugaron todas las muestras (AV y SA) 1 minuto a 3000 RPM y se retiró el sobrenadante. A las muestras SA se agregó buffer de unión, y guardó en frío. A las muestras AV se agregó 200 μl de buffer de unión, resuspendió con suavidad, centrifugó y retiró el sobrenadante a fin de eliminar la Anexina V que no se unió. Se analizaron las muestras por citometría de flujo en Fluorescence activated cell sorter (FACSCalibur) y el procesamiento de datos en Summit V 4.3.

Los análisis estadísticos.

Todos los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar. Los análisis estadísticos fueron realizado por ANOVA usando el programa GraphPad Prism, versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Peso de las ratas.

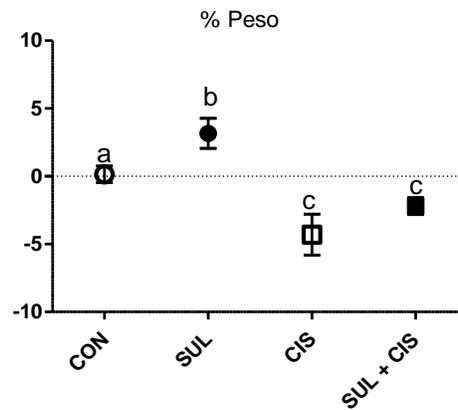


Figura 18. Cambio de peso en los grupos de ratas estudiados (○) sin y (□) con tratamiento con cisplatino (9mg/kg/i.p./dosis única), sólo (●) con sulforafano y (■) cisplatino con sulforafano (1 mg/kg/i.p./3dosis). Los datos son expresados como la media con el error estándar (n=5). (P<0.05) ANOVA. Letras diferentes= diferencia significativa.

Las ratas tratadas con cisplatino presentaron pérdida de peso que fue estadísticamente significativa, el tratamiento con sulforafano no pudo evitar la pérdida de peso inducida por el tratamiento con cisplatino, aun cuando el tratamiento sólo con SUL incrementó el peso por encima del grupo control.

Proteinuria y glucosuria

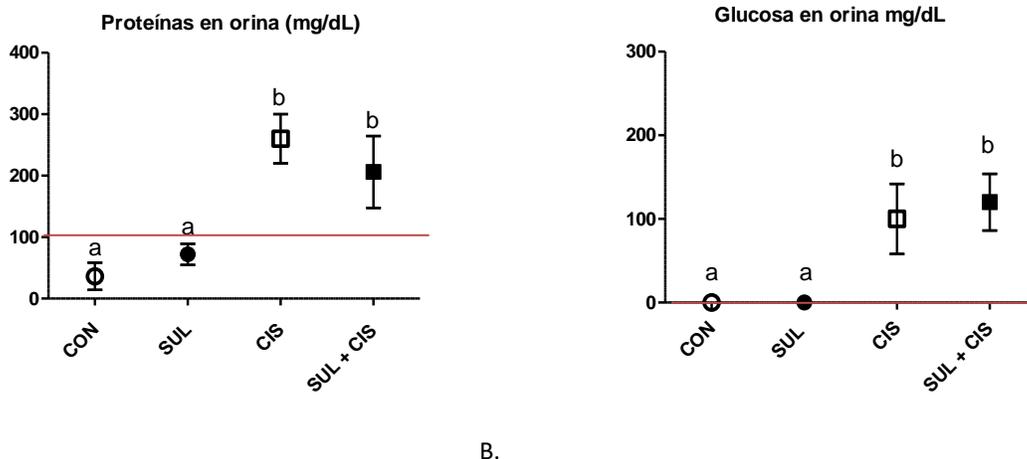


Figura 19. Marcadores de nefrotoxicidad, proteinuria (A) y glucosuria (B) en ratas (○) sin y (□) con tratamiento con cisplatino (9mg/kg/i.p./dosis única), sólo (●) con sulforafano y (■) cisplatino con sulforafano (1 mg/kg/i.p./3dosis). Los datos son expresados como la media con el error estándar (n=5). (P<0.05) ANOVA. Letras diferentes= diferencia significativa. La línea horizontal indica el límite máximo normal de proteínas en orina.

Como se muestra en la figura 19 el tratamiento con cisplatino produce proteinuria y glucosuria. El cotratamiento de sulforafano con cisplatino no evita la proteinuria y glucosuria. Como era de esperarse el grupo control y el grupo tratado con sulforafano presentan una concentración de proteínas en orina que no representa patología, y no se detecta glucosa en orina.

Biomarcadores de daño renal en plasma

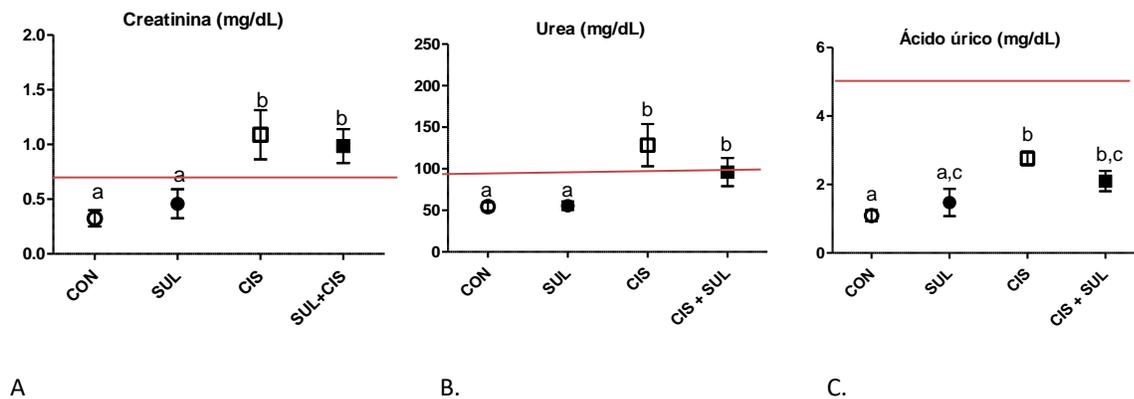


Figura 20 Marcadores de nefrotoxicidad en plasma de ratas wistar, (A) Creatinina (B) Urea (C) Ácido úrico. (○) sin y (□) con tratamiento con cisplatino (9mg/kg/i.p./dosis única), sólo (●) con sulforafano y (■) cisplatino con sulforafano (1 mg/kg/i.p./3 dosis). Los datos son expresados como la media ± ES (n=5). (P<0.05) ANOVA. Letras diferentes= diferencia significativa. La línea roja, indica el límite máximo normal de los parámetros evaluados.

Las ratas tratadas con cisplatino presentaron mayor concentración de creatinina, urea y ácido úrico. En creatinina y urea se observa una diferencia significativa entre los grupos sin y con tratamiento de cisplatino, también se observa que estos valores están por encima de los límites máximos normales, por otro lado, el cotratamiento cisplatino+ sulforafano no presenta diferencia significativa comparada con el grupo tratado con cisplatino. En el caso particular del ácido úrico, el grupo tratado con cisplatino demostró una mayor concentración estadísticamente significativa con respecto a los grupos control y tratado con sulforafano, pero sin diferencia respecto al grupo que recibió el cotratamiento sulforafano y cisplatino, hay que resaltar que las concentraciones de ácido úrico de todos los grupos se encuentran dentro del límite máximo normal.

Biomarcadores de daño celular.

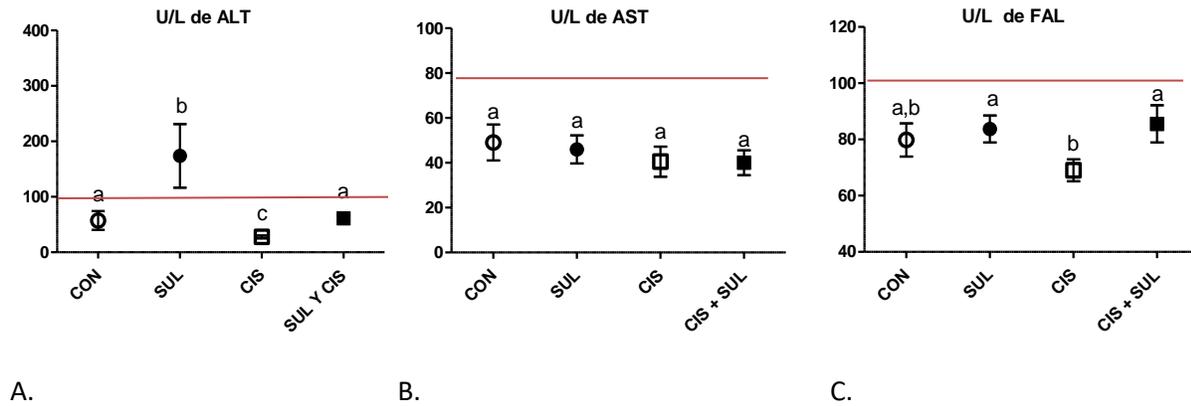


Figura 21. Marcadores de toxicidad en plasma de ratas wistar, (A) Alanina transaminasa, (B) Aspartato transaminasa y (C) Fostatasa alcalina (○) sin y (□) con tratamiento con cisplatino (9mg/kg/i.p./dosis única), (●) sólo con sulforafano y (■) cisplatino con sulforafano (1 mg/kg/i.p./3 dosis). Los datos son expresados como la media ± ES (n=5). ($P < 0.05$) según ANOVA. letras diferentes= diferencia significativa.

En el panel A de la figura 21 se observa la actividad de la alanina transaminasa en el grupo tratado con sulforafano una mayor actividad y en el grupo tratado con CIS una menor actividad estadísticamente significativas. La actividad de la AST y la FAL no muestran diferencia significativa entre los grupos con los diferentes tratamientos. En general todos los resultados están por debajo del límite normal máximo excepto el grupo tratado con SUL en la actividad de ALT.

Lipoperoxidación

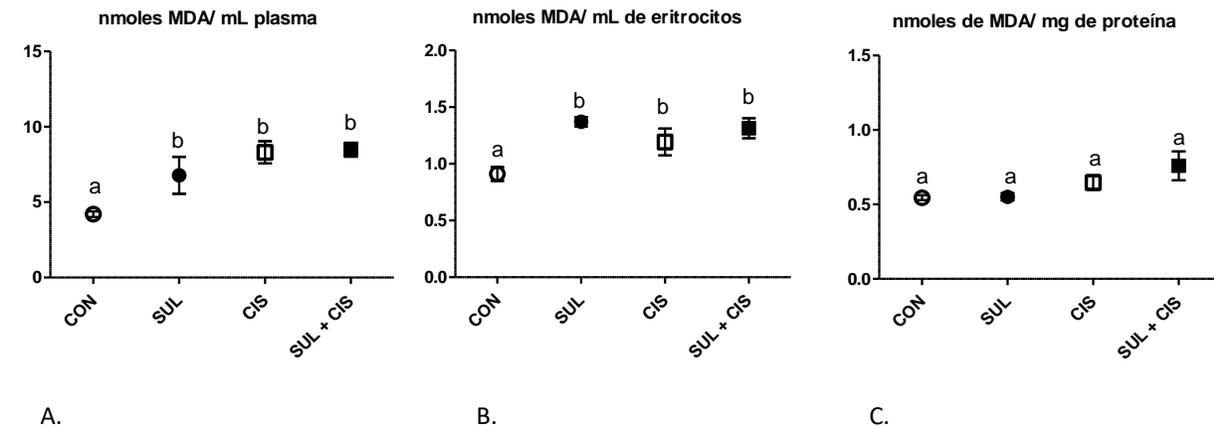


Figura 22. Lipoperoxidación en (A) plasma, (B) eritrocitos y (C) tejido de riñón. (○) sin y (□) con tratamiento con cisplatino (9mg/kg/i.p./dosis única), sólo (●) con sulforafano y (■) cisplatino con sulforafano (1 mg/kg/i.p./3 dosis). Los datos son expresados como la media ± ES (n=5). ($P < 0.05$) ANOVA. letras diferentes=diferencia significativa.

La lipoperoxidación es mayor y estadísticamente significativa en los grupos tratados con sulforafano, cisplatino y con el contratamiento sulforafano y cisplatino, comparados con los grupos control de plasma y eritrocitos (panel A y B, respectivamente de la figura 22). En el panel C, se muestran los resultados de la lipoperoxidación en homogenado de riñón sin diferencias significativas entre grupos.

Superóxido Dismutasa

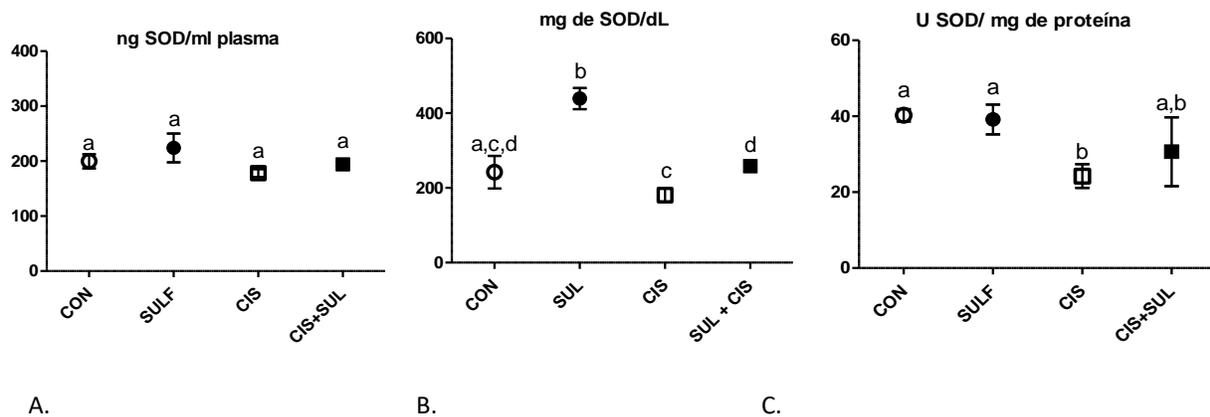
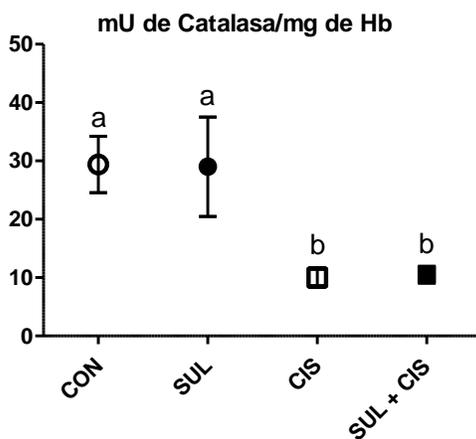
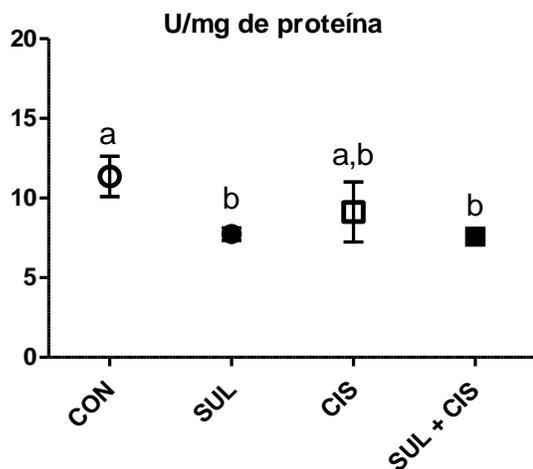


Figura 23. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en (A) plasma, (B) eritrocitos y (C) tejido de riñón de rata Wistar. (○) sin y (□) con tratamiento con cisplatino (9mg/kg/i.p./dosis única), sólo (●) con sulforafano y (■) cisplatino con sulforafano (1 mg/kg/i.p./3 dosis). Los datos son expresados como la media ± ES (n=5). ($P < 0.05$) ANOVA. letras diferentes= diferencia significativa.

En plasma la actividad de SOD no es diferente significativamente en los diferentes grupos. En los eritrocitos de ratas tratados con cisplatino se encontró menor actividad de SOD y en el grupo tratado con sulforafano se encontró mayor actividad con respecto al grupo control, el cotratamiento con SUL evita la menor actividad de SOD inducida por CIS. En homogenados de riñón, es significativa la menor actividad de SOD en el grupo tratado con CIS y el cotratamiento con SUL no modificó la actividad de manera significativa.

Catalasa





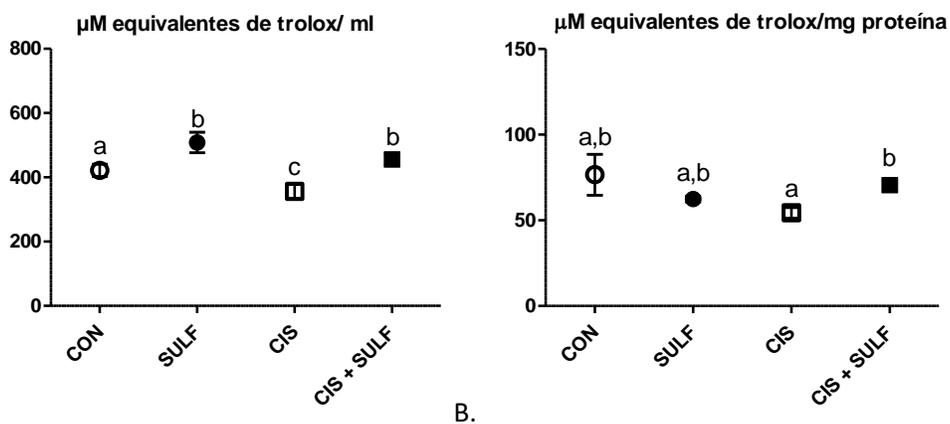
A.

B.

Figura 24. Actividad de la enzima catalasa en (A) eritrocitos y (B) tejido de riñón de rata. (○) sin y (□) con tratamiento con cisplatino (9mg/kg/i.p./dosis única), sólo (●) con sulforafano y (■) cisplatino con sulforafano (1 mg/kg/i.p./3 dosis). Los datos son expresados como la media ± ES (n=5). ($P<0.05$) ANOVA. letras diferentes= diferencia significativa.

La actividad de la enzima catalasa en los eritrocitos de rata tratados con cisplatino es menor a los grupos que no fueron tratados con el antineoplásico. En el caso del riñón en los grupos tratados con sulforafano con o sin cisplatino se encontró una menor actividad, estadísticamente significativamente en comparación al grupo control.

Capacidad antioxidante total



A.

B.

Figura 25. Capacidad antioxidante total en (A) plasma y (B) tejido de riñón de rata. (○) sin y (□) con tratamiento con cisplatino (9mg/kg/i.p./dosis única), sólo (●) con sulforafano y (■) cisplatino con sulforafano (1 mg/kg/i.p./3 dosis). Los datos son expresados como la media ± ES (n=5). ($P<0.05$) ANOVA. letras diferentes= diferencia significativa.

La capacidad antioxidante total fue estadísticamente menor en el grupo tratado con cisplatino, y los grupos con sulforafano mostraron mayor capacidad que el grupo control, en particular la TAC del grupo que recibió tratamiento combinado de sulforafano y cisplatino fue estadísticamente mayor que el grupo tratado con cisplatino. También, en homogenados de riñón el tratamiento con cisplatino mostró una menor capacidad antioxidante total, con respecto al grupo que recibió el tratamiento de cisplatino con sulforafano.

Determinación de externalización de fosfatidilserina

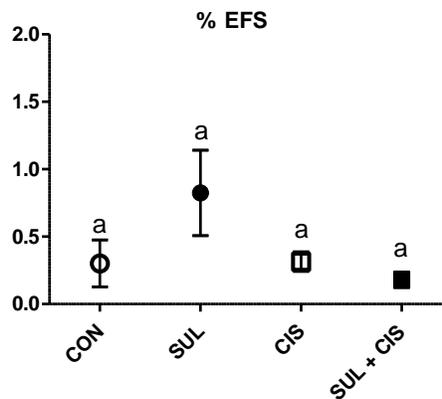


Figura 26. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos de rata. (○) sin y (□) con tratamiento con cisplatino (9mg/kg/i.p./dosis única), sólo (●) con sulforafano y (■) cisplatino con sulforafano (1 mg/kg/i.p./3 dosis). Los datos son expresados como la media ± ES (n=5). ($P < 0.05$) ANOVA. letras diferentes= diferencia significativa.

No se encontró diferencia significativa en la externalización de fosfatidilserina en los eritrocitos de las ratas que recibieron los diferentes tratamientos.

DISCUSIÓN

La patología de la nefrotoxicidad inducida por el agente quimioterapéutico cisplatino es compleja, y aun no se han dilucidado completamente los mecanismos, pero hay evidencias que indican que la patogenia involucra al estrés oxidativo.

Como se observó en los resultados, las ratas tratadas con cisplatino no solo no ganaron peso como parte natural de su desarrollo; sino que incluso disminuyeron de peso, lo cual es un efecto secundario común en el tratamiento con antineoplásicos, en el caso particular del tratamiento con cisplatino la pérdida de peso está documentada tanto en modelos animales como en humanos. En general, se ha referido que la pérdida de peso se debe a: anorexia, vómitos, diarrea y deshidratación (Miller, 2010). En 2003, Endo y Kambayashi reportaron que el cisplatino induce significativamente la disminución del peso corporal probablemente debido a mala absorción intestinal. El sulforafano no pudo evitar la pérdida de peso debido al tratamiento con cisplatino, las causas propuestas para la pérdida de peso son de origen central (anorexia y vómitos) o de origen irritativo (diarrea), en ambos casos es difícil proponer un efecto antioxidante como tratamiento para reducir esta condición patológica.

Para determinar el daño renal, en este estudio se usaron marcadores de daño glomerular y de daño tubular. La presencia de proteínas en orina mayor a 100 mg/dL indica daño glomerular, mientras que la presencia de glucosa en orina en este caso indica, daño a los túbulos renales. El cotratamiento con sulforafano no impidió el daño renal inducido por el tratamiento con cisplatino. Los fenómenos que llevan a que el cisplatino cause daño renal evidentemente no solo pueden ser oxidativo, si no que el cisplatino puede dañar el DNA de las células en proliferación, diversas proteínas, membranas; causar estrés al retículo endoplásmico, trastornos en la función mitocondrial y puede producir apoptosis o necrosis (Miller, 2010). El riñón contiene epitelios tubulares y endotelios glomerulares, ambos con un notable índice de proliferación, lo cual lleva a regenerar este tejido, que pierde una gran cantidad de células al día (Flaquer, 2010), por lo cual los efectos del cisplatino sobre el DNA, la necrosis o la apoptosis no serían eventos aislados y podrían llevarse a cabo aun cuando el sulforafano ofrezca protección antioxidante.

Cuando el daño renal progresa hacia una insuficiencia renal se incrementan en plasma las concentraciones de creatinina, urea y ácido úrico debido a la incapacidad del riñón de eliminar por excreción y secreción estos compuestos, indicando que se encuentran comprometida la función tubular y que se inicia un cierto grado de insuficiencia renal aguda. En los resultados se puede observar que en los grupos control y tratados con sulforafano, los biomarcadores de daño renal en plasma se encuentran dentro del límite normal. En cambio, la administración de cisplatino causa una mayor concentración de estos indicadores, en particular en la concentración de creatinina y urea el efecto es patológico dado que rebasan el límite normal; en ambos casos, no se puede sugerir protección por el cotratamiento con sulforafano, dado que no hubo diferencia con el tratamiento solo con cisplatino. En el caso de ácido úrico los cuatro grupos se encuentran dentro de los límites normales, por lo tanto, las diferencias que se encontraron con los diferentes tratamientos carecen de importancia fisiopatológica.

Los resultados anteriormente analizados difieren con los presentados por Guerrero en 2010, donde muestran que el sulforafano protege del daño inducido por el tratamiento con cisplatino, en este trabajo evaluaron urea y creatinina en suero, aclaramiento de la creatinina y proteinuria, en todos estos parámetros encontraron valores significativamente menores en los grupos que recibieron sulforafano y cisplatino con respecto al grupo que solo recibió cisplatino. La diferencia puede deberse a que Guerrero y colaboradores administraron el sulforafano vía intravenosa en una dosis (500 µg/kg) y en este trabajo se aplicó vía intraperitoneal (1mg/kg) aunque es mayor la dosis, el porcentaje de absorción y la cinética de distribución son menores en una aplicación intraperitoneal respecto a una intravenosa.

A fin de complementar el análisis clínico se evaluaron otros biomarcadores de toxicidad en plasma como las AST, ALT y FAL, enzimas intracelulares que se encuentran abundantemente en las células del hígado y el riñón. Las tres pruebas mencionadas son pruebas llamadas enzimas de escape; que se detecta su actividad y aumentan en la sangre cuando las células dañan notablemente su permeabilidad o han muerto por necrosis. Las causas más probables de aumento del nivel de las tres pruebas son daños necróticos a riñón o hígado; sin descartar que pueden ser indicadores de daño al

corazón y quemaduras extensas. En el presente trabajo no se detectó un incremento estadísticamente significativo de la actividad plasmática de las tres enzimas en el grupo tratado con cisplatino con respecto al grupo control, esto indica que no se detectó suficiente daño en el riñón a pesar de haber encontrado alteraciones en la funcionalidad tubular y glomerular de este órgano y que se estableció una insuficiencia renal aguda incipiente. Lo cual podría explicarse por la ventana del tiempo que se está explorando y en la cual posiblemente se han alcanzado daños moleculares y funcionales (glomerulares y tubulares), posiblemente estructurales pero aún no tisulares, es decir que los daños que llevan a franca insuficiencia renal aparecerían en tiempos posteriores al tiempo de análisis o que el daño no fue suficiente para alcanzar alteraciones necróticas en el tejido. A diferencia de los resultados mostrados por Gaona y cols. en 2011 donde el cisplatino produjo un mayor daño a las células o mayor número de células dañadas por lo que observaron una mayor actividad de las enzimas AST y ALT, en los resultados obtenidos en el presente trabajo no se encontró toxicidad necrótica en los diferentes grupos. En el estudio de referencia, los autores utilizaron una dosis de cisplatino de 10 mg/kg/i.p. mientras que en este trabajo se decidió usar 9 mg/kg/i.p. dado que en la curva dosis respuesta se encontró que a esta dosis ya existía daño a la función renal y se buscaba la menor dosis que produjera daño para poderla retar con el uso de sulforafano, con la intención de no usar dosis muy altas en las cuales el sulforafano ya no pudiera tener efectos que compitieran para evitar la toxicidad. En el caso del cotratamiento con sulforafano, no se encontraron cambios con respecto a las ratas del grupo control. Cabe mencionar que se encontró un discreto incremento, pero estadísticamente significativo de la ALT del grupo tratado sólo con sulforafano, sin embargo, se considera que no tiene una significancia patológica. El daño renal que se observa por los biomarcadores anteriormente mencionados, inducido por el tratamiento con cisplatino, depende de factores no oxidativos, tales como el daño al DNA, a proteínas y a sistemas energéticos o regulatorios, que provocarían un estado de insuficiencia renal aguda reversible, como se ha encontrado en pacientes tratados con este fármaco (Karasawa, 2015).

Aunque hay mucha información publicada en modelos animales y humanos donde el sulforafano afecta diversos parámetros clínicos e indicadores de daño oxidativo, no

solo por cisplatino, si no por otros compuestos oxidantes; en los trabajos de Robert A. Wise y colaboradores, mostraron también la falta de respuesta del sulforafano administrado durante 4 semanas en dosis de 25 y 150 μ moles a pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dado que no se estimuló la expresión de algunos genes blanco de Nrf2, ni se observó efecto en los niveles de otros antioxidantes (Wise *et al* 2016).

Los estudios bioquímicos no establecen las bases moleculares para la actividad y el mecanismo de acción del antineoplásico cisplatino. El platino tiene alta afinidad por el azufre, por lo que después de la administración de cisplatino hay una alta posibilidad de unión a las biomoléculas con los grupos sulfhidrilo de péptidos, proteínas, algunas de ellas con actividad enzimática. La unión de los complejos de platino con las moléculas que contienen azufre es una posible causa de los efectos tóxicos (Bugarčić, 2012). La hidrólisis del cisplatino puede generar un radical cloro altamente reactivo lo que implica las reacciones en cadena y la generación de más radicales como ión hidroxilo hasta producir lipoperoxidación.

En los grupos de ratas tratadas con cisplatino se encontró una mayor lipoperoxidación estadísticamente significativa respecto al grupo control, lo cual podría ser asociado fisiopatológicamente con los daños renales antes descritos. Sin embargo, el tratamiento y cotratamiento con sulforafano también mostraron niveles elevados de lipoperoxidación sin una asociación con daño renal. El malondialdehído que se produce en los tejidos de hígado y riñón, puede ingresar a la circulación y contribuir a que las pruebas que miden lipoperoxidación muestren resultados mayores en plasma y en eritrocitos.

La mayor oxidación de los lípidos en eritrocitos y plasma con respecto a lo encontrado en riñón puede explicarse por la administración intraperitoneal; los procesos de su distribución y redistribución en el organismo provocan que en el riñón se tenga una menor concentración de cisplatino que en la sangre, lo cual puede contribuir a un daño funcional pero no necesariamente suficiente para tener una mayor lipoperoxidación en el tejido. El cisplatino causó daño oxidativo a los lípidos, lo cual ya está documentado, lo que es interesante es que el sulforafano produjo lipoperoxidación en plasma y

eritrocitos; también se observa que no hubo prevención a la lipoperoxidación inducida por cisplatino. Es posible que antes de promover la respuesta antioxidante, hay consumo de GSH para el metabolismo del sulforafano, por lo que puede inducir una mayor oxidación a los lípidos, y ser en una primera fase un pro-oxidante. Los resultados de la lipoperoxidación encontrados cuando las ratas son tratadas únicamente con sulforafano, o con sulforafano y cisplatino generan un estado de insulto oxidante lo cual, se puede explicar con la formación directa o indirecta de especies reactivas de oxígeno, por el consumo de cosustratos antioxidantes y la saturación de los sistemas de defensa antioxidante, que puede ser inducido en fases iniciales con el tratamiento con sulforafano.

El metabolismo del sulforafano implica la conjugación con glutatión, por lo que se disminuye la concentración de GSH disponible como agente antioxidante (Shapiro, 2006). La estructura de la molécula de sulforafano en esta condición se convierte en un pro oxidante, ya que el carbono central adquiere una carga parcial positiva al estar entre dos átomos de mayor electronegatividad por lo que puede actuar como un compuesto electrofílico (Clarke, 2008). Los radicales libres pueden reaccionar con los lípidos de membrana para iniciar una reacción en cadena hasta provocar daño oxidativo. Los resultados obtenidos muestran que la administración de cisplatino puede causar daño oxidativo a lípidos del plasma y de los eritrocitos y el cotratamiento con sulforafano no atenúa tal daño, por el contrario, el tratamiento con sulforafano produjo una mayor lipoperoxidación que los grupos control, tanto en plasma, como en eritrocitos.

El ion superóxido es una de las principales especies reactivas de oxígeno producidas en el organismo y por ello es importante la actividad de protección antioxidante que ejerce la SOD para evitar el daño que pueda ocasionar este ion a las macromoléculas y estructuras celulares. En homogenados de riñón se encontró una menor actividad de SOD en el grupo tratado con cisplatino con respecto al grupo control y al grupo tratado con sulforafano; el cotratamiento con sulforafano no presenta diferencia significativa respecto al grupo tratado sólo con cisplatino o al grupo tratado con solo con sulforafano. En cambio, en eritrocitos, el grupo tratado con sulforafano, tiene una mayor

actividad y el grupo tratado con cisplatino menor actividad respecto al grupo control, el grupo que recibió el cotratamiento con sulforafano muestra mayor actividad que el grupo tratado sólo con cisplatino. Lo anterior sugiere que el sulforafano evita que se produzca menor actividad de SOD inducida por cisplatino y que la conservación de esta actividad sea capaz de hacer frente a la agresión oxidativa.

Se ha propuesto que, en ratas tratadas con cisplatino, la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT provoca mayor estrés oxidativo hasta causar daños sistémicos. En los trabajos de Guerrero y Beltrán en 2010 evaluaron la actividad renal de CAT, los resultados mostraron que en el grupo de ratas tratadas con cisplatino había una menor actividad enzimática, respecto a los grupos control; estos cambios fueron evitados por el cotratamiento con sulforafano, por lo que ellos sugieren que el sulforafano produce una mayor actividad de la enzima catalasa. En el presente trabajo se encontró que el tratamiento con cisplatino produce menor actividad de la catalasa; sin embargo, el tratamiento con sulforafano no promueve mayor actividad sólo o en co tratamiento. Las ratas tratadas sólo con sulforafano no mostraron mayor actividad de catalasa respecto a las ratas del grupo control. En eritrocitos y en homogenados de riñón de las ratas tratadas con cisplatino la actividad de la catalasa resulto menor que en los grupos control.

En el plasma, el tratamiento con cisplatino mostró menor capacidad antioxidante total con respecto al resto de los grupos y el cotratamiento con sulforafano previene la menor capacidad antioxidante total inducida por cisplatino. En la línea de defensa contra los oxidantes, se encuentran múltiples mecanismos, como el uso de cosustratos antioxidantes, vitaminas, enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción a altas velocidades, de estas las más importantes son SOD y CAT, en el presente estudio no se muestra que estas enzimas tengan mayor actividad, sin embargo, la actividad de SOD no se redujo por el cotratamiento con sulforafano. Aun así, los resultados nos llevan a sugerir que la promoción o el aumento de la capacidad antioxidante total, depende de otros mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.

Con respecto a la eriptosis, en la evaluación de la externalización de fosfatidilserina no se encontró diferencia significativa en los eritrocitos de las ratas que recibieron los diferentes tratamientos. El insulto oxidativo causado por cisplatino provoca daño a los eritrocitos y con ello desencadena una rápida respuesta sistémica para retirarlos del sistema. Con este tratamiento posiblemente no se alcanzó el grado de daño oxidativo que pudiera llevar a la condición en la que se iniciara el proceso eriptótico, como se ha mostrado en otras patologías. Incluso, puede ser que al administrar el sulforofano intraperitonealmente, el mismo sea modificado por el hígado dado que las vías mesentéricas lo llevan preferencialmente a este órgano y que dicha modificación reduzca la toxicidad y permita la eliminación por lo cual el intenso daño oxidativo a los eritrocitos sea menos probable. Es importante mencionar que la externalización de fosfadilserina no había sido estudiada anteriormente bajo este enfoque.

El presente trabajo sugiere, que algunos de los inductores específicos de Nrf2 podrían funcionar como buenos agentes quimioprotectores contra ERO/ERN y agentes carcinogénicos por activar el elemento de respuesta antioxidante. Dado que se han encontrado una gran cantidad de compuestos, tanto sintéticos como provenientes de la dieta, que activan de manera eficiente a Nrf2 (Li, et al. 2015). Entre ellos están los inductores derivados de origen vegetal que incluyen a los sulforafanos que se encuentran en el brócoli. Sin embargo, existen algunas limitaciones que son inherentes al uso de agentes que se dirigen a múltiples vías que pueden contribuir o la quimioprotección o quimioprevención.

Resumen de resultados

| | | SULFORAFANO | CISPLATINO | CISPLATINO Y SULFORAFANO |
|----------------------|-------------|-------------|------------|--------------------------|
| DAÑO RENAL | | = | + | + |
| LIPOPEROXIDACIÓN | Eritrocitos | + | + | + |
| | Plasma | + | + | + |
| | Riñón | = | = | = |
| SUPERÓXIDO DISMUTASA | Eritrocitos | + | - | = |
| | Plasma | = | = | = |

| | | | | |
|---------------------------------|-------------|---|---|---|
| | Riñón | = | - | = |
| CATALASA | Eritrocitos | = | - | - |
| | Riñón | - | = | - |
| CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL | Plasma | + | - | + |
| | Riñón | + | - | + |

Simbología: (+) mayor, (-) menor, (=) igual respecto al grupo control.

Resumen del análisis de resultados

| | Sulforafano | Cisplatino | Cisplatino con sulforafano |
|------------------------------|--|--|---|
| Daño renal | No causa daño. | Causa daño glomerular y tubular. | No protege del daño inducido por cisplatino. |
| Lipoperoxidación | Mayor en plasma y eritrocitos. Sin cambio en riñón. | Mayor en plasma y eritrocitos. Sin cambios en riñón. | No protege de la lipoperoxidación causada por cisplatino. Sin cambios en el riñón |
| Superóxido dismutasa | Mayor actividad en eritrocitos. Sin cambios en riñón y plasma | Menor actividad en eritrocitos y riñón. Sin cambio en plasma. | Protege de la menor actividad inducida por cisplatino en eritrocitos y riñón. Sin cambios en plasma. |
| Catalasa | Sin cambios en eritrocitos. Menor actividad en riñón. | Menor actividad en eritrocitos. Sin cambios en riñón. | No protege de la menor actividad inducida por cisplatino en eritrocitos. Menor actividad en riñón. |
| Capacidad antioxidante total | Mayor capacidad en plasma. Sin cambios en riñón. | Menor capacidad en plasma y en riñón. | Protege de la menor capacidad inducida por cisplatino en plasma y riñón. |

CONCLUSIONES

El tratamiento con cisplatino causa daño renal glomerular y tubular.

El tratamiento con cisplatino causa estrés oxidativo, caracterizado por la menor capacidad antioxidante total en plasma y riñón; por la menor actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa en eritrocitos. Además de una oxidación a lípidos en plasma y eritrocitos.

El tratamiento con sulforafano no causa daño renal, glomerular ni tubular.

El tratamiento con sulforafano no mostró características antioxidantes ya que incluso causa estrés oxidativo, caracterizado por aumentos en la actividad de SOD en eritrocitos y una mayor capacidad antioxidante total en plasma. Así como mayor lipoperoxidación en plasma y en eritrocitos.

El tratamiento con sulforafano no protege contra el daño glomerular o tubular inducido por el tratamiento con cisplatino.

El tratamiento con sulforafano no protege contra el estrés oxidativo inducido por cisplatino, dado que no disminuyó la lipoperoxidación, ni aumentó la actividad de catalasa inducidas por cisplatino en plasma y eritrocitos, aun cuando protegió contra la disminución de la actividad de SOD y generó una mejor respuesta antioxidante total en plasma y riñón.

Los efectos antioxidantes del sulforafano con respecto a la capacidad antioxidante total en plasma y riñón y la mayor actividad de SOD en eritrocitos no fue suficiente para evitar el daño oxidativo inducido por cisplatino.

El tratamiento con sulforafano por sí mismo causa estrés oxidativo posiblemente debido a los efectos prooxidantes, por un gasto excesivo de glutatión.

PERSPECTIVAS

- Probar esquemas de pretratamiento con sulforafano, que incluyan mayores dosis y tiempos.
- Evaluar en un lapso de tiempo mayor, después de la dosis aguda con cisplatino.
- Probar dosis crónicas con cisplatino.
- Cuantificar las especies reactivas generadas por ambos tratamientos y en conjunto.
- Evaluar la actividad de otras enzimas productos de la vía Nrf2, por ejemplo: Glutación S Transferasa, Tiorredoxina, Glutamil cisteinil ligasa, así como la concentración GSH y GSSG, como responsables en el aumento de la capacidad antioxidante total.
- Evaluar otros marcadores de daño renal temprano y de mayor sensibilidad como N-acetil glucosaminidasa, KIM.
- Cuantificar otros productos de daño oxidativo como la carbonilación de proteínas, oxidación de tioles o 4 hidroxinonenal.
- Hacer una evaluación global del sulforafano con respecto a dosis respuesta, para definir si en ciertas dosis puede tener propiedades prooxidantes.
- Probar el efecto de sulforafano en cotratamiento con otros fármacos que dañan la función renal, para conocer si en esas condiciones funciona como prooxidante o antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aebi, H. (1984) **Catalase in vitro**. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
2. Block, K., Gyllenhaal, C., Lowe, L. (2015) **A Broad-Spectrum Integrative Design for Cancer Prevention and Therapy**. *Seminars in cancer biology*. 35 (Suppl): S276-S304.
3. Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quatannens, B., Tissie,r J.P., Iomiani, C., Sartiaux, C., Alonso, C., Huart , J., Montreuil, J. y Ameisen, J. (2001) **Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria**. *Cell Death Differentiation*. 8: 1143–1156.
4. Brillet, G., Deray, G., Jacquiaux, C., Mignot, L., Bunker, D., Meillet, D., Raymond, F., Jacobs, C. (1994) **Long-term renal effect of cisplatin in man**. *American Journal of Nephrology*. 14, 81–84.
5. Brown, M. J. y Attardi, L.D. (2005) **The role of apoptosis in cancer development and treatment response**. *Nature Reviews Cancer* 5, 231-237 doi:10.1038/nrc1560.
6. Bugarčić, Z.D., Bogojeski, J., Petrović, B., Hochreuther, S. y Eldik, R. (2012) **Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen and sulfur-donor biomolecules**. *Dalton Transactions*. 41, 12329.
7. Calderón, V., Muñoz, E., Guerrero, J., Rodríguez, M., Bracho, R., Carrera, M. y Quintanar, M. (2011) **Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease**. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 171-179.
8. Chen, Y., Jungsuwadee, P., Vore, M., Butterfield, D. A., y St Clair, D. K., (2007) **Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues**. *Molecular Interventions* Vol. 7 (3) 147-56.
9. Chirino, Y.I. y Pedraza-Chaverri, J. (2009) **Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity**. *Experimental and Toxicologic Pathology* 61 223–242.
10. Cooper, G.M. (2012) *La célula*. Capítulo 15 **Cáncer**. Quinta Edición Editorial Marbán.

11. Dar, I. y Barzilai, A. (2009). **Celular responses to oxidative stress.** *The ADN Damage Responses.* 65-79.
12. De Conti, R.C., Toftness, B.R., Lange, R.C. y Creasey, W.A. **Clinical and pharmacological studies with cis-Diamminedichloroplatinum(II).** *Cancer Research.* **1973**, 33, 1310–1315.
13. Dragsted, L.O. (2008) **Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers** *European Journal Nutrition.* 47 (Suppl. 2) 3–18.
14. Flaquer, M., Romagnani, P. y Cruzado, J.M. (2010) **“Factores de crecimiento y regeneración renal”** *Nefrología. Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nefrología.* 385-394.
15. Guerrero, B.C.E., Calderón, O.M., Martínez A.E., Tapiac, E., Zarco M.G., Zazueta, C., Pedraza, C.J., (2010) **Protective effect of sulforaphane against cisplatin-induced mitochondrial alterations and impairment in the activity of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 and glutamyl cysteine ligase: Studies in mitochondria isolated from rat kidney and in LLC-PK1 cells** *Toxicology Letters* 199, 80–92.
16. Guerrero, B.C.E., Calderón, O.M., Tapiac, E., Medina, C.O.N., Sánchez, G.D.J., Martínez, M.C.M., Ortiz, V.K.M., Franco, M., Pedraza, C.J., (2010) **Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity.** *Toxicology Letters* 192 278–285
17. Halliwell, B. y Gutteridge J. (2007) **Free Radicals in Biology and Medicine.** United States. Editorial Oxford.
18. Hanlon, N., Coldham, N., Gielbert, A., Sauer, M.J., Ioannides, C. (2009) **Repeated intake of broccoli does not lead to higher plasma levels of sulforaphane in human volunteers.** *Cancer Letters* 2009, 284, 15–20.
19. Hansberg, W. (2002) **Biología de las especies de oxígeno reactivas.** *Mensaje Bioquímico* 26: 19-54.
20. Hu, Q., Sun, W., Wang, C., & Gu, Z. (2016). **Recent Advances of Cocktail Chemotherapy by Combination Drug Delivery Systems.** *Advanced Drug Delivery Reviews,* 98, 19–34.

21. John, D.C., Roderick, H.D., Emily, H. (2008) **Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane.** *Cancer Letters* 269 291–304
22. Kambayashi, Y., Binh, N.T., Asakura, H.W., Hibino, Y., Hitomi, Y., Nakamura H.y Ogino, K., (2009) **Efficient assay for total antioxidant capacity in human plasma using a 96-well microplate.** *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition.* 44:46–51. doi: 10.3164/jcbrn.08-162.
23. Karasawa, T. y Steyger, P.S. (2015) **An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity.** *Toxicology Letters.* 237:219–227.
24. Kelland, L. (2007) **The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.** *Nature Reviews Cancer.* 7, 573–584.
25. Königsberg, F.M. (2007) **Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo.** *Revista de Educación Biomédica.* 26(1): 18-25
26. Li, B., K M, D. S., Yadav, R. K., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2015). **Sulforaphane prevents doxorubicin-induced oxidative stress and cell death in rat H9c2 cells.** *International Journal of Molecular Medicine,* 36(1), 53–64.
27. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis, F. A. (1951) **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *The Journal of Biological Chemistry.* 193(1):P.265-275.
28. Miller, R. P., Tadagavadi, R.K., Ramesh, G., y Reeves W. B. (2010) **Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity** *Toxins* (Basel). Nov; 2(11): 2490–2518.
29. Monaghan, P., Metcalfe, N.B., Torres, R. (2009) **Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation.** *Ecology Letters.* 12: 75-92.
30. Nanji, A.A., Mikhael, N.Z., Stewart, D.J. (1985) **Increase in serum uric acid level associated with cisplatin therapy: Correlation with liver but not kidney platinum concentrations.** *Archives of Internal Medicine.* 145, 2013–2014.
31. Nelson, D. L., Cox, M. M. (2015) **Principios de bioquímica Lehninger.** Sexta Edición. Editorial Omega.

32. Ohkawa, H., Ohishi, N. y Yagi, K. (1979) **Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction.** *Analytical Biochemistry.* Japón. P.351-358.
33. Pabla, N., y Dong Z. (2008) **Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies.** *Kidney International.* 73: 994–1007
34. Quintanar, E. M. A. y Calderón, S. J. V. (2009) **La capacidad antioxidante total. Bases y Aplicaciones.** *Revista Educación Biomédica.* 28(3): 89-101.
35. Quintanar, M. A. y Calderón, J. V. (2006). **Eriptosis, la apoptosis del eritrocito.** *Revista de Educación Biomédica.* 25(3): P. 85-89.
36. Rosenberg, B., Vancamp, L., Krigas, T. (1965) **Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode.** *Nature.* Feb 13; 205 (698-9).
37. Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J.E., Mansour, V.H. 1969. **Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents.** *Nature.* Apr 26; 222(5191):385-6.
38. Ruddon, R.W., **Cancer Biology** ed. Oxford. University Edición. 2007. Página 4.
39. Santos, N.A.G., Catão, C.S., Martins, N.M., Curti, C., Bianchi, M.L. P., Santos, A.C. (2007) **Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria.** *Archives of Toxicology.* 81:495–504 DOI 10.1007/s00204-006-0173-2
40. Shapiro, T. A., Fahey, J.W., Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Stephenson, K. K., Wade, K. L., Lingxiang Ye, y Talalay, P. 2006 **Safety, Tolerance, and Metabolism of Broccoli Sprout Glucosinolates and Isothiocyanates: A Clinical Phase I Study.** *Nutrition and Cancer* 55 (1) 53-62.
41. Shapiro, T.A., Fahey J.W., Wade, K.L., Stephenson, K.K., y Talalay, P. (2001) **Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Preventions.* 10, 501–508.
42. ShSuh, S.M., Tashjian, A.H., Matsuo, N., Parkinson, D.K., Fraser, D. (1973) **Pathogenesis of hypocalcemia in primary hypomagnesemia: Normal end-**

- organ responsiveness to parathyroid hormone, impaired parathyroid gland function.** *The Journal of Clinical Investigation.* 52, 153–160.
43. Sun, Y., Oberley, L.W. and Li, Y. (1988) **A simple method for clinical assay of superoxide dismutase.** *Clinical Chemistry.* 34, 497-500
44. Sushil, K.J., Robert, M., Duett, J.,y Herbst, J. (1989) **Erythrocyte Membrane Lipid Peroxidation and Glycosylated Hemoglobin in Diabetes** *Diabetes.* Dec;38(12):1539-43.
45. Swainson, C.P., Colls, B.M., y Fitzharris, B.M. (1985) **Cis-platinum and distal renal tubule toxicity.** *The New Zealand Medical Journal.* 98, 375–378.
46. Wise, R. A., Holbrook, J. T., Criner, G., Sethi, S., Rayapudi, S., Sudini, K. R., (2016) **Lack of Effect of Oral Sulforaphane Administration on Nrf2 Expression in COPD: A Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Trial.** *PLoS ONE*, 11(11), e0163716.
47. Wood, P.A., Hrushesky, W.J. (1995) **Cisplatin-associated anemia: An erythropoietin deficiency syndrome.** *The Journal of Clinical Investigation.* 1995, 95, 1650–1659.
48. Y. Endo y H. Kanbayashi. (2003) **Modified rice bran beneficial for weight loss of mice as a major and acute adverse effect of cisplatin,”** *Pharmacology & Toxicology*, vol. 92, no. 6, pp. 300–303.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Muerte celular inducida por cisplatino. | 16 |
| Figura 2. Reacción de hidrólisis de la glucorafanina por la mirosinasa para formar sulforafano. | 17 |
| Figura 3. Metabolismo del sulforafano. | 17 |
| Figura 4. Morfología de la nefrona. | 18 |
| Figura 5. El SUL provoca menor muerte celular inducida por CIS. | 21 |
| Figura 6. SUL induce la translocación de Nrf2 en células LLC- PK1. | 21 |
| Figura 7. Efecto del sulforafano (a) en la concentración de GSH y en la menor concentración de GSH inducida por cisplatino (b). | 22 |
| Figura 8. Marcadores de nefrotoxicidad en los grupos de ratas estudiados. | 23 |
| Figura 9. Marcadores de estrés oxidativo en los grupos de ratas estudiados. | 23 |
| Figura 10. Enzimas antioxidantes en riñón de los grupos de ratas estudiados. | 24 |
| Figura 11. Efecto del pretratamiento con sulforafano sobre el estrés oxidativo y la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas inducidos por cisplatino. | 25 |
| Figura 12. Efecto del pretratamiento con sulforafano sobre la disminución del peso y relación con el peso del hígado y el incremento de la actividad de las enzimas ALT y AST en suero inducidos por cisplatino. | 25 |
| Figura 13. Curva Patrón de Albúmina Sérica Bovina. | 34 |
| Figura 14. Curva Patrón TMP. Valores de absorbancia a 532 nm. Los puntos representan el promedio de las 3 determinaciones para cada concentración evaluada. | 35 |
| Figura 15. Valores de porcentaje de inhibición contra el logaritmo de la concentración de SOD. | 38 |
| Figura 16. Curva patrón para la determinación de hemoglobina en sangre total. | 40 |
| Figura 17. Curva patrón de trolox. | 41 |
| Figura 18. Cambio de peso en los grupos de ratas estudiados. | 43 |
| Figura 19. Marcadores de nefrotoxicidad, proteinuria (A) y glucosuria (B) en los grupos de ratas estudiados. | 43 |
| Figura 20. Marcadores de nefrotoxicidad en plasma de ratas wistar, (A) Creatinina (B) Urea (C) Ácido úrico. | 44 |
| Figura 21. Marcadores de toxicidad en plasma de ratas wistar, (A) Alanina transaminasa, (B) Aspartato transaminasa y (C) Fostatasa alcalina. | 45 |
| Figura 22. Lipoperoxidación en (A) plasma, (B) eritrocitos y (C) tejido de riñón. | 45 |
| Figura 23. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en (A) plasma, (B) eritrocitos y (C) tejido de riñón de rata Wistar. | 46 |
| Figura 24. Actividad de la enzima catalasa en (A) eritrocitos y (B) tejido de riñón de rata. | 47 |
| Figura 25. Capacidad antioxidante total en (A) plasma y (B) tejido de riñón de rata. | 47 |
| Figura 26. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos de rata. | 48 |

ABREVIATURAS

- 4 HNE 4-hidroxinonenal
- ABTS 2,2'- azino-di(3-etilbenzotiazohín) sulfonato
- ADN Ácido Desoxirribonucleico
- ALT Alanina Aminotransferasas
- ARN Ácido Ribonucleico
- AST Aspartato Aminotransferasa
- ATP Adenosin Trifosfato
- BHT Hidroxitolueno
- BSA Albúmina de suero bovino
- BUN Nitrógeno ureico en sangre
- CAT Catalasa
- CIS cisplatino
- CON Control
- DMSO Dimetilsulfóxido
- ERN Especies Reactivas de Nitrógeno.
- ERO Especies Reactivas de Oxígeno
- FAL Fosfatasa Alcalina
- FD Factor de dilución
- FITC Isotiocianato de Fluoresceína
- GPx Glutación Peroxidasa
- GR Glutación Reductasa
- GSH Glutación reducido
- GSSG Glutación oxidado
- GST Glutación Sulfhidril Transferasas

i.p. Intraperitoneal

i.v. Intravenosa

LDH Lactato Deshidrogenasa

MDA Malondialdehído

MDH Malato Deshidrogenasa

NADH Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido

NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleótico fosfato forma reducida

NQO1 quinona oxidoreductasa de NADPH

PBS Amortiguador de fosfatos

SFN sulforafano

SOD Superóxido Dismutasa

SUL sulforafano

TAC Capacidad Antioxidante Total

TBA Ácido Tiobarbitúrico

TMP tetrametoxipropano

UPEAL Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio

XOD Xantina Oxidasa

γ GCL gama Glutamil Cisteína Ligasa