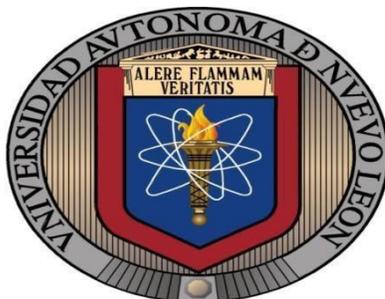


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFECTO PROTECTOR DE CURCUMINA POR MODULACIÓN DE PROTEÍNAS APOPTÓTICAS (Bcl-2, Bax) VÍA WT1 EN UN MODELO MURINO DE AFECCIÓN RENAL INDUCIDA POR DOXORRUBICINA

Por:

M. en C. Felipe de Jesús Torres Del muro

Como requisito parcial para obtener el grado de **Doctorado en Ciencias con
Orientación en Inmunobiología**

2025



**EFFECTO PROTECTOR DE CURCUMINA POR MODULACIÓN DE
PROTEÍNAS APOPTÓTICAS (Bcl-2, Bax) VÍA WT1 EN UN MODELO
MURINO DE AFECCIÓN RENAL INDUCIDA POR DOXORRUBICINA**

COMITÉ DE TESIS

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Presidente

Dr. Pablo Zapata Bonavides
Secretario

Dra. Diana Reséndez Pérez
Vocal

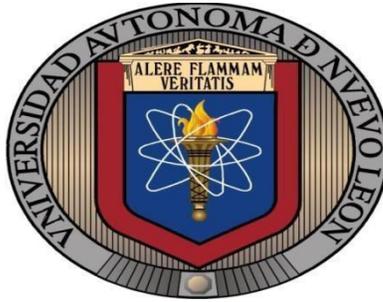
Dra. Diana Zárate Triviño
Vocal

Dr. Moisés Armides Franco Melina
Vocal

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO



**EFFECTO PROTECTOR DE CURCUMINA POR MODULACIÓN DE
PROTEÍNAS APOPTÓTICAS (Bcl-2, Bax) VÍA WT1 EN UN MODELO
MURINO DE AFECCIÓN RENAL INDUCIDA POR DOXORRUBICINA**

DIRECCIÓN DE TESIS

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Directora

Dr. Pablo Zapata Benavides

Co-Director

Dr. Juan José Bollain y Goytia de la Rosa

Asesor Externo

AVISO DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS®

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

DERECHOS RESERVADOS® PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar un sincero agradecimiento:

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Jefe y responsable del departamento de inmunología y virología de la facultad de ciencias biológicas de la Universidad Autónoma Nuevo León, directora de tesis de este trabajo, le agradezco su disposición, apoyo y confianza a lo largo de este proyecto.

Al Dr. Pablo Zapata Benavidez

Por su asesoría durante la realización del trabajo experimental, revisión de protocolos y de la tesis, por abrirme las puertas de su laboratorio y la confianza que depósito en mí, gracias por su apoyo.

Al Dr. Juan José Bollain y Goytia de la Rosa

Por su enseñanza, consejos, tiempo, apoyo en el trabajo experimental, revisión de protocolos y de la tesis.

Al comité de tesis

A la Dra. Diana Reséndiz Pérez, la Dra. Diana Zárate Triviño y al Dr. Moisés Armides Franco Molina, por brindarme su tiempo, su ayuda, disposición durante el desarrollo de este proyecto y la revisión de este. A la Dra. Laura Trejo y el Dr. Edgar Mendoza por su tiempo y brindarme un espacio en sus laboratorios.

Al equipo y amigos del laboratorio de la Unidad Biología Molecular del Cáncer

A todos ustedes por su tiempo y enseñanzas, su amistad y apoyo durante esta travesía. En especial al Dr. Santiago Saavedra por su apoyo.

Al equipo del Centro de Investigación Biomédicas del Noreste, IMSS

Por su enseñanza y confianza, por aceptarme en su laboratorio, gracias. La Dra. Pilar Carranza y la Dra. Irma Edith Carranza Torres.

Al equipo de laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Zacatecas (UAZ)

Por permitirme realizar el trabajo experimental con ustedes, por su amistad y confianza, por mantener su puerta abierta para mí. A el Dr. Rafael Herrera Esparza y a la Dra. Esperanza Avalos Díaz.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología

De la facultad de ciencias biológicas de la UANL, por su apoyo económico y de infraestructura brindado para llevar a cabo este trabajo de investigación.

A la dirección de posgrado de FCB

Por sus atenciones y cordialidad de cada persona que en el laboran.

Al CONAHCYT

Al consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios y manutención.

A mis amigas y compañeras de trabajo por todo su apoyo y sus comentarios. A la M; en C. Ivón Álvarez Cháirez, a la Dra. Sara Paola Hernández y Dra. Mariela Arellano Rodríguez.

A mis padres y hermanas que siempre han sido mi apoyo incondicional, que en todo momento han estado a mi lado aun con la distancia, apoyando y confiando siempre en mis decisiones, gracias por su paciencia.

DEDICATORIA

Para mi abuelita María Juana Najar Hernández por todas sus enseñanzas en el ámbito de la salud, la ciencia y la medicina tradicional mexicana.

Para mi padre, Felipe Torres Najar por recordarme las ganas de seguir aprendiendo hasta el último momento, enseñarme lo poco o mucho que estuvo en sus manos y cerebro.
Eternas gracias.

“La discordia, la soberbia, la vanidad y el orgullo son los detonantes de la enfermedad”

- María Juana Najar Hernández

- Febrero 2014

ÍNDICE

COMITÉ DE TESIS	ii
DIRECCIÓN DE TESIS	iii
AVISO DERECHOS DE AUTOR	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ANEXOS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 La enfermedad renal	3
2.2 Morfología renal	5
2.3 Muerte celular	10
2.4 La apoptosis en el riñón	12
2.5 WT1	12
2.6 WT1 y riñón	14
2.7 WT1 y Curcumina	14
2.8 Modelos de Afección Renal	17
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVO GENERAL	20
6. OBJETIVOS PARTRICULARES	21
7. MATERIAL Y MÉTODOS	22

7.1	Material biológico.	22
7.2	Diseño experimental.	22
7.3	Cultivo de tejidos (explantes).	23
7.4	Histopatología y análisis morfométrico.	23
7.5	Inmunohistoquímica (IHQ) en tejido renal para determinar la expresión de WT1, PCNA, Cas-3, Bax y Bcl-2.	23
7.6	Inmunofluorescencia (IFA) en Sedimento Urinario (SU) de ratón para determinar la expresión de WT1 y Podocalixina.	24
7.7	Análisis de Imagen.	25
7.8	Análisis de la modulación en la expresión de WT1 inducido por Curcumina utilizando RT-PCR punto final en explantes y qRT-PCR en tejido renal.	25
7.9	Análisis estadístico.	26
8	RESULTADOS	27
8.1	Efecto nefroprotector de la Curcumina en un modelo murino de afección renal.	27
8.1.1	Mejor proporción Albúmina: Creatinina en la orina de los ratones tratados con Curcumina que en un modelo murino de afección renal.	27
8.1.2	Valores cercanos a rangos normales en el grupo de Doxorubicina y Curcumina en la química sanguínea.	28
8.2	Alteraciones en la morfología renal por los tratamientos con Curcumina, Doxorubicina y Doxo-Curcumina.	28
8.2.1	Daño renal inducido por la administración de Doxorubicina en ratones BALB/c.	28
8.2.2	La Curcumina no altera la morfología de la nefrona observables a microscopía de campo claro.	29
8.2.3	La Curcumina muestra efecto nefroprotector en el daño inducido por Doxorubicina.	30
8.3	La Curcumina modula la transcripción de <i>wt1</i> en un modelo de afección renal inducido con Doxorubicina por RT-PCR punto final y tiempo real.	30
8.3.1	La Curcumina modula la transcripción del gen <i>wt1</i> por RT-PCR punto final en explantes.	30
8.3.2	Análisis de transcripción del gen <i>wt1</i> por qRT-PCR en los ratones tratados con Curcumina, Doxorubicina y Doxo-Curcumina.	31

8.3.3	Incremento de la expresión de WT1 en las muestras de tejido renal de ratones tratados con Curcumina.	32
8.3.4	Pérdida de podocitos en tejido renal inducido por Doxorubicina.	35
8.3.5	Detección de podocitos en SU en el modelo murino de afección renal	35
8.4	Modulación en la expresión de proteínas involucradas en apoptosis, Bax, Bcl-2 y Caspasa-3 en afección renal con Doxorubicina tratados con y sin Curcumina.	37
8.4.1	La Curcumina aumenta la expresión de Bcl-2 en el tejido renal.	37
8.4.2	La Curcumina disminuye la expresión de Bax en el modelo murino de afección renal.	40
8.4.3	La Curcumina disminuye la expresión de Caspasa-3 en el modelo murino de afección renal.	42
8.4.4	La Curcumina incrementa la expresión de PCNA en el modelo de afección renal.	44
9	DISCUSIÓN	47
10	CONCLUSIONES	53
11	PERSPECTIVAS	54
12	BIBLIOGRAFÍA	55
13	ANEXOS	63
13.1	Peso y perfil bioquímico de los ratones tratados con Curcumina y Doxo-Curcumina.	63
13.1.1	Control de peso de los ratones.	63
13.1.2	Efecto Hepatotóxica de la Doxorubicina y la Curcumina como hepatoprotectora.	64
13.2	Análisis comparativo del perfil bioquímico entre ratones R3 (Doxorubicina) y R4 (Doco-Curcu).	65
14	RESUMEN BIOGRÁFICO	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modelos murinos experimentales de afección renal.	17
Tabla 2. Anticuerpos empleados en IFA e IHQ.	24
Tabla 3. Primers y condiciones para el PCR.	26
Tabla 4. Efecto del tratamiento con Doxorubicina y/o Curcumina sobre el peso corporal en ratones.	63
Tabla 5. Efecto del tratamiento de Doxorubicina con o sin Curcumina sobre enzimas de función hepática.	65

ANEXOS

13.1 Resultados de peso de los ratones, perfil bioquímico y efecto hepático de los ratones tratados con Curcumina y Doxo-Curcumina.	63
13.1.1 Control de pesos de los ratones.	63
13.1.2 Efecto hepatotóxico de la Doxorubicina y la Curcumina como hepatoprotectora.	64
13.2 Análisis Comparativo del Perfil Bioquímico entre Ratones R3 (Doxo) y R4 (Doxo-curcu).	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Fisiología renal macroscópica.	5
Figura 2	Anatomía del corpúsculo renal y flujo del filtrado.	6
Figura 3	Podocito y localización en el glomérulo renal.	8
Figura 4	Proteínas de membrana y efectos en el podocito.	9
Figura 5	Desregulación de las vías de señalamiento reversible (a) e irreversible (b) en falla renal.	9
Figura 6	Estructura del gen de <i>wt1</i> .	13
Figura 7	Análisis de proteína en la orina en los tratamientos Curcumina, Doxorrubicina y Doxo-Curcumina	27
Figura 8	Inducción de daño renal en un modelo murino tratado con Doxorrubicina.	29
Figura 9	Efecto de la Curcumina en la nefrona en un modelo murino.	29
Figura 10	La Curcumina un nefroprotector en el daño inducido por Doxorrubicina.	30
Figura 11	Expresión de <i>wt1</i> a diferentes concentraciones de Curcumina en tejido renal (explantes).	31
Figura 12	Expresión del mRNA de <i>wt1</i> en tejido renal tratado con Doxorrubicina con y sin Curcumina.	32
Figura 13	Expresión de WT1 en tejido renal de un modelo murino con afección renal inducido por Doxorrubicina.	34
Figura 14	Promedio del número de podocitos en tejido renal.	35
Figura 15	Detección de podocitos en SU.	36
Figura 16	Podocitos en SU en un modelo murino con afección renal con o sin tratamiento de Curcumina.	37

Figura 17	Expresión de Bcl-2 en tejido renal de un modelo murino con afección renal inducido por Doxorrubicina.	39
Figura 18	Expresión de Bax en tejido renal de un modelo murino con afección renal inducido por Doxorrubicina.	41
Figura 19	Expresión de Cas-3 en tejido renal de un modelo murino con afección renal inducido por Doxorrubicina.	44
Figura 20	Expresión de PCNA en tejido renal de un modelo murino con afección renal inducido por Doxorrubicina	46
Figura 20	Morfología de los riñones tratados con Curcumina, Doxorrubicina y Doxo-Curcumina.	65

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

μL	Microlitro
°C	Grados Celsius
a.a.	Aminoácidos
AINE's	Fármacos Anti-Inflamatorios No Esteroideos
ARA	Bloqueadores de los Receptores de la Angiotensina
BSA	Albumina Serica Bovina
CAM's	Moléculas de Adhesión Celular
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DAB	3,3'-Diaminobencidina
DAPI	4',6-diamidinofenyl-indol
DD	Dominio de Muerte
DF	Diafragma de Filtración
dL	decilitro
DISC	Complejo de Señalamiento Inductor de Muerte
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FITC	Isotiocinato de Fluoresceína
g	Gramo
Genes ATG	Genes Asociados a la Autofagia
H-E	Hematoxilina & Eosina
IECA	Fármacos Inhibidores de la Enzima Convertidora de la Angiotensina
IFA	Ensayo de inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IRA	Insuficiencia Renal Aguda
IRCT	Insuficiencia Renal Crónica a Terminal
Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton's

Kg	Kilogramos
KTS	Lisina, Treonina y Serina
mAb	Anticuerpos monoclonales
MBG	Membrana Basal Glomerular
mg	Miligramos
min	Minutos
miRNA	MicroRNA
mM	miliMolar
MPT	Permeabilidad de Transición Mitocondrial
mRNA	RNA mensajero
PAS	Tinción de periodic Acid-Schieff
PCNA	Antígeno Nuclear de Células en Proliferación
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBS	Solución Buffer Fosfatos
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Retrotranscripción – Reacción en Cadena de la Polimerasa
s	Segundo
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SU	Sedimento Urinario
TFG	Tasa de Filtración Glomerular
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
WT1	Tumor de Wilm's 1

RESUMEN

La enfermedad renal crónica (ERC) afecta un 10% de la población adulta con alta incidencia de morbilidad y mortalidad, se caracteriza por la pérdida de proteínas y una baja Tasa de Filtración Glomerular (TFG) y donde las células afectadas son los podocitos, que forman la última red de filtración y su pérdida es irremplazable. El gen *wt1* codifica un factor de transcripción que modula genes de importancia en la nefrogénesis, de estructura, función y apoptosis en el podocito. Sin embargo, no se comprende en su totalidad la modulación de WT1 en la ERC.

El objetivo de este trabajo fue analizar la modulación de WT1 en afecciones renales por efecto de la Curcumina como terapia versus daño renal inducido por Doxorubicina a diferentes tiempos (24 horas, 48 horas, 7 días y 15 días). Para el análisis de la morfología renal se utilizaron las tinciones de H-E y PAS, la expresión del transcrito de *wt1* en explantes renales con diferentes concentraciones de Curcumina se determinó por RT-PCR punto final y las biopsias del modelo de afección renal con qRT-PCR, el conteo de podocitos en SU se realizó por ensayo de inmunofluorescencia (IFA), la expresión de WT1, proteínas apoptóticas (Bax y Cas-3), anti-apoptóticas (Bcl-2) y de proliferación celular (PCNA) se detectaron por inmunohistoquímica (IHQ). Los datos son presentados como medianas y los cuartiles 25 y 75. Las diferencias se analizaron por Mann-Whitney en dos grupos y más de 3 se por Kruskal-Wallis post-Dunn.

Se observaron cambios morfológicos en el modelo de afección renal donde se observa pérdida de la morfología glomerular, la modulación de WT1 por la Curcumina a la concentración de 10 mM en los explantes, incremento del mRNA de WT1 en los ratones con doble tratamiento en el tejido renal, y la Curcumina aumenta la expresión de WT1, mantiene el número de podocitos en el tejido renal y disminuye el número de podocitos excretados en la orina, aumenta la expresión de Bcl-2 y PCNA y disminuye la expresión de Bax y Cas-3 en tejido renal del modelo de afección renal.

La Curcumina en presencia de un inductor de daño modula la expresión de WT1, altera la ratio de expresión de Bax-Bcl-2 y promueve la expresión de PCNA en células de los glomérulos renales y adyacentes, así como disminuye la expresión de Cas-3.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) affects 10% of the adult population with a high incidence of morbidity and mortality. It is characterized by protein loss and a low Glomerular Filtration Rate (GFR) and where the affected cells are podocytes, which They form the last filtration network, and their loss is irreplaceable. The wt1 gene encodes a transcription factor that modulates genes of importance in nephrogenesis, structure, function, and apoptosis in the podocyte. However, the modulation of WT1 in CKD is not fully understood.

The objective of this work was to analyze the modulation of WT1 in kidney conditions due to the effect of Curcumin as therapy versus kidney damage induced by Doxorubicin at different times (24 hours, 48 hours, 7 days and 15 days). For the analysis of renal morphology, H-E and PAS stains were used, the expression of the wt1 transcript in renal explants with different concentrations of Curcumin was determined by RT-PCR end point and the biopsies of the kidney disease model with qRT-PCR, podocyte counting in SU was performed by immunofluorescence assay (IFA), the expression of WT1, apoptotic (Bax and Cas-3), anti-apoptotic (Bcl-2) and cell proliferation (PCNA) proteins were detected by immunohistochemistry (IHC). The data are presented as medians and the 25th and 75th quartiles. The differences were analyzed by Mann-Whitney in two groups and more than 3 were analyzed by Kruskal-Wallis post-Dunn.

Morphological changes were observed in the model of kidney disease where loss of glomerular morphology is observed, modulation of WT1 by Curcumin at a concentration of 10 mM in the explants, increase in WT1 mRNA in mice with double treatment in the tissue. Curcumin in kidney increases the expression of WT1, maintains the number of podocytes in the kidney tissue and decreases the number of podocytes excreted in the urine, increases the expression of Bcl-2 and PCNA and decreases the expression of Bax and Cas-3 in kidney tissue from the kidney disease model.

Curcumin in the presence of a damage inducer modulates the expression of WT1, alters the expression ratio of Bax-Bcl-2 and promotes the expression of PCNA in cells of the renal and adjacent glomeruli, as well as decreases the expression of Cas-3.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad renal crónica (ERC) está ampliamente distribuida en el mundo, afectan al 10% de la población adulta con una alta mortalidad y morbilidad (Montes Rivera JO, et al 2018) y son inducidas por una serie de patologías como hipertensión arterial (HTA), Síndrome metabólico, diabetes, autoinmunidad, escleróticos, infecciones, congénitos hereditarios, problemas cardíacos, productos químicos entre ellos los medicamentos (D´Achiarde, et al 2011).

Las células renales involucradas en el proceso de daño renal son los podocitos, varios mecanismos como la apoptosis, el desprendimiento de la Membrana Basal Glomerular (MBG), la necrosis, el daño del DNA y la desestabilización del ciclo conducen al agotamiento de los podocitos (Shankland. 2017) y estos se separan o entran en apoptosis y su lugar es ocupado por fibras de colágeno que destruyen la arquitectura renal y deterioran el proceso de filtración de la sangre.

La ERC se caracterizan por la pérdida de proteínas sanguíneas en la orina, el aumento de la creatinina y la hematuria que pueden ser inducidas por agentes antineoplásicos ampliamente utilizados en la práctica clínica como el cisplatino (Hartmann JT et al, 2000) y la Doxorubicina (Wang Y, et al 2000) que dependiendo de la dosis y la duración de la administración, puede causar daños en el corazón y los riñones (Kumral A. et al, 2015) por la inducción de estrés oxidativo a través de múltiples vías de señalización apoptótica (Lahoti TS, et al 2012).

Para contrarrestar los procesos inflamatorios, el daño oxidativo y la apoptosis inducida por estos fármacos antineoplásicos se han estudiado una gran cantidad de nefroprotectores naturales, como D-calcitriol (Dusso AS, 2011), decocción de Kangqianling (He L et al, 2009), resveratrol (MA Darwish et al, 2018) y Curcumina (Cohly H et al, 1998).

La Curcumina es un polifenol aislado del rizoma de la planta *Curcuma longa* y muestra un fuerte efecto antiinflamatorio, antioxidante y antiapoptótico (Aggarwal and Kuzhuvellil, 2009). Los estudios clínicos y preclínicos han demostrado que la Curcumina ejerce efectos protectores contra una variedad de enfermedades, interactúa directamente con las vías de señalización o modula el factor de transcripción por varios mecanismos, como WT1. Se ha descubierto que el gen *wt1* se inhibe en la línea celular K562 de la leucemia humana (Anuchapreeda S, et al 2006) a través de PKC- α (Semsri S, et al 2011) y disminuye la expresión parcial de WT1 por regulación positiva de miR-15a y miR-16-1 (Gao S, et al 2012).

WT1 modula la expresión de genes implicados en la proliferación, diferenciación (Kim J, et al 1999) y en apoptosis. WT1 se expresa en una gran cantidad de neoplasias que indican un mal pronóstico, sin embargo, en el riñón juega un papel importante, en el desarrollo urogenital durante la embriogénesis y en el mantenimiento del glomérulo.

En la etapa adulta WT1 se expresa a lo largo de la vida en los podocitos y es esencial para la integridad funcional de la barrera de filtración glomerular, la expresión basal de WT1 en el podocito modula más del 60% de las proteínas, como Nefrina, Podocina y Podocalixina, que son esenciales para el podocito, proteínas de adhesión y apoptóticas (Dong L, et al 2015). Las mutaciones de WT1 se han asociado en síndromes complejos del desarrollo que afectan a los riñones, como el Síndrome de WARM, y también están involucradas en el Síndrome renal resistente a los corticosteroides.

Debido a la controversia causada por la Curcumina como regulador negativo de WT1 en el cáncer, que tiene un efecto anticancerígeno y un efecto nefroprotector donde WT1 es esencial para mantener a los podocitos, en este trabajo el objetivo fue analizar el efecto de la Curcumina como un nefroprotector de Doxorubicina, la modulación de WT1 y la relación con la apoptosis.

2. ANTECEDENTES

2.1 La Enfermedad Renal.

El estilo de vida actual ha contribuido a la aparición e incremento de enfermedades agudas y crónicas con afectación en diversos órganos como el hígado, pulmones, corazón y riñón. La mayor parte de las enfermedades renales afectan a la nefrona, esto causa que los riñones no puedan eliminar los desechos. En la enfermedad renal el daño se da poco a poco a través del transcurso del tiempo, por lo que su detección se ve en etapas tardías de la enfermedad.

Las enfermedades renales toman relevancia por su incidencia y prevalencia que van en incremento en nuestro país y en el mundo, las estadísticas nos dicen que la diabetes mellitus, la hipertensión Arterial sistémica y la enfermedad renal crónica contribuyeron al 60% de la mortalidad mundial y aproximadamente el 47% del gasto en salud a nivel global y para el 2020 serán las primeras causas de muerte y discapacidad en países en desarrollo. En México las enfermedades renales ocupan el lugar número 10 en mortalidad, (INEGI 2017) y en 2005 el 21% del gasto medico total (seguro de enfermedades y maternidad) se dirigió solo al 0.7% de derechohabientes de la población con Insuficiencia Renal Crónica a Terminal (IRCT) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, 2005).

La afección renal se ha designado como un complejo sintomático con varias manifestaciones clínicas y anatómicas-patológicas, con pronóstico variable y presencia de proteinuria, oliguria, hipoalbuminemia e hiperlipidemia. Todavía no se comprende bien los factores que influyen en la velocidad con que se produce la insuficiencia renal, pero algunos factores que pueden dar origen a un daño renal van desde cambios en la presión sanguínea, Síndrome metabólicos, autoinmunidad, enfermedades escleróticas, infecciones, hereditarias congénitas, problemas cardiacos, cáncer, quistes, piedras y productos químicos entre ellos, los fármacos.

Los tratamientos farmacéuticos nefroprotectores deben ser considerados como una estrategia múltiple que incluya no solo medidas farmacológicas sino también cambio de hábitos, que tengan el objetivo de interrumpir, la progresión de la afección renal. Los fármacos causan hasta el 20% de los casos de insuficiencia renal aguda (IRA) en las personas, entre estos se encuentran, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), aminoglucósidos, anticancerígenos y material de contraste radiográfico intravenoso que merecen especial atención por lo frecuente de su uso.

La insuficiencia renal asociada a drogas muchas veces puede ser reversible, siempre y cuando sea reconocida a tiempo y descontinuado el tratamiento. Entre los fármacos nefrotóxicos existe una lista bastante amplia, medicamentos indicados para la depresión, antihistamínicos, antimicrobianos, retrovirales, benzodiazepinas inhibitoras de calcineurina, agentes cardiovasculares, diuréticos, drogas ilícitas y agentes quimioterapéuticos entre ellos el cisplatino y la Doxorubicina (Morales J, 2010).

Para determinar con seguridad el diagnóstico de la enfermedad renal y su etiopatogenia, el nefrólogo se apoya en los análisis de sangre para determinar sus niveles de creatinina sérica y la TGF un cálculo aproximado de la cantidad de sangre que pasa por los glomérulos cada minuto. La química general de orina y los SU (presencia de proteínas), así como la biopsia renal para el análisis morfológico y determinar qué tipo de células se ven afectadas en el riñón (Martínez D et al, 2016).

Por lo tanto, la enfermedad renal ocupa un gran gasto de recursos de atención, consulta e investigación para conocer y descifrar su fisiopatología y tratamientos que permitan aminorar el daño inducido a los riñones, así como permitir sus correctas funciones.

2.2 Morfología renal.

Los riñones realizan las funciones de regulación de la composición iónica de la sangre, el mantenimiento de la osmolaridad, la regulación del volumen de la sangre produce hormonas, como la renina del sistema de renina-angiotensina-aldosterona, eritropoyetina (control de la presión arterial), la activación de D-calcitriol.

La estructura interna del riñón solo es posible analizarla por disección, mostrando una capa externa granulosa llamada corteza, y la porción interna o central de aspecto estriado llamado medula, su morfología macroscópica se puede observar en la Figura 1.

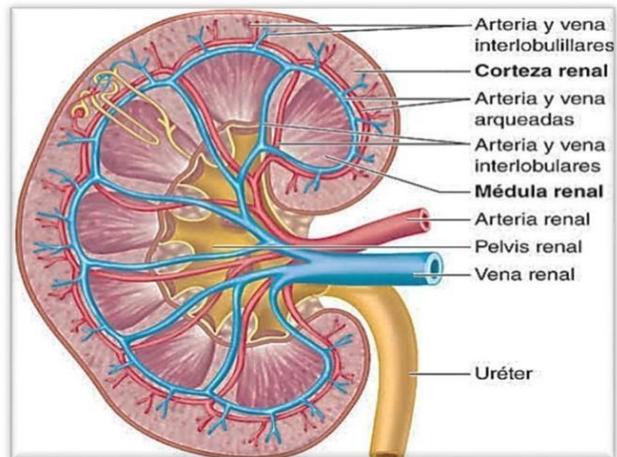


Figura 1. Fisiología renal macroscópica. Fuente: Stuart Ira Fox: fisiología humana, 14e: www.accessmedicina.com

La anatomía microscópica permite definir a las nefronas como la unidad funcional del riñón y un componente filtrante (el corpúsculo renal de Malpighi) que se encargan de los procesos funcionales de filtrar y retornar sustancias útiles a la sangre y la formación de orina. Sus componentes son: el túbulo y el corpúsculo renales, que a su vez está conformado por el glomérulo y la cápsula de Bowman.

El corpúsculo renal está compuesto por el glomérulo capilar y la cápsula de Bowman que lo recubre. Existe un espacio dentro de la cápsula, espacio urinario (de Bowman), donde pasa el líquido filtrado procedente del glomérulo. La barrera de filtración está constituida por 3 capas: el endotelio de los capilares glomerulares, la MBG y una capa de células especializadas (Figura 2).

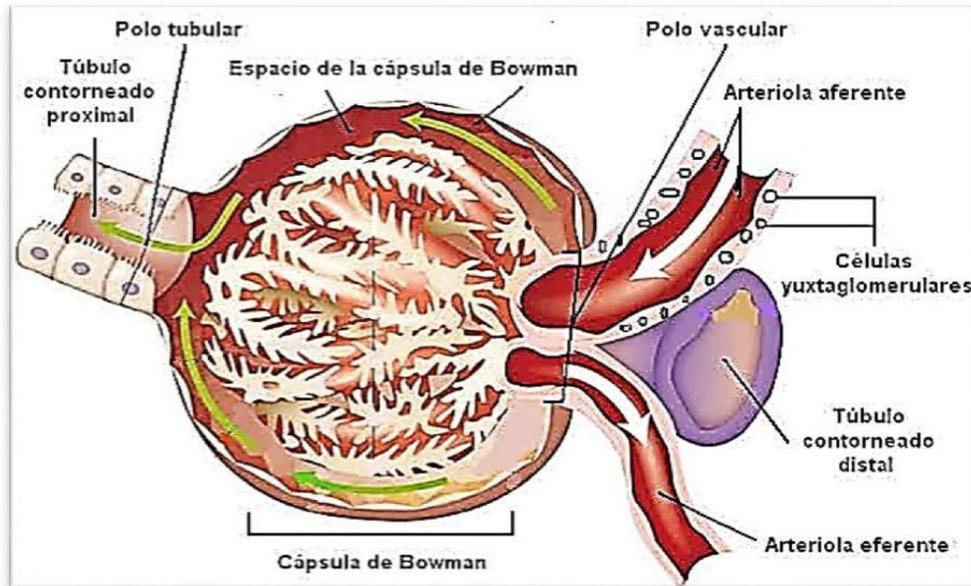


Figura 2.- Anatomía del corpúsculo renal (glomérulo) y flujo del filtrado.

Fuente: sites.google.com/site/srenalesm/.

La MBG impide el paso de macromoléculas en forma mecánica y eléctrica. Su integridad estructural es clave para el mantenimiento de la función de permeabilidad de la barrera al agua, pequeños solutos, iones y proteínas menores de 70 KDa. Está compuesta por dos capas finas, la lámina rara interna y la lámina rara externa y una capa central gruesa, la lámina densa. Las células endoteliales y epiteliales adyacentes secretan moléculas tales como colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y proteoglicanos de heparan sulfato, dando lugar a una estructura semejante a una maya. Las células endoteliales y del músculo liso como las células mesangiales proporcionan apoyo capilar y se encuentran dentro de la MBG, mientras que los podocitos están unidos a la parte externa de la MBG.

Existen cuatro tipos de células residentes en el glomérulo: células endoteliales, células mesangiales, células epiteliales parietales de la cápsula de Bowman, y células epiteliales viscerales, llamadas podocitos. (Greka and Mundel, 2012).

Los Podocitos son el tercer elemento de la barrera de filtración glomerular. Son células altamente especializadas y diferenciadas que no se dividen, con una organización celular y una citoarquitectura compleja, se componen de un cuerpo celular grande y prolongaciones digitiformes secundarias denominadas pedicelos.

Los pedicelos envuelven a los capilares glomerulares con sus extensiones de la superficie celular formando una estructura de filtración. Los pedicelos de podocitos vecinos se entrecruzan entre sí dejando entre ellos hendiduras de filtración y están unidos por una estructura extracelular impermeable a las grandes macromoléculas llamadas Diafragma de Filtración (DF), que proporcionan la última barrera a la pérdida de las proteínas en el riñón, se encargan de sintetizar la MBG.

Existe un número de podocitos inicial al nacer que se pierden de forma progresiva e irreversible en el transcurso de una lesión glomerular (Bollain et al, 2011). Sin embargo, en algunas glomerulopatías como las colapsantes, el fenotipo del podocito se altera y es capaz de dividirse (Barisoni et al, 1999; Ortiz et al, 2002; Nagata et al, 2002 y Kerjaschki, 2001).

Como miembro de la barrera de filtración, el podocito se encuentra en una posición geográfica única donde se expone a señales químicas del espacio urinario (cápsula de Bowman), recibe y transmite señales químicas y mecánicas desde la MBG sobre la que se posa y recibe señales químicas y mecánicas del espacio vascular con el que también se comunica. Los podocitos como toda célula para recibir señales desde el ambiente circundante y para traducirlos al medio intracelular dependen en gran medida de las moléculas que residen en la membrana celular (proteínas de membrana).

La superficie del podocitos está dividida en tres dominios; dominio apical, del diafragma de filtración y el dominio basal o de anclaje y cada dominio con proteínas, que son fundamentales para el mantenimiento y la integridad de este, más aún, para la estabilidad global de la arquitectura del podocito (Figura 3).

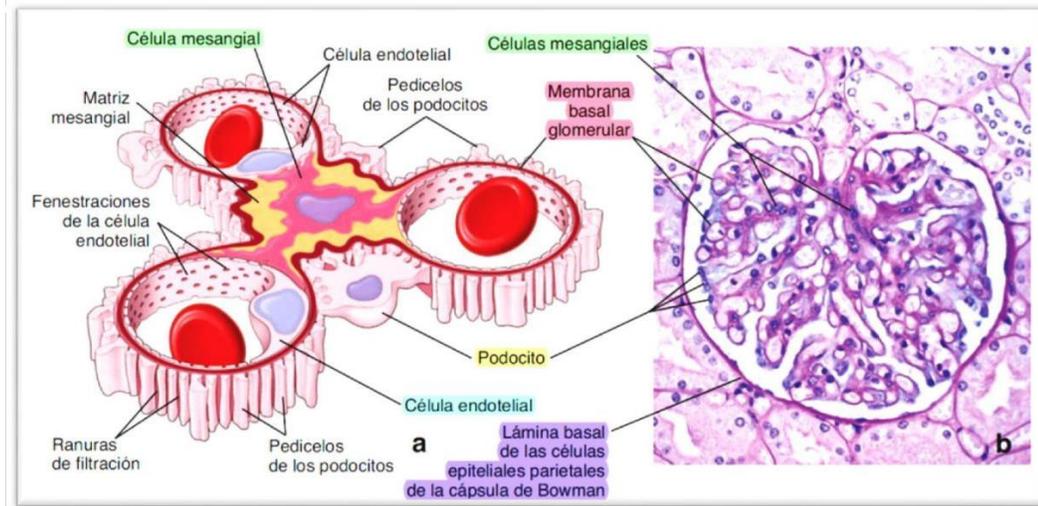


Figura 3.- Podocito y localización en el glomérulo renal. a) Representación esquemática y b) hematoxilina- eosina de un glomérulo. <https://quizlet.com/304623138/estructura-glomerular-normal-diagrama>

La pérdida de las proteínas de estructura y/o unión de los podocitos permite la separación de las células de la MBG, en donde toma importancia la actina del citoesqueleto, tanto para la función y disfunción de los podocitos. La interferencia con cualquiera de los tres dominios y la pérdida de proteínas de estructura y/o unión de los podocitos cambia el citoesqueleto de actina de haces paralelos y contráctiles (Drenckhahn et al, 1988) en una red densa., el daño en estas células se relaciona con filtración glomerular aberrante que ocasiona proteinuria (Kerjaschki et al, 2001), una característica de progresión del daño en enfermedad renal.

Proteínas de la membrana plasmática del podocito. Las proteínas membranales que se muestran en la Figura 4, están implicadas en la regulación de la función del podocito en sujetos sanos y con daño renal, y responden con un repertorio finito de cambios por susceptibilidad génica, metabólicas, hemodinámicas e inflamación, así como interacción de proteínas del endotelio y el mesangio directas con los podocitos que puede terminar en muerte celular.

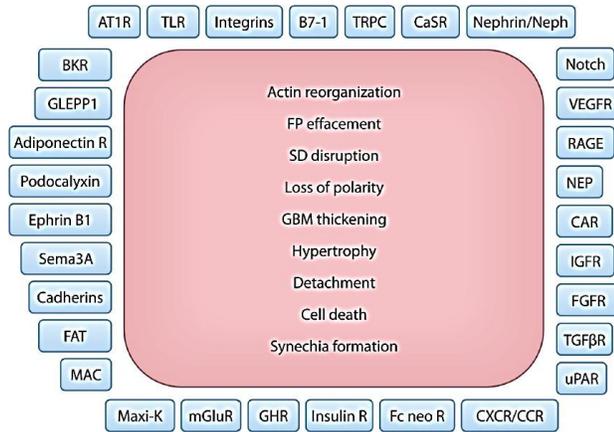
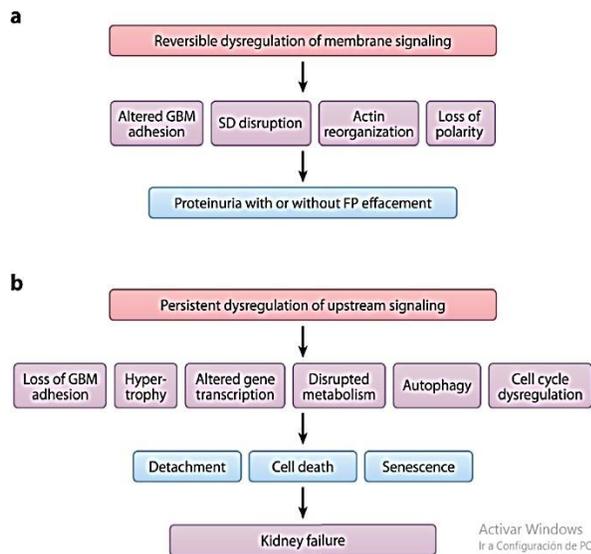


Figura 4. Proteínas de membrana y efectos en el podocito. Cell Biology and Pathology of Podocytes. Annu Rev Physiol. 2012.

Las proteínas de la membrana plasmática juegan un papel importante en la regulación y funcionamiento de los podocitos, en el mantenimiento del DF, reorganización del citoesqueleto y muerte celular. El daño renal es a través de dos vías, una reversible y otra irreversible dependiente de los efectos que se vean involucrados en el podocito, como son el desprendimiento, la senescencia y la muerte celular (Greka A and Mundel P, 2012; Figura 5).



1. **Figura 5. Desregulación de las vías de señalamiento reversible (a), e irreversible (b) en falla renal.** Cell Biology and Pathology of Podocytes. Annu Rev Physiol. 2012.

2.3 Muerte celular.

Existe una variedad de tipos de muerte celular, siendo los tres tipos de muerte más comunes y mejor descritos: la autofagia, necrosis y apoptosis.

La autofagia es un evento ordenado que involucra un gran número de genes conservados a través de la evolución denominados (genes ATG) que bloquean la lisis y los compartimientos celulares son auto-digeridos de aquí su nombre (Yorimitsu and Klionski, 2005; Meijer and Codogno, 2004).

La necrosis, es un daño celular irreversible causado por condiciones extremas o patológicas. En este tipo de muerte es activada una serie de enzimas lisosomales que inducen la pérdida de la integridad de organelos, la membrana celular y nuclear produciendo la liberación de los componentes intracelulares al medio extracelular conduciendo a una inflamación e interacciones inmunológicas no ordenadas (Paus et al., 1993; Ortiz and Egido, 2000).

La apoptosis juega un papel importante en los adultos, ya que existe una relación estrecha entre la muerte y la multiplicación celular, asegurando en muchos tejidos un flujo constante de células nuevas, las cuales son cruciales para la preservación y el óptimo funcionamiento de los organismos adultos (Golstein, 1998; Ortiz and Egido, 2000; Nelson *et al.*, 2004).

Los cambios morfológicos y estructurales de la apoptosis son producto de la fragmentación de aproximadamente 400 proteínas (Lüthi and Martin, 2007). Los cambios son observados por estudios de microscopía electrónica y de luz durante las primeras fases del proceso apoptótico, la condensación de la cromatina nuclear, exposición de la fosfatidilserina en la membrana, reducción citoplasmática, pérdida del contacto con células vecinas, fragmentación del núcleo (núcleo picnótico), formación de cuerpos apoptóticos que se traslocan a la membrana plasmática, modificando su arquitectura y finalmente, ocurre la fragmentación interna de la célula y estos productos son fagocitados por células vecinas o macrófagos (Ortiz y Egido, 2000; Kroemer *et al.*, 2005).

Los cuerpos apoptóticos frecuentemente están formados por mitocondrias intactas, que poseen un producto del proto-oncogen Bcl-2 (anti-apoptótico) en la membrana interna mitocondrial. Además, libera factores inductores de apoptosis que activan las endonucleasas endógenas (EndoG) (Li *et al.*, 2001) acelerando este proceso, los cambios ocurren de una manera reproducible y pronosticable en un período de tiempo de 30 a 120 min (Takahashi and Earnshaw., 1997; Green and Kroemer, 2004).

Las vías de señalamiento apoptóticas. La vía de señalamiento extrínseca involucra una interacción mediante receptores transmembranales, que involucra a la superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), estas proteínas tienen un dominio de muerte (DD) en su región citoplasmática de 80 a.a con un dominio extracelular rico en cisteínas (Locksley et al, 2001, Ashkenazi and Dixit, 1998).

La secuencia de eventos está definida por los modelos de FasL/FasR y TNF- α /TNFR1. Donde la unión del ligando a su receptor resulta en la proteína adaptadora FADD y el reclutamiento de RIP, FADD está asociado con procaspasa-8 formando el complejo de señalamiento inductor de muerte (DISC, Fotadar et al, 1996). Una vez, caspasa-8 es activada se inicia la fase de ejecución de la apoptosis.

La vía de señalamiento intrínseca de la apoptosis inicia por un conjunto de estímulos no mediados por receptores y que actúan sobre objetivos dentro de la misma célula. Los señalamientos negativos implican la ausencia de factores de crecimiento, hormonas y citocinas y de manera positiva, se limita a factores externos como la radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y radicales libres.

Tanto la vía extrínseca (por inducción de BID) como la intrínseca pueden causar cambios en la membrana mitocondrial esto resultando en la formación de un poro (Bax: Bax) de permeabilidad de transición mitocondrial (MPT), lo que induce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de citocromo C que interacciona con el apoptosoma, para activar Caspasa 9 y está a la Caspasa 3 siendo la efectora de la apoptosis.

2.4 La apoptosis en el riñón

La apoptosis a nivel renal tiene un papel crucial en la morfogénesis (Yamagishi 2002); Sin embargo, y después del nacimiento la tasa de apoptosis en células glomerulares disminuye (Bollain *et al.*, 2006), por lo tanto, es importante conocer sí el proceso de apoptosis es parte del daño renal, ya que este es un fenómeno fisiológico y necesario para mantener la homeostasis tisular del tejido (Ortiz *et al.*, 1999).

En el riñón, la apoptosis puede ser benéfica de reparación del daño en las glomerulonefritis proliferativas, minimizando la reacción inflamatoria intrarrenal o patogénica en las células glomerulares ha sido señalada como factor facilitador de la esclerosis glomerular, estos efectos dependen de qué tipo de células afecte, de la magnitud del fenómeno y del momento en que ocurre (Ortiz *et al.*, 1996, Ortiz, 2000).

La apoptosis y la lisis mediada por el complemento han sido consideradas las dos formas principales de muerte celular en el glomérulo inflamado, recientes estudios tienen como objetivo el estudio de apoptosis en células tubulares del riñón, pero existen pocos estudios en las células del glomérulo en este caso de los podocitos, y se han observado en pacientes con Síndrome nefrótico y con Nefritis Lúpica que hay un proceso activo de apoptosis en estas células determinadas “*in situ*” y en SU (Bollain, et al 2011).

En el desarrollo urogenital durante la embriogénesis la expresión de genes implicados en la proliferación, diferenciación, apoptosis y mantenimiento de las nefronas esta mediada por factores de transcripción, como lo es WT1 (Kim J, *et al* 1999).

2.5 WT1.

El gen del tumor de Wilm’s se compone de 50 kB con 10 exones y está ubicado en la región 11p13 que produce un mRNA de 3.5 kb y que se traduce en 449 aminoácidos para una proteína de unión a DNA mediante dedos de zinc en su extremo carboxilo terminal (Haber and Housman, 1992).

El mRNA posee tres sitios de inicio de la traducción de manera que genera tres isoformas de la proteína de diferente peso molecular (62-64 kDa, 52-54 kDa y 36-38 kDa) y múltiples isoformas del WT1 pueden ser generadas por dos eventos de splicing alternantes en el exón 5 y entre los dedos de zinc 3 y 4 y que han descrito alrededor de 32 formas postranscripcionales de la proteína WT1 (Scharnhorst et al, 1999).

WT1 presenta diversas isoformas dependientes del marco de lectura, así, la isoforma KTS+ tiene una alta afinidad por el RNA lo cual le confiere una función en los cambios postranscripcionales del RNA. Por el contrario, la isoforma KTS- tiene más afinidad por el DNA (Hartkamp and Roberts, 2008, Figura 6). Ratones homocigotos para KTS-, presentan fallas en el desarrollo renal y genital con muerte temprana en la etapa neonatal, lo que sugiere que son necesarias las dos copias del KTS's para el desarrollo normal de gónadas y riñones (Ho-Shik et al, 2007).

WT1 activa o inhibe la transcripción de más de 20 genes involucrados en proliferación, diferenciación y apoptosis mediante su unión a los promotores, está involucrado en el desarrollo genitourinario durante le embriogénesis y en adultos, la expresión es muy diversa y está presente en células de diferentes tejidos, como son el cerebro, tejido endocrino, medula ósea, bazo, en miocitos, macrófagos, células del epitelio pulmonar, páncreas, en el tracto glandular, en los sistemas reproductivos femeninos y masculinos, senos, tejido adiposo, fibroblastos, en piel y en el riñón (Menke et al, 1998).

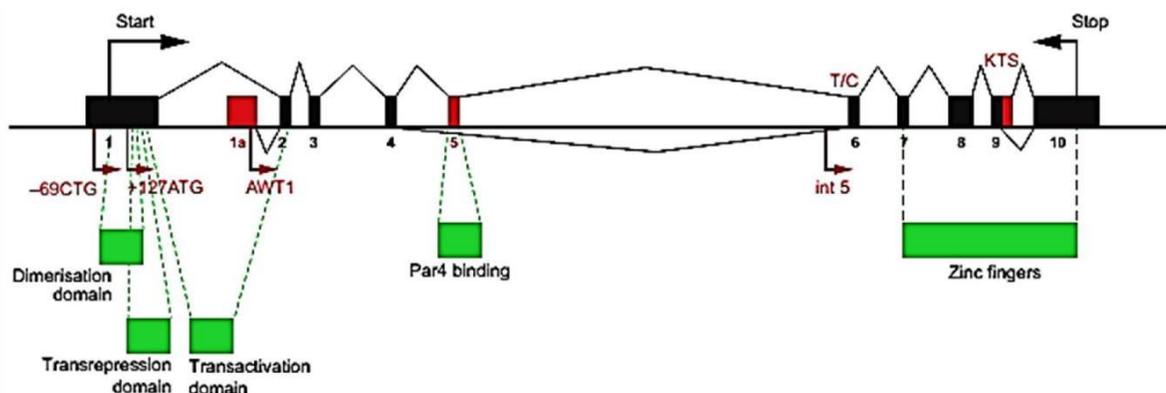


Figura 6.- Estructura del gen de *wt1*. Se representa lo que será su sitio de unión a DNA/RNA por la presencia y ausencia de la región KTS. Imagen tomada de Peter Hohenstein, 2006.

2.6 WT1 y Riñón.

El WT1 interactúa con el DNA induciendo la expresión de diferentes genes involucrados en la nefrogénesis como lo son: el factor de crecimiento epidérmico (FCE), la quimiokina, CX3CL1, el factor de transcripción SLUG, JUNB e involucrados en la apoptosis como C-mic, Bcl-2 y p53. Se ha visto que la expresión es importante durante la formación del metanefros y luego en el desarrollo de las nefronas (Donovan et al, 1999; Stark et al, 1998 y Hartkam & Roberts, 2008).

Se ha estudiado la relación de la expresión de WT1 nuclear y la presencia de Nefrina, jugando esta un papel importante en el proceso de estructura y función del podocito. La Nefrina es codificada por el gen *NPHS1* el cual se compone de 4.3 kb y se localiza en el locus 19q13.1, la proteína de 180 kDa está compuesta de 1241 a.a., con un dominio extracelular y otro intracelular, interactúa principalmente con P-Cadherina y Podocina en el centro proteico del DF.

2.7 WT1 y Curcumina.

Los nefroprotectores naturales tienen como principal efecto incrementar la diuresis (flujo urinario) con lo que existe mayor pérdida de líquido y solutos como la sal, lo que permite regular la presión arterial. En la naturaleza existen productos que favorecen este efecto y que son de consumo habitual. Entre los nefroprotectores el más simple es el agua ya que una ingesta de 6-8 vasos es lo mejor contra la retención de líquidos, el uso de plantas con efectos diuréticos tienen gran relevancia en la medicina tradicional como el té verde (*Camellia sinensis*), espárragos (*Asparagus officinalis*), cola de caballo (*Equisetum arvense* L) y de los productos más eficientes y con un gran número de investigaciones en el sistema urinario están el resveratrol de la uva morada, la vitamina D (D-calcitriol) y la Curcumina de la cúrcuma.

El resveratrol es un polifenol con fuertes efectos antiinflamatorios y suprime la fibrosis intersticial renal, las investigaciones de Liu G et al del 2017 observaron que ratones tratados con adriamicina, las expresiones de C3aR, C5aR, esfingosina quinasa 1 (Sphk1) y el receptor activador de plasminogeno de tipo uroquinasa soluble (suPAR) se regularon positivamente, mientras que el tratamiento con resveratrol pudo inhibir la expresión de estas, conduciendo eventualmente a condiciones antiinflamatorias y anti-fibrosis.

La Curcumina es un polifenol hidrófobo, principal activo constituyente del turmeric (tallo) o del polvo del curry a partir del rizoma de la planta *cúrcuma longa*, donde estudios han demostrado que la Curcumina comercial contiene aproximadamente 77% Curcumina, 17% demethoxicurcumin y 3% bisdemetoxicurcumin, actualmente se ha encontrado un isómero nombrado como cicloCurcumina con mejor biodisponibilidad. Fue purificada en 1815 por vogel y Pallieteri y su estructura y síntesis química por lampe et al en 1913 y 1915 respectivamente.

Durante más de 60 años y 3000 estudios han demostrado que la Curcumina tiene efectos antioxidantes, antibacteriales, antifungicos, antiviral, antiinflamatorios, antiproliferativos, proapoptoticos, anti-ateroescleroticos, ayuda en enfermedades neurodegenerativas, artritis, alergias, esclerosis múltiple, SIDA, Psoriasis, diabetes, enfermedad cardiovascular, fibrosis de pulmón y en nefrotoxicidad (Maheswarin R et al, 2006). Aún falta determinar los mecanismos moleculares que propician estos efectos biológicos favorables inducidos por la Curcumina, ya que la evidencia existente indica que tiene un efecto pleiotropico, ya que interacciona y regula múltiples blancos o receptores moleculares (Zhou H et al, 2011).

Se ha observado la interacción de Curcumina con factores de transcripción, factores de crecimiento, protein-cinasas, citocinas inflamatorias, enzimas, moléculas de adhesión y proteínas relacionadas con apoptosis.

En factores de transcripción, se ha observado que en algunas líneas de cáncer con expresión de WT1, la Curcumina disminuye su expresión e induce apoptosis vía modulación de WT1 activando genes proapoptóticos de la familia de Bcl-2 y P53, por lo que podemos observar su importancia en procesos neoplásicos y su uso terapéutico. (Liu J, et al 2021; Gao S, et al 2012).

En cuanto apoptosis, la Curcumina modula una gran cantidad de proteínas para inducir apoptosis en líneas celulares de cáncer, demostrando su efecto anticancerígeno modulando proteínas como Bax, Bcl-2, Bclx-L, Caspasas (3, 7, 8 y 9), incrementa la expresión del receptor de Fas, FADD, IAP, Noxa, Puma y survivin. P53 es un gen crítico para el control del ciclo celular, supresor tumoral e inductor de apoptosis (Li P, et al 2022).

Por lo anterior podemos notar un efecto interesante entre moléculas como lo son WT1 y la Curcumina donde estos estudios se han enfocado en apoptosis dirigidos en cáncer, por lo que falta analizar más la interacción de WT1 y Curcumina en procesos de daño renal y donde la expresión de WT1 es importante para el mantenimiento y funcionalidad de este órgano.

La Curcumina en riñón, ha sido abordada por la vía de la inflamación, donde los efectos antiinflamatorios toman importancia y en modelos con estrés oxidativo, observando una inhibición de radicales libres de oxígeno en macrófagos peritoneales, inhibición de ácido araquidónico, evitando la liberación de colagenasa, elastasa y otras enzimas catalíticas de las membranas celulares de macrófagos y modulación de genes como pPar- γ , NF-kB y citocinas inflamatorias (Jie Z, et al 2021).

Los estudios en cáncer con modulación de WT1 por la Curcumina, nos muestra un bloque de la expresión de WT1 por miRNAs inducidos (15-a y 16-1; Gao et al, 2012), por unión directa a un sitio consenso y evitando la auto-replicación de WT1 y por último vía PCK α (Semsri, et al 2011).

Estudios que contrastan con los beneficios del uso de la Curcumina en cáncer es el trabajo de los podocitos que expresan WT1 de manera constitutiva y es necesario saber cómo interacciona con ellos la Curcumina durante las afecciones renales.

2.8 Modelos de afección renal.

Las enfermedades renales se han estudiado en diversos modelos de enfermedad renal en murinos (véase Tabla 1), en donde los más estudiados son variantes de glomerulonefritis, en el daño tubular por obstrucción urinaria y por isquemia. Modelos de afección renal metabólicas (diabetes), por infección bacteriana (estreptococcica, LPS) y por el uso de fármacos anticancerígenos (cisplatino y Doxorubicina; Ortiz 1997 y sook min 2016), así los modelos experimentales se enfocan más a un tipo específico de enfermedad o daño renal.

Riñón poliústico en ratones myc y pcy	Enfermedad poliústica hereditaria
Uropatía obstructiva	Nefritis Lúpica
Necrosis tubular aguda isquémica	Nefropatía por HIV
Daño tubular por tóxicos y drogas	Nefropatía por IgA
Nefrectomía subtotal	Glomerulonefritis post-estreptococcica
Nefritis antimembrana basal	MRI/LPR-Fas/lpr
Nefritis mesangio proliferativa (anti-Thy-1)	Nefrosis por aminonucleosidos de puromicina

Tabla 1. Modelos murinos experimentales de afección renal.

Se ha observado inducción de daño renal agudo y crónico por inducción de Doxorubicina, fármaco derivado de las antraciclinas, un antibiótico utilizado en diversas neoplasias y que se ha asociado con daño a túbulo proximal y con activación del mecanismo fundamental del estrés oxidativo, inflamación y daño vascular, además en células glomerulares tiene efectos tóxicos directos al DNA, autofagia, alteración del citoesqueleto, disfunción mitocondrial y apoptosis (Ryter SW, et al 2007; Sun j, et al 2016).

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La enfermedad renal crónica disminuye la calidad de vida de quien lo padece, es una patología que conlleva a una alta incidencia de discapacidad y mortalidad en México. La pérdida de podocitos en el daño renal se ha detectado en sedimento urinario por la presencia de WT1.

Existen moléculas nefrotóxicas y nefroprotectoras, la Curcumina se clasifica dentro de los productos naturales nefroprotectores en los modelos de afección renal, sin embargo, no se comprende el mecanismo de modulación de la Curcumina en la expresión de WT1 en las afecciones renales. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar si la Curcumina tiene un efecto modulador de la apoptosis vía WT1 en un proceso de afección renal inducida por Doxorubicina

La realización de este trabajo contribuirá a definir el papel de WT1 en las afecciones renales inducidas por fármacos y la modulación del gen de wt1 por la Curcumina, lo que incrementará el conocimiento a nivel molecular, celular e histológico para comprender la fisiopatología de las afecciones renales y mejorar la calidad de vida del paciente.

4. HIPÓTESIS

"El tratamiento con Curcumina protege a las células del riñón de entrar a apoptosis por modulación en la expresión de WTI, en el mantenimiento de la estructura glomerular y viabilidad de los podocitos en un proceso de afección renal inducida por Doxorubicina"

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la Curcumina tiene un efecto modulador de la apoptosis vía WT1 en un proceso de afección renal inducida por Doxorrubicina.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Implementar un modelo murino de afección renal inducido por fármaco.
2. Analizar el efecto nefroprotector de la Curcumina en un modelo con afección renal inducida por Doxorrubicina.
3. Determinar la expresión de WT1 en el tejido renal de un modelo murino de afección renal con Doxorrubicina, control sano y tratados con Curcumina.
4. Determinar la modulación en la expresión de proteínas apoptóticas en un modelo murino de afección renal con Doxorrubicina con y sin tratamiento de Curcumina.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Se obtuvieron ratones BALB/c machos de seis a ocho semanas de edad que pesaban 25-30 g del bioterio LIV, UANL. El estudio fue aprobado por el Comité Ético Animal de la Universidad y se llevó a cabo de conformidad con las leyes y políticas internacionales. (NOM-062-ZOO-1999, 2002)

7.2 Diseño experimental

Utilizamos un ratón para realizar nefrotecnización y posteriormente realizar cultivo de tejidos (explantes) con diferentes concentraciones de Curcumina.

Además, en este estudio, 12 ratones se dividieron aleatoriamente en 4 grupos iguales (n= 3) y se trataron de la siguiente manera: grupo control (una dosis de PBS tiempo 0). El segundo grupo fue tratado con Curcumina (100 mg / kg una dosis a tiempo 0) se analizaron a 24 y 48 horas. El tercero, fue tratado con Doxorubicina (11 mg / kg una sola dosis a tiempo 0) y se analizaron a 24 y 48 horas. El 4° grupo se trató con Doxorubicina y Curcumina una dosis a tiempo 0 para su análisis a 24 y 48 horas. Así también se analizaron 4 grupos de 3 ratones cada uno de la siguiente manera: grupo control (PBS). El segundo grupo fue tratado con Curcumina a tiempo 0 solo una dosis. El tercer grupo, fue tratado con una segunda dosis de Doxorubicina a los 7 días y el cuarto grupo fue tratado con una dosis inicial a tiempo 0 de Curcumina y dos dosis de Doxorubicina (tiempo 0 y 7 días) para su análisis a los 7 y 15 días.

Se realizó la toma de orina para realizar la determinación de microalbuminuria y creatinina con el uso de las Tiras reactivas (urinalysis 2CE, ACON Laboratories, inc, San Diego, Ca), además de sangre cardíaca para realizar la química sanguínea en un laboratorio de referencia veterinaria (www.laboratoriovetlab.com) y la nefrotecnización (se extrajeron los riñones) uno se incluyó en formalina y otro se

congeló a -80 °C para su conservación y posterior utilización.

7.3 Cultivo de tejido (Explantes)

Se realizó la nefrotecnización a un ratón para obtener rebanadas de riñón que fueron subsecuentemente preparadas en buffer Krebs-Henseleit frío, suplementado con 25 mM D- glucosa, 25 mM NHCO₃, 10 mM ácido 4-(2-hidroxietil) piperizina-1-ethanosulfónico (gibco) saturado con carbogen (95% O₂, 5% CO₂), usando un Krumdieck tissue slicer como se describió por De Graaf et al, 2010. Las rebanadas de tejido fueron incubadas individualmente en medio William E, en una atmósfera de 95% O₂ y 5% de CO₂ con una agitación suave por 12 y 24 horas con diferentes concentraciones de Curcumina (0, 1, 5, 10, 20 y 30 µM).

7.4 Histopatología y análisis morfométrico.

Los riñones se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%, se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Se prepararon secciones de cuatro micrómetros a partir de bloques de parafina de riñón y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H-E) y tinción de ácido Periódico de Schiff (PAS).

Los tejidos renales se examinaron en áreas microscópicas aleatorias semicuantitativas bajo 40 campos de alta potencia y el número de cambios se evaluaron mediante el recuento de 3 campos no solapados para el mismo portaobjetos de cada animal.

7.5 Inmunohistoquímica (IHQ) en tejido renal para determinar la expresión de WT1, PCNA, Cas-3, Bax y Bcl-2.

Para la detección de proteínas del podocito como WT1 y podocina, las proteínas apoptóticas Bax y Cas-3, la proteína antiapoptótica Bcl-2 y de proliferación celular se emplearon los siguientes anticuerpos que se muestran en la Tabla 2.

Anticuerpos primarios	Anticuerpos secundarios
Anti-WT1 (F-6, sc-7385)	Anti-IgG mouse Texas red
Anti-Podocalixin-like 1 (3D3, sc-23904)	Anti-IgG rabbit FITC
Anti-Bax (N-20, sc-493)	Anti-IgG mouse HRP
Anti-Bcl-2 (C-21, sc-783)	
Anti-Cas3 (T46L, sc-56055)	
Anti-PCNA (EPR3821, abcam)	

Tabla 2.- Anticuerpos empleados en IFA e IHQ. sc: Santa Cruz Biotechnology, La joya CA.

Se obtuvieron los cortes de 3-5 μm sobre cubreobjetos, se desparafinó 10 minutos a 60 $^{\circ}\text{C}$, se pasó a xileno por 10 min y se rehidrato en alcoholes al 100%, 96%, 70% y 50% por 5 min en cada uno y agua destilada, se incubó con buffer citrato (pH=6) por 30 s, se incubó con solución de tritón por 8 min para después incubarse por 30 min con Tris-HCl 0.1M pH-7.5, BSA 3% y 20% suero normal bovino, seguidas de un lavado en PBS por 5 min se colocaron los anticuerpos monoclonales anti-WT1, anti-PCNA, anti-Cas3, anti-Bax y anti-Bcl-2 (dilución 1:100) y se incubaron toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$ en cámara húmeda, después de 3 lavados de 5 min con PBS se incubó con el segundo anticuerpo conjugado HRP anti-IgG de ratón por 30 min, las muestras se revelaron con 3,3'-diaminobencidina (DAB) y se contrastarán con hematoxilina por 5 min y se montaron en resina sintética para ser analizadas a 20X y 40X en un microscopio de luz (Olympus B-Max BX-40).

7.6 Inmunofluorescencia en Sedimento Urinario (SU) de ratón para determinar la expresión de WT1 y Podocalixina

La expresión de WT1 y Podocalixina se determinó por doble-IFA en frotis de SU de ratones tratados con Doxorrubicina, Curcumina y Doxo-Curcumina.

Un mililitro de orina de 24 horas se centrifugó a 1.500 rpm; el botón se resuspendió en 500 μL de PBS y se colocó 100 μL del SU sobre un cubreobjetos dentro de una caja petri y se colocó en incubadora a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h y se fijó con formaldehído al 10% por 5 min. Las muestras de SU fijadas se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 (Tritón

al 0.1% con citrato de sodio al 0.1% en PBS) a 4°C por 2 min, y se bloqueó sitios inespecíficos por 20 min con Tris-HCl 0.1M pH-7.5, BSA 3% y 20% de suero normal bovino, seguido de 2 lavados con PBS 1X se incubó con los anticuerpos monoclonales (mAb) Podocalixina diluido 1:100 en PBS por 2 hrs a T.A y en cámara húmeda, luego de los lavados con PBS, se incubó por 2 hrs con los Abs secundarios Anti-IgG de conejo conjugado con Isotiocianato de fluoresceína también llamado FITC y seguido del lavado se incubó con el mAbs anti-WT1 luego del lavado se incubó con el secundario Anti-IgG de ratón conjugado con Rojo Texas (Rx) diluido 1:100 en PBS por 1 h.

Después de lavar se contrasto 30 min con DAPI (4', 6-Diamidine-2'phenylindole dihydrochloride, ROCHE), posterior al lavado con metanol y metanol-PBS se montaron en PBS/Glicerol (3/7).

7.7 Análisis de Imágenes

Las muestras del IFA y campo claro (H-E, PAS y IHQ) fueron fotografiadas en un microscopio (Olympus BX-40) y analizadas en el programa ImageJ-Pro Plus Versión 7.0. El análisis de imagen se realizó con el programa de ImageJ, para obtener las intensidades/píxeles de las IHQ.

7.8 Análisis de la modulación en la expresión de WT1 inducido por Curcumina utilizando RT-PCR punto final en explantes y qRT-PCR en tejido renal.

Se extrajo RNA de explantes y tejido renal por medio de Trizol y usando la metodología del fabricante. La concentración de RNA se cuantificó usando el equipo nanodrop (2000, Thermo Scientific). Para la obtención de cDNA se utilizó el tetro cDNA synthesis kit (Bioline, a Meridian Life science Company) usando la metodología del fabricante.

Para determinar la transcripción del gen wt1 en los explantes se tomó 4 µL de cDNA y se corrió en un gel de agarosa al 2%, para después realizar densitometría de las bandas obtenidas.

Para el qRT-PCR se tomaron 4 μ L de cDNA para cada reacción de WT1, 10 μ L de Máster Mix, 1 μ L de GA3PDH (Control endógeno), 0.7 μ L de sonda de WT1 y se llevó a un volumen de 20 μ L con agua tratada con DEPC. Todas las reacciones se realizaron por triplicado y el análisis de resultados se realizó en el del software del termociclador PCR en Tiempo Real (Applied Biosystems 7500 Software v2.0.1).

Los primers de *wt1*, y *gapdh* como control endógeno, son los siguientes:

<i>wt1</i>	Forward	5' CACATGAGAGAAACGCCCTTCATGTG3'
	reverse	5' TTTGAGCTGGTCTGAACGAGAAA3'
<i>gapdh</i>	Forward	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	reverse	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Tiempo de corrida

<i>Gen</i>	<i>desnaturalización</i>	<i>alineamiento</i>	<i>extensión</i>	<i># de ciclos</i>	<i>Pb</i>
<i>wt1</i>	96 °C-40 s	64 °C-30 s	72 °C-40 s	35	166
<i>gapdh</i>	94 °C-40 s	64 °C-30 s	72 °C-40 s	35	452

Tabla 3.- Primers y condiciones para el PCR.

7.9 Análisis estadísticos:

Los datos son presentados como medianas y los cuartiles 25 y 75, las diferencias entre dos grupos se analizaron por Mann-Whitney y de 3 o más grupos se analizaron por Kruskal-Wallis post-Dunn en el programa estadístico Graph pad Prism versión 8 con un intervalo de confianza del 95%.

8.- RESULTADOS

8.1 Efecto nefroprotector de la Curcumina en un modelo murino de afección renal.

Para evaluar el efecto nefroprotector de la Curcumina frente a la citotoxicidad por la Doxorrubicina, utilizamos un modelo de daño renal en ratones Balb/c. Se analizaron tanto los efectos agudos (24 y 48 horas) como los crónicos (7 y 15 días).

8.1.1 Mejor proporción Albúmina: Creatinina en la orina de ratones tratados con Curcumina que en un modelo murino de afección renal.

Se recolectó la orina de los diferentes grupos de ratones, tanto tratados como no tratados con Doxorrubicina. Los resultados indican que el grupo de ratones tratados con Doxorrubicina presenta niveles altos de albúmina a 24 y 48 horas con una mediana de 150 y 103 mg/dL en comparación con los ratones tratados con Doxorrubicina y Curcumina, 110 y 86.67 mg/dL. La relación de Albúmina: Creatinina es la prueba más exacta y fácil disponible para evaluar la microalbuminuria y donde valores mayores a 30 mg/g es anormal. Los resultados que obtuvimos en el grupo tratado con Doxorrubicina a las 24 y 48 horas fue de 300 y 820 mg/g diferente a los tratados con Doxorrubicina y Curcumina donde observamos una relación de 160 y 83.33 mg/g, mostrando diferencias significativas principalmente entre el grupo tratado con Doxorrubicina y los grupos control, Curcumina y Doxo-Curcu (0.0018, 0.0064 y 0.0103, respectivamente) como se muestra en la Figura 7.

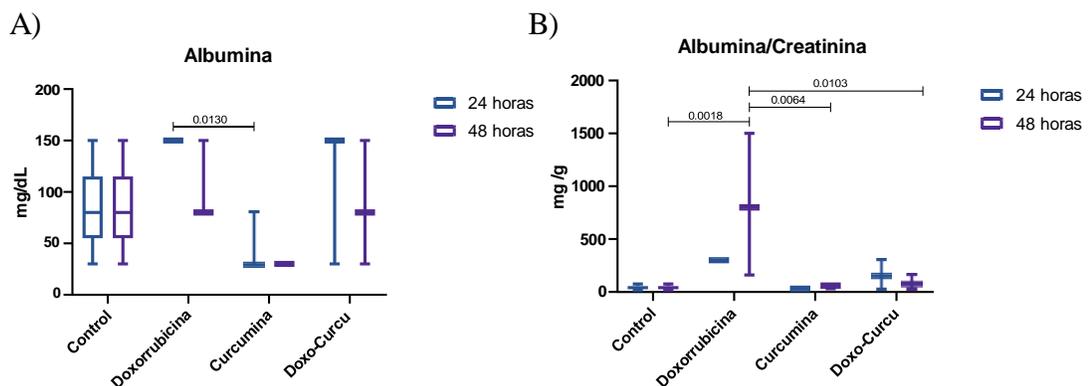


Figura 7. Análisis de microalbuminuria en la orina de ratones con los tratamientos de Curcumina, Doxorrubicina y Doxo-Curcumina. A) Determinación de Albúmina y B) La relación de Albúmina: Creatinina en la orina de ratones.

8.1.2 Valores cercanos a rangos normales en el grupo de Doxorrubicina y Curcumina en la química sanguínea.

El grupo de ratones control presento algunos indicadores leves de patología. Con el tratamiento de Curcumina observamos un leve incremento en los perfiles bioquímicos. El Grupo de ratones tratado con Doxorrubicina muestra varios indicadores de posibles patologías o desregulaciones metabólicas, como niveles elevados de enzimas hepáticas (AST, ALT), perfil lipídico desfavorable (mayores niveles de LDL y VLDL), y anomalías en los valores de calcio y fósforo, que sugieren una posible disfunción renal o paratiroidea. El Grupo de ratones tratado con Doxorrubicina y Curcumina presento un perfil bioquímico más estable y saludable comparado con el grupo de ratones tratado con Doxorrubicina con valores más cercanos a los rangos normales en glucosa, lípidos, y enzimas hepáticas. (ANEXO).

8.2 Alteraciones en la morfología renal por los tratamientos con Curcumina, Doxorrubicina y Doxo-Curcumina.

8.2.1 Daño renal inducido por la administración de Doxorrubicina en ratones Balb/C.

Los cortes histológicos de los riñones de los ratones tratados con Doxorrubicina se analizaron con las tinciones de H-E y PAS para determinar las modificaciones en la morfología de la estructura de la nefrona y corroborar daño renal en diferentes tiempos comparado con un control sano (sin tratamientos).

La tinción de H-E en los cortes histológicos renales indican cambios morfológicos por microscopía visible desde las 48 horas, y se mantienen a los 7-15 días después del tratamiento, los cambios estructurales se observaron en los glomérulos, túbulos, MBG, además de fusión de la cápsula de Bowman, y la presencia de infiltrado linfocitario y eritrocitos, sobre todo pérdida de la celularidad como se muestra en la Figura 8A.

Con la tinción de PAS se observa un incremento de colágeno en las muestras de los días 7 y 15 (Figura 8B), con lo que se confirma un daño progresivo y sostenido inducido por la Doxorrubicina en el tejido renal.

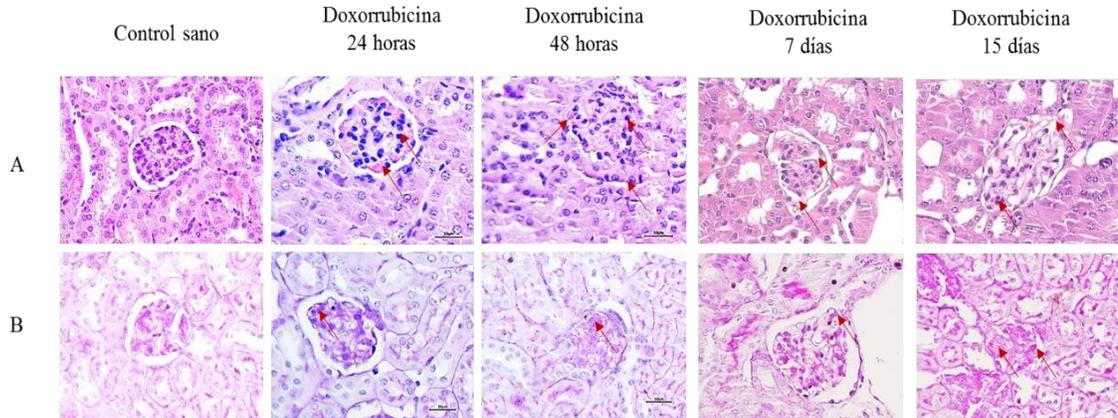


Figura 8. Inducción de Daño renal en un modelo murino tratado con Doxorubicina. A) H-E. Cambios morfológicos a las 48 horas y visible a los 7 y 15 días, en contraste con los controles a nivel de microscopía luz visible. B) Tinción de PAS. Mayor expresión de fibronectina y colágeno principalmente en las muestras de 7 y 15 días.

8.2.2 La Curcumina no altera la morfología de la nefrona observables a microscopía de campo claro.

En los riñones de los ratones tratados sólo con Curcumina, no se observan cambios significativos en las estructuras del tejido renal por microscopía de luz visible, en los cortes histológicos teñidos con H-E se observan los glomérulos y túbulos bien definidos (Figura 9A). La Curcumina no origina cambios morfológicos que demuestren un daño en la funcionalidad de las nefronas, aun así, se observa mayor expresión de colágeno a 24 y 48 horas en glomérulo principalmente en la MBG y en túbulos distales y proximales (Figura 9B).

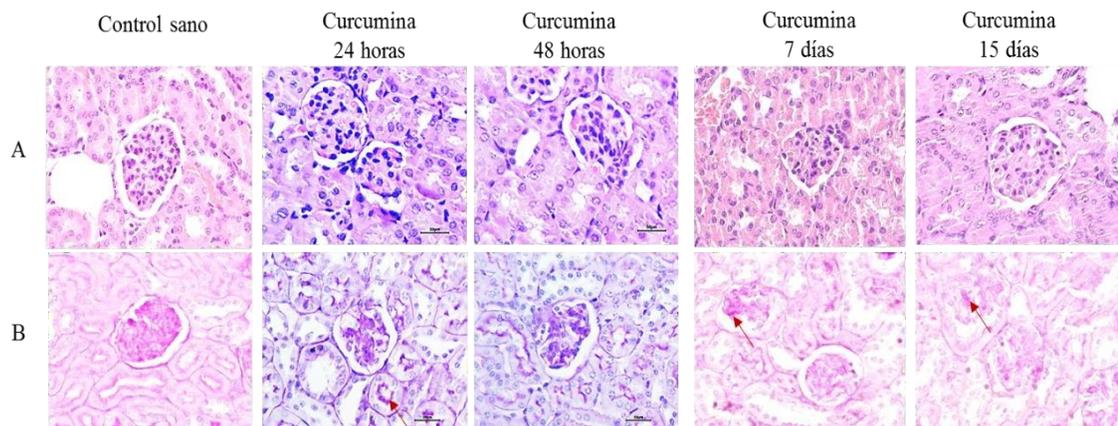


Figura 9. Efecto de la Curcumina en la nefrona en un modelo murino. A) H-E. No se observan cambios diferenciales entre los tratados con Curcumina comparados con los controles, se sugiere que la Curcumina no genera toxicidad tisular en el riñón. B) PAS. Leve expresión de colágeno a las 24 y 48 horas en contraste con el control y los tratados de 7 y 15 días.

8.2.3 La Curcumina muestra efecto nefroprotector en el daño inducido por Doxorrubicina.

Se analizó el efecto de la Curcumina como nefroprotector en daño renal inducido por Doxorrubicina.

En las biopsias teñidas con H-E y analizadas a las 48 horas después del tratamiento se observaron alteraciones leves en la morfología renal y fusión de la cápsula de Bowman, con recuperación a los 7 días. Y a los 15 días se observó la presencia de eritrocitos sin hemorragia (Figura 10A). Mientras que por la tinción de PAS se observó una leve expresión de colágeno 24 y 48 horas e incrementa a los 7 y 15 días de forma homogénea tanto en glomérulos como en túbulos (Figura 10B). La Curcumina muestra un efecto nefroprotector en el mantenimiento estructural y funcional de las nefronas.

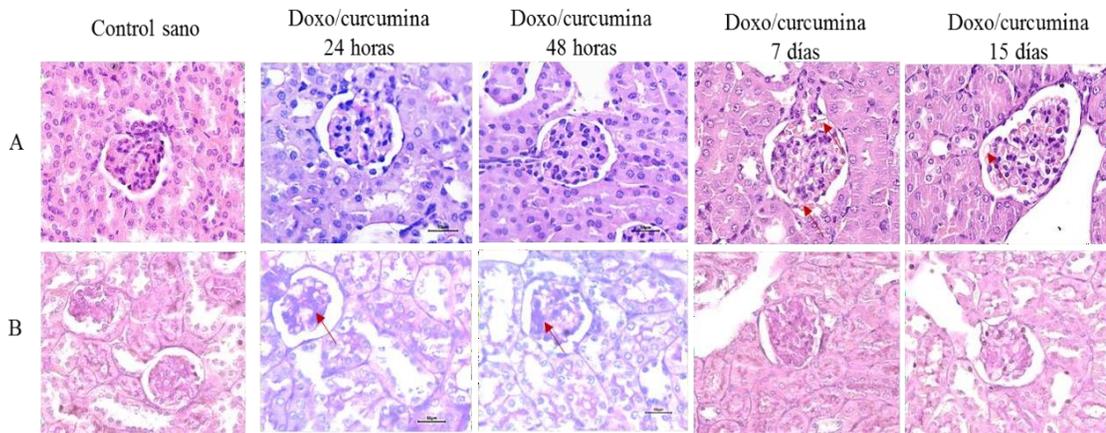


Figura 10. La Curcumina un nefroprotector en el daño inducido por Doxorrubicina. A) H- E. Se observan leves cambios morfológicos a las 24 horas y cambios más marcados a las 48 horas, pero se mantiene las estructuras funcionales del riñón. **B) PAS.** Alta expresión de colágeno y fibrinógeno a los 7 y 15 días muy homogéneo.

8.3 La Curcumina modula la expresión de *wt1* en un modelo de afección renal inducido con Doxorrubicina por RT-PCR punto final y tiempo real.

8.3.1 La Curcumina modula la expresión del gen *wt1* por RT-PCR punto final en explantes.

Se determinó la expresión del gen *wt1* en diferentes concentraciones de Curcumina y a diferente tiempo por medio de la técnica de RT-PCR punto final en explantes de tejido renal y qRT-PCR e IHQ en muestras de riñón de un modelo murino tratado con Doxorubicina y Curcumina solos y combinados.

El RT-PCR punto final en explantes de tejido renales muestra una leve disminución del gen *wt1* a una concentración de 10 mM de Curcumina a las 12 horas en comparación con el control y a las 24 horas la expresión en la concentración de 10 mM se incrementó de manera significativa ($p=0.0001$; Figura 11).

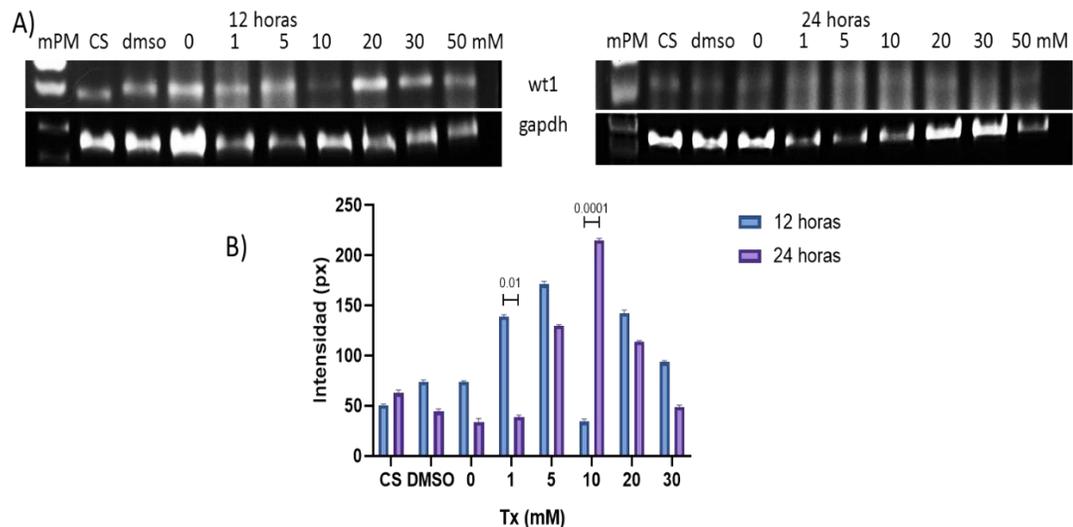


Figura 11. Expresión de *wt1* a diferentes concentraciones de Curcumina en tejido renal (explantes).

A) RT-PCR. CS=Tiempo 0 y sin tratamiento. **B) Densitometría.** El tratamiento de Curcumina a 12 horas modula negativamente a *wt1* a una concentración de 10 mM, en contraste a las 24 horas que se incrementa. Por lo que se observa que hay una modulación de Curcumina sobre *wt1* en los explantes.

8.3.2 Análisis de transcripción del gen *wt1* por qRT-PCR en los ratones tratados con Curcumina, Doxorubicina y Doxo-Curcumina.

El RT-PCR tiempo real en el modelo murino de afección renal con y sin tratamiento de Curcumina, nos muestra una expresión relativa (radios) del mRNA muy variable entre los diferentes grupos, donde se observa un radio de 20 en Curcumina 24 horas y una caída a las 48 horas y a los 7 días tiene un valor de 3.

En Doxorrubicina 24 horas el radio tiene un valor de 13 y tiene una leve baja a las 48 horas (radio de 7).

Para los tejidos con afección renal inducido y tratados con Curcumina los valores obtenidos fueron, DC24 obtuvo un valor de 13, en DC48 fue de 16 y DC7 mostro un valor de 35. También se anexo un grupo de Doxorrubicina a 15 días que mostro un radio de 6 y otro grupo tratados 24 horas con Curcumina antes de inducir afección renal mostrando un valor de 19 (Figura 12).

Expresión de mRNA de WT1 en tejido renal con tratamientos

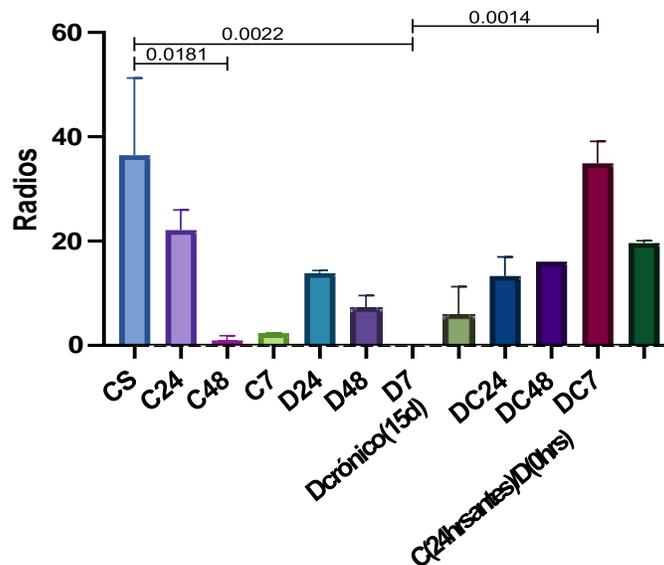


Figura 12.- Expresión del mRNA de wt1 en tejido renal tratado con Doxorrubicina con y sin Curcumina. Se observa una expresión mayor en los tejidos tratados con Doxorrubicina y Curcumina a los 7 días, en comparación a los demás tratamientos ($p < 0.05$).

8.3.3 Incremento de la expresión de WT1 en las muestras de tejido renal de ratones tratados con Curcumina.

El análisis de la IHQ de las muestras de los ratones con daño renal agudo por la Doxorrubicina presento una baja expresión de WT1 en un rango de un 54% a las 48 horas en contraste con los tejidos control. La expresión de WT1 se midió por la intensidad obtenida en los diferentes tratamientos y a diferentes tiempos.

A las 24 horas, la mediana de la expresión de WT1 en el grupo Control (SS) fue de 0.368 (percentiles 25%; 0.342 y 75%; 0.390). En el grupo tratado con Doxorrubicina (D), la mediana fue de 0.191 (percentiles 25%; 0.174 y 75%; 0.237). En el grupo tratado con Curcumina (C), los valores de WT1 fueron de 0.354 (percentiles 25%; 0.251 y 75%; 0.443), y en el grupo tratado con la combinación de Doxorrubicina y Curcumina (DC), la mediana fue de 0.399 (percentiles 25%; 0.388 y 75%; 0.422). Se observó una disminución significativa en la expresión de WT1 en el grupo D en comparación con los grupos SS, C y DC ($p=0.0408$, 0.0260 y 0.0002 , respectivamente. (Figura 13B. a).

Mientras que, a las 48 horas después del tratamiento, los resultados fueron los siguientes: el grupo SS mostró una mediana de 0.345 (percentiles 25%; 0.306 y 75%; 0.360), el grupo D presentó una mediana de 0.145 (percentiles 25%; 0.132 y 75%; 0.156), el grupo C tuvo una mediana de 0.281 (percentiles 25%; 0.251 y 75%; 0.298), y el grupo DC mostró una mediana de 0.316 (percentiles 25%; 0.264 y 75%; 0.389). Se mantuvo una disminución significativa en la expresión de WT1 en el grupo D en comparación con los grupos SS y DC ($p=0.0004$ y 0.0013 , respectivamente (Figura 13B. b).

Mientras que en el daño renal crónico Se encontró 28.52% y 41.18% de disminución de la expresión de WT1 a los 7 y 15 días respectivamente.

En el grupo de 7 días los resultados fueron, los SS mostraron una mediana de 0.322 (25%; 0.281, 75%; 0.407), en D, fue de 0.231 (25%; 0.183, 75%; 0.387), en C fue de 0.288 (25%; 0.257, 75%; 0.320) y en DC se obtuvieron los siguientes resultados, 0.415 (25%; 0.367, 75%; 0.423). Se mantiene una menor expresión de WT1 en el grupo de D con un incremento parcial donde no se observan diferencias significativas con el grupo de SS, en contraste, D y DC que muestran diferencias entre ellos ($p=0.0109$, Figura 13B. c).

Mientras que el grupo de los 15 días los resultados fueron, los SS mostraron una mediana de 0.355 (25%; 0.268, 75%; 0.386), en D, fue de 0.209 (25%; 0.169, 75%; 0.261), en C fue de 0.270 (25%; 0.260, 75%; 0.281) y en DC se obtuvo 0.415 (25%; 0.308, 75%; 0.318). El grupo de D mantiene una expresión baja de WT1 en contraste con el grupo SS y DC ($P=0.0063$ y 0.0006 , respectivamente, Figura 13B. d).

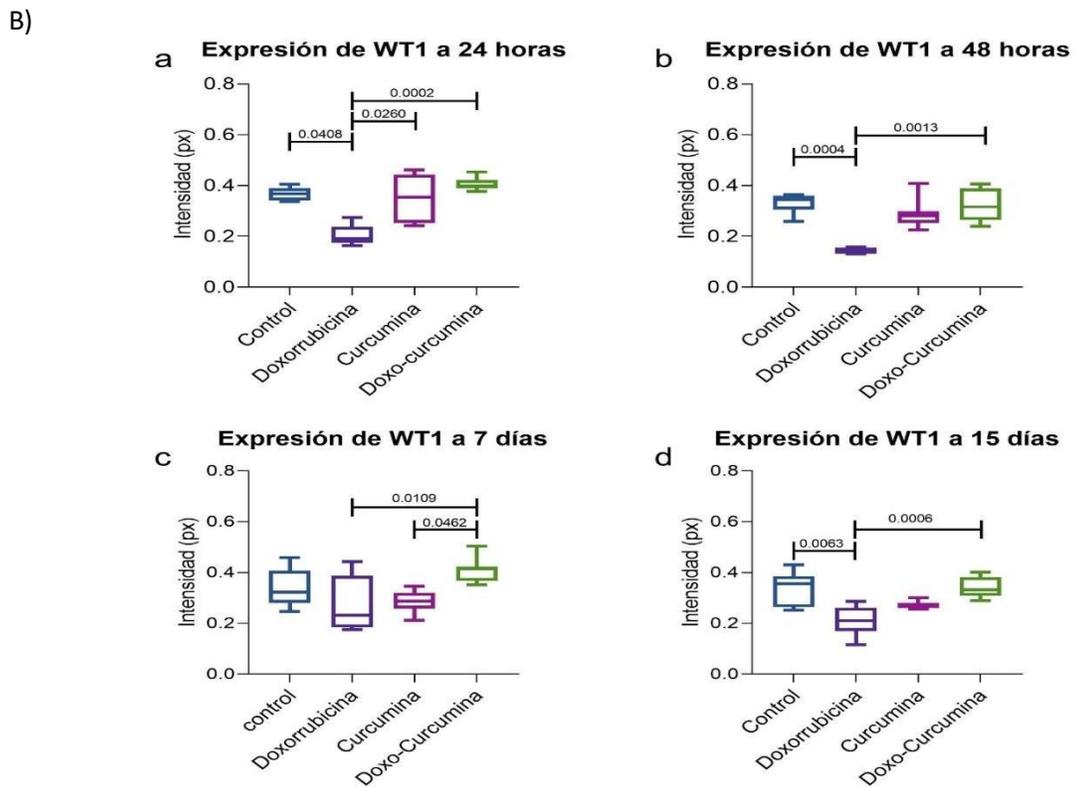
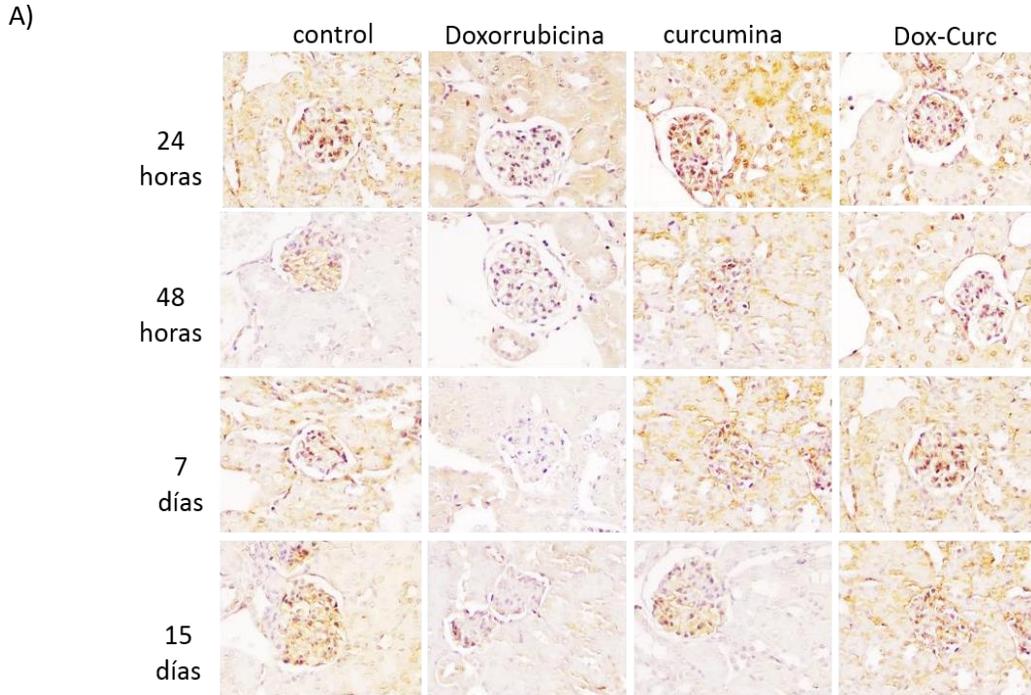


Figura 13. Expresión de WT1 en tejido renal de un modelo murino con afección renal inducido por Doxorubicina. A) Expresión de WT1 a las 24 y 48 horas, y a los 7 y 15 días. B). Análisis de intensidad en los grupos de estudio. La expresión de Wt1 en Doxorubicina es inferior en contraste a los controles y levemente baja en contraste con Curcumina y Doxo-Curc ($p < 0.05$).

8.3.4 Pérdida de podocitos en tejido renal inducido por Doxorrubicina.

En los tejidos renales tratados con Doxorrubicina muestra una pérdida del número de podocitos en forma progresiva con el tiempo. En los tratamientos con Curcumina y Dox-Curc se observa un mantenimiento en el número de podocitos con respecto a los controles como se muestra en la Figura 14.

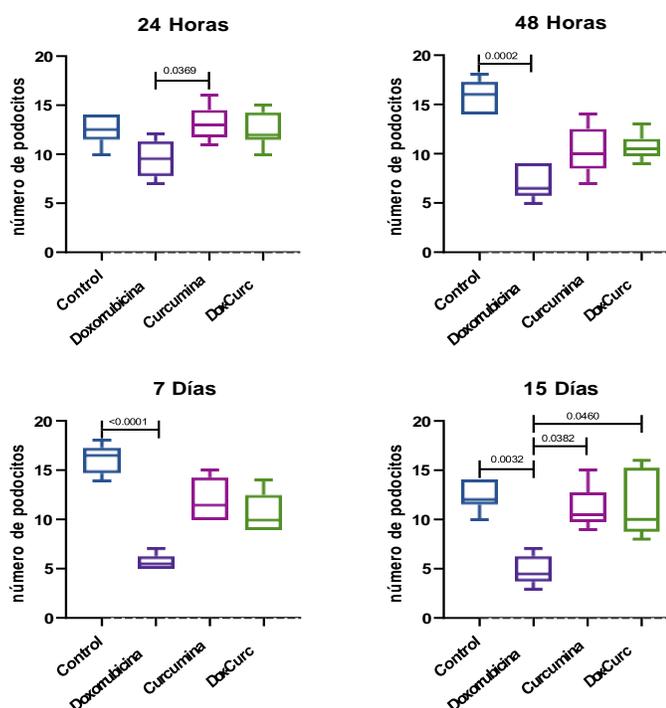


Figura 14. Promedio del número de podocitos en tejido renal. Se observa una disminución de podocitos en glomérulo dependiente del tiempo en los tratados con Doxorrubicina en contraste con los tratados con Curcumina, Doxo-Curc y control. El efecto tóxico de la Doxorrubicina es progresivo al favorecer el desprendimiento celular y la pérdida de los podocitos, y la Curcumina bloquea su pérdida, así como cambios estructurales del glomérulo.

8.3.5 Detección de podocitos en SU en el modelo murino de afección renal WT1.

El número de podocitos se determinó de la colecta de orina de 24 horas en grupo de 5 ratones por tratamiento, la identificación de los podocitos se llevó a cabo con un doble marcaje específico para este tipo de células viscerales, WT1 y Podocalixina, (Figura 15). En el SU del grupo de ratones control se observó la presencia de un podocito con expresión leve de WT1, bacterias y artefactos (cristales).

El SU de los ratones tratados con Doxorubicina se contabilizaron 17 podocitos, un número muy alto (relación de 1:17 con el control) en comparación con los demás tratamientos, así como una mayor expresión de WT1 y Podocalixina. En el SU de los ratones que se les administro Curcumina no se observaron podocitos, por lo que, su expresión es indeterminada, mientras que en el SU de los ratones tratados con Dox-Curc solo se observó 3 podocito con una expresión moderada de WT1 y Podocalixina (Figura 16).

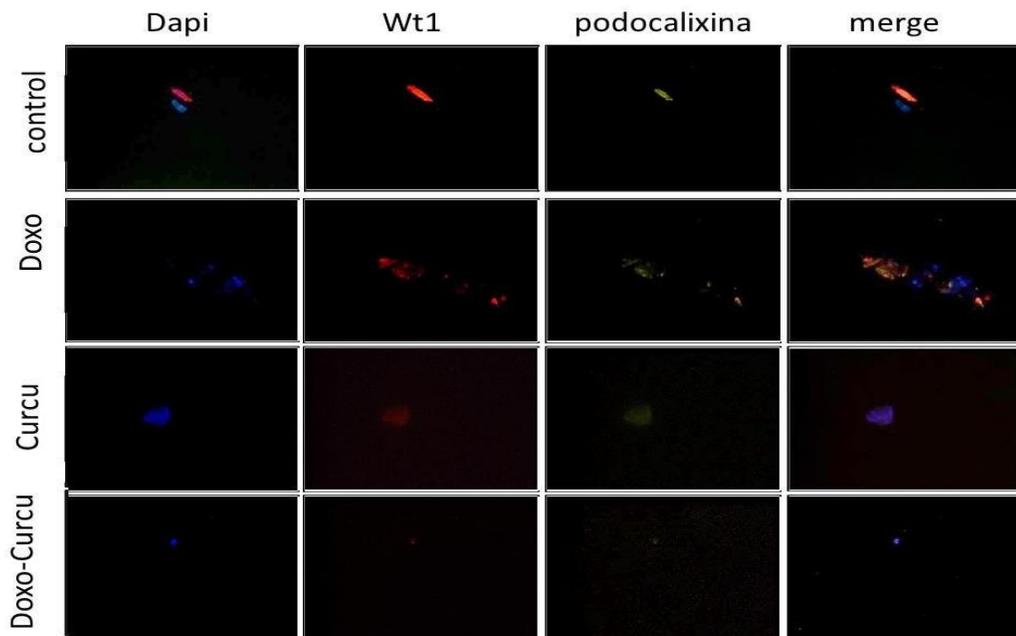


Figura 15. Detección de podocitos en SU. Se realizó una doble marca para detectar podocitos en SU de ratones con y sin afección renal tratados con Curcumina. WT1 se detectó con rojo Texas, Podocalixina se marcó con FITC y se tiñeron núcleos de color azul (DAPI).

Número de podocitos excretados

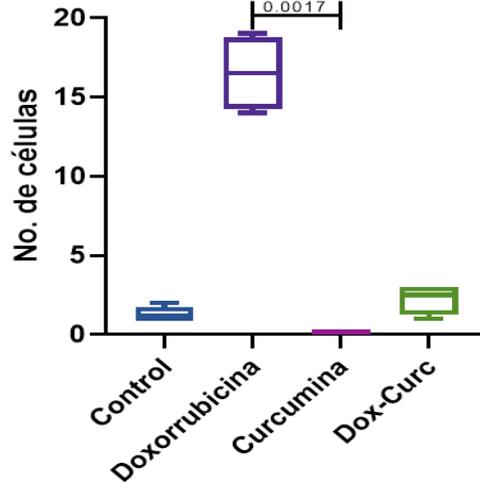


Figura 16. Podocitos en SU y expresión de WT1 en un modelo murino con y sin tratamiento de Curcumina. Número de podocitos. Se observa un mayor número de podocitos en el grupo de Doxorubicina en contraste a los demás grupos.

8.4 Modulación en la expresión de proteínas involucradas en apoptosis, Bax, Bcl-2 y Caspasa-3 en afección renal con Doxorubicina tratados con y sin Curcumina.

La expresión de las proteínas involucradas en apoptosis como son Bcl-2, Bax, Caspasa-3 y PCNA se detectaron por la técnica de IHQ en los tejidos renales de los ratones sometidos a los diferentes tratamientos

8.4.1 La Curcumina aumenta la expresión de Bcl-2 en el tejido renal

La expresión de Bcl-2 en las muestras de tejido renal de los ratones control, Curcumina y Doxo-Curc muestra una expresión más alta en células glomerulares en contraste con la biopsia de afección renal (tratadas con Doxorubicina) y con un incremento paulatino en la expresión de Bcl-2 conforme avanza el tiempo (Fig. 18A). Sin embargo, la expresión de BCL-2 se observa más alta en los tratamientos de Curcumina y Doxo-Curcumina comparado que los glomérulos del modelo de afección renal en todos los tiempos analizados (18B).

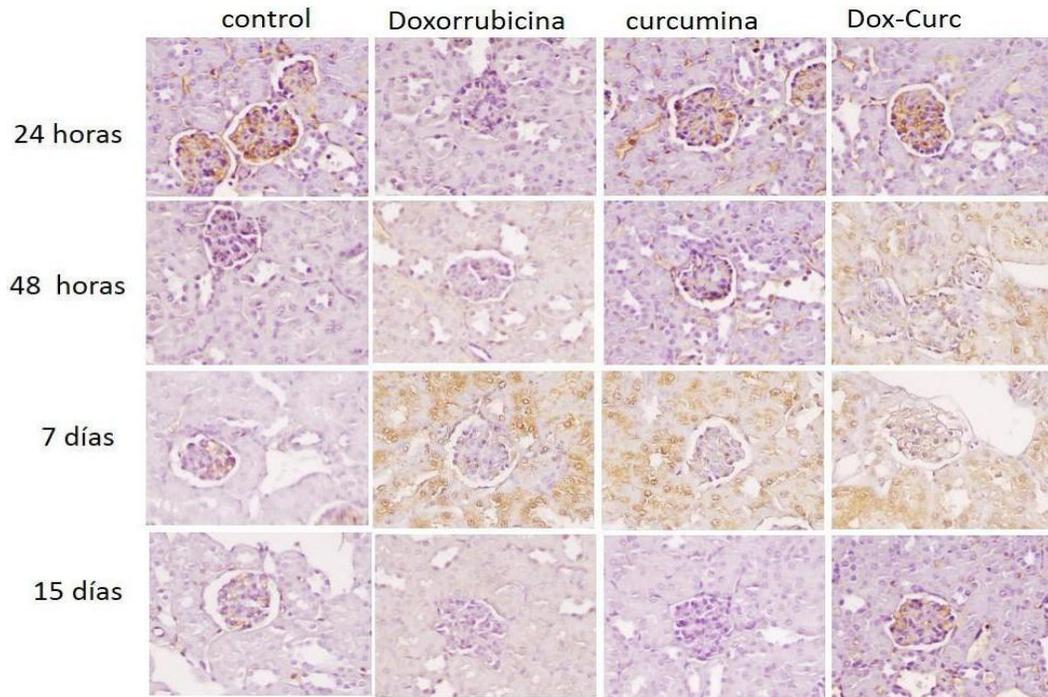
La expresión de Bcl-2 a 24 horas en el grupo Control (SS) tiene una mediana 0.510 (25%; 0.437, 75%; 0.574), en Doxorubicina (D) obtuvo de 0.220 (25%; 0.167, 75%; 0.235), con Curcumina (C) los valores fueron de 0.472 (25%; 0.436, 75%; 0.583) y en Doxo-Curcumina (DC) se obtuvo de 0.462 (25%; 0.377, 75%; 0.530). Se observó una disminución de Bcl-2 a 24 h del grupo tratado con D diferente al grupo de SS, C y DC ($p=0.0006$, 0.0052 y 0.0149 , respectivamente; Figura 17B. a).

En el grupo a 48 horas los resultados fueron, los SS mostraron una mediana de 0.270 (25%; 0.226, 75%; 0.305), en D fue de 0.187 (25%; 0.141, 75%; 0.231), en C fue 0.248 (25%; 0.0.174, 75%; 0.311) y en DC fue de 0.371 (25%; 0.303, 75%; 0.436). Se observa un incremento de Bcl2 a 48 h del grupo tratado con DC versus el grupo de D ($p=0.0149$, Figura 17B. b).

En el grupo de 7 días los resultados fueron, los SS mostraron una mediana de 0.213 (25%; 0.170, 75%; 0.282), en D, fue de 0.192 (25%; 0.154, 75%; 0.224), en C fue de 0.235 (25%; 0.191, 75%; 0.253) y en DC se obtuvieron los siguientes resultados, 0.255 (25%; 0.245, 75%; 0.271). Se observa mantiene una menor expresión de Bcl-2 en el grupo de D se observan diferencias significativas con el grupo de DC ($p=0.0109$, Figura 17B. c).

En el grupo de 15 días los resultados fueron, los SS mostraron una mediana de 0.274 (25%; 0.252, 75%; 0.375), en D, fue de 0.213 (25%; 0.181, 75%; 0.235), en C fue de 0.211 (25%; 0.173, 75%; 0.291) y en DC se obtuvo 0.322 (25%; 0.274, 75%; 0.354). El grupo de D mantiene una expresión baja de bcl-2 en contraste con el grupo SS y DC ($P=0.0063$ y 0.0006 , respectivamente, Figura 17B. d).

A)



B)

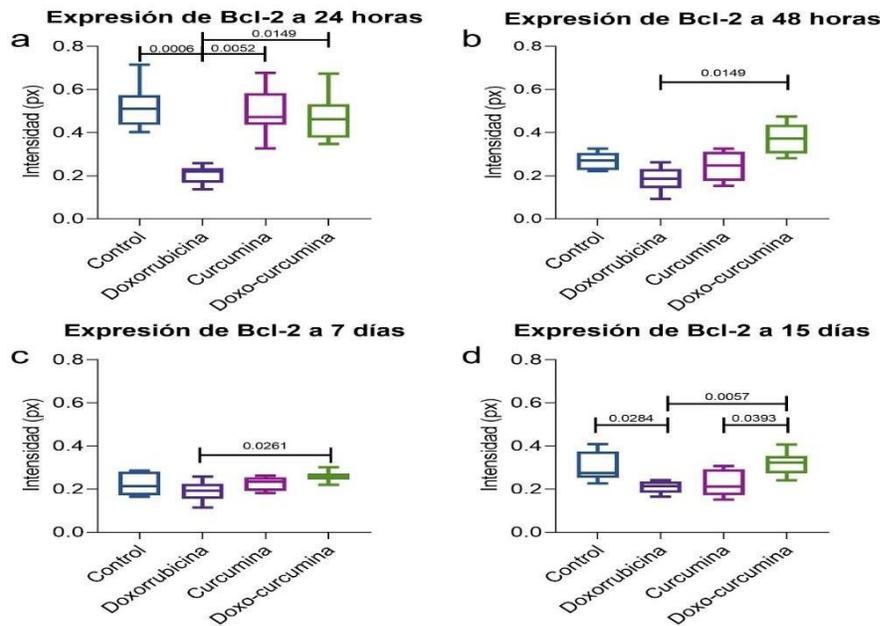


Figura 17. Expresión de Bcl-2 en tejido renal de un modelo murino con afección renal inducido por Doxorubicina. A) Expresión de Bcl-2 en tejido renal con y sin afección renal. a) 24 horas, b) 48 horas, c) 7 días y d) 15 días. B). Análisis de intensidad en los grupos de estudio. La expresión de Bcl-2 en Doxorubicina es inferior en contraste a los controles y levemente baja en contraste con Curcumina y Doxo-Curcumina ($p < 0.05$).

8.4.2 La Curcumina disminuye la expresión de Bax en el modelo murino de afección renal.

Bax es un miembro de la familia de Bcl-2 involucrada en el proceso apoptótico, cuya expresión está asociada a muerte. El análisis de la IHQ en las muestras control a las 24 y 48 horas indica que una leve expresión de Bax en células glomerulares y un incremento a 7 y 15 días, en contraste, en las muestras de los ratones que se le indujo la afección renal con Doxorubicina que mostraron una expresión alta de Bax en células del glomérulo y en túbulos distales y proximales a los diferentes tiempos, y una expresión leve en Doxo-Curcumina (Fig. 18 A y B).

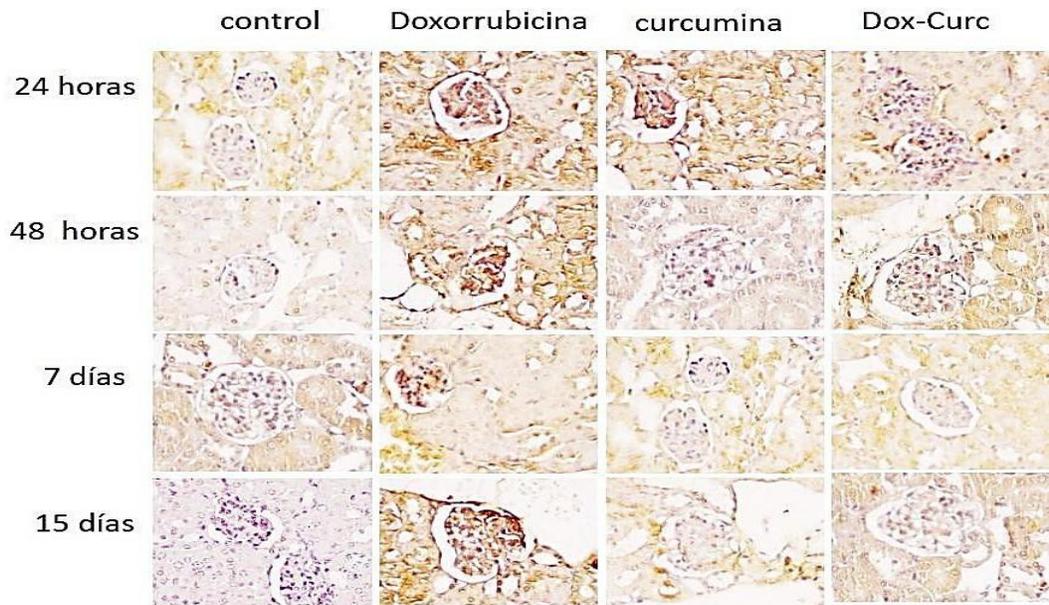
La expresión de Bax a 24 horas en el grupo Control (SS) tiene una mediana 0.238 (25%; 0.204, 75%; 0.262), en Doxorubicina (D) obtuvo de 0.442 (25%; 0.413, 75%; 0.493), con Curcumina (C) los valores fueron de 0.377 (25%; 0.324, 75%; 0.445) y en Doxo-Curcumina (DC) se obtuvo de 0.252 (25%; 0.218, 75%; 0.313). Se observó incremento de Bax a 24 h del grupo tratado con D y C diferente a los grupos de SS y DC (Figura 18B. a).

En el grupo a 48 horas los resultados obtenidos fueron, los SS mostraron una mediana de 0.220 (25%; 0.159, 75%; 0.297), en D fue de 0.332 (25%; 0.307, 75%; 0.362), en C fue 0.221 (25%; 0.185, 75%; 0.292) y en DC fue de 0.236 (25%; 0.219, 75%; 0.272). Se observa un incremento de Bax a 48 h del grupo tratado con D con diferencias significativas con los grupos de SS y C ($p=0.0461$ y 0.0393 respectivamente, Figura 18B. b).

En el grupo de 7 días los resultados fueron, los SS mostraron una mediana de 0.384 (25%; 0.351, 75%; 0.421), en D, fue de 0.580 (25%; 0.511, 75%; 0.630), en C fue de 0.222 (25%; 0.190, 75%; 0.243) y en DC se obtuvieron los siguientes resultados, 0.206 (25%; 0.172, 75%; 0.229). El grupo D muestra diferencias contra los grupos de SS, C y DC ($p=0.0272$, 0.0004 y 0.0001 respectivamente, Figura 18B. c).

En el grupo de 15 días los resultados fueron, los SS mostraron una mediana de 0.238 (25%; 0.204, 75%; 0.262), en D, fue de 0.442 (25%; 0.413, 75%; 0.493), en C fue de 0.377 (25%; 0.324, 75%; 0.445) y en DC se obtuvo 0.252 (25%; 0.218, 75%; 0.313). El grupo de D mantiene una expresión alta en contraste con el grupo C y DC ($P=0.0032$ y 0.0001 respectivamente, Figura 18B. d).

A)



B)

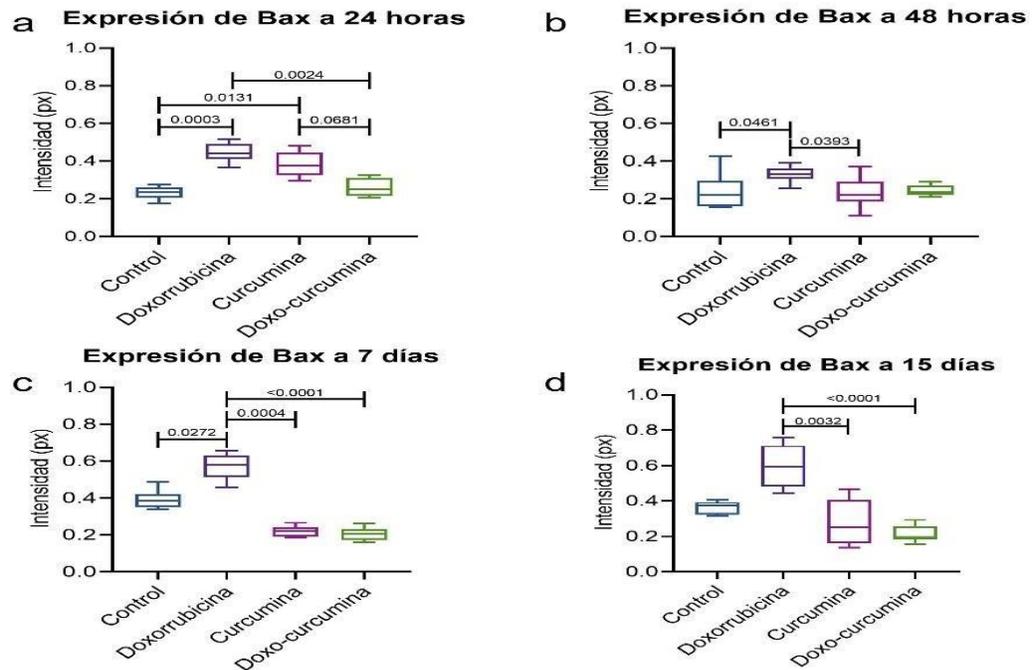


Figura 18.- Expresión de Bax en tejido renal de un modelo murino con afección renal inducido por Doxorrubicina. Se observa mayor expresión de Bax en el tratamiento con Doxorrubicina a 24 y 48 horas y en 7 y 15 días en contraste con los controles, y con los demás tratamientos principalmente a los tiempos de 7 y 15 días.

8.4.3 La Curcumina disminuye la expresión de Caspasa-3 en el modelo murino de afección renal.

Para determinar la presencia de apoptosis se determinó la expresión de Casp-3 una proteína efectora del proceso apoptótico en tejido renal de ratones tratado con Doxorrubicina (modelo de afección renal), así como Curcumina sola o combinada con Doxorrubicina y ratones sanos.

En los tejidos tratados con Doxorrubicina se observa la presencia de Casp-3 sostenida en los diferentes tiempos, además de cambios muy marcados en la morfología glomerular, lo que sugiere una apoptosis en el tejido renal y principalmente en componentes celulares del glomérulo, así como la disminución gradual en su expresión en los glomérulos tratados con Doxo-Curcumina (Figura 19A).

La expresión de Caspasa-3 se midió por la intensidad obtenida en los diferentes tratamientos y a diferentes tiempos:

La expresión Caspasa-3 a 24 horas en el grupo Control (SS) tiene una mediana 0.148 (25%; 0.129, 75%; 0.162), en Doxorrubicina (D) obtuvo de 0.289 (25%; 0.258, 75%; 0.298), con Curcumina (C) los valores fueron de 0.189 (25%; 0.172, 75%; 0.205) y en Doxo-Curcumina (DC) se obtuvo de 0.322 (25%; 0.300, 75%; 0.369). Se observó un incremento de Caspasa-3 a 24 h del grupo tratado con D y DC en contraste al grupo control ($p=0.0046$, 0.0001 , respectivamente; Figura 19B. a).

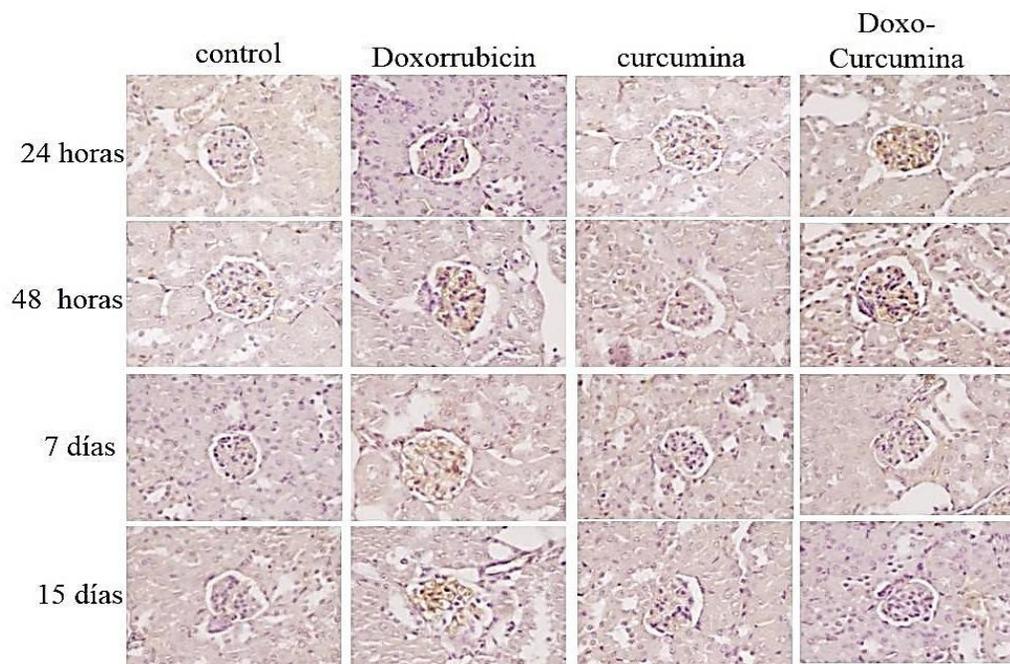
En el grupo a 48 horas los resultados obtenidos fueron, los SS mostraron una mediana de 0.204 (25%; 0.178, 75%; 0.213), en D fue de 0.276 (25%; 0.254, 75%; 0.286), en C fue 0.202 (25%; 0.162, 75%; 0.212) y en DC fue de 0.301 (25%; 0.228, 75%; 0.347). Se observaron diferencias entre los grupos, excepto el grupo SS y C que no muestran

diferencias (Figura 20B. b).

En el grupo de 7 días los resultados fueron, los SS mostraron una mediana de 0.187 (25%; 0.167, 75%; 0.202), en D, fue de 0.290 (25%; 0.241, 75%; 0.303), en C fue de 0.201 (25%; 0.190, 75%; 0.224) y en DC se obtuvieron los siguientes resultados, 0.197 (25%; 0.193, 75%; 0.200). Se mantiene una menor expresión de Caspasa-3 en el grupo de D se observan diferencias significativas con el grupo de SS y DC ($p=0.0027$ y 0.0267 , Figura 19B. c).

En el grupo de 15 días los resultados fueron, los SS mostraron una mediana de 0.190 (25%; 0.180, 75%; 0.205), en D, fue de 0.326 (25%; 0.274, 75%; 0.370), en C fue de 0.200 (25%; 0.194, 75%; 0.227) y en DC se obtuvo 0.215 (25%; 0.192, 75%; 0.220). El grupo de D mantiene una expresión alta en contraste con los demás grupos, pero solo muestra diferencias con el grupo SS ($P=0.0069$, Figura 19B. d).

A)



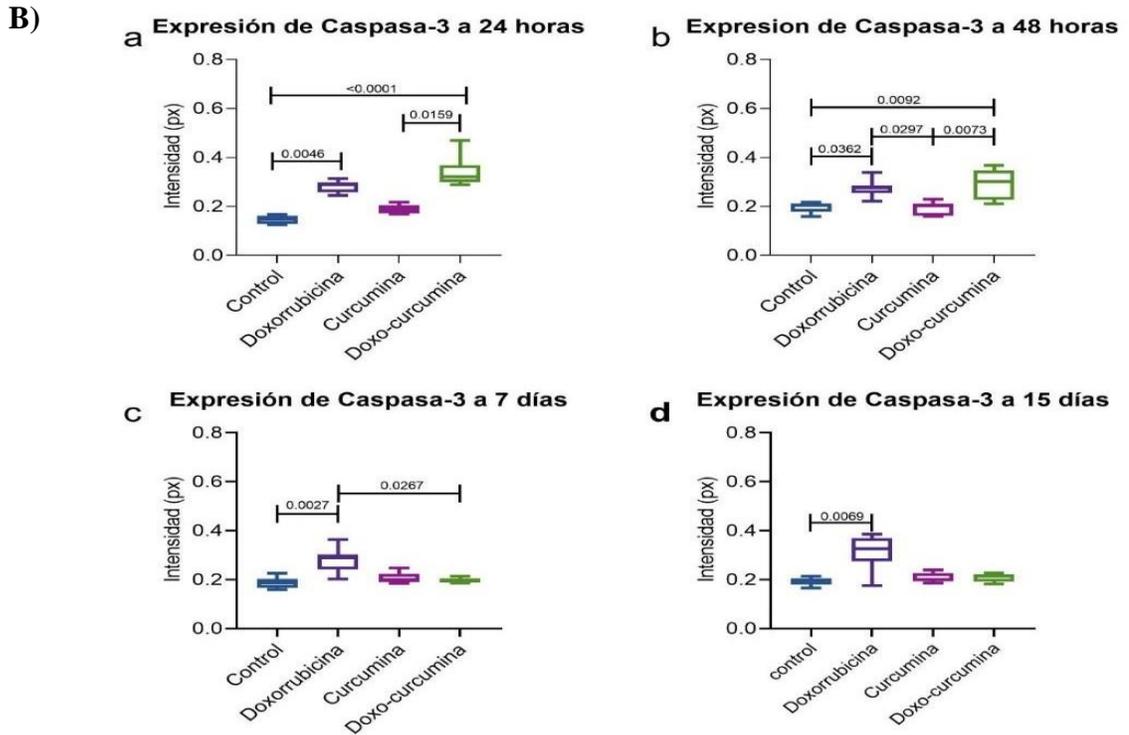


Figura 19.- Expresión de Cas-3 en tejido renal de un modelo murino con afección renal inducido por Doxorubicina. A) expresión “in situ de cas-3 por IHQ. B) Expresión de cas-3 a las 24 y 48 horas, y a los 7 y 15 días. La expresión de cas-3 en Doxorubicina es mayor que en los controles y Curcumina, y levemente baja a comparación de los tratados con Doxo-Curcumina a las 24 y 48 horas, en contraste a los tiempos de 7 días y 15 días ($p < 0.05$).

8.4.4 La Curcumina incrementa la expresión de PCNA en el modelo de afección renal.

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es una proteína que se expresa durante la fase G1 y S del ciclo celular y es considerado como un biomarcador de proliferación en algunas neoplasias. En el análisis de la IHQ de los tejidos se encontró un incremento en la expresión de PCNA en tejido renal tratado con Curcumina desde las 24 horas principalmente en glomérulo y células adyacentes, en contraste con los controles y los tratados con Doxorubicina (Figura 20A).

La expresión de PCNA se midió por la intensidad obtenida en los diferentes tratamientos y a diferentes tiempos (Figura 20B):

La expresión de PCNA a 24 horas en el grupo Control (SS) tiene una mediana 0.077 (25%; 0.06, 75%; 0.09), en Doxorubicina (D) obtuvo de 0.089 (25%; 0.083, 75%; 0.107), con Curcumina (C) los valores fueron de 0.196 (25%; 0.192, 75%; 0.229) y en Doxo-Curcumina (DC) se obtuvo de 0.154 (25%; 0.152, 75%; 0.165). Se observó un incremento de PCNA en el grupo C con diferencias con el grupo de SS y D ($p=0.020$ y 0.0028 , respectivamente, Figura 20B. a).

En el grupo a 48 horas los resultados obtenidos fueron, los SS mostraron una mediana de 0.125 (25%; 0.113, 75%; 0.146), en D fue de 0.125 (25%; 0.110, 75%; 0.138), en C fue 0.202 (25%; 0.171, 75%; 0.253) y en DC fue de 0.208 (25%; 0.186, 75%; 0.250). Se observa un incremento de PCNA en los grupos tratados con Curcumina en contraste a SS y D a 48 h (Figura 20B. b).

En el grupo de 7 días los resultados fueron, los SS mostraron una mediana de 0.130 (25%; 0.116, 75%; 0.180), en D, fue de 0.166 (25%; 0.099, 75%; 0.187), en C fue de 0.248 (25%; 0.228, 75%; 0.284) y en DC se obtuvieron los siguientes resultados, 0.342 (25%; 0.281, 75%; 0.388). Se observa un incremento de PCNA en el grupo de DC con gran diferencia con los grupos SS y D ($p=0.0006$ y 0.0032 respectivamente, Figura 20B. c).

En el grupo de 15 días los resultados fueron, los SS mostraron una mediana de 0.140 (25%; 0.125, 75%; 0.156), en D, fue de 0.119 (25%; 0.105, 75%; 0.210), en C fue de 0.130 (25%; 0.121, 75%; 0.142) y en DC se obtuvo 0.366 (25%; 0.229, 75%; 0.451). El grupo de DC mantiene una expresión alta de PCNA en contraste con los grupos SS, D y C ($P=0.0419$, 0.0065 y 0.0128 , respectivamente, Figura 20B. d).

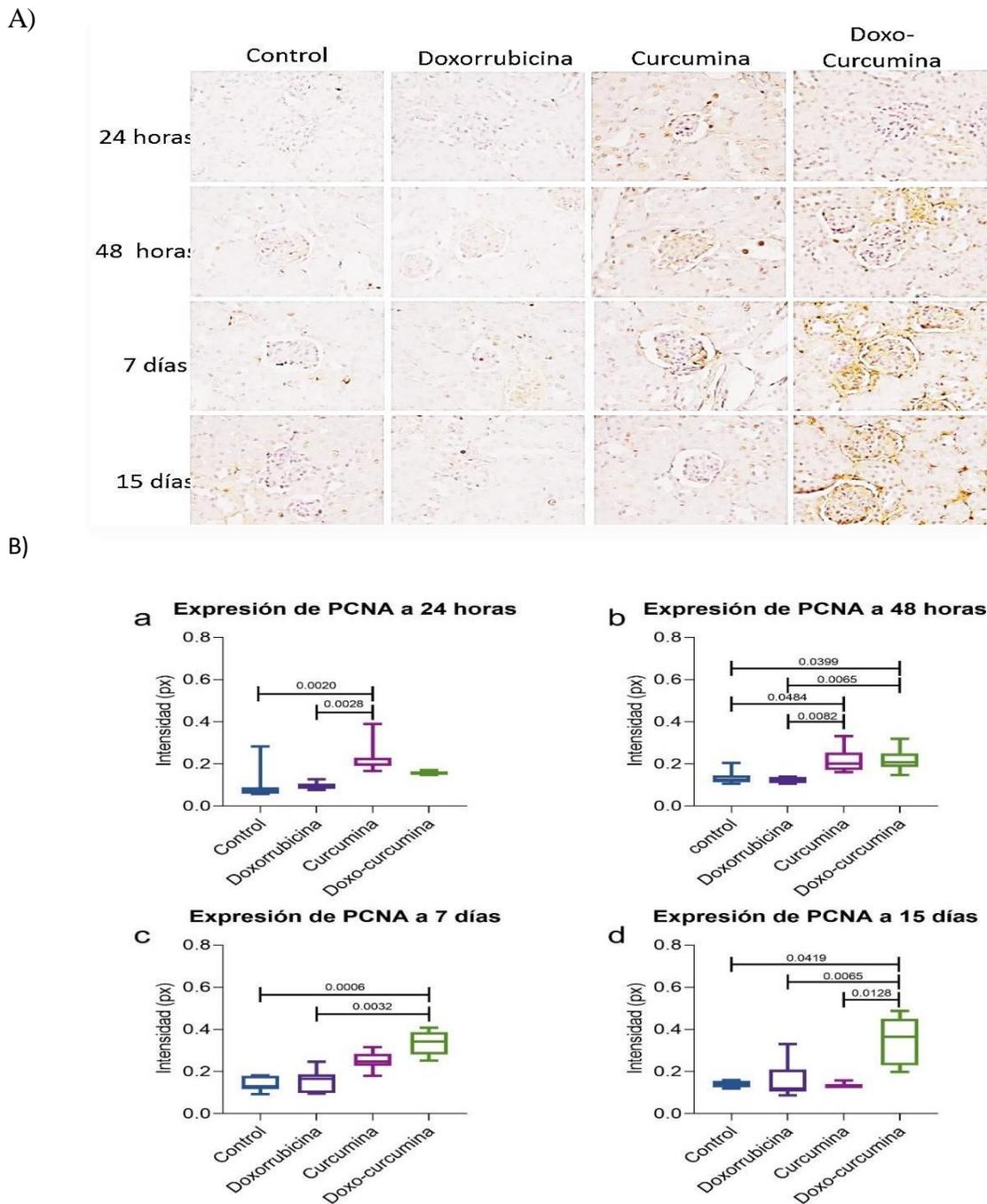


Figura 20. Expresión de PCNA en tejido renal de un modelo murino con afección renal inducido por Doxorubicina. A) expresión “in situ de PCNA por IHQ. B) Expresión de PCNA a las 24 y 48 horas, y a los 7 y 15 días. La expresión de PCNA en Curcumina es mayor que en los controles y Doxorubicina. Incremento de la expresión de PCNA a las 48 horas muy similar a Curcumina y mayor a los 7 y 15 días ($p < 0.05$).

9.- DISCUSIÓN

El riñón es un órgano esencial para la homeostasis debido a que sus funciones son vitales para el organismo, como la secreción de los desechos metabólicos, modulación de electrolitos y volumen extracelular además de que es un órgano importante en la síntesis de hormonas, por su capacidad de filtración y concentración de compuestos de la orina es blanco de muchos fármacos como la Doxorubicina y cisplatino (Si-Jia et al, 2020) y otros compuestos tóxicos que provocan perturbaciones en las funciones esenciales que pueden conducir a la muerte del paciente por una enfermedad renal, se ha observado que el riñón posee mecanismos de regeneración restableciendo parcial o totalmente sus funciones, este trabajo tiene como objetivo analizar si se puede prevenir el daño provocado por la Doxorubicina por la acción de la Curcumina vía WT1, proteína esencial en la funcionalidad del podocito.

En el estudio analizamos marcadores urinarios críticos, revisando la concentración de Albúmina, Creatinina y la relación Albúmina: Creatinina para evaluar el deterioro de la función renal. Nuestros resultados concuerdan parcialmente con Li L et al en el 2021, donde observo una disminución de los niveles séricos de la relación Albúmina: Creatinina por el tratamiento de Tetra hidrocurcumina (THC) en un modelo de IRA y donde nosotros observamos esa disminución en la relación A:C en orina de los ratones con afección renal inducida por Doxorubicina (24 y 48 horas). Esto sugiere que el uso de Curcumina mejora los resultados clínicos de albúmina y la proporción A:C en una IRA inducida por fármaco.

Se determinó un análisis de química sanguínea a los cuatro grupos de ratones con diferentes tratamientos de Doxorubicina y Curcumina. Debido al número de ratones tratados, se realizó un pool por grupo con 100 µl de sangre por ratón, el cual fue enviado para su análisis. Los resultados revelaron alteraciones marcadas en las enzimas hepáticas, daño renal y perturbaciones en el metabolismo de los lípidos. Sin embargo, la Curcumina redujo estos parámetros bioquímicos en los ratones tratados con Doxorubicina, mostrando una mejor función hepática, pancreática y renal en comparación con los animales tratados únicamente con Doxorubicina. Esto sugiere que el Grupo de ratones tratado

con Doxorubicina y Curcumina podría estar en mejor estado general de salud que el Grupo de ratones tratado con Doxorubicina.

Se ha observado que agentes quimioterapéuticos como la Doxorubicina en pacientes con cáncer inducen cambios en el citoesqueleto podocitario formando pseudoquistes en el penacho glomerular abriendo el diafragma de filtración con la pérdida consecuente de proteínas, además de inducción de apoptosis por activación de P53 vía intrínseca por lo que muestra efectos nefrotóxicos y que puede ocasionar otras patologías que empeoran la calidad de vida de los pacientes. Nosotros observamos por medio de la técnica H-E en las muestras tratadas con Doxorubicina y en tiempos cortos cambios estructurales en el corpúsculo renal y túbulos principalmente a las 48 horas, concordando con los trabajos de Sook min et al 2016 y anteriormente con Ortiz et al 1998, que indujeron daño renal del tipo focal segmental y esclerótica (FSGS) en ratones BALB/c analizados a 7 y 15 días.

El uso de agentes nefroprotectores para el mantenimiento de la función glomerular y tubular ha sido observado por muchos investigadores, ya que las enfermedades renales tienen una incidencia y mortalidad creciente principalmente en países de primer mundo y en vías de desarrollo como lo es España, Noruega, Japón, EUA, India, etc. Uno de estos agentes nefroprotectores es la Curcumina, ya que ha mostrado efectos antioxidantes, antiinflamatorios, modulador de vías apoptóticas, y se ha utilizado en cáncer.

Para corroborar si existe una protección por parte de la Curcumina en el glomérulo, se procedió a la administración simultánea de Doxorubicina y Curcumina, obteniendo los siguientes resultados, por H-E al observar la morfología, se observan cambios principalmente en túbulos y en glomérulo como lo es el rompimiento de la cápsula de Bowman, presencia de eritrocitos en el espacio urinario, pérdida de células del penacho glomerular, afectación en la luz de los túbulos en el tratamiento con Doxorubicina, con la Curcumina y la administración simultánea no se observan cambios significativos en el glomérulo, quizás estudios con microscopía electrónica nos permita observar si es un daño de cambios mínimos pero nosotros consideramos como disminución del daño

renal. Estos resultados concuerdan parcialmente con los de Yagmurca M del 2015 que observa por H-E, dilatación tubular, vacuolización glomerular, decrecimiento en el espacio urinario, engrosamiento de la cápsula de Bowman y la infiltración intersticial, y donde la lesión se atenuó con la administración de quercetin.

Nuestro grupo analizó la expresión “*in situ*” de WT1 por IHQ y los cambios, donde se puede observar una leve disminución de la expresión de la proteína con respecto al control sano y no se observan cambios morfológicos detectables a patologías. Estos resultados concuerdan parcialmente con los de Venkatesan et al en el 2000 que no reportan nefrotoxicidad por parte de la Curcumina, aunque en trabajos realizados en líneas de cáncer que expresan WT1 se ha observado que la Curcumina disminuye la expresión de WT1 proponiendo tres vías, por unión directo al gen de WT1, por el incremento en los miRNA 15- y 16-a y por inactivación vía akt. La literatura nos demuestra que la Curcumina en el riñón ejerce su beneficio en los túbulos por efectos antiinflamatorios, antioxidantes y no esclarece su efecto en los podocitos, que expresan de forma basal WT1.

La proteína WT1 se expresa principalmente en etapas embrionarias, en adultos desaparece solamente quedando en algunos tejidos como es el caso de riñón principalmente en los podocitos y en una menor expresión en células tubulares y uroteliales, en los podocitos glomerulares la expresión de WT1 juega un papel importante en el mantenimiento de la función y estructura morfológica de esta maquinaria de filtración y se ve afectada por una serie de factores tanto extrínsecos e intrínsecos.

El número de podocitos en el tejido renal se detectó con la expresión de WT1 por la técnica de IHQ, observando una pérdida de podocitos en el modelo de afección renal en contraste con los controles (24, 48 horas y 7 días), y en las muestras a 15 días se observa diferencias con el control, Curcumina y Doxo-Curcu. En orina utilizamos marcadores podocitarios (WT1 y Podocalixina) y la IFA a 24 horas para detectar podocitos excretados, observando mayor número de podocitos excretados en el tratamiento de

Doxorrubicina y sugerimos que el mantenimiento de los podocitos en el glomérulo por Curcumina es favorable para realizar la función renal en los ratones tratados con Doxorrubicina. Estos resultados concuerdan parcialmente con los resultados de Tao J et al en el 2014, que observa disminución del número de podocitos glomerulares y un incremento en podocitos urinarios en un modelo de afección renal (FSGS) inducido por Doxorrubicina y concuerdan parcialmente con los resultados de Di Ti Q et al del 2020, que observa un mantenimiento en el número de podocitos glomerulares en un modelo de daño renal del tipo Nefropatía Membranosa en ratas tratada con Curcumina y donde analiza la autofagia en podocitos.

La técnica de IHQ nos permite observar la expresión de WT1 donde se observa una expresión muy similar al control sano y en los tratamientos de Curcumina y Doxorrubicina-Curcumina, en contraste con el modelo de afección renal inducida por Doxorrubicina que disminuye, por lo que, se sugiere que la Curcumina modula a WT1 hacia arriba en daño renal, lo cual puede favorecer la transcripción de proteínas favorables para el sostén y funcionamiento de los podocitos. Nuestros resultados concuerdan con Husain S en el 2023 que observa una disminución de la expresión de WT1 en un modelo de FSGS inducida con Doxorrubicina en ratas y parcialmente con Zhang H et al del 2023, donde ellos describen los efectos de la Curcumina en la modulación de proteínas involucradas en apoptosis y estrés oxidativa como son AKT1, TNF, IL-6, VEGFA, STAT3, MAPK3, HIF1A, CASP3, IL1B, and JUN en una enfermedad FSGS.

La expresión de la ratio de Bax: Bcl-2 toma la relevancia en la formación o no del poro de permeabilidad de transición mitocondrial (MPT) el cual puede desencadenar la apoptosis en células del glomérulo. En nuestro modelo murino de afección renal podemos observar en el tratamiento de Doxo-Curcumina una expresión de Bax menor que Bcl-2 con diferencias muy marcadas y en Doxorrubicina se observa una expresión alta de Bax en contraste con la expresión de Bcl-2. Estos resultados concuerdan parcialmente con el trabajo de Soetikna *et al*, 2019 que observa una modulación en la relación del mRNA Bax y Bcl-2 y donde sugiere un efecto en el perfil anti-inflamatorio

y anti-apoptótico de la Curcumina en un modelo en rata de afección renal inducido por cisplatino y concuerdan parcialmente con Di Ti Q et al del 2020, observando en su modelo de Nefropatía Membranosa tratado con Curcumina la disminución de la expresión de Bax y Cas-3, así como el incremento de Bcl-2 a los 4 días de tratamiento.

La activación de caspasa-3 por las vías intrínsecas o extrínsecas juega un papel muy importante en la apoptosis, nosotros observamos un incremento en nuestro modelo de afección renal lo que sugiere, actividades apoptóticas en el tejido, también lo observamos en la muestra de Doxo-Curcumina a las 24 horas y presenta una disminución conforme pasa el tiempo (48 horas, 7 y 15 días) en este grupo. Estos resultados concuerdan con los de Benzer et al, del 2018 donde observan en su modelo de afección renal con Doxorubicina en ratas un incremento de Caspasa-3 y que disminuye en las ratas tratadas con Doxorubicina y Curcumina.

Mosa et al, en el 2019 observaron el daño renal en ratas winstar inducido por nanopartículas de hidroxipatita, y disminuyeron los cambios morfológicos con la administración de nanopartículas de quitosan y Curcumina, y, además, encontraron una expresión media de PCNA en el glomérulo renal. Este resultado concuerda parcialmente con nuestros resultados, donde observamos una expresión de PCNA en los glomérulos y túbulos en los ratones tratados con Curcumina y el modelo de afección renal tratado con Curcumina, y no así, en el modelo de afección renal donde la expresión de PCNA se observa disminuida. Este último resultado abre interrogantes aún más específicos, sugiriendo si esta expresión de PCNA es benéfica por expresarse en células como los podocitos (regeneración o inducción de progenitores PEC) o inducirá algún problema por cambios en la estructura tubular, glomerular y en los podocitos como lo es la catástrofe mitótica, desprendimiento o una lesión del tipo glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP).

Nosotros sugerimos que el factor de transcripción WT1, al ser modulado por las diferentes vías de interacción con la Curcumina esta a su vez modulara la expresión de otras proteínas importantes para los podocitos ya sea del diafragma de filtración, la zona

apical podocitaria, el citoesqueleto, la zona de adhesión con la membrana basal glomerular y las proteínas involucradas en apoptosis como lo son Bcl-2 y Bax.

10.- CONCLUSIONES

La Curcumina en presencia de un inductor de daño renal modula la expresión de WT1, altera la ratio de expresión de Bax: Bcl-2 y promueve la expresión de PCNA en células del glomérulo renal y adyacentes, así como disminuye la expresión de Cas-3.

11.- PERSPECTIVAS

1. Analizar y determinar la afección renal de cambios mínimos por microscopía electrónica de barrido.
2. Determinar el tipo de colágeno presente en las afecciones renales inducidas por Doxorubicina y Curcumina.
3. Analizar y determinar las isoformas de WT1, así como la localización presente a nivel celular por inducción de Curcumina, Doxorubicina y Doxorubicina-Curcumina.
4. Analizar la interacción de los procesos de productos ROS, inflamación y apoptosis vía WT1.
5. Desarrollar un tratamiento experimental con eficacia a disminuir el daño renal con o sin inducción por fármacos.

12.- BIBLIOGRAFÍA

2. Aggarwal, Bharat B., and Kuzhuvelil B. Harikumar. "Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases." *The international journal of biochemistry & cell biology* 41.1 (2009): 40-59.
3. Anna Greka and Peter Mundel. Cell Biology and Pathology of Podocytes. *Annu Rev Physiol.* 2012; 74: 299–323.
4. Ashkenazi, Avi, and Vishva M. Dixit. "Death receptors: signaling and modulation." *science* 281.5381 (1998): 1305-1308.
5. Barisoni L, Kriz W, Mundel P. The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the patogénesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis, and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc nephrol* 10: 51-61, 1999.
6. Bollain-y-Goytia JJ, Avalos E, Rodríguez C, Herrera R. Renal Cell turnover result in fine balance between apoptosis proliferation. *Journal of Biological Research.* 2006; 6: 131-138.
7. Bollain-Y-Goytia, J. J., González-Castañeda, M., Torres-Del-Muro, F., Daza-Benitez, L., Zapata-Benavides, P., Rodríguez-Padilla, C. & Herrera-Esparza, R. (2011). Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. *Indian Journal of Nephrology*, 21(3), 166-171.
8. Cohly, H. H., Taylor, A., Angel, M. F., & Salahudeen, A. K. (1998). Effect of turmeric, turmerin and curcumin on H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(1), 49-54.
9. Darwish, M. A., Abo-Youssef, A. M., Khalaf, M. M., Abo-Saif, A. A., Saleh, I. G., & Abdelghany, T. M. (2018). Resveratrol influences platinum pharmacokinetics: A novel mechanism in protection against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology Letters*, 290, 73-82.
10. Di Tu Q, Jin J, Hu X, Ren Y, Zhao L, He Q. Curcumin Improves the Renal Autophagy in Rat Experimental Membranous Nephropathy via Regulating the PI3K/AKT/mTOR and Nrf2/HO-1 Signaling Pathways. *Biomed Res Int.* 2020

Nov 1; 2020:7069052. doi: 10.1155/2020/7069052. PMID: 33204708; PMCID: PMC7654212.

11. Dong, L., Pietsch, S., Tan, Z., Perner, B., Sierig, R., Kruspe, D., ... & Englert, C. (2015). Integration of cistromic and transcriptomic analyses identifies Nphs2, Mafk, and Magi2 as Wilms' tumor 1 target genes in podocyte differentiation and maintenance. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(9), 2118-2128.
12. Donovan, M.J., Natoli, T.A., Sainio, K., Amstutz, A., Jaenisch, R., Sariola, H. and Kreidberg, J.A. Initial differentiation of the metanephric mesenchyme is independent of WT1 and the ureteric bud. *Dev. Genet.* 1999; 24, 252–262.
13. Drenckhahn D, Franke RP. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab Invest* 1988;59(5):673–682.
14. Dusso, Adriana S. "Kidney disease and vitamin D levels: 25-hydroxyvitamin D, 1, 25-dihydroxyvitamin D, and VDR activation." *Kidney international supplements* 1.4 (2011): 136-141.
15. Fulya Benzer, Fatih Mehmet Kandemir, Sefa Kucukler, Selim Comaklı, Cuneyt Caglayan. Chemoprotective effects of curcumin on doxorubicin-induced nephrotoxicity in wistar rats: by modulating inflammatory cytokines, apoptosis, oxidative stress, and oxidative DNA damage. *Arch Physiol Biochem.* 2018 Dec;124(5):448-457. Doi: 10.1080/13813455.2017.1422766. Epub 2018 Jan 5.
16. Gao, S. M., Yang, J. J., Chen, C. Q., Chen, J. J., Ye, L. P., Wang, L. Y., & Yu, K. (2012). Pure curcumin decreases the expression of WT1 by upregulation of miR-15a and miR-16-1 in leukemic cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31, 1-9.
17. Goldstein, Sidney, Abbas S. Ali, and Hani Sabbah. "Ventricular remodeling: mechanisms and prevention." *Cardiology clinics* 16.4 (1998): 623-632.
18. Green, Douglas R., and Guido Kroemer. "The pathophysiology of mitochondrial cell death." *Science* 305.5684 (2004): 626-629.
19. Haber DA, Housman DE. The genetics of Wilms' tumour. *Adv Cancer Res.* 1992; 59: 41-68.
20. Hartkamp J, Roberts, S. The role of the Wilms' tumour-suppressor protein

WT1 in apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36:629-631.

21. Hartmann, Jörg T., et al. "A randomized trial comparing the nephrotoxicity of cisplatin/ifosfamide-based combination chemotherapy with or without amifostine in patients with solid tumors." *Investigational new drugs* 18 (2000): 281-289.
22. He, L., Shen, P., Fu, Q., Li, J., Dan, M., Wang, X., & Jia, W. (2009). Nephroprotective effect of Kangqianling decoction on chronic renal failure rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 367-373.
23. Ho-Shik Kim, Myoung Shin Kim, Anne L. Hancock.: Identification of Novel Wilm's Tumor Suppressor Gene Target Genes Implicated in Kidney Development. *The Journal of Biological Chemistry.*2007; 282: 16278–16287.
24. Husain S. Renal Glomerular Expression of WT-1, TGF- β , VEGF, and ET-1 Immunostains in Murine Models of Focal and Segmental Glomerulosclerosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2023 Sep 1;31(8):574-582. doi: 10.1097/PAI.0000000000001146. Epub 2023 Aug 3. PMID: 37615656.
25. Jie Z, Chao M, Jun A, Wei S, LiFeng M. Effect of Curcumin on Diabetic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trials. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021 Dec 2; 2021:6109406. Doi: 10.1155/2021/6109406. PMID: 34899954; PMCID: PMC8660194.
26. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin. Invest.*2001; 108 (11): 1583-1587.
27. Kim JM, Wu H, Green G, Winkler CA, Kopp JB, Miner JH, Unanue ER, Shaw AS. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 2003; 300: 1298-1300 [PMID: 12764198 DOI: 10.1126/science.1081068]
28. Kroemer, G., El-Deiry, W., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P. & Melino, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell death and differentiation*, 12, 1463-1467.

29. Kumral, A., Soluk-Tekkeşin, M., Olgaç, V., Doğru-Abbasoğlu, S., Türkoğlu, Ü., & Uysal, M. (2015). Effect of olive leaf extract treatment on doxorubicin-induced cardiac, hepatic, and renal toxicity in rats. *Pathophysiology*, 22(2), 117-123.
30. Lahoti TS, Patel D, Thekkemadom V, Beckett R, Ray SD. Doxorubicin-induced in vivo nephrotoxicity involves oxidative stress-mediated multiple pro- and anti-apoptotic signaling pathways. *Curr Neurovasc Res*. 2012 Nov;9(4):282-95. Doi: 10.2174/156720212803530636. PMID: 22873725.
31. Li L, Liu X, Li S, Wang Q, Wang H, Xu M, An Y. Tetrahydrocurcumin protects against sepsis-induced acute kidney injury via the SIRT1 pathway. *Ren Fail*. 2021 Dec;43(1):1028-1040. doi: 10.1080/0886022X.2021.1942915. PMID: 34187277; PMCID: PMC8253188.
32. Li, Lily Y., Xu Luo, and Xiaodong Wang. "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature* 412.6842 (2001): 95-99.
33. Li, P., Pu, S., Lin, C., He, L., Zhao, H., Yang, C., & Zhou, Z. (2022). Curcumin selectively induces colon cancer cell apoptosis and S cell cycle arrest by regulates Rb/E2F/p53 pathway. *Journal of Molecular Structure*, 1263, 133180.
34. Liu G, Kaw B, Kurfi J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS. Nephl and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* 2003; 112:209-221 [PMID: 12865409 DOI: 10.1172/JCI18242]
35. Liu, J. M., Li, M., Luo, W., & Sun, H. B. (2021). Curcumin attenuates Adriamycin-resistance of acute myeloid leukemia by inhibiting the lncRNA HOTAIR/miR-20a-5p/WT1 axis. *Laboratory investigation*, 101(10), 1308-1317.
36. Locksley, Richard M., Nigel Killeen, and Michael J. Lenardo. "The TNF and TNF
37. Lüthi, A. U., and S. J. Martin. "The CASBAH: a searchable database of caspase substrates." *Cell Death & Differentiation* 14.4 (2007): 641-650.
38. M Yagmurca, Z Yasar, O Bas. Effects of quercetin on kidney injury induced by doxorubicin. *Bratisl Lek Listy*. 2015; 116(8):486-9. Doi: 10.4149/bl_2015_092.
39. Maheshwari, R. K., Singh, A. K., Gaddipati, J., & Srimal, R. C. (2006). Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life sciences*, 78(18), 2081-2087.

40. Martínez Pérez, D., Pérez de Alejo Rodríguez, L., Moré Chang, C. X., Rodríguez Viera, R., & Dupuy Nuñez, J. C. (2016). Estudios de laboratorio clínico para la detección de la enfermedad renal crónica en grupos poblacionales de riesgo. *Medisan*, 20(1), 49-58.
41. Meijer, Alfred J., and Patrice Codogno. "Regulation and role of autophagy in mammalian cells." *The international journal of biochemistry & cell biology* 36.12 (2004): 2445-2462.
42. Menke A, McInnes L, Hastie ND, Schedl A: The Wilms' tumor suppressor WT1: Approaches to gene function. *Kidney Int* 1998; 53:1512–1518.
43. Min, Hye Sook, et al. "Renoprotective effects of a highly selective A3 adenosine receptor antagonist in a mouse model of adriamycin-induced nephropathy." *Journal of Korean medical science* 31.9 (2016): 1403-1412.
44. Morales, J. (2010). Drug-induced nephrotoxicity. *Med Clin Condes*, 21(4), 623-628.
45. Mosa IF, Yousef MI, Kamel M, Mosa OF, Helmy Y. The protective role of CsNPs and CurNPs against DNA damage, oxidative stress, and histopathological and immunohistochemical alterations induced by hydroxyapatite nanoparticles in male rat kidney. *Toxicol Res (Camb)*. 2019 Jul 30;8(5):741-753. doi: 10.1039/c9tx00138g. PMID: 31588351; PMCID: PMC6764468.
46. Nagata M, Tomari S, Kanemoto K. Podocytes, parietal cells, and glomerular pathology: the role of cell cycle proteins. *Pediatric Nephrology* 2002.
47. Nelson, Deirdre A., et al. "Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis." *Genes & development* 18.17 (2004): 2095-2107.
48. Norma Oficial Mexicana -NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Gac Méd Méx* 2002;138(3):295-298.
49. Ortiz A, Egidio J. Mecanismos patogénicos de las glomerulonefritis: muerte celular por apoptosis. *Revista Clínica Española*. 2000; 8:438-441.
50. Ortiz A, González Cuadrado S, Lorz C, Egidio J. Apoptosis in renal diseases. *Frontiers in Bioscience*. 1996; 1:30-49.
51. Ortiz A, Lorz C, Egidio J. The Fas ligand/Fas system in renal injury. *Nephrol dial*

- transplant 1999; 14:1831-1834.
52. Ortiz A, Marrón B, Ramos A. El destino de los podocitos en las nefropatías proteinúricas. *Nefrología*. Vol. XXII. 2002; Número 5 :425-431.
 53. Paus, R., Rosenbach, T., Haas, N., & Czarnetzki, B. M. (1993). Patterns of cell death: the significance of apoptosis for dermatology. *Experimental dermatology*, 2(1), 3-10.
 54. Reaper, Hid. "R. FOTEDAR, L. DIEDERICH AND A. FOTEDAR." *Progress in Cell Cycle Research* 2 (1996): 147.
 55. Ryter SW, Kim HP, Hoetzal A, Park JW, Nakahira K, et al. (2007). mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid redox signal* 9(1):49-89.
 56. Scharnhorst, V.; Dekker, P.; vander Eb, A. J.; Jochemsen, A. G. Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *J. Biol. Chem.*1999; 274:23456-23462.
 57. Semsri S, Krig SR, Kotelawala L, Sweeney CA, Anuchapreeda S. Inhibitory mechanism of pure curcumin on Wilms' tumor 1 (WT1) gene expression through the PKC α signaling pathway in leukemic K562 cells. *FEBS Lett.* 2011 jul 21;585(14):2235-42. Doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.043. Epub 2011 Jun 7. PMID: 21658388.
 58. Shankland, Stuart J., Benjamin S. Freedman, and Jeffrey W. Pippin. "Can podocytes be regenerated in adults?." *Current opinion in nephrology and hypertension* 26.3 (2017): 154-164.
 59. Si-Jia Huang, Jing Huang, Yun-Bo Yan, Jiao Qiu, Rui-Qiao Tan, Yu Liu, Qing Tian, Li Guan, Shuai-Shuai Niu, Yanxiang Zhang, Zhijiang Xi, Ying Xiang, Quan Gong. The renoprotective effect of curcumin against cisplatin-induced acute kidney injury in mice: involvement of miR-181a/PTEN axis *Ren Fail.* 2020 Nov;42(1):350-357. Doi: 10.1080/0886022X.2020.1751658.
 60. Soetikno, V., Sari, S. D. P., Maknun, L. U., Sumbung, N. K., Rahmi, D. N. I., Pandhita, B. A. W., & Estuningtyas, A. (2019). Pre-treatment with curcumin ameliorates cisplatin-induced kidney damage by suppressing kidney inflammation and apoptosis in rats. *Drug research*, 69(02), 75-82.
 61. Stark K, Vanio S, Vassileva G, McMahan AP. Wnt-4 regulates epithelial

transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Nature* 1994;372: 679–83.

62. Sun, Jing, Sun, Guibo, Cui, Xiaolan, Meng, Xiangbao, Qin, Meng, Sun, Xiaobo, Myricitrin Protects against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Counteracting Oxidative Stress, and Inhibiting Mitochondrial Apoptosis via ERK/P53 Pathway, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 6093783, 16 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6093783>.
63. Takahashi, A., & Earnshaw, W. C. (1997). In vitro systems for the study of apoptosis. *Advances in Pharmacology*, 41, 89-106.
64. Tao J, Polumbo C, Reidy K, Sweetwyne M, Susztak K. A multicolor podocyte reporter highlights heterogeneous podocyte changes in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2014 Apr;85(4):972-80. doi: 10.1038/ki.2013.463. Epub 2013 Nov 27. PMID: 24284512; PMCID: PMC3987991.
65. Venkatesan, Narayanan, Durairaj Punithavathi, and Venkatesan Arumugam. "Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats." *British journal of pharmacology* 129.2 (2000): 231-234.
66. Wang, Y., Wang, Y. P., Tay, Y. C., & Harris, D. C. (2000). Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney international*, 58(4), 1797-1804.
67. Yamagishi, S. I., Inagaki, Y., Okamoto, T., Amano, S., Koga, K., Takeuchi, M., & Makita, Z. (2002). Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *Journal of biological chemistry*, 277(23), 20309-20315.
68. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 2005; 12:1542-1552.
69. Zhang H, Dong QQ, Shu HP, Tu YC, Liao QQ, Yao LJ. Curcumin ameliorates focal segmental glomerulosclerosis by inhibiting apoptosis and oxidative stress in podocytes. *Arch Biochem Biophys.* 2023 Sep 15;746:109728. doi: 10.1016/j.abb.2023.109728. Epub 2023 Aug 24. PMID: 37633586.

70. Zhou, Hongyu, Christopher S Beevers, and Shile Huang. "The targets of curcumin." *Current drug targets* 12.3 (2011): 332-347.

13.- ANEXOS

13.1 Resultados de peso de los ratones, perfil bioquímico y efecto hepático de los ratones tratados con Curcumina y Doxo-Curcumina.

13.1.1 Control de pesos de los ratones.

El análisis del peso corporal de los diferentes grupos de ratones tratados con Doxorubicina durante 48 horas muestra una pérdida de aproximadamente un 9% tanto en el grupo tratado solo con Doxorubicina como en el grupo tratado con Doxorubicina y Curcumina simultáneamente. En los grupos del modelo crónico, se observó una reducción del peso corporal de aproximadamente un 13% en el grupo tratado solo con Doxorubicina y un 12.8% en el grupo tratado con Doxorubicina y Curcumina. En contraste, el grupo control mostró una pérdida de peso del 0.59% a las 48 horas, mientras que el grupo de 14 días presentó una ganancia de peso del 1.5%, como se muestra en la Tabla 4, la morfología de los riñones se muestra en la Figura 21.

GRUPOS	AGUDO 48 HORAS PESO EN GRAMOS.				CRÓNICO 15 DÍAS PESO EN GRAMOS.			
	Inicial	Final	diferencia	%	Inicial	Final	diferencia	%
CONTROL	25.7	25.55	-0.15	0.59	25.7	27	1.3	1.5
DOX	27.2	24.75	-2.45	9.01	26.62	23.15	-3.47	13.04
CURCUMINA	26.4	26	-0.4	1.52	25.7	26.5	0.8	3.11
DOX+CURCUMINA	28.77	26.1	-2.67	9.29	25.85	22.65	-3.2	12.28

Tabla 4. Efecto del tratamiento con Doxorubicina y/o Curcumina sobre el peso corporal en ratones. Se muestra la diferencia entre el peso inicial y final, así como, el porcentaje de peso perdido en cada tratamiento.

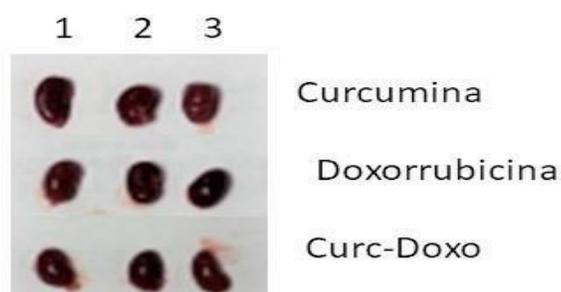


Figura 21. Morfología de los riñones tratados con Curcumina, Doxorubicina y Doxo-Curcumina.
Diferencias de los riñones por tratamiento.

13.1.2 Efecto hepatotóxico de la Doxorubicina y la Curcumina como hepatoprotectora.

Uno de los aspectos importantes observados en este grupo de ratones tratados con Doxorubicina y Curcumina fue el efecto hepatotóxico. Para su evaluación, se midieron las enzimas hepáticas mediante análisis de química sanguínea en estos ratones, y los resultados obtenidos fueron los siguientes: los grupos de control y Doxorubicina-Curcumina agudo presenta valores normales en todas las enzimas hepáticas. En el grupo de Doxorubicina agudo se observó un aumento significativo en los niveles de AST y ALT, lo cual sugiere un posible daño hepático severo. Los grupos con daño renal crónico (Curcumina, Doxorubicina, y Doxo-Cur) muestran niveles elevados de AST y ALT, lo que indica daño hepático, aunque en menor grado en comparación con el grupo de Doxorubicina agudo. El grupo de Curcumina de 48 horas presenta niveles más bajos de ALP y ALT, lo que podría sugerir una condición diferente que afecta estas enzimas. Estos resultados sugieren que el grupo tratado con Doxorubicina agudo presenta una afección hepática que requiere una mayor atención, dado el significativo daño observado (Tabla 5).

	AGUDO 48 HORAS				CRÓNICO 15 DÍAS		
	Control	Curcumina	Doxorrubicina	Doxo-Curcumina	Curcumina	Doxorrubicina	Doxo-Curcumina
FOSFATASA ALCALINA (ALP):	356 U/L valor normal	222 U/L valor bajo	468 U/L valor elevado	356 U/L valor normal	295 U/L valor normal	200 U/L valor bajo	188 U/L valor bajo
ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST O TGO):	249 U/L valor normal	254 U/L valor normal	1052 U/L valor extremadamente elevado, sugiere daño hepático severo	254 U/L valor normal	752 U/L valor elevado, marcado sugiere daño hepático moderado	R6: 908 U/L valor elevado sugiere daño hepático severo	895 U/L valor elevado sugiere daño hepático severo
ALANINO AMINOTRANSFERASA (ALT O TGP):	97 U/L valor normal	88 U/L valor bajo	160 U/L valor elevado daño hepático leve	105 U/L valor normal	186 U/L valor elevado daño hepático leve	138 U/L valor normal	152 U/L valor elevado

Tabla 5. Efecto del tratamiento de Doxorrubicina con o sin Curcumina sobre enzimas de función hepática.

13.2 Análisis Comparativo del Perfil Bioquímico entre Ratones R3 (Doxo) y R4 (Doxo-curcu)

- 1. Glucosa R3: 156 mg/dL R4: 113 mg/dL
- Interpretación: R3 presenta niveles elevados de glucosa, lo que sugiere hiperglucemia. En cambio, R4 tiene niveles más cercanos al rango normal, indicando un mejor control de la glucosa.
- 2. Urea R3: 74 mg/dL R4: 63 mg/dL
- Interpretación: Ambos ratones tienen niveles de urea elevados, pero R3 muestra una elevación mayor, lo que podría sugerir una mayor carga renal o un mayor catabolismo proteico en comparación con R4.
- 3. Ácido Úrico R3: 2.8 mg/dL R4: 1.2 mg/dL
- Interpretación: R3 tiene un nivel significativamente más alto de ácido úrico, lo que podría indicar un riesgo aumentado de hiperuricemia, mientras que R4 tiene un nivel dentro de un rango más normal.
- 4. Colesterol R3: 104 mg/dL R4: 78 mg/dL
- Interpretación: R3 tiene un nivel más alto de colesterol, lo que podría ser indicativo de un perfil lipídico menos favorable en comparación con R4, quien presenta niveles más bajos de colesterol.

- 5. Triglicéridos R3: 160 mg/dL R4: 114 mg/dL
- Interpretación: R3 tiene niveles más altos de triglicéridos, lo que podría estar relacionado con un mayor riesgo de dislipidemia y enfermedades cardiovasculares en comparación con R4.
- 6. Proteínas Totales R3: 8.6 g/dL R4: 6.9 g/dL
- Interpretación: R3 tiene un nivel más alto de proteínas totales, lo que podría indicar una posible inflamación o un estado hiperproteico, mientras que R4 tiene niveles dentro de un rango más típico.
- 7. Albúmina: R3: 4.2 g/dL R4: 3.5 g/dL
- Interpretación: Ambos ratones tienen niveles normales de albúmina, pero R3 muestra un nivel ligeramente superior, lo que podría reflejar una mejor función hepática o estado nutricional.
- 8. Amilasa R3: 947 U/L R4: 606 U/L
- Interpretación: R3 tiene un nivel elevado de amilasa, lo que podría indicar una mayor actividad pancreática o un problema pancreático en comparación con R4, quien tiene un nivel más bajo.
- 9. Fosfatasa Alcalina (ALP) R3: 468 U/L R4: 356 U/L
- Interpretación: R3 presenta niveles más altos de ALP, lo que podría estar relacionado con problemas hepáticos, óseos o biliares en comparación con R4.
- 10. Aspartato Aminotransferasa (AST o TGO) R3: 1052 U/L R4: 254 U/L
- Interpretación: R3 tiene niveles extremadamente elevados de AST, lo que sugiere daño hepático o muscular grave, mientras que R4 presenta un valor mucho más bajo, indicando mejor salud hepática o muscular.
- 11. Alanino Amino Transferasa (ALT o TGP) R3: 160 U/L R4: 105 U/L
- Interpretación: R3 tiene niveles elevados de ALT, indicando daño hepático más significativo en comparación con R4.

12. Calcio

- R3: 10.4 mg/dL R4: 9.4 mg/dL
- Interpretación: El valor de calcio en R3 es anormalmente alto, lo que sugiere un error en la medición o una condición extremadamente rara y grave. R4 tiene un valor de calcio dentro del rango normal.

- 13. Fósforo R3: 14.6 mg/dL R4: 10.6 mg/dL

- Interpretación: Ambos valores están elevados, pero R3 muestra un nivel más alto, lo que podría indicar una disfunción renal o paratiroidea en comparación con R4.
- 14. Hierro R3: 280 µg/dL R4: 199 µg/dL
- Interpretación: R3 tiene un nivel más alto de hierro, lo que podría reflejar un mayor almacenamiento de hierro o menor anemia en comparación con R4.
- 15. HDL R3: 42 mg/dL R4: 45 mg/dL
- Interpretación: R4 tiene un nivel ligeramente más alto de HDL, lo que es favorable para la salud cardiovascular en comparación con R3.
- 16. VLDL R3: 32 mg/dL R4: 23 mg/dL
- Interpretación: R3 tiene un nivel más alto de VLDL, lo que podría estar asociado con un mayor riesgo de triglicéridos elevados y aterosclerosis en comparación con R4.
- 17. LDL R3: 34 mg/dL R4: 23 mg/dL
- Interpretación: R3 presenta un nivel más alto de LDL, lo que sugiere un mayor riesgo de acumulación de placas arteriales y problemas cardiovasculares en comparación con R4.

Evaluación Comparativa General:

En resumen, R4 parece estar en mejor estado de salud en comparación con R3, quien muestra varios indicadores de posibles problemas hepáticos, renales, y un perfil lipídico menos favorable.

14.- RESUMEN BIOGRÁFICO

Felipe de Jesús Torres Del Muro

Candidato a Doctor en Ciencias con orientación en Inmunobiología

Tesis: Efecto protector de Curcumina por modulación de proteínas apoptoticas (Bcl-2, Bax) vía WT1 en un modelo murino de afección renal inducido por Doxorubicina.

Maestro en Ciencias con orientación en Inmunobiología.

Tesis: Modulación de la expresión de proteínas de apoptosis por siRNAs contra WT1 en tejido renal

Datos personales: nacido en Zacatecas, Zacatecas en marzo de 1986, hijo de Felipe Torres Najjar y Rogelia Del Muro López.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Zacatecas, Químico Farmacéutico Biólogo.

Servicio social realizado de agosto del 2008 a diciembre del 2009 en los Laboratorios de Inmunología y Biología Molecular de la Unidad Académica de Biología Experimental de la UAZ.