

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



**Evaluación del Uso de (-)-Epicatequina en la Prevención de la
Nefrotoxicidad Causada por Doxorrubicina en Ratones**

Tesis que Presenta
QFB. Liliana Danaé Correa Zavala

para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 184
Tijuana, B. C., a 12 de octubre de 2016

C. Liliana Danae Correa Zavala
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por el C. Dr. Diego Romero Pérez

Quien será la responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al
tema Evaluación del Uso de (-)-Epicatequina en la Prevención de la
Nefrotoxicidad Causada por Doxorubicina en Ratones.

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION
- III.- MARCO TEORICO
- IV.- HIPOTESIS
- V.- OBJETIVO GENERAL
- VI.- METODOLOGIA
- VII.- RESULTADOS
- VIII.- DISCUSION
- IX.- CONCLUSION
- X.- BIBLIOGRAFIA

Dr. José Luis González Vázquez
Secretario

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA

Dr. Diego Romero Pérez
Director de Tesis

Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

A Dios:

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres:

Ana y Arturo por su gran ejemplo de superación, por ser el pilar en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A mi esposo:

Felipe por ese optimismo que siempre me impulso a seguir adelante y no renunciar, gracias por tu amor incondicional.

A mis hermanas:

Nancy y Giselle; quienes con su apoyo y muestras de cariño, me han motivado para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis realizado en la Universidad Autónoma de Baja California es un esfuerzo en el cual directa e indirectamente, participaron distintas personas opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimos, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Este trabajo me ha permitido aprovechar la competencia y la experiencia de muchas personas que deseo agradecer en este apartado:

A mi tutor y guía de ésta tesis el Dr. Diego Romero Pérez, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con él y por transmitirme su conocimiento.

Un agradecimiento muy especial a los Dres., Francisco Villarreal y Guillermo Ceballos por su grata colaboración, por su apoyo y por sus valiosos consejos sobre este trabajo.

A CONACYT por la beca que me proporcionaron, porque gracias a ello, fue posible mi estancia en este proyecto de investigación.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (FCQI) y al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MYDCI) por la oportunidad de seguir adelante en mi formación y por el gran apoyo brindado durante este tiempo.

A las universidades

A mis compañeras QFB Mariana Martínez Olvera y MC Viviana Sarmiento por su compañía, por compartir su conocimiento y por ayuda durante la realización de este proyecto.

Finalmente, a mis maestros, aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario compartiendo su conocimiento y motivándonos a seguir desarrollándonos profesionalmente.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	v
1. RESUMEN.....	6
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	6
3. MARCO TEÓRICO	8
3.1 Mecanismo antitumoral.....	10
3.2 Mecanismo de Nefrotoxicidad.....	10
3.3 Estrategias Propuestas para combatir la Nefrotoxicidad inducida por DOX.....	12
3.4 Flavonoides: estructura, clasificación y propiedades	14
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVO GENERAL	18
5.1 Objetivos Específicos	18
5.1.1 Determinación de la Función Renal.....	18
5.1.2 Determinación de la Función Mitocondrial.....	18
5.1.3 Determinación de Estrés Oxidativo	19
6. METODOLOGÍA.....	19
6.1 Fármacos y Reactivos	19
6.2 Protocolo Experimental.....	20
6.2.1 Determinación de Dosificación	21
6.2.2 Criterios de exclusión.....	22
6.3 Parámetros a analizar.....	22
6.3.1 Determinación de la Función Renal.....	22
6.3.2 Determinación de la Función Mitocondrial.....	22
6.3.3 Determinación de Estrés Oxidativo	22
6.4 Preparación de las Muestras.....	23
6.4.1 Homogeneización	23
6.4.2 Western blot.....	23
6.4.3 Proteínas Carboniladas En Plasma (Dot Blot).....	25
6.5 Plan de análisis de resultados	26

7.	RESULTADOS	27
7.1	Supervivencia y Mortalidad	27
7.2	Variación en peso	28
7.3	Determinación del estrés oxidativo	30
7.3.1	Determinación de la Carbonilación de Proteínas.....	30
7.3.2	Determinación de los niveles proteicos de SOD2 y Catalasa	31
7.4	Determinación de la función mitocondrial.....	32
7.4.1	Determinación de los niveles proteicos de complejo V y porina	32
8.	DISCUSIÓN.....	34
9.	CONCLUSIÓN	37
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Anticuerpos utilizados en western blot.....	25
Tabla 2:	Índice de Mortalidad.....	27
Tabla 3:	Variación en el Peso Corporal y Peso del Riñón.....	29
Tabla 4:	Carbonilación de Proteínas en Plasma (Método Dotblot).....	30
Tabla 5:	Determinación de superóxido dismutasa 2 y catalasa.....	31
Tabla 6:	Determinación de complejo V y porina	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Estructura de Doxorrubicina	8
Figura 2:	Estructura base de los flavonoides.....	15
Figura 3:	Estructura de (-)-Epicatequina	16
Figura 4:	A) Variación del peso corporal. B) Variación del peso promedio del riñón.....	29
Figura 5:	Carbonilación de Proteínas	31
Figura 6:	A) Niveles proteicos de superóxido dismutasa 2 y, B) catalasa	32
Figura 7:	A) Niveles proteicos de complejo V y, B) porina.....	33

ABREVIATURAS

%	Porcentaje	HRP	Peroxidasa de rábano
°C	Grados centígrados	Kg, g, mg, µg	Kilogramo, gramo, miligramo, microgramo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	m ²	Metro cuadrado
BC	Baja California	mL, µL	Mililitro, microlitro
BSA	Suero de Albumina Bovina	M, mM	Molar, milimolar
Ctrl	Control	MO	Missouri
DNP, DNPH	Desoxirribonucleoproteína, 2,4-Dinitrofenilhidrazina	MX	México
DOX, Dox	Doxorrubicina	n	Numero de muestra muestreal
D+E	Doxorrubicina+(-)-Epicatequina	NaCl	Cloruro de sodio
DTT	Ditiotreitol	NaF	Fluoruro sódico
DXR	Dexrazoxane	Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sodio
ECV	Evento Cerebro Vascular	No.	Número
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético	ns	No significativo
EEM	Error estándar de la muestra	O ₂ ⁻	Anión superóxido
EO	Estrés Oxidativo	O ₂	Oxígeno molecular
EPI, Epi	(-)-Epicatequina	·OH ⁻	Radical hidroxilo
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno	OMS	Organización Mundial de la Salud
Etc	Etcétera	p.e.	Por ejemplo
<i>et al.</i>	Del latín “ <i>et allos</i> ” y colaboradores	PVDF	Fluoruro de polivinilideno
FDA	Del ingles <i>Food and Drug Administration</i>	S.A. DE C.V.	Sociedad Anónima De Capital Variable
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	SOD	Superóxido Dismutasa
Gpx	Glutación Peroxidasa	TCA	Ácido tricoloroacético
h	Hora	USA	Del ingles <i>United States of America</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno	V, V:V	Volumen, volumen-volumen
HCl	Ácido Clorhídrico		

Evaluación del Uso de (-)-Epicatequina en la Prevención de la Nefrotoxicidad Causada por Doxorrubicina en Ratones

1. RESUMEN

La nefrotoxicidad es uno de los efectos tóxicos más importantes causada por el uso de antraciclinas utilizadas en el tratamiento quimioterapéutico, provocando así que su uso en la clínica se vea reducido. Diversos estudios han demostrado que la (-)-Epicatequina (compuesto flavonoide natural) tiene propiedades capaces de proteger órganos de retos estresantes. El objetivo de este estudio fue investigar *in vivo*, los posibles efectos nefroprotectores atribuidos de (-)-Epicatequina contra los efectos adversos inducidos por el tratamiento con Doxorrubicina. El presente estudio, no logró evidenciar un daño renal asociado al tratamiento con el agente nefrotóxico Doxorrubicina mediante la determinación de indicadores de función renal, antioxidante y mitocondrial, impidiendo así la evaluación de los posibles efectos nefroprotectores de (-)-Epicatequina.

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer como un conjunto de enfermedades caracterizadas por un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células, clasificándolo como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo con 8,2 millones de muertes al año y 14 millones de nuevos casos en el año 2012 (OMS, 2015).

En la actualidad, los tratamientos antineoplásicos clásicos (quimioterapia) se utilizan ampliamente debido a la gran cantidad de sujetos (tanto niños como adultos) a nivel mundial que sufre de estos padecimientos. La quimioterapia utiliza agentes químicos para interrumpir el crecimiento y provocar la destrucción de las células cancerígenas. Sin embargo este tratamiento no logra distinguir entre ambas células, afectando también a aquellas células normales con una rápida tasa de crecimiento. (Radish, 2013).

Desde la introducción de Doxorubicina (DOX) en 1969, este antibiótico ha demostrado una alta eficacia antitumoral en el tratamiento de una gran diversidad de neoplasias que afectan tanto niños como adultos (Rade Injac M. B., 2008). Sin embargo, debido a su inespecífica acción sobre el linaje celular, y dado su alto grado de toxicidad en diversos órganos, su uso clínico se ve limitado (C. Cervalho, 2009).

Estudios recientes han demostrado que DOX puede producir síndrome nefrótico caracterizado por proteinuria, albuminuria, hipoalbuminemia e hiperlipidemia (Bertani T, 1982; Milner, 1991), además de un aumento en la permeabilidad capilar, atrofia, y vacuolización del glomérulo, conduciendo así a insuficiencia renal.

A pesar de los esfuerzos para identificar factores de riesgo, desarrollar análogos menos tóxicos, y detectar una toxicidad subclínica temprana, no hay consenso sobre el mejor enfoque para evitar los efectos secundarios inducidos por esta antraciclina (Pimprapa Vejpongsa, 2014).

Recientemente ha surgido interés en la búsqueda de tratamientos complementarios para reducir la toxicidad por agentes quimioterapéuticos, como por ejemplo la administración de flavonoides, compuestos naturales que han demostrado en diversos estudios en modelos animales disminuir los efectos adversos de este tipo de agentes sin comprometer su efectividad (Jose L. Quiles, 2002; Sadzuka, 1997).

Este estudio pretende demostrar que el uso de (-)-Epicatequina EPI limita el daño renal causado por DOX así como resaltar que su administración en conjunto con la terapia antitumoral podría ser una aportación de gran relevancia ya que permitiría utilizar fármacos antineoplásicos de este tipo a la vez que se aminora su toxicidad.

Además, ya que este estudio es un estudio traslacional se pretende que, de obtenerse resultados favorables, se pudieran proponer estudios clínicos para evaluar la administración de EPI a pacientes candidatos al uso de DOX ya que este flavonoide aparenta ser altamente seguro.

3. MARCO TEÓRICO

Las antraciclinas son agentes antineoplásicos muy eficaces con un amplio espectro antitumoral, incluyendo muchos tumores sólidos y leucemias (Azza A. K. El-Sheikh, 2012). Desafortunadamente, su uso clínico se ve limitado debido a la toxicidad dosis dependiente que ejerce sobre diversos órganos (Chengqun Huang, 2010; O'Donnell M.P., 1985; Koima S., 1993).

DOX, es un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces peucetius* (**FIGURA 1**), (Giorgio Minotti, 2004) que posee un amplio espectro antitumoral en ciertos cánceres humanos, incluyendo cáncer de mama, carcinoma de células pequeñas del pulmón y leucemia aguda (Jaroslaw Dudka, 2012). El uso óptimo de DOX se encuentra limitado dados sus efectos secundarios, siendo de los más importantes la cardiotoxicidad, hematotoxicidad, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad dosis-dependiente (Mahmoud A. Mansouru, 1999) (Radish, 2013; Feti Tulubas, 2013).

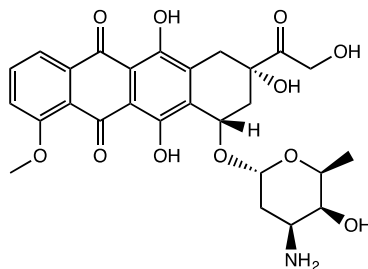


Figura 1. Estructura de Doxorubicina

Investigaciones previas sugieren que los efectos tóxicos que DOX induce parecen estar relacionados con la dosis total del fármaco administrada a los pacientes (Lefrak, 1973; Cortes, 1978; Von Hoff, 1979). A pesar de las variaciones entre los pacientes en su tolerancia a DOX, una dosis empírica límite de 500mg/m^2 de área de superficie corporal ha sido sugerida como una estrategia para minimizar el riesgo de cardiomiopatía. Sin embargo, en un estudio realizado en 2003, la incidencia de insuficiencia cardíaca reportada fue de 5%, 16% y 26% para una dosis acumulada de Doxorubicina de 400, 500, y 550 mg/m^2 , respectivamente, lo que resultó en una modificación de la dosis a un rango de $400\text{-}450\text{ mg/m}^2$ (Swain SM, 2003).

Se ha observado que DOX produce nefrotoxicidad caracterizada por síndrome nefrótico (hipoalbuminemia, proteinuria, albuminuria e hiperlipidemia) (Narayan Vekatesan, 2000; Joyce Trujillo, 2013) además de atrofia tubular, vacuolización y necrosis del glomérulo y túbulo colectores (Ayla S, 2011).

Se han descrito en dos tipos de nefrotoxicidad: a corto plazo o aguda, la cual aparece después de su administración y generalmente es reversible (Carla Patricia Carlos, 2014; Seiya Okuda, 1986); y a largo plazo o crónica, caracterizada por extensas lesiones glomerulares, dilatación tubular y fibrosis y que usualmente desencadena un deterioro en la función renal (Seiya Okuda, 1986).

El mecanismo de acción de DOX puede dividirse de acuerdo a su acción principal, es decir mecanismo antitumoral y el mecanismo por el cual genera toxicidad.

3.1 Mecanismo antitumoral

Diversas teorías sugieren su intercalación entre los pares de bases de las cadenas de ADN (Rade Injac M. B., 2008) lo que provoca un bloqueo del ciclo celular de la fase G2, previniendo la replicación de las células cancerosas de crecimiento rápido, la activación de las cascadas de inflamación, la programación de muerte celular (apoptosis) e inhibición de la Topoisomerasa II (Memy H. Hassan, 2014; Giorgio Minotti, 2004; Sinha BK, 1984).

3.2 Mecanismo de Nefrotoxicidad

El mecanismo por el cual DOX causa nefrotoxicidad no es del todo conocido sin embargo, la formación de Radicales Libres de Oxígeno (ERO) (Pristos C.A., 2000), daño oxidativo dependiente de Hierro (Abo-Salem, 2011) y el daño mitocondrial (Alessandra Stacchiotti, 2014) son los mecanismos propuestos con mayor frecuencia.

La biotransformación de DOX en su correspondiente semiquinona mediante reacciones de óxido-reducción (Vishal B Jadhav, 2013; Bachur N., 1979) regenera rápidamente su quinona al oxidar el O₂ a sus especies reactivas de Oxígeno como el radical superóxido, radical hidroxilo o peróxido de hidrógeno y puede darse por acción enzimática (NADH deshidrogenasa, Citocromo P450 Reductasa), o por su unión al Hierro (Giorgio Minotti, 2004). Este proceso produce un nivel extremadamente alto de estrés oxidativo (EO) (Memy H. Hassan, 2014).

El estrés oxidativo es un término que denota un desequilibrio entre la producción de oxidantes (ERO) y los respectivos sistemas de defensa del organismo (antioxidantes). (Seval Yilmaz, 2005). En condiciones normales, la generación excesiva de estos ERO es contrarrestada mediante el sistema de defensa antioxidante del organismo como glutatión y enzimas antioxidantes: El radical Superóxido generado es catabolizado por la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) a Oxígeno y Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 es posteriormente metabolizado a agua y Oxígeno por las enzimas Catalasa y Glutatión Peroxidasa (Gpx) (Chance B, 1979).

Se cree que concentraciones elevadas de ERO son la principal causa del deterioro de la función de la célula. Cuando esta excesiva producción no puede ser modulada por los sistemas antioxidantes naturales, las ERO pueden alterar el ADN, lípidos, proteínas y otras moléculas (ER, 1992).

En el riñón, estas ERO son biológicamente importantes ya que llevan a cabo la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y la oxidación de proteínas, llevando así a la alteración de la permeabilidad de las nefronas (Saad S. Y., Najja T. A. & Al-Rikabi A.C. , 2001), así como la alteración en su ADN (Kazim Sahin, 2010).

Estudios previos correlacionan fuertemente el EO con la disfunción mitocondrial y con la disminución de la bioenergética mitocondrial (Alessandra Stacchiotti, 2014). La mitocondria ha sido ampliamente considerada como el sitio principal para la producción endógena de ERO. El incompleto metabolismo de aproximadamente el 1-3% de oxígeno consumido conduce a la producción de Superóxido (O_2^-), H_2O_2 , y radical Hidroxilo ($OH^\cdot$) que a su vez dañan la membrana de la mitocondria (Wei-Cheng Chen, 2014).

De esta manera, cantidades excesivas de ERO pueden contribuir al envejecimiento de la célula debido a la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial, lo cual compromete la función óptima del organelo, provocando una disminución en la función renal (Saad S. Y., Najja T. A. & Al-Rikabi A.C. , 2001).

Recientemente ha sido descrita una clara desregulación de la maquinaria respiratoria mitocondrial en pacientes con enfermedad renal crónica asociada a un aumento del estrés oxidativo (Simona Granata, 2009) y disminución en la actividad de proteínas mitocondriales como el complejo I y IV (Otkay Tacar, 2013). En el daño renal tubular, el daño a la mitocondria ha sido reconocido como la causa de la muerte celular tubular (Servais H., 2008; Kaushal GP., 2004) y ha sido reportada una relación entre la disfunción mitocondrial y disfunción tubular renal, nefritis intersticial, patología glomerular, y en raros casos enfermedad quística (O'Toole, 2014).

En consecuencia a los efectos adversos antes mencionados y al incremento en la población afectada por distintos tipos de neoplasias, la comunidad científica se ha dedicado a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que logren atenuar la nefrotoxicidad inducida por DOX (Ana Luisa Miranda-Vilela, 2014).

3.3 Estrategias Propuestas para combatir la Nefrotoxicidad inducida por DOX

Las dos últimas décadas han sido testigas de numerosos intentos para la identificación de nuevas antraciclinas que superen en términos de actividad y/o tolerabilidad a Doxorubicina. Eso ha dado lugar a la síntesis de más de 2000 análogos, aunque sólo pocos han alcanzado la etapa de aprobación y desarrollo clínico; entre ellos, la epirubicina e idarubicina (Giorgio Minotti, 2004).

Otra alternativa desarrollada es el uso de Dexrazoxane (DXR), el cual se hidroliza en la célula para formar su metabolito ADR-925. ADR-925 actúa como un quelante de hierro intracelular. Ha sido el primer agente aprobado por la FDA para el tratamiento de la toxicidad inducida por DOX (Tomas Simunek, 2009), sin embargo se ha observado que reduce su eficacia anticancerígena (Tomas Simunek, 2009).

Otra de las alternativas que se han desarrollado para disminuir los efectos adversos de DOX es la modificación en su sistema de liberación, mediante la encapsulación del fármaco en un liposoma, en donde este sistema le permite acumularse en el tumor y reducir las concentraciones plasmáticas de DOX libre, disminuyendo así su toxicidad (AA, 2001). Sin embargo este sistema de liberación se encuentra autorizado solo para algunos tipos de neoplasias, además de tener un costo elevado.

A pesar del desarrollo de las estrategias previamente mencionadas, el tratamiento de la DOX convencional sigue siendo el utilizado con mayor frecuencia. Pese a los esfuerzos para identificar factores de riesgo, desarrollar derivados menos tóxicos, y detectar la toxicidad subclínica temprana, no hay consenso sobre el mejor enfoque para evitar la toxicidad inducida por esta antraciclina (Pimprapa Vejpongsa, 2014).

Debido a la hipótesis de que las ERO juegan un papel determinante en mediar la toxicidad de DOX (Pristos C.A., 2000), compuestos antioxidantes han sido centro de atención como posible terapia en la prevención de la toxicidad inducida por este fármaco antineoplásico.

Diversos compuestos con capacidad antioxidante han demostrado cierta protección en contra de la toxicidad causada por DOX, sin embargo, por ejemplo, el uso de vitamina E, un potente antioxidante no demostró protección en humanos tratados con DOX (Sewa S. Legha, 1982). Aunado a la teoría de estos compuestos antioxidantes, distintos grupos de investigación han realizado estudios *in vivo* (ratas, ratones, etc.) con una gran variedad de compuestos naturales o sintéticos en busca de nuevas terapias que contrarresten los efectos tóxicos de DOX como el ácido lipóico (Kumarvel Paalnichamy Malarkodi, 2003), la hierba sosa (Mahalaxmi Mohan A, 2010), Luffa acutangula (Vishal B Jadhav, 2013), captopril (Mahmoud A. Mansouru, 1999), meloxicam (Memy H. Hassan, 2014), ácido cafeico (Murat Yagmurca, 2004), por mencionar algunos.

Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han enfocado en el uso de compuestos “antioxidantes”, sabiendo que ya un compuesto de dicha naturaleza fracasó en la clínica. No obstante, existen otro grupo de compuestos (p.e. flavonoides) con distintos mecanismos de acción que protegen a la célula del EO, no solo por sus propiedades antioxidantes si no, por su capacidad de incrementar enzimas antioxidantes y activar vías de señalización que protegen del EO (Aldo Moreno-Ulloa, 2013).

3.4 Flavonoides: estructura, clasificación y propiedades

Los flavonoides son compuestos polifenólicos los cuales están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (S. Martínez-Flórez, 2002), dentro de los cuales destacan algunos ejemplos como el vino, el té verde, las frutas, la soya y el cacao (Roberto Corti A. J., 2009).

Su estructura básica se encuentra formada por un esqueleto de 15 carbonos, representados por la fórmula C₆-C₃-C₆ los cuales consisten en dos anillos bencénicos (Pan M.H., 2009) ligados a través de un anillo C de pirano (S. Martínez-Flórez, 2002). (**FIGURA 2**)

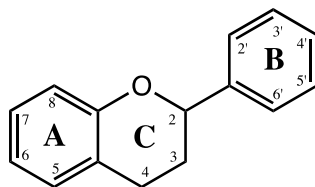


Figura 2. Estructura base de los flavonoides

Los flavonoides tienen la capacidad de generar protección de órganos frente a los fenómenos de daño de tipo de EO, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, aterosclerosis y cáncer (Pace-Asciak CR, 1995; Jang M, 1997). Además, los flavonoides han sido siempre reconocidos por su actividad de captación de radicales libres (Rice-Evans CA, 1996). Investigaciones sugieren que la atribución de propiedades antioxidantes en los flavonoides y su habilidad para quelar el Hierro podrían ser efectivas para la disminución de la nefrotoxicidad atribuida a DOX (Siveski-Iliskovic N., 1995).

Los flavonoides se pueden dividir en cuatro clases como se muestra a continuación: flavonas, flavanoles, flavonoles, y antocianinas. Las cuatro clases tienen anillos fenólicos comunes con variaciones en el número y disposición de los grupos hidroxilo, así como la naturaleza y extensión de alquilación y / o glicosilación de estos grupos (Min-Hsiung Pan, 2010).

Entre los alimentos con alto contenido de flavonoides se encuentra el Cacao (*Theobroma Cacao*). En especial, las semillas del cacao contienen una gran cantidad de flavonoides (Ortiz-Vilchis Pilar, 2014), en particular del subtipo conocido como flavanoles (hasta un 7 % de su peso) (Roberto Corti A. J., 2009).

Los principales flavanoles presentes en las semillas del cacao procesadas para consumo humano son monómeros o polímeros de (+)-Catequina y EPI. EPI es capaz de mediar efectos sistémicos como la vasodilatación (Ottaviani JI, 2011), además de atribuirse a este flavanol propiedades antibacteriales, antivirales, antioxidantes, antitumorales y antimutagénicas (Galán AI, 1995; Kada T., 1985; Hara Y., 1985).

La primera evidencia de los posibles efectos benéficos del cacao se obtuvo con los Indios Kuna, una población indígena que vive en las islas de la costa de Panamá. Los indios Kuna pertenecen a una de las pocas culturas que están protegidos contra la disminución de la función renal y vascular atribuida a la edad (Hollenberg NK R. A., 1999; McCullough ML, 2006). Curiosamente, los Kunas consumen diariamente una bebida preparada de cacao. Un estudio realizado reveló que los Kunas de hecho tienen bajos valores de presión arterial y ninguna disminución en la función renal (Hollenberg NK M. G.-C., 1997).

Algunos estudios atribuyen las propiedades antioxidantes y antiperoxidativas al anillo bencénico de EPI (**FIGURA 3**) debido a su propiedad para eliminar los radicales hidroxilo, ya que se sabe que tales compuestos aromáticos tienen constantes de muy alta tasa de reactividad con el radical hidroxilo (Chakravarthy BK, 1981).

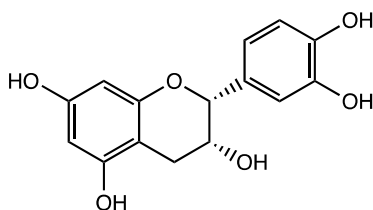


Figura 3. Estructura de (-)-Epicatequina

Otros beneficios atribuidos a EPI incluyen mejora en la función vascular, resistencia a la insulina, disminución de la agregación plaquetaria y efectos antiinflamatorios (Tarek A, 2012; Ding EL, 2006). Además, Estudios *In vitro* e *In vivo* sugieren que EPI puede ejercer la protección contra enfermedades cerebrovasculares (ECV) (Mohamed Rasha H, 2011), mejorando la estructura y función mitocondrial (Aldo Moreno-Ulloa, 2013).

Interesantemente, investigaciones en ratones sometidos a ejercicio físico demostraron que la administración del flavanol EPI condujo a notables mejoras en la resistencia a la fatiga y aumento en la capacidad oxidativa que se correlacionaron con aumento del volumen mitocondrial y aumento en la abundancia de crestas mitocondriales (Leonardo Nogueira, 2011). En pacientes con músculo esquelético dañado debido a insuficiencia cardíaca y diabetes tipo 2 el consumo de cocoa rica en EPI también logró restaurar las crestas mitocondriales (Pam R. Taub, 2013). Durante la administración de EPI en ratones seniles se ha observado un aumento en los niveles proteicos de enzimas antioxidantes como SOD y Catalasa, además de un incremento en la producción de mitocondrias (biogénesis mitocondrial) (Moreno-Ulloa A, 2014).

En cuanto a los efectos que EPI produce en riñón, en estudios recientes, investigadores evidenciaron que el pre-tratamiento con EPI redujo el daño renal producido por los agentes antineoplásicos cisplatino y ciclosporina y durante el tratamiento el antibiótico nefrotóxico gentamicina (Katsuyuki Tanabe, 2012; Al-Malk Abdulrahman L., 2011; Sardana Ankush, 2014). En ratas diabéticas tratadas con estreptozocina y EPI se observó cierta protección antioxidante así como una disminución en la progresión de los cambios morfológicos y funcionales del riñón (Sabarimuthu Darlin Quine, 2005).

Por los datos anteriormente señalados, el flavanol EPI aparenta poseer un gran potencial como agente protector en la toxicidad renal mediada por agentes quimioterapéuticos como DOX.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento previo y simultáneo (-)-Epicatequina es capaz de disminuir la toxicidad renal inducida por Doxorubicina.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos en riñón del tratamiento previo y simultáneo de (-)-Epicatequina en la toxicidad renal inducida por Doxorubicina.

5.1 Objetivos Específicos

Determinar las variaciones de los siguientes parámetros en ratones tratados con Doxorubicina a los cuales se les administró un pre-tratamiento y co-tratamiento de (-)-Epicatequina:

5.1.1 Determinación de la Función Renal

5.1.1.1 Medición del Peso Corporal al inicio y final del tratamiento.

5.1.1.2. Medición del Peso de los Riñones al final del tratamiento.

5.1.2 Determinación de la Función Mitocondrial

5.1.2.1. Determinación de los niveles proteicos del Complejo V y Porina.

5.1.3 Determinación de Estrés Oxidativo

5.1.3.1. Determinación de los niveles proteicos de Catalasa y Superóxido Dismutasa2.

5.1.3.2. Cuantificación de la Carbonilación de Proteínas en Plasma.

6. METODOLOGÍA

El protocolo experimental utilizado en este estudio fue aprobado por el “Comité de bioética de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California, Campus Tijuana” en acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Como modelo animal se utilizaron ratones machos cepas ICR (CD-1 outbred) con una edad de 6 semanas y un peso aproximado de 30 gramos. Se mantuvieron separados en jaulas en grupos de 3 – 4 ratones, los cuales fueron previamente aclimatados durante 1 semana, manteniéndolos en condiciones de temperatura constantes ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) y ciclos de luz/oscuridad (12h/12h). La alimentación consistió en agua potable y alimento para ratón, permitiéndoles libre acceso a los mismos.

6.1 Fármacos y Reactivos

Doxorrubicina fue obtenida en su presentación comercial (Adriblastina[®]) por Fármacos Especializados, S.A. de C.V., Tijuana, BC, MX. (-)-Epicatequina fue obtenida de Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA.

6.2 Protocolo Experimental

Para la administración del tratamiento, los animales fueron divididos en cuatro grupos de 10 ratones por grupo y cada uno se conformó de acuerdo a protocolos previamente establecidos (Leonardo Nogueira, 2011; Memy H. Hassan, 2014; Vincent WS Le, 2011):

- **Grupo I.** Grupo control, se le administró agua potable vía oral (gavage) diariamente además de la aplicación de cinco inyecciones de Solución Salina 0.9% vía intraperitoneal con intervalos de 2 días entre cada administración. Las inyecciones se aplicaron los días 5, 8, 11, 14 y 17.
- **Grupo II.** Se le administró diariamente (-)-Epicatequina (EPI) a una concentración de 1mg/kg/día vía oral (gavage) además de cinco inyecciones de Solución Salina 0.9% vía intraperitoneal por el mismo periodo de tiempo que el grupo I. Este grupo se utilizó como control de (-)-Epicatequina y fue de utilidad para observar los efectos que se producen en animales sanos asociados a su consumo.
- **Grupo III.** Tratado diariamente con agua potable vía oral y cinco administraciones de Doxorubicina (DOX) a una concentración de 5mg/kg vía intraperitoneal con intervalos de 2 días entre cada administración, obteniendo así una dosis total acumulada de 25mg/kg para inducir un daño renal. Las dosis se aplicaron los días 5, 8, 11, 14 y 17.
- **Grupo IV.** Tratado con (-)-Epicatequina 1mg/kg/día (Leonardo Nogueira, 2011), vía oral (gavage) y en conjunto con la administración de Doxorubicina. La dosificación y duración del tratamiento con Doxorubicina se llevó a cabo de la misma manera que el grupo III.

La administración vía oral para todos los grupos tratados con (-)-Epicatequina y con agua potable fue administrada durante 4 días previos, en conjunto con el tratamiento con Doxorubicina y 4 días posteriores a la última dosis administrada.

Se llevó a cabo seguimiento del peso corporal de los animales antes, durante y después del tratamiento, se realizó el pesaje de un riñón durante su eutanasia.

Al día siguiente de la finalización del tratamiento vía oral para cada uno de los grupos (día 21), los ratones fueron eutanasiados por inhalación con Isoflurano y se procedió a recolectar la sangre añadiendo heparina así como ambos riñones.

6.2.1 Determinación de Dosificación

La dosis utilizada en el protocolo experimental se determinó mediante el porcentaje de supervivencia y la variación del peso corporal de un grupo piloto.

La prueba piloto se llevó a cabo utilizando 20 ratones ICR (CD-1 outbred) con una edad de 9 semanas y un peso aproximado de 30 gramos. Se mantuvieron separados en jaulas en grupos de 5 ratones los cuales fueron previamente aclimatados durante 2 semanas, manteniéndolos en condiciones constantes de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) y ciclos de luz/oscuridad (12h/12h).

Para la administración del tratamiento, los animales fueron divididos en cuatro grupos y el esquema de tratamiento para cada uno fue el mismo descrito en el protocolo experimental, con algunas excepciones en los días de administración:

- Para el grupo III, la administración de Doxorubicina se realizó los días 5, 6, 8, 9 y 10.
- El tratamiento vía oral con (-)-Epicatequina se administró del día 1 al día 14.
- La suspensión del tratamiento se realizó el día 15 para proceder a su eutanasia el día 17.

6.2.2 Criterios de exclusión

Riñones con tejido necrosado.

6.3 Parámetros a analizar

Se utilizaron diversos marcadores biológicos para identificar daño renal en cada uno de los grupos de ratones:

6.3.1 Determinación de la Función Renal

6.3.1.1 Medición del Peso Corporal al inicio y final del tratamiento.

6.3.1.2 Medición del peso de los Riñones al eutanizar a los animales.

6.3.2 Determinación de la Función Mitocondrial

6.3.2.1 Determinación de los niveles proteicos de Complejo V y Porina en el sobrenadante del homogenizado de riñón por medio de Western Blot.

6.3.3 Determinación de Estrés Oxidativo

6.3.3.1 Determinación de los niveles proteicos de Catalasa y Superóxido Dismutasa en el sobrenadante del homogenizado de riñón por medio de Western Blot.

6.3.3.2 Cuantificación de proteínas carboniladas en plasma método Dot Blot.

6.4 Preparación de las Muestras

6.4.1 Homogeneización

Las muestras de tejido (25 – 35 mg) se homogeneizaron con un Polytron en 300µL de solución de lisis (1% Triton X-100, 20 mM Tris, NaCl 140 mM, EDTA 2 mM, y 0,1% de Sodio Dodecil Sulfato) con inhibidores de proteasa (Sigma-Aldrich), inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich) 5 mM Na_3VO_4 , y 3 mM de NaF, se sonicaron en hielo durante 15 minutos y por último fueron centrifugadas a 13 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó para las determinaciones posteriores.

6.4.2 Western blot

El contenido total de la proteína se cuantificó mediante el método de Bradford a partir del sobrenadante obtenido en la preparación de las muestras, utilizando Reactivo de Bradford dilución 1:5 y BSA 1% (Suero de Albumina Bovina) como estándar de referencia para realizar la curva de linealidad. Las muestras y la curva se analizaron por triplicado y el resultado de sus absorbancias fue calculado en el software “KC Junior” (Bio Tek®). Los microlitros requeridos para obtener un total de 30 microgramos de proteína se calcularon matemáticamente a partir de la ecuación obtenida en la curva de linealidad y el promedio de las absorbancias obtenidas.

Una vez obtenidos los microlitros necesarios, las muestras fueron tratadas con el buffer de carga “4x Laemmli Sample Buffer” (BIO-RAD) y el agente reductor Ditiotreitól (DTT) para posteriormente ser desnaturalizadas a 80°C aproximadamente. Un total de 6 microlitros fueron cargados en geles de poliacrilamida prefabricados (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels) al 4% - 15%.

En cada gel se cargaron entre 2 y 3 muestras por grupo para poder comparar los distintos tratamientos, además de añadir un marcador de Peso Molecular. La electroforesis se realizó en el equipo “Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell” (BIO-RAD) a 110V durante 1 hora 20 minutos aproximadamente.

Una vez finalizada la electroforesis los geles fueron transferidos a una membrana de PVDF (Difluoruro de Polivinilo), previamente activada con metanol, enjuagada con agua destilada y equilibrada en buffer de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 20% (v:v) metanol) dilución 1:10, al igual que los geles y el papel filtro) utilizando dos sistemas de transferencia semi-secos. El primer equipo utilizado fue Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BIO-RAD) en donde las proteínas fueron transferidas a 23V durante 2 horas y media. El segundo equipo de transferencia fue Pierce™ Power Blotter (ThermoFisher Scientific) a 25V durante 1 hora.

Las distintas membranas obtenidas en la transferencia fueron incubadas durante 1 hora en solución de bloqueo (5% de leche sin grasa en solución salina buffer con Tris más 0,1% de Tween 20), seguido por la incubación de un anticuerpo primario. Las membranas se lavaron (3 veces durante 5 minutos en cada ocasión) en una solución Tris-salina tamponada más 0,1% de Tween 20 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia de Peroxidasa de rábano conjugada a los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos 1: 5,000 en solución de bloqueo. Las membranas se lavaron una vez más (3×5) en solución salina tamponada con Tris más 0,1% de Tween 20, y las inmunotransferencias se desarrollaron utilizando un Kit de detección de Quimioluminiscencia Clarity™ Western ECL Substrate (BIO-RAD). A continuación se muestra una tabla con los distintos anticuerpos utilizados, dilución, preparación, tiempos y temperatura de incubación.

La detección de las bandas se realizó utilizando radiografías y revelándolas en un equipo automatizado. Las intensidades fueron cuantificadas digitalmente usando el software ImageJ.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en western blot

Anticuerpo	Dilución	Tiempo de Incubación	Temperatura de Incubación	Anticuerpo secundario utilizado
Anti-Catalasa	1:5000	30 minutos	ambiente	Anti-Rabbit HRP
Anti-Superóxido Dismutasa 2	1:5000	40 minutos	ambiente	Anti-Rabbit HRP
Porina	1:1000	18 horas	4°C	Anti-Mouse HRP
Anti-Complejo V	1:5000	18 horas	4°C	Anti-Mouse HRP
Ac. Secundario Anti-Mouse HRP	1:5000	1 hora	ambiente	No Aplica
Ac. Secundario Anti-Rabbit HRP	1:5000	1 hora	ambiente	No Aplica
Anti-GAPDH	1:1000	15 minutos	ambiente	Anti-Rabbit HRP
DNP	1:1000	18 horas	4°C	Anti-Mouse HRP

GAPDH = Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HRP = Peroxidasa de rábano

DNP = Desoxirribonucleoproteína

6.4.3 Proteínas Carboniladas En Plasma (Dot Blot)

El plasma de los ratones se utilizó de acuerdo a las instrucciones indicadas en el kit Protein Carbonyl Colorimetric Assay (Cayman chemical. Un total de 4 muestras por grupo fueron analizadas. Las muestras fueron incubadas con DNPH (2,4-Dinitrofenilhidrazina) y las muestras blanco con HCl (Ácido Clorhídrico) 2.5M durante una hora en cuarto oscuro, mezclando con vórtex cada 15 minutos. Se procedió a añadir TCA (Ácido Tricloroacético) 20% a cada muestra y éstas se incubaron en frío durante 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 g durante 10 minutos a 4°C para después descartar el sobrenadante y resuspender el pellet obtenido en TCA 10% incubando durante 5 minutos en frío.

Se centrifugó nuevamente a 10,000 g durante 10 minutos a 4°C y el pellet fue resuspendido en una mezcla 1:1 de Acetato de Etilo/Etanol. Se centrifugó a 10,000 g durante 10 minutos a 4°C. Se repitió la resuspensión en la mezcla 1:1 de Acetato de Etilo/Etanol y centrifugación 2 veces más y el pellet obtenido fue resuspendido con vórtex en Hidrocloruro de guanidina centrifugando una última vez a 10,000 g durante 10 minutos a 4°C, descartando el pellet y conservando el sobrenadante.

El contenido total de la proteína se cuantificó mediante el método de Bradford. Un total 10µg de proteína ajustado a un volumen de 8 microlitros con Buffer de Fosfato Salino (PBS) fue cargado directamente en una membrana PVDF, dejando impregnar y secar la membrana. La membrana fue incubada con anticuerpo DNP a una dilución 1:1000 durante toda una noche. La membrana se lavó (3 veces durante 5 minutos en cada ocasión) en una solución Tris-salina tamponada más 0,1% de Tween 20 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia de Peroxidasa de rábano conjugada con el anticuerpo secundario Anti-Mouse diluido 1:5,000 en solución de bloqueo. La membrana se lavó una vez más (3×5) en solución salina tamponada con Tris más 0,1% de Tween 20, y la inmunotransferencia se desarrolló utilizando el Kit de detección de Quimioluminiscencia Clarity™ Western ECL Substrate (BIO-RAD).

La detección de las bandas se realizó utilizando radiografías y revelándolas en un equipo automatizado. Las intensidades fueron cuantificadas digitalmente usando el software ImageJ.

6.5 Plan de análisis de resultados

Al menos 5 animales por grupo fueron utilizados. Los datos se analizaron utilizando análisis de la varianza de una vía (ANOVA) aplicando la prueba de Tukey y la prueba *t*-student. El nivel de significancia fue del 5 %.

7. RESULTADOS

7.1 Supervivencia y Mortalidad

El estudio se llevó a cabo utilizando 10 ratones para los grupos control (Ctrl), doxorubicina (Dox) y doxorubicina más (-)-epicatequina (D+E), y con 9 ratones para el grupo control de (-)-epicatequina (Epi). Con el transcurso de los días y consecuentes administraciones del tratamiento, se observó un deterioro en el aparente estado de salud de animales a los cuales se les administró Dox lo que condujo a su muerte. A los 22 días del inicio del tratamiento, el índice de mortalidad más alto se observó en el grupo que recibió Dox cuyo índice fue del 30 % (equivalente a la muerte de 3 ratones). El pretratamiento con Epi no logro mejorar el índice de mortalidad ya que presento el mismo índice de mortalidad (D+E = 30%). Los ratones pertenecientes a los grupos Ctrl y Epi presentaron un índice de supervivencia del 100 % (TABLA 2).

Tabla 2. Índice de Mortalidad

Grupo	No. Inicial de Ratones	No. Final de Ratones	Mortalidad (%)
Control	10	10	0
Epi	9	9	0
Dox	10	7	30
D+E	10	7	30

7.2 Variación en peso

Se ha reportado que el tratamiento con Dox suele ser muy agresivo y generalmente conlleva a deterioros en el estado de salud (pérdida del peso corporal, disminución en el estado de ánimo, pérdida del apetito, etc.) situaciones que podrían generar graves consecuencias e incluso la muerte si no se tiene especial cuidado durante su tratamiento (referencia).

En este estudio, la administración de Dox a una dosis total acumulada de 25 mg/kg causó diferencias significativas en la variación del peso corporal en gramos entre los grupos Dox ($p < 0.05$) y D+E ($p < 0.005$) comparados con el Control y entre los grupos Dox ($p < 0.005$) y D+E ($p < 0.0005$) comparados con el grupo Epi. No se observaron diferencias significativas entre los grupos Ctrl y Epi (**FIGURA 4A**).

Una vez realizada la eutanasia de los animales, se procedió a realizar el pesaje de uno de los riñones. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas en la variación del peso (g) del riñón entre los grupos Dox ($p < 0.05$) y D+E comparados con el Control y entre los grupos Dox ($p < 0.005$) y D+E ($p < 0.0005$) comparados con el grupo control Epi mas no diferencias significativas entre los grupos Ctrl y Epi (**FIGURA 4B**).

La relación peso riñón-peso corporal no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos tratados con Dox comparados con los controles así como tampoco entre los grupos Ctrl y Epi. (**TABLA 3**).

Tabla 3. Variación en el Peso Corporal y Peso del Riñón

Grupo	n	Peso Corporal promedio (g) $\pm$ EEM	Peso de Riñón promedio (g) $\pm$ EEM	Relación peso riñón-peso corporal (%) $\pm$ EEM
Ctrl	8	33.84 $\pm$ 0.58	0.27 $\pm$ 0.01	0.81 $\pm$ 0.03
Epi	9	35.67 $\pm$ 0.94	0.28 $\pm$ 0.01	0.79 $\pm$ 0.03
Dox	7	28.57 $\pm$ 1.12 ^{a,c}	0.20 $\pm$ 0.02 ^{a,c}	0.72 $\pm$ 0.05
D+E	7	25.67 $\pm$ 0.96 ^{b,d}	0.19 $\pm$ 0.02 ^{b,d}	0.73 $\pm$ 0.06

Los resultados se presentan como promedios $\pm$ EEM de acuerdo al número de muestras por grupo.

^a p<0.05 comparado con el grupo control

^b p<0.005 comparado con el grupo control

^c p<0.005 comparado con el grupo epi

^d p<0.0005 comparado con el grupo control epi

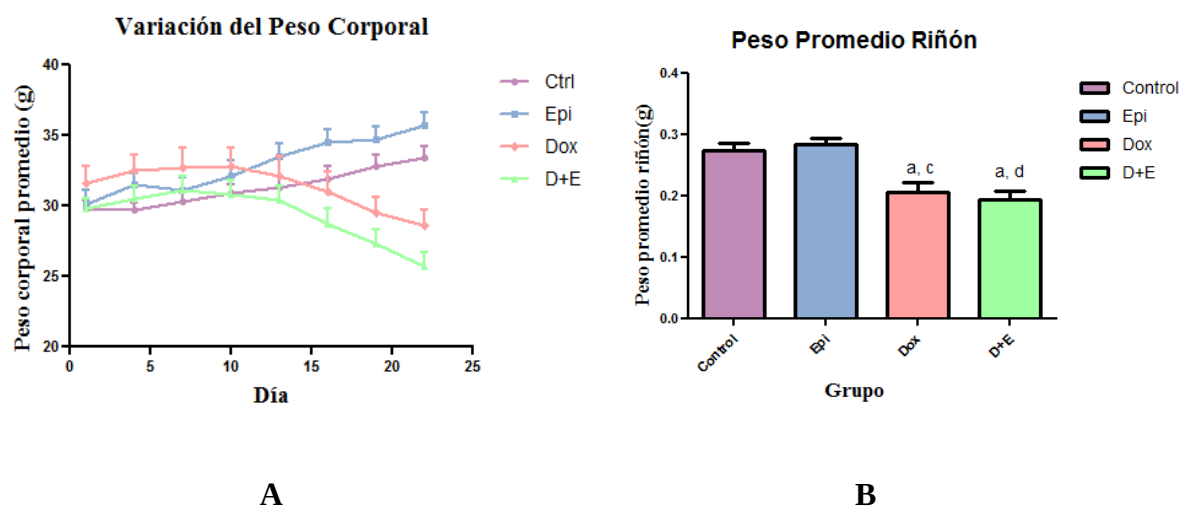


FIGURA 4. A) Variación del peso corporal en gramos entre los grupos Ctrl, Epi, Dox, D+E durante los 22 días de tratamiento con (-)-epicatequina 1mg/kg y doxorubicina 5mg/kg. **B)** Variación en el peso promedio del riñón en gramos. Los resultados se presentan como promedios $\pm$ EEM de acuerdo al número de muestras por grupo. ^a p<0.05 comparado con el grupo control, ^b p<0.005 comparado con el grupo control, ^c p<0.005 comparado con el grupo epi, ^d p<0.0005 comparado con el grupo control epi.

7.3 Determinación del estrés oxidativo

Las ERO dan lugar a la oxidación de lípidos, proteínas y DNA contribuyendo al deterioro celular y envejecimiento (Otkay Tacar, 2013). Sin embargo, el organismo cuenta con sistemas de defensa antioxidante natural, enzimas tales como SOD2 y catalasa, las cuales contrarrestan los efectos de estos radicales generando especies menos reactivas (Rade Injac M. B., 2008).

Se ha descrito una relación entre la administración de Dox y un aumento de estos radicales libres de oxígeno (Murat Yagmurca, 2004).

Un método muy utilizado para detectar la oxidación de proteínas así como el estado de este sistema de balance del estrés oxidativo se realiza mediante la cuantificación del contenido de carbonilos en las proteínas y la determinación de los niveles proteicos de SOD2 y Catalasa.

7.3.1 Determinación de la Carbonilación de Proteínas

Este estudio, no observó diferencias significativas atribuidas a la administración de Dox entre los distintos grupos control, los tratados con Epi y los grupos tratados con Dox (**TABLA 4, FIGURA 5**).

Tabla 4. Carbonilación de Proteínas en Plasma (Método Dotblot)

Promedio de densitometría (1×10^3) $\pm$ EEM		
Grupo	n	Promedio
Ctrl	4	32.45 $\pm$ 1.87
Epi	4	36.58 $\pm$ 1.87
Dox	4	34.49 $\pm$ 3.57
D+E	4	33.57 $\pm$ 1.93

Los resultados se presentan como promedios $\pm$ EEM de acuerdo al número de muestras por grupo. No se observaron diferencias significativas.

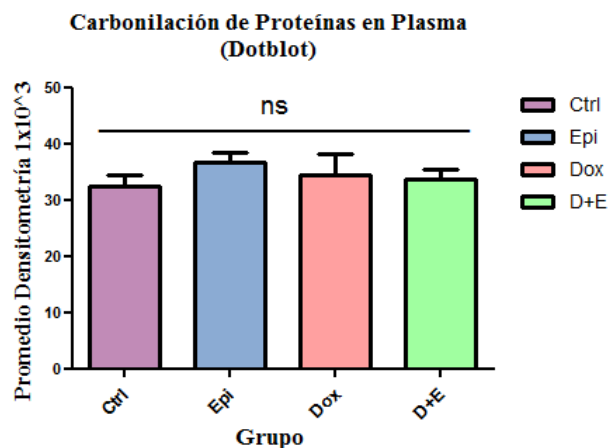


FIGURA 5. Carbonilación de Proteínas en ratones tratados con (-)-epicatequina (Epi), doxorubicina (Dox) y grupos control. Los resultados se presentan como promedios $\pm$ EEM de acuerdo al número de muestras por grupo. No se observaron diferencias significativas (ns).

7.3.2 Determinación de los niveles proteicos de SOD2 y Catalasa

Como se muestra en la **TABLA 5 Y FIGURA 6A**, se detectó una disminución significativa en el contenido de proteína SOD2 en el grupo Dox de 0.66 ± 0.10 comparado con el grupo Ctrl 1.00 ($p < 0.05$). El pretratamiento con Epi (D+E) no logro recuperar los niveles proteicos de SOD2 0.74 ± 0.06 . No se observaron diferencias significativas entre los grupos Ctrl 1.00 y Epi 0.90 ± 0.66 .

Los niveles proteicos de catalasa (B) no mostraron diferencias significativas en ninguno de los grupos tratados (Epi 0.97 ± 0.04 , Dox 1.11 ± 0.11 y D+E 0.99 ± 0.15) comparados con el grupo control 1.00.

Tabla 5. Determinación de superóxido dismutasa 2 y catalasa

Valor Normalizado $\pm$ EEM			
Grupo	N	Superóxido Dismutasa 2	Catalasa
Ctrl	9	1.00	1.00
Epi	8	0.90 ± 0.66	0.97 ± 0.04
Dox	6	0.66 ± 0.10^a	1.11 ± 0.11
D+E	8	0.74 ± 0.06	0.99 ± 0.15

Los resultados se presentan como promedios $\pm$ EEM de acuerdo al número de muestras por grupo.

^a $p < 0.05$ comparado con el grupo control.

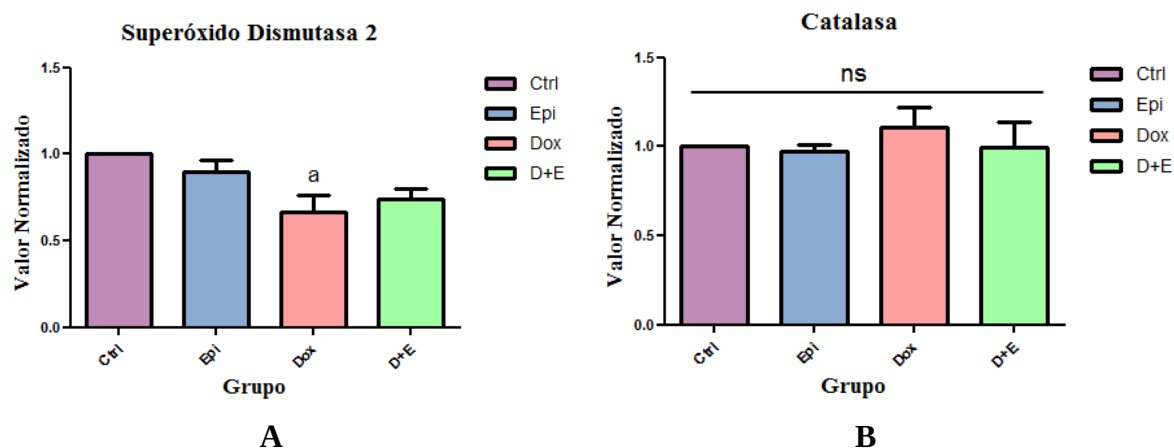


FIGURA 6. A) Determinación de los niveles proteicos de superóxido dismutasa 2. **B)** Determinación de los niveles proteicos de catalasa. Los resultados se presentan como promedios normalizados con gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) en función a la relación con el grupo control utilizado como unidad de referencia $\pm$ EEM. ^a $p < 0.05$ comparado con el grupo control para la determinación de SOD2. No se observaron diferencias significativas (ns) entre los grupos Ctrl, Epi, Dox, D+E para catalasa.

7.4 Determinación de la función mitocondrial

El complejo V y la porina son proteínas mitocondriales involucradas en el proceso de fosforilación oxidativa e integridad y estructura de la mitocondria, respectivamente. Se ha observado que aumentos o disminuciones en los niveles de estas proteínas afectan directamente en la correcta funcionalidad de la mitocondria.

7.4.1 Determinación de los niveles proteicos de complejo V y porina

Los niveles proteicos de complejo V no mostraron diferencias significativas (**FIGURA 7A**) en ninguno de los grupos tratados (Epi 1.69 ± 0.18 , Dox 1.13 ± 0.27 y D+E 1.58 ± 0.34) comparados con el grupo control 1.00 (**TABLA 6**).

Los niveles proteicos de porina no mostraron diferencias significativas (**FIGURA 7B**) en ninguno de los grupos tratados (Epi 1.25 ± 0.20 , Dox 0.97 ± 0.12 y D+E 1.21 ± 0.13) comparados con el grupo control 1.00 (**TABLA 6**).

Tabla 6. Determinación de complejo V y porina

Valor Normalizado $\pm$ EEM				
Grupo	n	Complejo V	n	Porina
Ctrl	8	1.00	9	1.00
Epi	8	1.69 ± 0.18	8	1.25 ± 0.20
Dox	6	1.13 ± 0.27	5	0.97 ± 0.12
D+E	6	1.58 ± 0.34	7	1.21 ± 0.13

Los resultados se presentan como promedios $\pm$ EEM de acuerdo al número de muestras por grupo. No se observaron diferencias significativas.

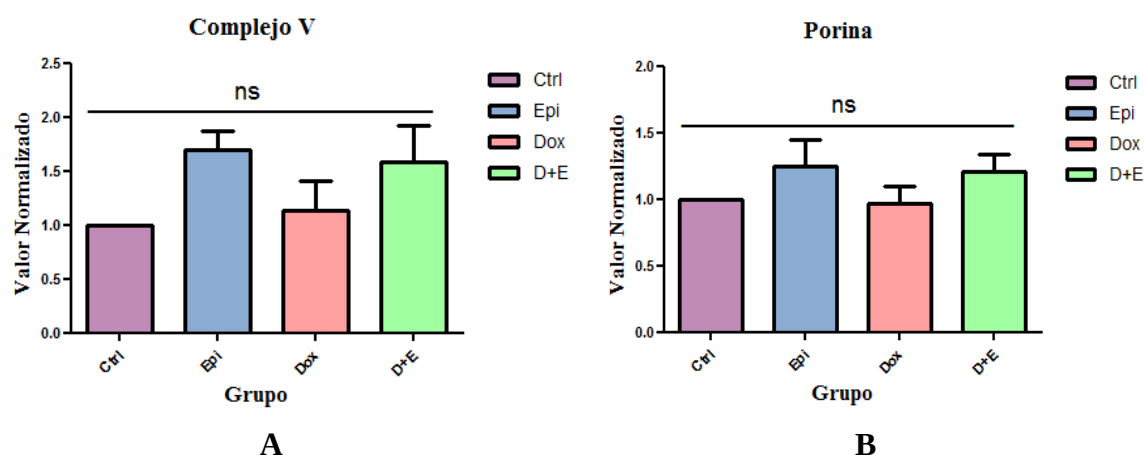


FIGURA 7. A) Determinación de los niveles proteicos de complejo V. **B)** Determinación de los niveles proteicos de porina. Los resultados se presentan como promedios normalizados con Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) en función a la relación con el grupo control utilizado como unidad de referencia $\pm$ EEM No se observaron diferencias significativas (ns) entre los grupos Ctrl, Epi, Dox, D+E para ambas proteínas.

8. DISCUSIÓN

Desde su introducción en 1969, la Dox, en conjunto con otros fármacos antineoplásicos ha sido ampliamente utilizada como primera línea de tratamiento en contra de distintos tipos de cáncer. Sin embargo, su uso clínico y efectividad se han visto limitados debido a la nefrotoxicidad asociada a su administración (Otkay Tacar, 2013).

Diversas investigaciones (J. HRENÁK, 2013; Mohamed A. El-Moselhy A, 2014) han reportado una disminución del peso corporal en relación al peso del riñón asociada a la administración de Dox, esto probablemente debido a la eliminación de la membrana de la mucosa intestinal provocando una reducción en la absorción del producto de la digestión de los alimentos y una disminución en la secreción de hormonas intestinales (Weidong Zhu, 1999). **Rashikh et al (2012)** reportó una disminución en peso corporal en relación al peso del riñón en ratas tratadas con Dox con respecto al grupo control. En este estudio, aunque el análisis del peso corporal y del riñón por separado muestran diferencias significativas en los grupos tratados con Dox con respecto al control, la relación peso corporal/peso de riñón no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos tratados con Epi y con Dox.

Aunque el mecanismo por el cual Dox genera toxicidad no es del todo conocido, el estrés oxidativo, producto del aumento en la formación de radicales libres de oxígeno y la disminución en la síntesis de enzimas antioxidantes como Catalasa y SOD que neutralicen estos radicales, es la teoría comúnmente aceptada. Ciertamente, **Deman et al (2001)** reportó que el tratamiento con Dox reduce la capacidad antioxidante en riñón, aumentando la susceptibilidad al estrés oxidativo de sus estructuras celulares.

La SOD se encuentra distribuida ampliamente en todas las células, y juega un papel muy importante durante el daño oxidativo causado por ERO. Lleva a cabo la transformación iones superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los cuales serán después transformados por acción de otras enzimas como Catalasa y GPx (**Rashid S. et al, 2013**). En el presente estudio la SOD mostró una disminución significativa en los niveles proteicos del grupo Dox con respecto al grupo control. Consistente con estos resultados, **Nehal M. Elsherbiny et al (2014)** reportó una disminución en la actividad enzimática de SOD en ratas a una dosis total de 21 mg/kg. Además, en otras investigaciones **Yagmurca M et al (2004)** y **Rashikh et al (2012)** evidenció que la administración de Dox de 20 mg/kg en ratas a los veinte y 30 días posteriores respectivamente, causaron una disminución en la actividad de SOD, GPx y Catalasa. Aunque las investigaciones anteriores determinaron la actividad enzimática de estas proteínas, **Julicher et al 1988** quien determinó la influencia del tratamiento crónico de Dox en los mecanismos de defensa celular en ratas, propuso que una disminución en la actividad de estas enzimas probablemente se debe a una disminución en su síntesis.

Katsuyuki et al (2012) administró el agente neoplásico Cisplatino (CDDP) en un modelo de nefropatía en ratas en co-administración con el flavonoide Epi a una concentración de 1 mg/kg. Sus resultados mostraron que Epi fue capaz de ejercer cierto grado de protección en contra del daño renal producido por CDDP aumentando los niveles proteicos de SOD y proteínas mitocondriales en comparación con el grupo que solo recibió CDDP. En este estudio, no se observó un aumento en los niveles proteicos de SOD con respecto al grupo Dox y al grupo control en los ratones que recibieron un pre y co-tratamiento con Epi.

Con respecto a los niveles de expresión de Catalasa, por otra parte, no se observaron diferencias en ninguno de los grupos tratados con Dox y Epi con respecto al control. Referente a los datos obtenidos para Catalasa, **Adachi et al (1983)**, **Nowak y Drzewoski (1996)** no observaron disminución o afectación en la actividad de esta enzima a una dosis de 15 y 20 mg/kg de Dox respectivamente en órganos como hígado y riñón. Con respecto a la carbonilación como indicador de EO.

Aunque la causa principal de la toxicidad generada por Dox ha sido atribuida principalmente al daño oxidativo, factores como la supresión de la biogénesis mitocondrial o disminución en la actividad de la mitocondria han sido ampliamente descritos (**Jirkovsky et al, 2012**). Los resultados reportados en este estudio no arrojaron diferencias en ninguno de los grupos tratados con Dox y Epi con respecto al grupo control para ninguna de las proteínas mitocondriales tales como complejo V o porina.

I. Ramírez-Sánchez et al (2014) y **L. Nogueira et al (2011)** reportaron que con un pre-tratamiento de Epi en ratones resultó un aumento de proteínas mitocondriales en músculo esquelético y corazón de ratones sometidos a estrés oxidativo, sin embargo en este estudio la posible reno-protección atribuida a la administración de Epi en conjunto con Dox objeto de este estudio, no pudo ser evaluada debido a que aparentemente no se logró generar un daño renal notorio para poder comparar estos grupos.

En conjunto a la investigación de la nefrotoxicidad, se realizaron distintos ensayos (resultados no mostrados) en corazón e hígado. Los resultados obtenidos tampoco evidenciaron indicios de daño sobre estos órganos a las dosis y tiempos comprendidos en el presente estudio.

9. CONCLUSIÓN

En conclusión, como resultado de este estudio, se observó una disminución en los niveles de expresión de SOD, disminución del peso corporal y peso del riñón asociados al tratamiento con Dox. Sin embargo, este estudio no generó evidencia clara para demostrar que la administración de Dox fue lo suficientemente agresiva como para generar un daño renal importante, ya que no se observaron diferencias significativas en los niveles de carbonilación de proteínas y en los niveles proteicos de catalasa, complejo V y porina de los grupos Dox con respecto al grupo control. En el presente estudio un aumento en la dosis total del fármaco no fue posible debido a la alta tasa de mortalidad mostrada en los ratones (susceptibilidad no mostrada en otros modelos animales, como por ejemplo en ratas), lo que arriesgaría la cantidad y viabilidad de las muestras de riñón. Una causa probable se atribuye a que la duración del tratamiento no fue lo suficientemente prolongada. **Dirk Lebrecht et al (2004)** realizó un estudio en ratas a las cuales se les administró 1 mg/kg de Dox durante 7 semanas hasta lograr una dosis total acumulada de 7 mg/kg. La división de los grupos se llevó a cabo de acuerdo a los distintos tiempos a los cuales las ratas serían eutanizadas con respecto a la última administración de Dox. Estos investigadores observaron que en los grupos que fueron eutanizados inmediatamente, 1 y 2 días después de la última administración de Dox no mostraron un daño renal evidente. Sin embargo, el grupo donde la eutanasia se llevó a cabo 30 días posteriores a la última administración de Dox, el daño renal caracterizado por lesiones glomerulares y una alteración en la función de la cadena respiratoria fue significativo. Estos datos apoyan la teoría de que la ausencia de evidencia de daño renal en este estudio se debió principalmente a una eutanasia muy temprana del modelo animal utilizado.

10. BIBLIOGRAFÍA

- AA, G. (2001). Stealth liposomes and tumor targering: one step further in the quest for the magic. . *Clin Cancer Res*, 7:223-5.
- Abo-Salem, O. M. (2011). The Protective Effect of Aminoguanidine on Doxorubicin-Induced Nephropathy in Rats. *J Biochem Molecular Toxicology*, 26(1):1-9.
- Aldo Moreno-Ulloa, A. C.-G.-S. (2013). Effects of (-)-epicatechin and derivatives on nitric oxide mediated induction of mitochondrial proteins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 4441-4446.
- Alessandra Stacchiotti, G. F. (2014). Mitochondrial and Metabolic Dysfunction in Renal Convuluted Tubules of Obese Mice: Protective Role of Melatonin. *PLOS one*, 1-8.
- Al-Malk Abdulrahman L., M. S. (2011). The protective effect of epicatchin against oxidative stress and nephrotoxicity in rats induced by cyclosporine. *Human and Experimental Toxicology*, 145-151.
- Ana Luisa Miranda-Vilela, C. K. (2014). Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1161-1176.
- Ayla S, S. I. (2011). Doxorubicin induced nephrotoxicity: protective effect of nicotinamide. *Int J Cell Biol*, Vol. 2011 Art. ID 390238.
- Azhar Rashikh, K. K. (2014). Protective effect of a direct renin inhibitor in acute murine model of cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 489-500.
- Azza A. K. El-Sheikh, M. A. (2012). ffect of Coenzyme-Q10 on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Advances in Pharmacological Sciences*, 1-8.
- Bachur N., G. S. (1979). NADPH-cytochrome P450 reductase activation of quinine anticancer agents to free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 954.
- Bertani T, P. A. (1982). Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab. Invest.*, 46: 16-23.
- C. Cervelho, R. X. (2009). Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect . *Current Medicinal Chemistry*, 3267-3285.
- Carla Patricia Carlos, N. M. (2014). Predictive Usefulness of Urinary Biomarkers for the Identification of Cyclosporine A-Induced Nephrotoxicity in a Rat Model. *PLOS one*, 1-11.
- Chakravarthy BK, G. S. (1981). The prophylactic action of (-)-epicatechin against alloxan-induced diabetes in rats. *Life Sci*, 29: 2043–2047.
- Chance B, S. H. (1979). Hydroperoxide metabolism in mam- malian organs. . *Physiol Rev.* , 5: 527–60.
- Chengqun Huang, X. Z. (2010). uvenile Exposure to Anthracyclines Impairs Cardiac Progenitor Cell Function and Vascularization Resulting in Greater Susceptibility to Stress-Induced Myocardial Injury in Adult Mice. *Circulation*, 675-683.
- Cortes, E. G. (1978). Adriamycin cardiotoxicity: early detection by systolic time interval and possible prevention by coenzyme Q. *Cancer*, 62: 887-892.
- Ding EL, H. S. (2006). Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutr Metab*, 3:2.
- ER, S. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257: 1220–1224.

- Feti Tulubas, A. G. (2013). The protective effects of w-3 fatty acids on doxorubicin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 31(7):638-44.
- Galán AI, F. E. (1995). Cyclosporine A hepatotoxicity: effect of prolonged treatment with cyclosporine on biliary lipid secretion in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22: 260-265.
- Giorgio Minotti, P. M. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 185-229.
- Hara Y., M. S. (1985). Antitumor activity of tea catechins. *Nutr Res*, 150: 127-135.
- Hollenberg NK, M. G.-C. (1997). Aging, acculturation, salt intake, and hypertension in the Kuna of Panama. *Hypertension*, 29:171-176.
- Hollenberg NK, R. A. (1999). Age, renal perfusion and function in island-dwelling indigenous Kuna Amerinds in Panama . *Nephron*, 82: 131-138.
- I Ramirez-Sanchez, L. N. (2012). Stimulatory effects of the flavanol (-)-epicatechin on cardiac angiogenesis: Additive effects with exercise. *J Cardiovasc Pharmacol*, 429-438.
- Igarashi Kiharu, H. K. (2007). Effects of Dietary Catechins on Glucose Tolerance, Blood Pressure and Oxidative Status in Goto-Kakizaki Rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 496-500.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, I. (2014). *Estadísticas a propósito de... día mundial contra el cáncer (4 de febrero)*. Obtenido de <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2014/cancer11.pdf>
- J. Hrenák, K. A. (2013). Protective Effect of Captopril, Olmesartan, Melatonin and Compound 21 on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats . *Physiol. Res*, 181-189.
- Jang M, C. L. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Sciencie*, 275:218-221.
- Jaroslav Dudka, R. G.-J. (2012). Different Effects of Resveratrol on Dose-Related Doxorubicin-Induced Heart and Liver Toxicity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-10.
- Jose L. Quiles, J. R.-T. (2002). Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*, 79-95.
- Joyce Trujillo, Y. I.-J.-R.-C. (2013). Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biology* , 448-456.
- Kada T., K. K. (1985). Detection and identification of natural bio-antimutagens of tea catechins. *Nippon Eiyo Shokuryou Gakkaishi (en japonés)*, 38: 77-81.
- Katrina Go Yamazaki, D. R.-P.-H. (2008). Short- and long-term effects of (-)-epicatechin on myocardial ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 761-767.
- Katsuyuki Tanabe, Y. T. (2012). Epicatechin limits renal injury by mitochondrial protection in cisplatin nephropaty. *American Journal of physiology*, 1264-1274.
- Kaushal GP., B. A. (2004). Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*, 66:500-506.
- Kazim Sahin, M. T. (2010). Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sciences*, 240-245.
- Koima S., I. T. (1993). Inhibitory effect of 5,6,7,8-tetrahydroneoterin on adryamicin induced cardiotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266: 1699-1704.

- Kumarvel Paalnichamy Malarkodi, A. V. (2003). Protective effect of lipoic acid on adriamycin induced lipid peroxidation in rat kidney. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 9-13.
- Lefrak, E. P. (1973). A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*, 32: 302-314.
- Leonardo Nogueira, I. R.-S. (2011). (–)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *J Physiol*, 4615-4631.
- Ling Tao, S. C. (2014). The role of the mitochondrial oxidative stress in the cytotoxic effects of the green tea catechin, (–)-epigallocatechin-3-gallate, in oral cells. *Nutr. Food Res.*, 665-676.
- Liu L, L. Q. (2007). Differential effects of dihydropyridine calcium antagonist on doxorubicin induced nephrotoxicity in rats. *Toxicology*, 81-90.
- Maha Baligh Zickri, S. Z. (2012). Effect of Stem Cell Therapy on Adriamycin Induced Tubulointerstitial Injury. *International Journal of Stem Cells*, 130-139.
- Mahalaxmi Mohan A, S. K. (2010). Protective effect of Solanum torvum on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 436-440.
- Mahmoud A. Mansouru, H. A.-K.-S. (1999). Effect of Captopril on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Normal Rats. *Pharmacological Research*, 233-237.
- Manucha, W. (2014). Papel de las mitocondrias y el estrés oxidativo en el proceso inflamatorio renal. *MEDICINA*, 254-258.
- McCullough ML, C. K. (2006). Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols. *J Cardiovasc Pharmacol*, 47: 103–109.
- Memy H. Hassan, M. G.-A. (2014). Modulator Effects of Meloxicam against Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Mice. *J Biochem Molecular Toxicology*, 337-346.
- Milner, L. W. (1991). Amelioration of glomerular injury in doxorubicin hydrochloride nephrosis by dimethylthiourea. *J. Lab. Clin. Med.*, 118: 427-434.
- Min-Hsiung Pan, C.-S. L.-T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & Function*, 15-31.
- Mohamed A. El-Moselhy A, 1. A.-S. (2014). Protective mechanisms of atorvastatin against doxorubicin-induced hepato-renal toxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101-110.
- Mohamed Rasha H, K. R. (2011). Epicatechin attenuates doxorubicin-induced brain toxicity: Critical role of TNF- α , iNOS and NF- κ B. *Brain Research Bulletin*, 22-28.
- Moreno Ulloa, A. N. (2014). Recovery of Indicators of Mitochondrial Biogenesis, Oxidative Stress, and Aging With (–)-Epicatechin in Senile Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 70(11):1370-8.
- Moselhy, A. L.-M. (2011). The protective effect of epicatechin against oxidative stress and nephrotoxicity in rats induced by cyclosporine. *Human and Experimental Toxicology*, 145-151.
- Murat Yagmurca, H. E. (2004). Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clinica Chimica Acta*, 27-34.
- Nagla A. El-Shitany A, S. E.-H.-D. (2008). Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2422-2428.
- Narayan Vekatesan, D. P. (2000). Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *British Journal of Pharmacology*, 231-234.
- O'Toole, J. F. (2014). Renal manifestations of genetic mitochondrial disease. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 57-67.

- O'Donnell M.P., M. I. (1985). Adriamycin-induced chronic proteinuria: a structural and functional study. *J. Lab. Clin. Med.*, 106: 62-67.
- OMS. (01 de Febrero de 2015). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 01 de Julio de 2016, de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Ortiz-Vilchis Pilar, G. Y.-G.-S.-P. (2014). Co-administration of the flavanol (-)-epicatechin with doxycycline synergistically reduces infarct size in a model of ischemia reperfusion injury by inhibition of mitochondrial swelling . *European Journal of Pharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.09.042>.
- Otkay Tacar, P. S. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy And Pharmacology*, 157-170.
- Ottaviani JJ, M. T.-U. (2011). The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. *Free Radic Biol Med*, 50: 237–244.
- Pace-Asciak CR, H. S.-b. (1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*, 235:207-219.
- Pam R. Taub, I. R.-S.-B.-V. (2013). Perturbations in skeletal muscle sarcomere structure in patients with heart failure and Type 2 diabetes: restorative effects of (-)-epicatechin rich cocoa. *Clinical Science* , 383-389.
- Pan M.H., L. C. (2009). Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds. *J Agric Food Chem*, 11:4467-77.
- Pimprapa Vejpongsa, E. T. (2014). Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Journal of the american college of cardiology*, 938-945.
- Pristos C.A., M. J. (2000). Basal and drug-induced antioxidant enzyme activities correlate with age-dependent doxorubicin oxidative toxicity. *Chem. Biol. Interact.*, 127, 1-11.
- Rade Injac, M. B. (2008). Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullereneol C60(OH)24 via suppression of oxidative stress. *Pharmacological Reports*, 742-749.
- Radish, S. (2013). Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 337-345.
- Rice-Evans CA, M. N. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20:933–956.
- Roberto Corti, A. J. (2009). Cocoa and cardiovascular Health. *Circulation*, 1433 – 1441.
- S. Martínez-Flórez, J. G.-G. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp*, 271-278.
- Saad S. Y., Najja T. A. & Al-Rikabi A.C. . (2001). *The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats*, 43:211-8.
- Sabarimuthu Darlin Quine, P. S. (2005). Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart. *Pharmacological Reports*, 610-615.
- Sadzuka, Y. S. (1997). Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol. Lett*, 92: 1-7.
- Sardana Ankush, K. S. (2014). Nephroprotective effect of catechin on gentamicin-induced experimental nephrotoxicity. *Clin Exp Nephrol*, 19(2):178-84.

- Secretaria de Salud, S. (2009). *Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Renal Crónica Temprana*. Obtenido de http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/335_IMSS_09_Enfermedad_Renal_Cronica_Temprana/EyR_IMSS_335_09.pdf
- Seiya Okuda, Y. O. (1986). Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney International*, 502-510.
- Servais H., O. A.-L. (2008). Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic agents: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis*, 13:11-32.
- Seval Yilmaz, A. A. (2005). Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*, 164-171.
- Sewa S. Legha, Y.-M. W. (1982). *Clinical and pharmacologic investigation of the effects of α -Tocopherol on adriamycin cardiotoxicity*, 393: 411-417.
- Simona Granata, G. Z. (2009). Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC Genomics*, 10:388.
- Sinha BK, T. M. (1984). Enzymatic activation and binding of adriamycin to nuclear DNA. *Cancer Res*, 44:2892-2896.
- Siveski-Iliskovic N., H. M. (1995). Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with antitumor effect. *Circulation*, 1:10-15.
- Sue Ayla, I. S. (2011). Doxorubicin Induced Nephrotoxicity: Protective Effect of Nicotinamide. *International Journal of Cell Biology*, 1-9.
- Swain SM, W. F. (2003). Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*, 97: 2869-79.
- Tarek A, A. E.-A.-A. (2012). Catechin protects against oxidative stress and inflammatory-mediated cardiotoxicity in adriamycin-treated rats. *Clin Exp Med*, 233-240.
- Tomas Simunek, M. S. (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*, 154-171.
- Vincent WS Le, D. C. (2011). Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology*, 30-38.
- Vishal B Jadhav, V. N. (2013). Ameliorative effect of *Luffa acutangula* Roxb On doxorubicin induced cardiac and nephrotoxicity in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 149-156.
- Von Hoff, D. L. (1979). Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann. Intern. Med.*, 91: 710-717.
- Wei Zhai, J. Z. (2013). Catechin prevents the calcium oxalate monohydrate induced renal calcium crystallization in NRK-52E cells and the ethylene glycol induced renal stone formation in rat. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 1-11.
- Wei-Cheng Chen, Z. S.-R.-H.-D.-M. (2014). Molecular identification for epigallocatechin-3-gallate-mediated antioxidant intervention on the H₂O₂-induced oxidative stress in H9c2 rat cardiomyoblasts. *J Biomed Sci*, 1-12.
- Weidong Zhu, Y. Z. (1999). MAPK Superfamily Plays an Important Role in Daunomycin-Induced Apoptosis of Cardiac Myocytes. *Circulation*, 100: 2100-2107.
- Yuka Shimeda, Y. H. (2005). Protective Effects of Capsaicin against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 1635-1638.