



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**Departamento de Fisiología y Farmacología**

**“ESTUDIO DE LOS EFECTOS NEFROTÓXICOS DEL NÍQUEL EN RATAS  
MACHOS ADULTOS-EFECTO DE LA QUERCETINA”**

Trabajo Realizado por:  
**LIC. EN BIOLOGÍA AARÓN EMMANUEL GONZÁLEZ ESQUIVEL**

Para obtener el grado de:  
**MAESTRO EN CIENCIAS, EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA**

Asesores:

**DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ.**

**DRA. MA. CONSOLACIÓN MARTÍNEZ SALDAÑA**

**DR. FRANCISCO ANIBAL POSADAS DEL RIO.**

Con la colaboración de:

**LCN MA. LUISA RODRÍGUEZ VÁZQUEZ**

Aguascalientes, Ags., Octubre del 2010.

## *Agradezco*

*Primeramente a Dios por brindarme toda la fortaleza en mi vida, por todas las alegrías, pero sobre todo por haberme mandado a todas aquellas personas a las que el día de hoy tengo el honor de llamar mi familia.*

*Gracias a mis padres por haberme apoyado en este sueño, por su comprensión y su cariño.*

*A mis hermanos, tíos y demás familiares, por el apoyo que me brindaron.*

*Y especialmente agradezco a todas esas personas que me enseñaron que la familia no es aquella que se une por la sangre, si no por el amor, gracias a todas esas personas que me brindaron cuando lo necesite el consejo de un padre, el amor de una madre y el apoyo de un hermano, gracias a todas aquellas personas a las que un día los considere mis amigos, pero que en realidad eran mi familia...mi muy amada familia. Gracias a Gustavo, Lety, Eunice, José de Jesús, Omar, Héctor y Arturo por enseñarme que un amigo es para siempre; a mis queridas pollitas Margarita, Laura Patricia, Giovanna, Laura Elisa, Cecilia, Sandra, Claudia, a ellas gracias por haberme enseñado que siempre habrá personas que se preocuparán por mi y más aun por siempre regalarme el universo en una sonrisa; gracias a Leoncio y a Pablo, por enseñarme que las batallas se luchan hasta el final y siempre dando lo mejor de uno; a mi abijada María del Refugio por enseñarme que la edad no es obstáculo para hacer una amistad; a Diana Marcela, por darle a la maestría un toque de familia; a mis tutores: el Dr. Fernando Jaramillo Juárez, por apoyarme y creer en mí; al*

Dr. Francisco A. Posadas del Río, por su asesoría en la cuestión teórica; a la Dr. Consolación Martínez Saldaña, por su apoyo en la parte histológica del proyecto; a la L.C.N. Ma. Luisa Rodríguez Vázquez, por su apoyo, consejo y guía en la cuestión práctica; a Ana Laura, Berenice Elizabeth y Gladis Judith, les agradezco el apoyo dado en la elaboración de este proyecto de vida; a mi amigo Fernando, gracias por enseñarme que hay veces en la vida en que uno tropieza, pero que siempre Dios nos dará una muleta para continuar el viaje y por último a mi fiel amigo Jesús Ángel, gracias por 14 años de cuidarme y guiarme.

A toda mi familia le envío este mensaje... "los amo, siempre estarán conmigo en mi corazón y a donde quiera que yo vaya y sin importar donde me encuentre, si me necesitan... I WILL FOLLOW YOU INTO THE DARK".

"Para vencer al mal... los hombres buenos deben llevar luz a la oscuridad" (AEQE, 2010).

## *Dedicatoria*

*El Esfuerzo y dedicación de este Taller de Investigación se lo dedico a todos aquellos a quienes considero mi familia.*

### *Mis Padres.*

*Enrique González Valadéz.*

*Ma. Concepción Esquivel Arenas.*

### *Mis Hermanos.*

*Enrique González Esquivel.*

*Sonia Ivette González Esquivel.*

### *Mis Tios.*

*Ma. Del Rosario García.*

*Graciela Linaritakis.*

*Fermin García Baeza.*

### *Todos Aquellos A Quienes Considero Mi Familia.*

*Laura Patricia Rodríguez Olmos.*

*Margarita López Obregón.*

*Giovanna de Jesús Villalobos Jiménez.*

*Laura Elisa Arguello Sánchez.*

*Sandra Álvarez Betancourt.*

*Claudia I. Luján García.*

*Erika Cecilia Sánchez Estrada.*

*Lety Vázquez Méndez.*

*Eunice Martínez Martínez.*

*Diana Marcela Santos Martell.*

*María del Refugio Bonilla Cabral.*

*Jesús Ángel Rodríguez García.*

*Pablo Cesar Hernández Romero.*

*Luis Fernando López Gutiérrez.*

*Leoncio Ibarra Almeida.*

*Jaime Escoto Rocha.*

*Edgar Omar Martínez Correa.*

*Gustavo Díaz Montañés.*

*Héctor Felipe Prado González.*

*Luis Arturo Arenas Huizar.*

*José de Jesús Guerra Vázquez.*

*"Lo único que necesita el mal para triunfar es que los hombres buenos no hagan nada" (Edmund Burke).*



Centro de Ciencias Básicas

**LIC. EN BIOLOGÍA AARÓN EMMANUEL GONZÁLEZ ESQUIVEL  
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA,  
P R E S E N T E .**

Estimado (a) Alumno (a) González:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o trabajo práctico titulado: **"ESTUDIO DE LOS EFECTOS NEFROTÓXICOS DEL NIQUEL EN RATAS MACHOS ADULTOS-EFECTO DE LA QUERCETINA"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE  
Aguascalientes, Ags., 7 de octubre de 2010  
"LUMEN PROFERRE"  
EL DECANO

DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ



c.c.p.- Archivo



**DR. FRANCISO J. ÁLVAREZ RODRÍGUEZ**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS.**  
**PRESENTE.**

Estimado Señor Decano:

Nos permitimos comunicarle que después haber analizado la versión escrita del trabajo de tesis "*Estudio de los efectos nefrotóxicos del níquel en ratas machos adultos-Efecto de la quercetina*", realizado por el Lic. en Biología Aarón Emmanuel González Esquivel, estudiante de la Octava Generación del programa de Maestría en Ciencias-Área Toxicología, consideramos que el trabajo:

- 1) Reúne los requisitos de una tesis de Maestría en Ciencias.
- 2) Genera información en el área de la Toxicología.


Por ello, y dado que este trabajo cumple con el requisito establecido en el Artículo 162-Inciso III del Reglamento General de Docencia de la UAA, damos nuestro voto aprobatorio para que la persona antes citada continúe con los trámites administrativos que le permitan presentar su examen de grado.

Aprovechamos este conducto para saludarlo cordialmente.

ATENTAMENTE  
Aguascalientes, Ags., a 6 de octubre de 2010.  
"SE LUMEN PROFERRE"

COMITÉ TUTORAL

  
DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ

  
DRA. MA. CONSOLACIÓN MARTÍNEZ SALDAÑA

  
DR. F. ANÍBAL POSADAS DEL RÍO

c.c.p.- Interesado.  
c.c.p.- Archivo.



## 1. RESUMEN

Los metales son compuestos tóxicos que representan un riesgo importante para la salud de los humanos. Ejercen sus efectos tóxicos al combinarse con uno o más grupos reactivos (ligandos) de las moléculas de las células, que son indispensables en el funcionamiento normal de órganos y tejidos. Los riñones de los mamíferos son órganos blanco para la acción tóxica de los metales, fundamentalmente por sus funciones de filtración de la sangre y concentración del líquido filtrado que finalmente constituirá la orina. El níquel (Ni) es un elemento metálico empleado en muchas aleaciones para fabricar monedas y principalmente acero inoxidable. Este metal contamina el ambiente por las actividades antropogénicas, entre ellas, las plantas de energía que queman petróleo o carbón y los incineradores de basura. Los compuestos de Ni pueden ingresar al organismo humano por diferentes vías: respiratoria, gastrointestinal o dérmica. La orina es la principal vía de excreción, aunque pequeñas cantidades de Ni también son excretadas por la bilis, el sudor o en las heces fecales. Los efectos tóxicos por la exposición ocupacional crónica al níquel incluyen: bronquitis, disminución de la función pulmonar, cáncer en pulmones y senos nasales. Estos efectos nocivos se presentan con frecuencia en los trabajadores de las refinerías o de plantas de procesamiento de níquel. La EPA-USA ha establecido que el polvo de níquel de las refinerías y el subsulfuro de níquel son agentes carcinógenos para los seres humanos. Los antioxidantes son sustancias que retardan o previenen la oxidación de los sustratos oxidables de las células y ejercen su efecto atrapando a las especies reactivas de oxígeno (ERO) o activando la batería de enzimas protectoras detoxificantes. La quercetina es un flavonoide con actividad antioxidante que se encuentra comúnmente en frutas y vegetales (cebolla, lechuga, etc.) en su forma glucosada, sin embargo, este compuesto puede actuar también como agente prooxidante mediante diversos mecanismos.

El objetivo de este trabajo fue analizar el daño a los riñones de ratas Wistar producido por el níquel y el efecto de la quercetina sobre este daño. Para ello, ratas Wistar macho de entre 200-250 g fueron divididas en cinco grupos: A) Control, B) Tratadas con NiCl<sub>2</sub>, C) Tratadas con Quercetina, D) Tratadas con quercetina + NiCl<sub>2</sub> (tratamiento preventivo) y E) Tratadas con NiCl<sub>2</sub> + quercetina (tratamiento correctivo). Al grupo de NiCl<sub>2</sub> se le administró una dosis única de 1 mg/Kg (vía i.p.), al de quercetina se le administró este flavonoide a dosis de 25 mg/Kg/día/5 días (vía i.p.), los animales del grupo D recibieron el tratamiento de cinco días de quercetina (dosis ya señaladas) y al sexto día NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, i.p.) y para el grupo E primero fue la dosis única de NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, i.p.) y posteriormente el tratamiento de cinco días con quercetina a las dosis antes descritas. Concluido el tratamiento con NiCl<sub>2</sub> y durante el de quercetina, se obtuvieron muestras de orina de las ratas tratadas y se midieron: el flujo, la osmolaridad, las concentraciones de glucosa (Trinder, 1969), fosfatos (Sumner, 1944), proteínas (Peterson, 1977), creatinina (Bauer, 1982) así como sodio y potasio (método flamométrico); además se determinaron las actividades de las enzimas transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo (TGP, Thompson y Meister, 1976), dipeptidilaminopeptidasa IV (DAP-IV, Rahfeld et al, 1991) y aminopeptidasa de alanina (APA, Lehky et al, 1973). Posteriormente, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de riñones para cuantificar las concentraciones de glutatión reducido (GSH, Cohn y Lyle, 1966), ATP (Adams, 1963) y malondialdehído (MDH, Draper H, Hadley, 1990). Por último, se realizó un estudio histológico a los riñones



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(Prophet et al, 1994). Los resultados obtenidos fueron analizados con las pruebas de ANOVA, Tukey-Kramer y *t* de *student*.

Con relación a los valores medios de los animales controles: 1) el grupo tratado con NiCl<sub>2</sub> presentó disminuciones significativas en los parámetros de osmolaridad y masa excretada de Na<sup>+</sup>, así como aumentos significativos en el flujo urinario, excreción de glucosa, concentración urinaria de creatinina y en las actividades urinarias de las enzimas APA y DAP-IV; 2) el grupo tratado con quercetina mostró aumentos significativos en la concentración urinaria de creatinina y en las actividad urinaria de las enzimas APA, DAP-IV y TGP; 3) el grupo de quercetina más NiCl<sub>2</sub> (tratamiento preventivo) tuvo disminución del flujo urinario y aumentos en la osmolaridad de la orina, la excreción de glucosa, la concentración urinaria de creatinina y la actividad urinaria de las enzimas APA, DAP-IV y TGP; 4) por último, el grupo tratado con NiCl<sub>2</sub> más quercetina (tratamiento correctivo) mostró incrementos en la osmolaridad de la orina, concentración urinaria de creatinina y la actividad urinaria de las enzimas APA, DAP-IV y TGP. Aunado a esto, todos los grupos presentaron aumento del estrés oxidativo de los riñones, acompañado de la disminución de la concentración de GSH y aumento de la de MDH; además, daño estructural renal, particularmente en los túbulos contorneados proximales. Este daño fue menor en los grupos de quercetina y preventivo.

De los resultados anteriores se puede concluir lo siguiente: 1) dosis bajas de NiCl<sub>2</sub> producen daño renal temprano a nivel funcional y estructural, 2) la quercetina es capaz de generar efectos tóxicos en los riñones debido a sus efectos pro-oxidantes y 3) el tratamiento preventivo con quercetina revierte parcialmente la toxicidad renal del níquel.

## 2. ÍNDICE

Agradecimientos.....	ii
Dedicatorias.....	iv
Carta de liberación del decano.....	vi
Carta de liberación del comité tutorial.....	vii
1. RESUMEN.....	viii
2. ÍNDICE.....	x
3. INTRODUCCIÓN.....	1
3.1 NÍQUEL.....	1
3.1.1 Usos.....	2
3.1.2 Fuentes de exposición.....	2
3.1.3 Toxicocinética.....	2
3.1.4 Toxicodinamia.....	3
3.1.5 Toxicidad renal del níquel.....	4
3.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y AGENTES ANTIOXIDANES.....	6
3.2.1 Quercetina.....	7
3.2.2 Propiedades farmacológicas.....	8
3.2.3 Actividad antioxidante.....	8
3.2.4 Quercetina y nefrotoxicidad por estrés oxidativo.....	9
3.2.5 Efectos adversos prooxidantes.....	10
4. JUSTIFICACIÓN.....	12
5. HIPOTESIS.....	13
6. OBJETIVOS.....	13
7. METODOLOGÍA.....	14
8. RESULTADOS.....	16
8.1 DAÑO RENAL POR NiCl <sub>2</sub> (1 mg/Kg, ip).....	16
8.2 QUERCETINA (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.) y DAÑO RENAL.....	20
8.3 DAÑO RENAL TRATAMIENTO PREVENTIVO (quercetina 25 mg/Kg/día, 5 días, i.p. + NiCl <sub>2</sub> 1 mg/Kg, i.p.).....	25
8.4 DAÑO RENAL TRATAMIENTO TERAPÉUTICO (NiCl <sub>2</sub> 1 mg/Kg, i.p. + quercetina 25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.).....	30
8.5 ESTUDIO ESTRUCTURAL.....	35
9. DISCUSIÓN.....	41
9.1 Peso corporal.....	41
9.2 Flujo urinario.....	41
9.3 Osmolaridad de la orina.....	42
9.4 Excreción urinaria de sodio y potasio.....	42
9.5 Excreción urinaria de glucosa y fosfatos.....	43
9.6 Excreción urinaria de proteínas.....	44
9.7 Creatinina en orina.....	44
9.8 Enzimuria.....	45
9.9 Concentración renal de glutatión reducido (GSH).....	46
9.10 Concentración de malondialdehído en los riñones.....	46
9.11 Concentración renal de ATP.....	47
9.12 Daño estructural de los riñones.....	47
10. CONCLUSIONES.....	49
11. GLOSARIO.....	50
12. BIBLIOGRAFÍA.....	52

### 3. INTRODUCCIÓN

Los metales son un grupo de compuestos tóxicos que representan un riesgo importante para la salud de los humanos y para el medio ambiente. Los metales ejercen sus efectos tóxicos al combinarse con uno o más grupos reactivos (ligandos) de las moléculas de las células, que son indispensables en el funcionamiento normal de los órganos y tejidos del organismo (Klaassen, 1996). Los riñones de los mamíferos son órganos blanco para la acción tóxica de los metales, fundamentalmente por sus funciones de filtración de la sangre y concentración del líquido filtrado que finalmente constituirá la orina (Lock, 1995).

Los metales tienen características especiales que juegan un papel importante en la toxicidad renal. Como elementos son indestructibles, ya que el hígado y los riñones no pueden destoxificarlos como lo hacen con los compuestos orgánicos. Los metales en su forma catiónica pueden existir en diferentes estados de oxidación y cada estado de oxidación generalmente difiere en la toxicidad renal. Sin embargo, en general, los cationes son capaces de formar complejos y quelatos con ligandos endógenos. Además, los compuestos orgánicos que contienen metales (organometálicos) difieren de su forma inorgánica para dañar los riñones. Finalmente, la acción tóxica de los metales sobre los riñones frecuentemente se realiza en las células proximales de la nefrona. De manera general, los procesos de reabsorción y secreción realizados en el túbulo proximal son los primeros en ser afectados. Así, se puede alterar la reabsorción de proteínas de peso molecular bajo, de aminoácidos y de glucosa, así como la secreción de ácido úrico (Clarkson y Shaikh, 1982).

#### 3.1 NÍQUEL.

El níquel (Ni) es un elemento metálico de número atómico 28 y masa atómica de 58.71. Pertenece al grupo VIII B de los metales de transición de la tabla periódica. Su rango de estados de oxidación va de  $-1$  a  $+4$ , pero el más común es el  $+2$ . El Ni es un metal duro, blanco-plateado, con alta conductividad térmica y eléctrica. Se encuentra en la corteza terrestre y es liberado al ambiente por las erupciones de los volcanes. El Ni se encuentra combinado principalmente con el oxígeno, arsénico, antimonio y azufre (sulfuros) y es uno de los pocos metales de transición que se pueden combinar con el monóxido de carbono de la atmósfera. Muchos compuestos de níquel son solubles en agua y tienen un color verde característico, aunque en su estado elemental o combinado no tiene olor ni sabor. Para usos industriales, su origen principal es la piritita, la cual contiene de 3-5% de níquel. Este metal contamina el ambiente a causa de las actividades antropogénicas, entre ellas, las plantas de energía que queman petróleo o carbón y los incineradores de basura. Tales actividades pueden desechar níquel en las aguas residuales (Stanley, 2003; [www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs/.5htm1](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs/.5htm1)).

Las propiedades del níquel y su distribución en el medio ambiente han sido resumidas por la Agencia de E.U.A. para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR, 1988). A su vez, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 1990) y el Departamento de Salud y Servicios Humanos de E.U.A. (USADHHS, 1994), basándose en estudios realizados con trabajadores del níquel y animales de laboratorio, clasificaron como carcinógeno a todos los compuestos

de níquel (con excepción del níquel metálico), aunque existe evidencia que sugiere que este metal puede ser un elemento traza esencial para los mamíferos (Goyer, 1996).

Hay cinco sustancias del níquel que han sido seleccionadas por la OMS como prioritarias para la evaluación de riesgos: polvo de níquel, sulfato de níquel, cloruro de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ), carbonato de níquel ( $\text{NiCO}_3$ ) y el nitrato de níquel [ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ]. El  $\text{NiCl}_2$  es clasificado como: carcinógeno clase I, tóxico para la reproducción clase II (puede causar daño a los niños en gestación) y tóxico crónico ([www.enia.org/index.cfm/ci\\_id/3741.htm](http://www.enia.org/index.cfm/ci_id/3741.htm)).

### 3.1.1 Usos.

El Ni es empleado en aleaciones para fabricar monedas y joyas. En la industria se usa para producir diversos artículos, como válvulas e intercambiadores de calor, aunque la mayor parte de este metal es utilizado para fabricar acero inoxidable. Muchas formas metálicas del níquel son resistentes a la oxidación del agua y del aire, a temperatura ambiente, y por eso son utilizadas para el galvanizado de materiales. Además, los compuestos de níquel se emplean en el coloreado de cerámicas, en la fabricación de baterías y como catalizadores (WHO, 1991; Klaassen y Watkins, 2001).

### 3.1.2 Fuentes de exposición.

En general, la contaminación de alimentos con níquel es la principal fuente de exposición para la población abierta; aproximadamente, se consumen  $170 \mu\text{g}/\text{día}$  en los alimentos, sobresaliendo por su alto contenido de níquel el chocolate, las habichuelas de soya, las nueces y la avena. Además, la ingesta diaria de níquel a través del agua potable es de aproximadamente  $2 \mu\text{g}$ ; a su vez, la cantidad que inhalamos oscila entre  $0.1-1 \mu\text{g}/\text{día}$ , sin incluir el Ni que se encuentra en el humo del tabaco. En el suelo, se encuentra adherido a partículas de polvo y de tierra o incrustado en minerales. Finalmente, puede estar disuelto en el agua o adherido a la materia suspendida en este líquido ([www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs/.5htm1](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs/.5htm1)).

### 3.1.3 Toxicocinética.

Al igual que la mayoría de los metales, la toxicidad del Ni depende de la vía de exposición, del tiempo de exposición y de la solubilidad de sus compuestos. Dicha toxicidad puede ser clasificada en inmunológica, neurológica, reproductiva y carcinógena (Coogan et al, 1989). Los compuestos de Ni pueden ingresar al organismo humano por diferentes vías (respiratoria, gastrointestinal o dérmica). Por inhalación, la cantidad de níquel que llega a los pulmones y pasa a la sangre depende del tamaño de las partículas: si son grandes permanecen en la nariz, pero si son pequeñas pueden alcanzar las partes más profundas de los pulmones. De esta manera, cerca del 30 % del níquel inhalado se deposita en los pulmones y, aproximadamente, el 20% es absorbido en el tracto respiratorio. Algunas de estas partículas se pueden deglutir y pasan al tracto gastrointestinal. Al respecto, la absorción de Ni en el tracto digestivo es baja ( $< 1 \%$ ) y la mayor parte se elimina por las heces fecales. También la absorción de este metal por

la piel es baja, en comparación con otras vías (www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\_phs/.5html).

Luego de su absorción, el níquel es transportado en el plasma sanguíneo unido principalmente a la albúmina. Este metal se puede distribuir en todos los órganos, entre ellos los riñones. La orina es la principal vía de excreción, aunque pequeñas cantidades de Ni también son excretadas por la bilis, el sudor o por el aire exhalado. La excreción en las heces fecales refleja la fracción no absorbida por ingestión oral. Wase et al (1954), administraron a ratones Ni<sup>63</sup>, vía intraperitoneal, y observaron una amplia distribución de este metal en todos los tejidos de los animales expuestos. En estudios con animales a corto y largo plazo, a los que se administraron diversas sales solubles de níquel por vía oral, se encontró este metal principalmente en los riñones. Las concentraciones relativas en los tejidos fueron: riñones> pulmones> hígado> corazón> testículos (Ambrose et al, 1976; Dieter et al, 1988). Independientemente de la ruta de exposición, la mayoría del Ni absorbido es excretado en la orina (Nielsen et al, 1999). Finalmente, el contenido total de Ni en el cuerpo de un individuo de aproximadamente 70 kg, no expuesto laboralmente a este metal, es de cerca de 0.5 mg (www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\_phs/.5html).

#### 3.1.4 Toxicodinamia.

En los animales de experimentación, la DL-50 de las sales de Ni varía entre 43-330 mg/Kg, cuando se administran por vía oral. En la intoxicación aguda por Ni los síntomas iniciales son dolor de cabeza y vómito, posteriormente (12 a 36 horas) se presenta: disnea, cianosis, leucocitosis y aumento de la temperatura corporal, así como delirio y otros signos en el sistema nervioso central. Las fallas respiratoria y cardiaca son la causa de la muerte de los humanos (Fairhurst e Illing, 1987). Es pertinente señalar que, en modelos experimentales, el níquel actúa como un vasoconstrictor potente de las arterias coronarias, aunque su papel en la enfermedad cardiovascular no ha sido dilucidado (Leach et al, 1985).

Los efectos tóxicos del Ni por exposición ocupacional crónica incluyen: bronquitis, disminución de la función pulmonar y cáncer en pulmones y senos nasales. Estos efectos nocivos se presentan con frecuencia en los trabajadores de las refinerías o de plantas de procesamiento de níquel. Por ello, se requiere realizar un control de exposición midiendo los niveles de este metal en las áreas de trabajo o sus concentraciones en la orina de los trabajadores (monitoreo biológico). En este contexto, se ha descrito que los efectos carcinógenos del Ni pueden estar relacionados con sus propiedades oxidantes que inducen la separación o ruptura de las hebras del ADN. Debido a lo anterior, la EPA-USA ha establecido que el polvo de Ni de las refinerías y el subsulfuro de Ni son agentes carcinógenos para los seres humanos (Massry y Glasscock, 2001; www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\_phs/.5html).

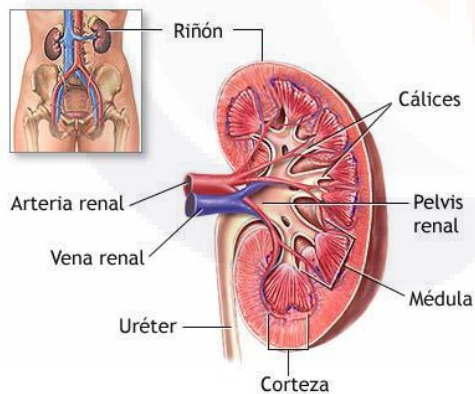
Debe señalarse también que, debido a la contaminación del ambiente, los habitantes de países industrializados frecuentemente pueden estar en contacto con el Ni y, por ello, las alergias cutáneas (dermatitis por contacto) producidas por este metal son muy comunes. Al respecto, se ha descrito que del 15-20 % de la población expuesta a la

contaminación ambiental por Ni ha resultado positiva con la prueba epicutánea (Bhramra y Costa, 1992; www.ncbi.nlm.nih.gov).

Respecto a las acciones tóxicas producidas por el níquel, se ha reportado que este metal disminuye las concentraciones celulares de glutatión (GSH) y de grupos tiol de las proteínas, lo que aumenta la concentración de especies reactivas de oxígeno como el ión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. A causa de ello, se genera lipoperoxidación, se daña la estructura del ADN y se altera la homeostasis del calcio y de los grupos sulfhidrilo. Además, en la mayoría de las membranas celulares (mitocondrias, microsomas y peroxisomas) se generan reacciones tipo Fenton (Stohs y Bagchi, 1995; Valko et al, 2005; Das et al, 2008).

### 3.1.5 Toxicidad renal del níquel.

Antes de abordar la toxicidad del Ni sobre los riñones, conviene describir algunos aspectos estructurales y funcionales de estos órganos. Al respecto, debe señalarse que la vida de los organismos multicelulares depende de la constancia en la composición de su medio interno. En los mamíferos, esta constancia se debe en gran parte al funcionamiento adecuado de los pulmones, el hígado y los riñones. En efecto, los riñones realizan una gran variedad de funciones orgánicas y la mayoría de ellas son esenciales para la vida (Eaton y Pooler, 2004; Jaramillo et al, 2006). Los riñones están situados fuera de la cavidad peritoneal, contra la pared abdominal posterior, uno a cada lado de la columna vertebral. En un corte longitudinal del riñón se identifican dos regiones: la región externa llamada corteza y la región interna llamada médula (Figura 3-1).



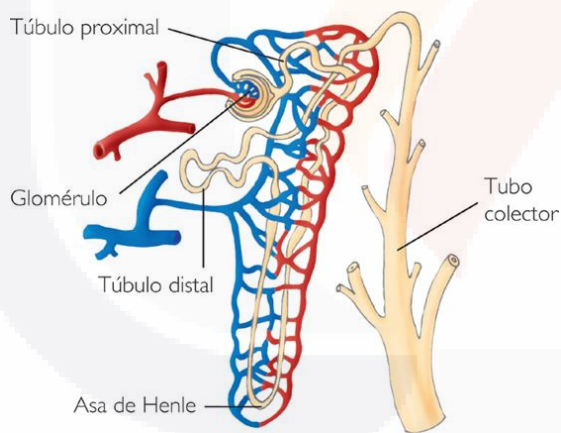
**Figura 3-1.** Estructura macroscópica del riñón.

En los mamíferos, los riñones participan de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal. Las funciones de estos órganos incluyen: 1) regulación del contenido de agua y electrolitos en los líquidos corporales, 2) excreción de los productos de desecho derivados del metabolismo celular, 3) participación en la regulación de la presión arterial a través del sistema renina-angiotensina, 4) eliminación de sustancias extrañas al organismo (xenobióticos), 5) reabsorción de sustancias útiles para las células como la glucosa, los electrolitos y los aminoácidos y 6) participación en la regulación del equilibrio ácido-base de los líquidos corporales. Los riñones están formados por estructuras vasculares y epiteliales y su funcionamiento correcto depende



de las acciones combinadas de ambos componentes. La unidad básica estructural y funcional de estos órganos es la nefrona, la cual consiste de un aparato de filtración o glomérulo, conectado a una porción tubular larga que reabsorbe y secreta sustancias, determinando la presencia de solutos en el líquido tubular. Para su estudio, la porción tubular de la nefrona ha sido dividida en diferentes segmentos que incluyen: túbulo contorneado proximal, asa de Henle, túbulo contorneado distal y túbulo colector (Figura 3-2).

En los riñones humanos existen aproximadamente dos millones de nefronas. Para desarrollar su trabajo, las nefronas realizan tres procesos fundamentales: la filtración glomerular, la reabsorción tubular y la secreción tubular. Estos procesos se desarrollan de manera continua y simultánea. En efecto, a medida que el filtrado glomerular fluye en el interior de los túbulos, disminuye su volumen y se modifica su composición mediante los procesos de reabsorción (retiro de agua y solutos) y de secreción de sustancias en el líquido tubular, para formar finalmente la orina. La comparación de la composición del plasma y de la orina muestran la magnitud de estos cambios y subraya la eliminación de los desechos metabólicos, así como la conservación del agua y sustancias útiles para las células. El daño funcional o estructural de los riñones disminuye la calidad de vida de los humanos y, con frecuencia, conduce a estados fisiopatológicos graves como la insuficiencia renal aguda o crónica y a la muerte (Eaton y Pooler, 2004; Jaramillo et al, 2006).



**Figura 3-2.** Estructura de la nefrona

Se ha reportado que la nefrotoxicidad de los compuestos de Ni disminuye en el siguiente orden: carbonatos > sulfuros > sulfatos > óxidos. Al respecto, en estudios *in vitro* la incubación previa de rebanadas de corteza renal de la rata con diferentes compuestos de Ni (hasta por 4 horas), seguida de la incubación con p-aminohipurato (PAH, 74  $\mu\text{M}$ ) durante 2 horas, disminuyó la captación del PAH en estas rebanadas, de manera dependiente del tiempo. Además, la magnitud de la reducción de la captación fue dependiente de las formas químicas (especiación) de los compuestos usados en el estudio. Así, las relaciones de concentración de PAH rebanadas/medio fueron equivalentes al 45, 48 y 66% de los valores controles, después del pretratamiento con subsulfuro de níquel (1.5 mM), sulfato de níquel (4 mM) y óxido de níquel (2.98 mM), respectivamente (www.ncbi.nlm.nih.gov).



Por otra parte, en un estudio de nefrotoxicidad crónica, ratas Wistar machos y hembras recibieron NiSO<sub>4</sub> en el agua para beber (100 mg/L), durante 6 meses. Al final del tratamiento, la excreción urinaria de albúmina fue de 354 y de 1319 µg/24 h/L para las hembras controles y las expuestas, respectivamente (P<0.05), así como de 989 y 2065 µg/24h/L para los machos controles y animales expuestos, respectivamente (P>0.05, no significativo). Además, el peso de los riñones aumentó significativamente en los animales tratados con Ni. Estos resultados muestran que la exposición crónica a concentraciones bajas de Ni induce cambios en la permeabilidad de los glomérulos de las ratas hembras (de menor intensidad en los machos) o aumenta las lesiones normales de los glomérulos (glomerulonefritis) que se presentan con el envejecimiento de las ratas (www.ncbi.nlm.nih.gov).

### 3.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y AGENTES ANTIOXIDANTES.

Durante la función normal de las células se producen especies reactivas de oxígeno (ERO) o radicales libres de oxígeno que incluyen: los radicales hidroxil (<sup>•</sup>OH), el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el óxido nítrico (NO). Estas especies son transitorias y tienen una elevada reactividad química que puede conducir a la lipoperoxidación y a la oxidación de proteínas y del ADN. En condiciones normales, los sistemas antioxidantes de las células neutralizan o minimizan las alteraciones causadas por las ERO. Sin embargo, cuando aumenta la generación de ERO hasta una concentración que supera a los antioxidantes celulares, aparece el **estrés oxidativo** (Matés, 2000).

Los **antioxidantes** son sustancias que retardan o previenen la oxidación de los sustratos oxidables de las células y ejercen su efecto atrapando a las ERO o activando la batería de proteínas protectoras detoxificantes. La prevención de la oxidación es un proceso esencial en todos los organismos aeróbicos, de tal manera que la disminución de la protección antioxidante puede conducir a la citotoxicidad, mutagenicidad y/o carcinogenicidad (Matés, 2000). En la célula existen diferentes sistemas antioxidantes y el glutatión forma parte de ellos. Así, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es reducido por el GSH en presencia de la GSH peroxidasa, enzima dependiente de selenio. Como consecuencia, el GSH se oxida a GSSG, el cual se reduce rápidamente a GSH por la GSSG reductasa a expensas de NADPH, formando de esta manera un sistema cerrado (ciclo redox). La reducción de hidroperóxidos orgánicos por el GSH puede ser catalizada tanto por esta peroxidasa selenio dependiente como por la acción de la peroxidasa selenio-independiente (glutatión-S transferasa) (Maxwell, 1995).

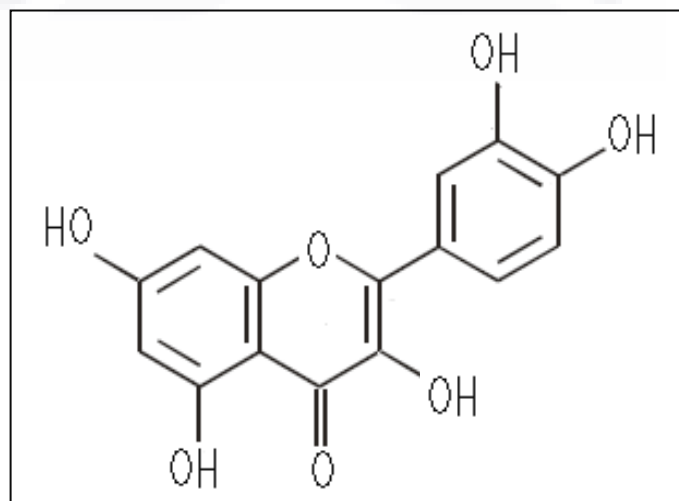
Conviene señalar que el glutatión (GSH) es un tripéptido (L-γ-glutamyl-L-cisteinil-glicina) cuya concentración intracelular es del orden milimolar, lo que lo convierte en el principal tiol no protéico en las células aeróbicas. El glutatión es sintetizado en el hígado a partir de la γ-glutamylcisteína, reacción catalizada por la GSH sintetasa. La cisteína proporciona la capacidad funcional del péptido al proveer el grupo tiol reactivo (-SH) (Reed, 1990). Bajo condiciones fisiológicas, la enzima glutatión reductasa cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG), de tal manera que más del 98 % del glutatión intracelular se encuentra en la forma tiólica (GSH) y el resto en la forma de disulfuro (GSSG), disulfuro mixto (GSS-proteína) y como tioéteres. Las

funciones del GSH incluyen: 1) detoxificación de compuestos endógenos y exógenos como especies reactivas de oxígeno e intermediarios reactivos, 2) mantenimiento de la estructura normal de las proteínas y otras moléculas (grupos tiol) y 3) proporciona a la célula equivalentes reductores del tipo NADPH (DeLeve y Kaplowitz, 1991).

### 3.2.1 Quercetina.

Desde hace siglos, los fármacos obtenidos de los vegetales han sido utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades. Por ello, estas sustancias son una fuente de importantes investigaciones farmacológicas y toxicológicas. Al respecto, el Ginkgo biloba (Gb), planta que pertenece a la familia Ginkgoaceae, se ha utilizado en la medicina china tradicional para tratar el asma, la enuresis y la tos. Sin embargo, a partir de 1990, el extracto de las hojas de este árbol fue ampliamente conocido y consumido, una vez que se descubrió su capacidad para mejorar la memoria (Ziemmerman et al., 2002). Además, los efectos antioxidantes del Gb se han corroborado por la reducción de la lipoperoxidación en diferentes tejidos animales (Pietri et al., 1997). En la década de 1950, se investigaron las propiedades químicas y farmacológicas de las hojas de Gb y se estandarizó el extracto concentrado conocido como EGb 761. Los principales constituyentes del Gb son: lactosas sesquiterpénicas (bilobálide) y diterpénicas (ginkgólidos A, B, C, J y M), bioflavonas (ginkgetina, isoginkgetina y bilbobetina), flavonoides (**quercetina**, camferol) y pequeñas cantidades de ácido ginkgólico. Los extractos estandarizados contienen dos fracciones principales: flavonoides (24%) y lactosas terpénicas (6%) (Jacobs y Browner, 2002).

La quercetina (3,3',4',5, 7-pentahidroxiflavona) es uno de los flavonoides más abundantes de su tipo (Figura 3.3). Se encuentra comúnmente en frutas y vegetales (cebolla, lechuga, etc.) en su forma glucosada (Moon et al, 2000; Shirai et al, 2002; Jovanovic y Simic, 2000). Las concentraciones mayores de quercetina se encuentran en las cebollas (280-490 mg/Kg de porción comestible), en las cerezas (10-15 mg/Kg) y en la grosella negra (37 mg/Kg de quercetina y 1 mg/Kg de canferol). La grosella roja contiene de 8 a 13 mg/Kg de quercetina, las uvas rojas de 15 a 37 mg/Kg y las uvas blancas entre 2 y 12 mg/Kg (García, 2005).



**Figura 3.3** Estructura molecular de la quercetina.

(Russo y Sánchez, 2006)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Es importante señalar que la quercetina es un potente antioxidante que ha sido utilizado en diversos estudios farmacológicos y toxicológicos (Francescato et al., 2004; Sánchez et al., 2005; Morales et al., 2006).

### 3.2.2 Propiedades farmacológicas.

A los flavonoides se les atribuyen varias propiedades farmacológicas, entre ellas: antioxidantes, antiasmáticas, inhibidores de enzimas (hidrolasas, ciclooxigenasas, fosfodiesterasas, ATP-etasas, transferasas, oxidoreductasas, etc.), antiinflamatorias, anticancerígenas, antibacterianas, antivirales, vasodilatadoras, inhibidores de la agregación plaquetaria y de los síntomas alérgicos (Nijveldt et al., 2001; Drago et al., 2006).

### 3.2.3 Actividad antioxidante.

Los flavonoides neutralizan a las ERO porque reaccionan con ellas y las inactivan gracias a la elevada reactividad de sus grupos hidroxilo, de acuerdo con la siguiente reacción:



en donde  $\text{R}\cdot$  es un radical libre (Nijveldt et al., 2001).

La actividad antioxidante de los flavonoides (como la quercetina) resulta de una combinación de sus propiedades quelantes y secuestradoras de radicales libres. Además, la inhibición de oxidasas, como lipooxigenasa (LO), ciclooxigenasa (CO), mieloperoxidasa (MPO), NADPH oxidasa y xantina oxidasa (XO), evita la generación de ERO in vivo así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, los flavonoides también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (FLA2), al mismo tiempo que estimulan otras enzimas con reconocidas propiedades antioxidantes como la catalasa (CAT) y la superóxido-dismutasa (SOD). De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de formación y propagación de radicales libres.

La quercetina tiene efectos citoprotectores mediados por la disminución de la generación de radicales derivados del NO. Tales efectos son manifiestos en fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxina-butionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa (Huk et al, 1998; Shutenko et al, 1999). Además, previene el daño tubular y la inflamación intersticial (Shoskes, 1998), también parece evitar la peroxidación lipídica en la obstrucción biliar y disminuye el depósito de colágeno y la fibrogénesis (William et al, 2000).

Para actuar como antioxidante, la quercetina secuestra oxígeno reactivo especialmente en la forma de aniones superóxido, radicales hidroxil, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. Por ello, bloquea los efectos nocivos de tales sustancias sobre las células. La inhibición de algunas oxidasas es otro de los mecanismos de la acción

antioxidante de la quercetina. Asimismo, *in vitro* ha demostrado inhibir la oxidación por los macrófagos de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), reduciendo con ello la citotoxicidad de las LDL oxidadas. La propiedad antioxidante de la quercetina se manifiesta también por la inhibición de la peroxidación lipídica, por mecanismos como la inhibición de la actividad de la fosfolipasa A2 en neutrófilos y la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa en plaquetas indemnes (Sankara et al, 1972; Havsteen, 1983; Villar del Fresno, 1999; MERCK, 2000). La quercetina también tiene la capacidad de unirse a la cabeza polar de los fosfolípidos membranales, evitando así que los agentes oxidantes accedan a la fracción hidrofóbica de las membranas. Esto protege a las células contra la lipoperoxidación, el evento inicial de daño celular (Erleiman *et al*, 2004).

### 3.2.4 Quercetina y nefrotoxicidad por estrés oxidativo.

Uno de los mecanismos por el cual la quercetina podría reducir la nefrotoxicidad producida por el níquel, puede estar relacionado con sus propiedades antiinflamatorias y relajantes vasculares, a través del metabolismo del ácido araquidónico. En efecto, un desequilibrio en la síntesis de prostaglandinas puede provocar alteraciones cardiovasculares y renales. Al respecto, los flavonoides han mostrado ser inhibidores de la síntesis de eicosanoides porque inhiben las actividades de la lipooxigenasa (Yoshimoto et al, 1983) y de la ciclooxigenasa (Moroney et al, 1988). Este efecto supondría la inhibición de mediadores vasoconstrictores (prostaglandinas vasoconstrictoras, tromboxanos, etc.) implicados en el daño renal producido por vasoconstricción. Estos mecanismos, además están estrechamente relacionados con la actividad más importante de la quercetina que es la antioxidante e inhibidora de la peroxidación lipídica (Das y Ray, 1988; Sahu y Washington, 1991 y 1992).

En un estudio realizado en ratas, se demostró el efecto protector de la quercetina contra la nefrotoxicidad por estrés oxidativo causada por un quelato de hierro (nitriltriacetato ferrico, Fe-NTA). El pretratamiento con quercetina (2 mg/Kg, ip), 30 minutos antes de la administración del Fe-NTA (8 mg Fe/Kg, ip), disminuyó marcadamente la disfunción renal, las alteraciones morfológicas y redujo las concentraciones de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), restableciendo también las enzimas antioxidantes depletadas (Singh et al.,2004). Además, se ha reportado que el tratamiento con quercetina (50 mg/Kg) disminuye las alteraciones funcionales, histológicas e inmunohistoquímicas producidas por el cisplatino (Francescato et al., 2004).

Por otra parte, la administración oral de quercetina (10 mg/Kg/día, durante 4 semanas) a ratas diabéticas, disminuyó significativamente la disfunción renal y el estrés oxidativo (Anjaneyulu y Chopra, 2004). También ha sido descrito que el pretratamiento de ratas Wistar con este flavonoides disminuye el daño y la lipoperoxidación hepática producida por la N-dietilnitrosamina (Sánchez et al., 2005). Además, se ha visto que la administración de quercetina a ratas Wistar disminuye el daño tubular renal y el estrés oxidativo inducido por el cadmio (Morales et al., 2006). En años recientes, Amalia et al. (2007) reportaron efectos benéficos de la quercetina sobre la fibrosis hepática de ratas cirróticas, debido al incremento en la actividad antioxidante y la disminución de efectos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

prooxidantes. Finalmente, Yao et al. (2007) encontraron que la quercetina protege a los hepatocitos contra el estrés oxidativo causado por el etanol.

### 3.2.5 Efectos adversos prooxidantes.

Como antes se señaló, los flavonoides ocupan un lugar destacado en la familia de los antioxidantes. Sin embargo, estos compuestos pueden actuar también como **agentes prooxidantes** mediante mecanismos que incluyen la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I), la generación de ERO, así como afectando las funciones del sistema de defensa antioxidante de las células mediado por el glutatión reducido (GSH) (Pérez, 2003).

En este contexto, se ha descrito que cuando la quercetina ejerce su actividad antioxidante es convertida en compuestos potencialmente tóxicos derivados de procesos oxido-reductores involucrados en su biotransformación (Boots et al., 2007; Metodiewa et al., 1999). Estos compuestos son la o-quinona (QQ) y la o-semiquinona, los cuales pueden reaccionar con el GSH para formar 6-GSQ y 8-GSQ, lo que disminuye la concentración celular del GSH. Por lo tanto, en ausencia de GSH, los GSQ pueden realizar reacciones de arilación con los grupos tioles de las proteínas (Boots et al., 2003).

Profundizando en este tema, es pertinente señalar que las quinonas son productos de la oxidación de los grupos -OH presentes en los fenoles. Una característica importante de las quinonas es su deficiencia de electrones, por lo tanto, estas especies sufren reacciones de transferencia electrónica reversible, lo que produce que se autooxiden o se autoprotoneen de manera casi simultánea (Graham, 1978). Dependiendo de la posición del alcohol que se ha oxidado, se forman dos tipos de quinonas: las orto y las p-quinonas, de las cuales debido al acercamiento de los orbitales moleculares de los grupos involucrados, las p-quinonas son considerablemente más estables que las o-quinonas (López y Arancibia, 2008). También existen evidencias de que la quercetina inhibe a la NADPH-reductasa del citocromo P450 (CYP450) en microsomas hepáticos. Es factible que este efecto impida el metabolismo de muchos xenobióticos que son oxidados por el CYP450 (Pérez, 2003).

Ferraresi et al. (2005) al analizar los efectos anti y prooxidantes de la quercetina, en función del tiempo de exposición, encontraron lo siguiente: en periodos cortos de tratamiento ejerce efectos antioxidantes y disminuye los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que en periodos prolongados muestra una actividad prooxidante; además, en los periodos prolongados, el contenido celular de GSH se redujo. Por otra parte, en estudios celulares *in vitro*, Robaszkiewicz et al. (2007) encontraron que la quercetina disminuyó la producción de ERO en las células, pero indujo estrés oxidativo por la producción de peróxidos. Así, a concentraciones bajas, la quercetina estimuló la proliferación celular e incrementó la capacidad antioxidante total de las células, mientras que a concentraciones altas disminuyó la supervivencia y viabilidad celular, el contenido de tioles, la capacidad antioxidante total y las actividades de las enzimas SOD, CAT y glutatión S-transferasa.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Relacionado con lo anterior, experimentalmente se ha encontrado que la vitamina C trabaja junto con la vitamina E para prevenir la lipoperoxidación, sin embargo, al igual que la quercetina, las dosis altas de vitamina C pueden originar la formación de sustancias tóxicas (Das et al, 2008).



#### 4. JUSTIFICACIÓN

Los efectos nefrotóxicos tempranos o iniciales de los metales han sido poco estudiados, ya que muchos investigadores utilizan dosis altas y, frecuentemente, tiempos prolongados de tratamiento, con lo que se soslaya información que puede ser importante para valorar el daño inicial producido por los metales. Por ello, con este trabajo se pretende colaborar en el conocimiento de las acciones tóxicas tempranas producidas por el níquel. Esta información puede ser de utilidad clínica para los médicos que atienden a los trabajadores expuestos a este metal, así como para ampliar el espectro de la toxicidad renal producida por el níquel.





## 5. HIPOTESIS

La administración de dosis bajas de níquel a ratas produce alteraciones importantes de las funciones renales que pueden ser modificadas por la quercetina.

## 6. OBJETIVOS

a) General.

Analizar el daño de los riñones de ratas Wistar producido por el níquel y el efecto de la quercetina sobre este daño.

b) Específicos:

En ratas Wistar machos adultos, analizar el curso temporal de la toxicidad renal de una dosis baja de níquel y el efecto de la quercetina sobre este daño, mediante:

1.- Las determinaciones de las actividades urinarias de la Transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo, Dipeptidilaminopeptidasa-IV y Aminopeptidasa de alanina (enzimuria).

2.- Las mediciones del peso corporal, volumen y osmolalidad de la orina.

3.- Las concentraciones urinarias de proteínas, sodio, potasio, glucosa y fosfatos.

4.- La concentraciones en orina de creatinina.

5.- Las concentraciones renales de malondialdehído, GSH y ATP.

6.- Las alteraciones estructurales de los riñones.

**NOTA.-** Las determinaciones anteriores fueron hechas en los siguientes tiempos: 0-5, 19-24, 48, 72, 96 y 120 horas.

## 7. METODOLOGÍA

El estudio se realizó en ratas Wistar machos de 200-250 g de peso. Se trabajó con 5 grupos de ratas (10 ratas/grupo): 1) control (sin tratamiento), 2) tratado con NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, i.p.), 3) tratado con quercetina (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.), 3) tratamiento preventivo quercetina (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.) + NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, i.p.) y 5) tratamiento terapéutico NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, i.p.) + quercetina (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.). Así, los grupos de animales de experimentación quedaron establecidos de la siguiente manera:

**Tabla 7-1.** Grupos de animales de experimentación.

TESTIGOS	TRATADOS NiCl <sub>2</sub>	TRATADOS Quercetina	TRATADO PREVENTIVO (Quercetina + NiCl <sub>2</sub> )	TRATADO TERAPÉUTICO (NiCl <sub>2</sub> + Quercetina)
↓	↓	↓	↓	↓
Se colocaron las ratas en jaulas metabólicas y se colectaron muestras de orina: 0-5, 19-24, 48*, 72*, 96*, 120* hs. * (periodos de 5 h).  Posteriormente se realizaron las pruebas programadas en la orina: enzimuria y otras pruebas renales.	Se les administró NiCl <sub>2</sub> a las ratas (1 mg/Kg, i.p.), y se colocaron las ratas en jaulas metabólicas, posteriormente se colectaron las muestras de orina: 0-5, 19-24, 48*, 72*, 96*, 120* hs * (periodos de 5 h).  Posteriormente se realizaron las pruebas programadas en la orina: enzimuria y otras pruebas renales.	Se les administró a las ratas quercetina (25 mg/Kg/día, i.p.), durante 5 días, al día siguiente se colocaron las ratas en jaulas metabólicas y se colectaron las muestras de orina: 0-5, 19-24, 48*, 72*, 96*, 120* hs * (periodos de 5 h).  Posteriormente se realizaron las pruebas programadas en la orina: enzimuria y otras pruebas renales.	Se les administró a las ratas quercetina (25 mg/Kg/día, i.p.) durante 5 días, al día siguiente se les administró NiCl <sub>2</sub> (1 mg/Kg, i.p.), después se colocaron en jaulas metabólicas y se colectaron las muestras de orina 0-5, 19-24, 48*, 72*, 96*, 120* hs * (periodos de 5 h).  Posteriormente se realizaron las pruebas programadas en la orina: enzimuria y otras pruebas renales.	Se les administró NiCl <sub>2</sub> a las ratas (1 mg/Kg, i.p.), al día siguiente se inició el tratamiento con quercetina (25 mg/Kg/día, i.p.), durante 5 días, simultáneamente, se colocaron las ratas en jaulas metabólicas y se colectaron las muestras de orina 0-5, 19-24, 48*, 72*, 96*, 120* hs * (periodos de 5 h).  Posteriormente se realizaron las pruebas programadas en la orina: enzimuria y otras pruebas renales.
↓	↓	↓	↓	↓
Se sacrificaron los animales y se realizó la cuantificación de MD, GSH y ATP en corteza renal. Posteriormente se realizó el estudio histológico de los riñones.	Se sacrificaron los animales y se realizó la cuantificación de MD, GSH y ATP en corteza renal. Posteriormente se realizó el estudio histológico de los riñones.	Se sacrificaron los animales y se realizó la cuantificación de MD, GSH y ATP en corteza renal. Posteriormente se realizó el estudio histológico de los riñones.	Se sacrificaron los animales y se realizó la cuantificación de MD, GSH y ATP en corteza renal. Posteriormente se realizó el estudio histológico de los riñones.	Se sacrificaron los animales y se realizó la cuantificación de MD, GSH y ATP en corteza renal. Posteriormente se realizó el estudio histológico de los riñones.

**NOTAS:** 1) la dosis de NiCl<sub>2</sub> (1 mg/kg, ip) es 20 veces menor que su DL-50 para ratas adultas (Gitlitz et al, 1975; Soria et al, 1995) y 2) la quercetina (25 mg/Kg/día, 5 días) se administró por vía intraperitoneal, ya que la absorción por vía oral no es completa (Terao, 1999; Formica y Regelson, 1995).

Los métodos analíticos que se evaluaron fueron los siguientes:

**Tabla 7-2.** Métodos analíticos evaluados.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>MÉTODO</b>
-Actividad de transpeptidasa de $\gamma$ -glutamilo	* Thompson y Meister, 1976.
-Actividad de dipeptidilaminopeptidasa IV	*Rahfeld et al, 1991.
-Actividad de aminopeptidasa de alanina	*Lehky et al, 1973.
-Concentraciones de glucosa y fosfatos en orina.	*Trinder, 1969; *Sumner, 1944.
-Concentración de proteínas en orina.	* Peterson, 1977.
-Concentración de creatinina en orina.	*Bauer, 1982.
-Malondialdehído en riñones	*Draper H, Hadley, 1990.
-Concentración de GSH en riñones	*Cohn y Lyle, 1966.
-ATP en riñones	*Adams, 1963.
-Concentraciones de sodio y potasio en la orina.	*Método flamométrico.
-Osmolalidad de orina.	*Método osmométrico.
-Estudio histológico de los riñones.	*Técnica histológica por inclusión en parafina (tinción H/E). Prophet et al, 1994.

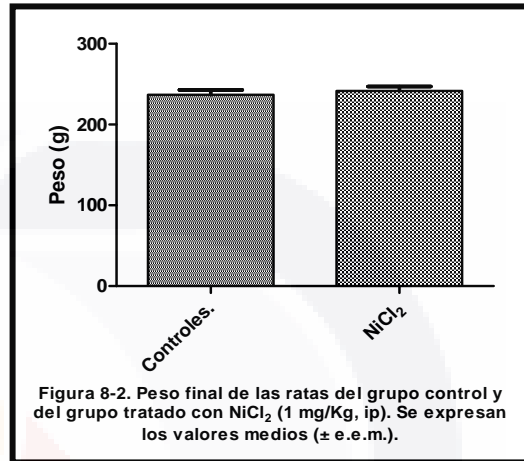
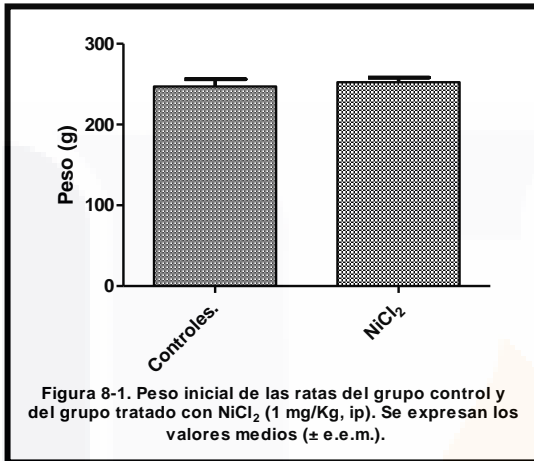
Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con las pruebas de ANOVA y de Tukey-Kramer. Además se utilizó la *t* de *student* como apoyo en algunos casos.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 DAÑO RENAL POR NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, ip).

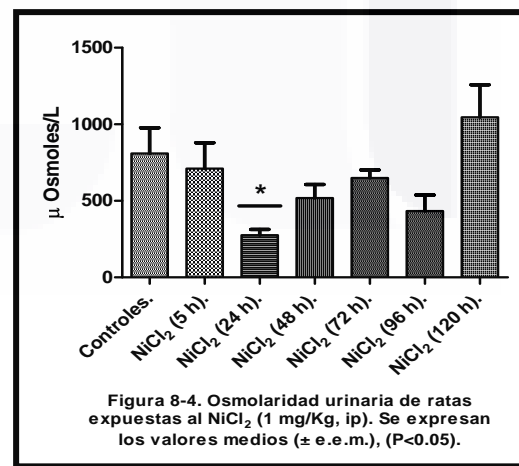
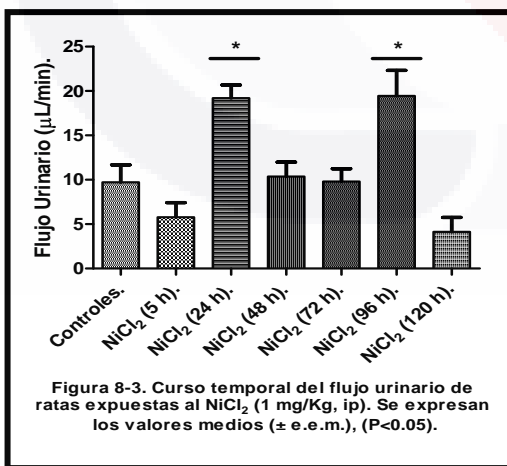
\* Peso corporal.

No hubo cambios significativos en los pesos corporales (inicial y final) de los animales tratados estudiados (tabla 8-2 y figuras 8-1, 8-2, respectivamente).



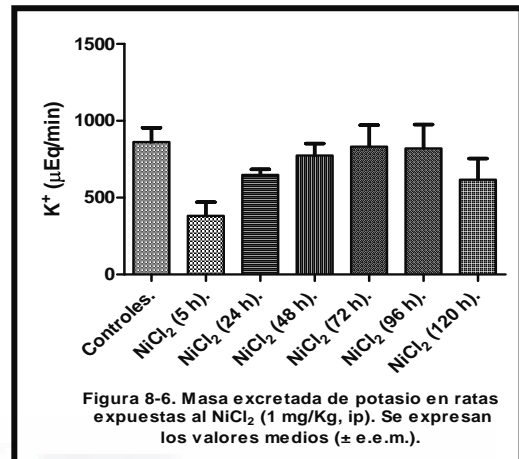
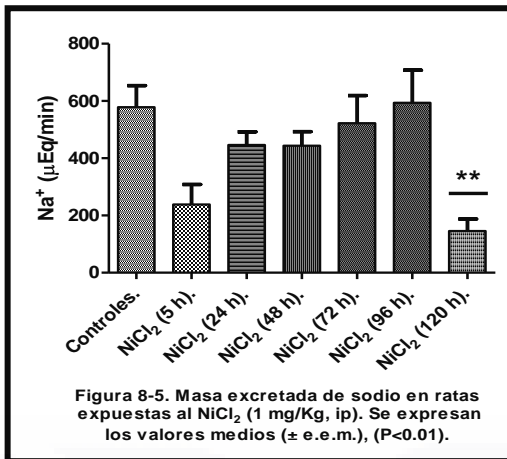
\* Flujo Urinario y Osmolaridad.

Con respecto al grupo control, el flujo urinario aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) a las 24 y 96 h (98 % y 100 %, respectivamente) en los animales tratados con NiCl<sub>2</sub> (figura 8-3 y tabla 8-1). Mientras que para la osmolaridad, con relación al control, se presentó una disminución en los mismos tiempos, pero solo hubo significancia estadística ( $P < 0.05$ ) a las 24 h con una disminución del 66% (figura 8-4 y tabla 8-1).



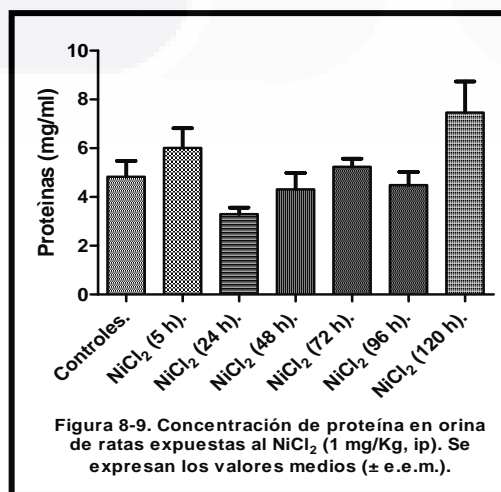
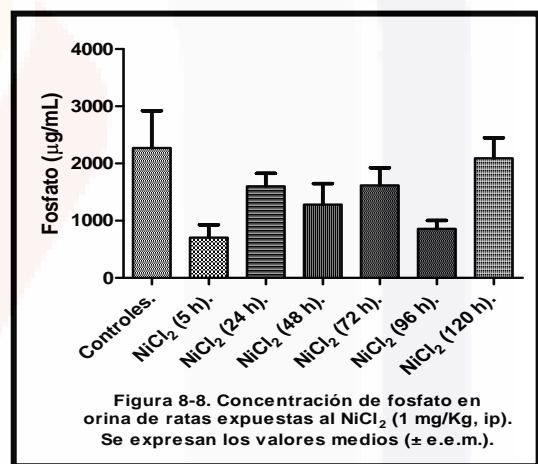
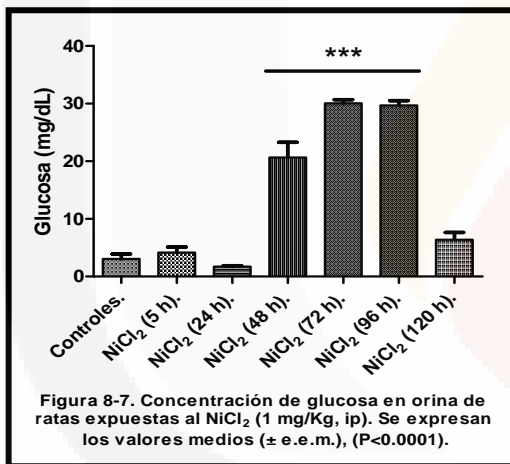
\* Masa Excretada de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup>.

Con relación al grupo control, la masa excretada de Na<sup>+</sup> disminuyó de manera no significativa a las 5 h y de manera significativa ( $P < 0.01$ ) a las 120 h (75 %). Para el K<sup>+</sup> hubo tres disminuciones no significativas a las 5, 24 y 120 h (56%, 25% y 28% respectivamente), (figuras 8-5, 8-6 y tabla 8-1).



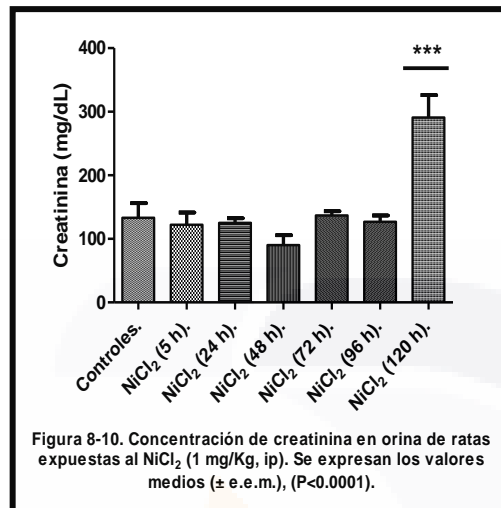
\* Glucosa, Fosfatos y Proteínas en Orina.

Para la concentración urinaria de glucosa, se observó un incremento altamente significativo (P<0.0001) a las 48, 72 y 96 h (577%, 886% y 873%, respectivamente), (figura 8-7 y tabla 8-1); mientras que para las concentraciones de fosfatos y proteínas en la orina no hubo cambios significativos (figuras 8-8, 8-9 y tabla 8-1).



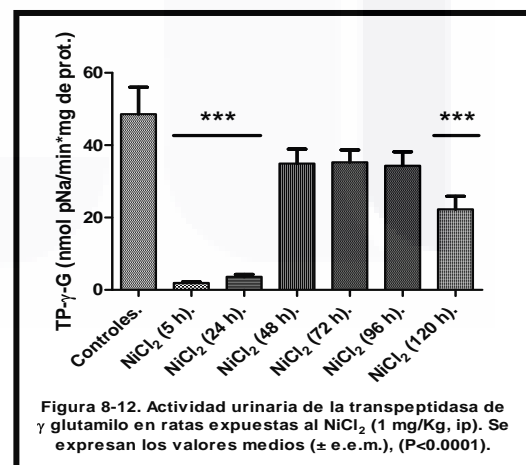
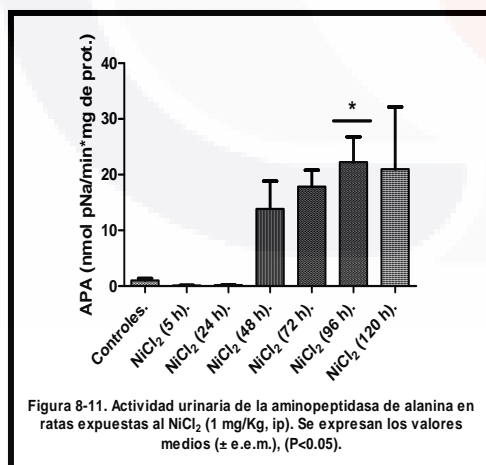
\* Creatinina en Orina.

Con relación al control, la concentración urinaria de creatinina tuvo un incremento altamente significativo ( $P < 0.0001$ ) a las 120 h con 118% (figura 8-10 y tabla 8-1).



\* Actividades Urinarias de la Aminopeptidasa de Alanina y Transpeptidasa de  $\gamma$ -Glutamilo.

También hubo cambios en las actividades urinarias de las enzimas aminopeptidasa de alanina y transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo. Para la primera, hubo un incremento desde las 48 h hasta las 120 h, siendo significativo ( $P < 0.05$ ) a las 96 h (2081%), (figura 8-11 y tabla 8-1); para la segunda, la actividad urinaria disminuyó en todos los tiempos, con diferencias significativas respecto al control ( $P < 0.0001$ ) a las 5, 24 y 120 h (96%, 93% y 54%, respectivamente), (figura 8-12 y tabla 8-1).



\* Actividad Urinaria de la Dipeptidilaminopeptidasa IV.

Con relación al control, la actividad de la dipeptidilaminopeptidasa IV en la orina aumentó de manera no significativa a las 96 y 120 h (figura 8-13 y tabla 8-1).

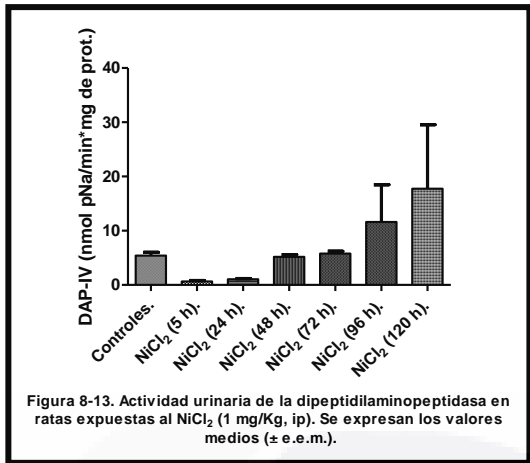


Figura 8-13. Actividad urinaria de la dipeptidilaminopeptidasa en ratas expuestas al NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, ip). Se expresan los valores medios (± e.e.m.).

\* Glutación, Malondialdehído y ATP en riñones.

Con relación al valor medio del grupo control: a) la concentración renal de glutación disminuyó (69%) de manera altamente significativa (P<0.0001), b) la concentración de malondialdehído aumentó 252% significativamente (P<0.0001) y c) el ATP no presentó cambios significativos (figuras 8-14, 8-15 y 8-16, tabla 8-2).

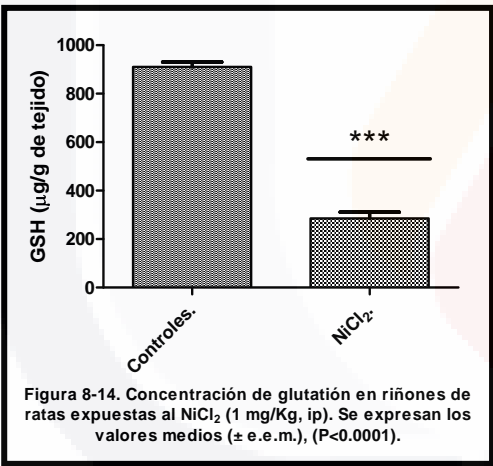


Figura 8-14. Concentración de glutación en riñones de ratas expuestas al NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, ip). Se expresan los valores medios (± e.e.m.), (P<0.0001).

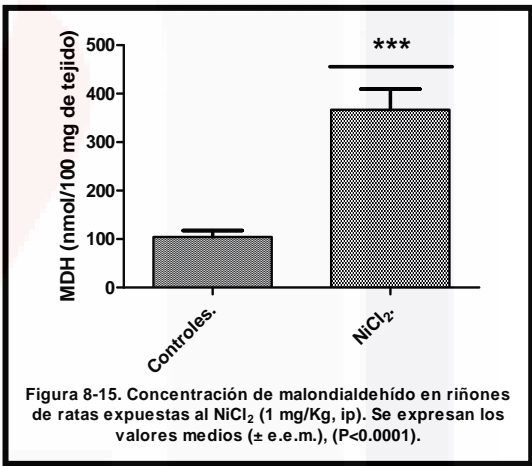


Figura 8-15. Concentración de malondialdehído en riñones de ratas expuestas al NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, ip). Se expresan los valores medios (± e.e.m.), (P<0.0001).

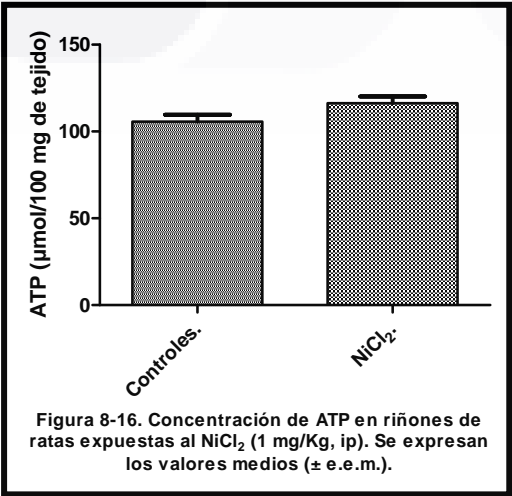


Figura 8-16. Concentración de ATP en riñones de ratas expuestas al NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, ip). Se expresan los valores medios (± e.e.m.).



**Tabla 8-1.** Evaluación del daño renal producido por el NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, i.p.) en ratas Wistar macho. Se presentan los valores de la media (± e.e.m.), (\*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001).

PARÁMETROS	Control	Periodos					
		5 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Flujo Urinario (µl/min)	9.72 (±1.95)	5.78 (±1.65)	19.2* (±1.48)	10.37 (±1.61)	9.81 (±1.43)	19.44* (±2.89)	4.14 (±1.62)
Osmolaridad (µosmoles/L)	808.88 (±168.46)	710 (±169.31)	275.89* (±36.77)	518 (±89.39)	649.22 (±52.17)	432.89 (±104.71)	1045.43 (±213.11)
Flujo urinario de Sodio (µEq/min)	578.08 (±75.71)	238.39 (±70.24)	446.30 (±46.08)	443.70 (±49.39)	522.22 (±96.66)	593.70 (±114.08)	145.48** (±42.05)
Flujo urinario de Potasio (µEq/min)	862.25 (±91.73)	382.33 (±88.22)	648.56 (±35.61)	774.67 (±77.60)	832.35 (±139.87)	820.26 (±155.69)	616.89 (±137.05)
Concentración urinaria de Glucosa (mg/dL)	3.05 (±0.85)	4.15 (±0.97)	1.73 (±0.15)	20.64*** (±2.65)	30.06*** (±0.61)	29.69*** (±0.81)	6.39 (±1.25)
Concentración urinaria de Fosfatos (µg/mL)	2273.02 (±647.85)	705.99 (±222.81)	1601.05 (±226.68)	1282.70 (±366.45)	1616.81 (±307.61)	859.71 (±144.91)	2090.18 (±359.29)
Concentración urinaria de Proteínas (mg/ml)	4.83 (±0.65)	6.01 (±0.81)	3.30 (±0.26)	4.31 (±0.68)	5.24 (±0.33)	4.49 (±0.54)	7.46 (±1.28)
Concentración urinaria de Creatinina (mg/dL)	133.26 (±22.81)	122.03 (±19.47)	125 (±7.60)	90.08 (±15.68)	136.91 (±6.49)	126.99 (±9.71)	290.82*** (±35.48)
Actividad de la aminopeptidasa de alanina (nmol Apa pNa/min*mg de Proteína)	1.02 (±0.35)	0.12 (±0.04)	0.17 (±0.03)	13.84 (±5.02)	17.84 (±2.98)	22.25* (±4.55)	20.99 (±11.15)
Actividad de la transpeptidasa de γ-glutamilo (nmol γ-G pNa/min*mg de Proteína)	48.56 (±7.48)	1.93*** (±0.30)	3.63*** (±0.64)	34.93 (±4.01)	35.25 (±3.43)	34.34 (±3.85)	22.25*** (±3.62)
Actividad de la dipeptidilaminopeptidasa IV (nmol Gli-Prolil pNa/min*mg de Proteína)	5.43 (±0.59)	0.66 (±0.14)	1.04 (±0.16)	5.18 (±0.42)	5.77 (±0.46)	11.61 (±6.87)	17.74 (±11.82)

**Tabla 8-2.** Evaluación del daño renal producido por el NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, i.p.) en ratas Wistar macho. Se presentan los valores de la media (± e.e.m.), (\*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001).

Grupos	PARÁMETROS				
	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	[ ] de GSH (µg / g de tejido)	[ ] de Malondialdehído (nmol / 100 mg de tejido)	[ ] de ATP (µmol / 100 mg de tejido)
Control	247.125 (±9.07)	236.88 (±6.06)	910 (±20.57)	104.26 (±13.56)	105.67 (±3.96)
NiCl <sub>2</sub>	252.44 (±5.79)	241.56 (±5.59)	285.71*** (±25.55)	366.83*** (±42.63)	116.25 (±3.95)

## 8.2 QUERCETINA (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.) y DAÑO RENAL.

\* Peso corporal.

Para el peso inicial no hay diferencia significativa entre los grupos estudiados (tabla 8-4 y figura 8-17); sin embargo, el peso final del grupo tratado con quercetina aumentó significativamente (P<0.01) respecto al grupo control (figura 8-18 y tabla 8-4).

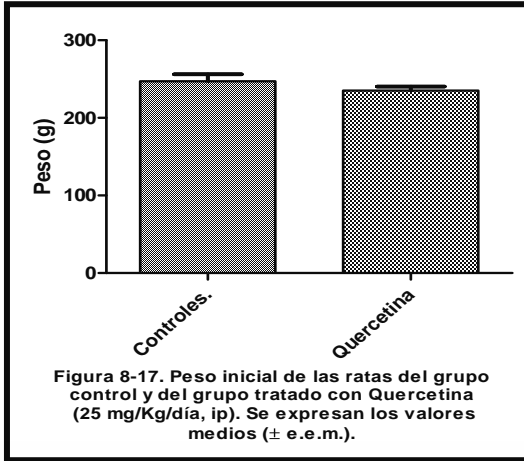


Figura 8-17. Peso inicial de las ratas del grupo control y del grupo tratado con Quercetina (25 mg/Kg/día, ip). Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m.).

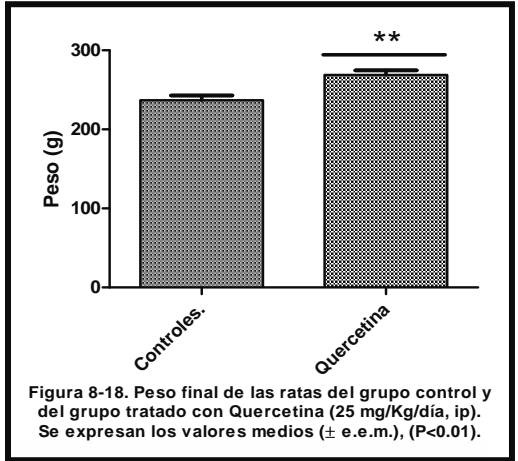


Figura 8-18. Peso final de las ratas del grupo control y del grupo tratado con Quercetina (25 mg/Kg/día, ip). Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m.), ( $P < 0.01$ ).

\* Flujo Urinario y Osmolaridad.

Con relación al control, el flujo urinario disminuyó de manera no significativa a las 24, 48, 96 y 120 h (38%, 50%, 46% y 42%, respectivamente). Para la osmolaridad se observaron incrementos no significativos en los mismos tiempos del parámetro anterior, (figuras 8-19, 8-20 y tabla 8-3).

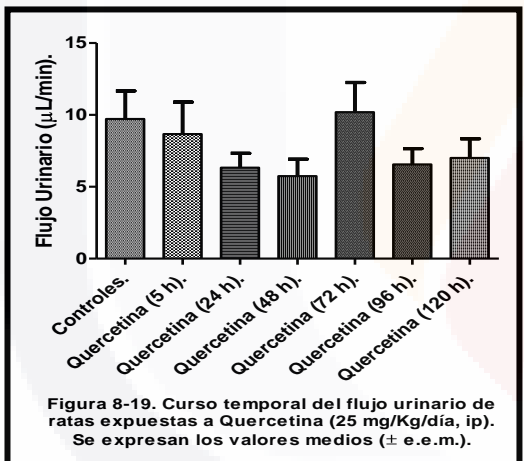


Figura 8-19. Curso temporal del flujo urinario de ratas expuestas a Quercetina (25 mg/Kg/día, ip). Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m.).

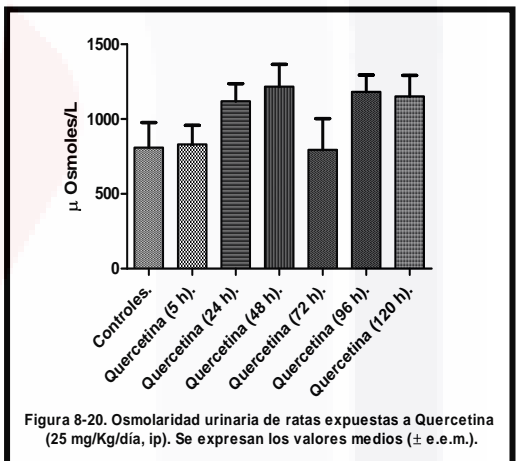
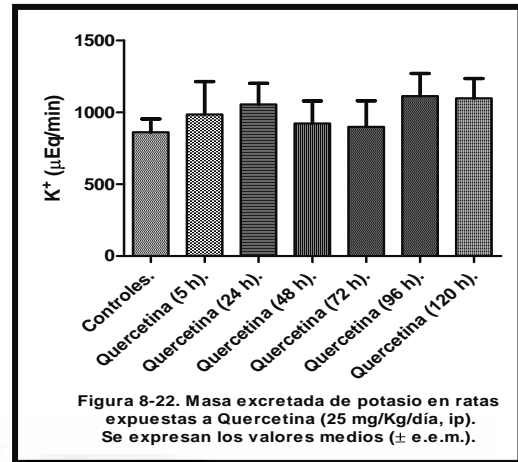
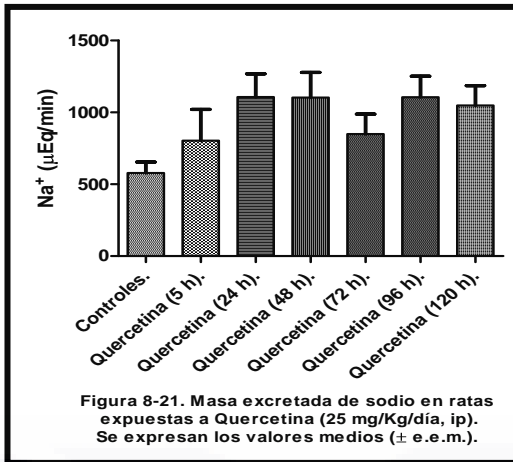


Figura 8-20. Osmolaridad urinaria de ratas expuestas a Quercetina (25 mg/Kg/día, ip). Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m.).

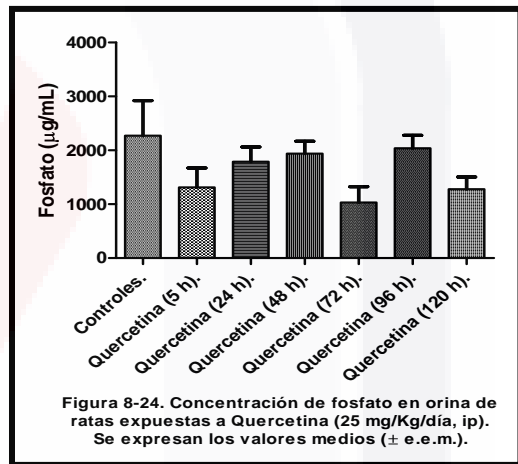
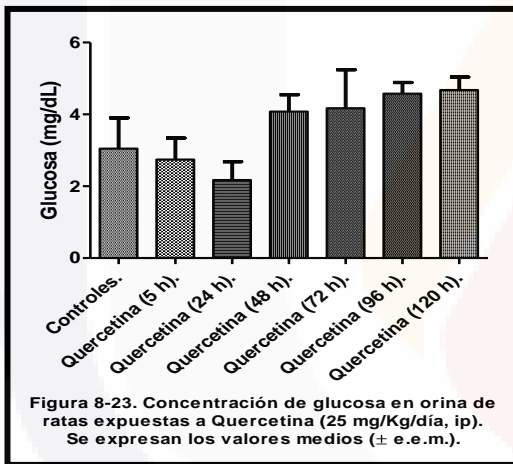
\* Masa Excretada de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup>.

Las masas excretadas de sodio y potasio no presentaron cambios significativos respecto a los controles (figuras 8-21, 8-22 y tabla 8-3).



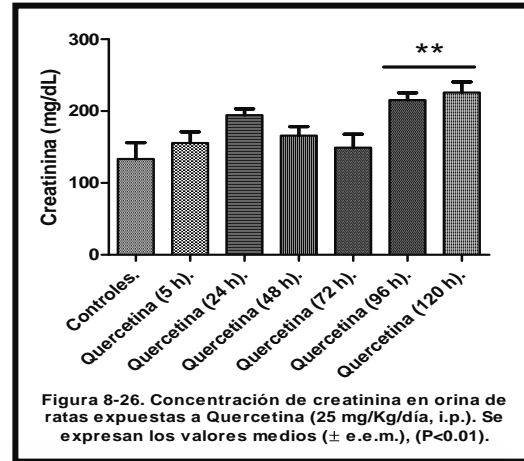
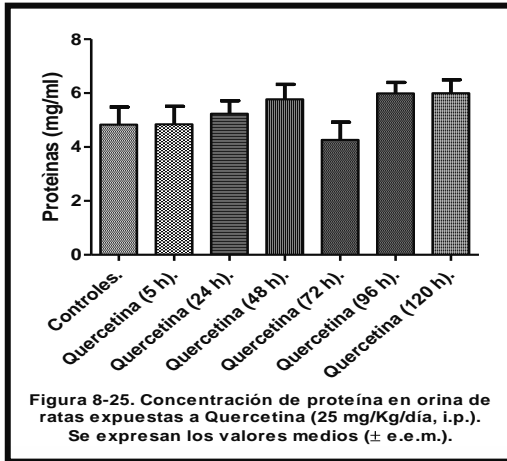
\* Glucosa y Fosfatos en Orina.

Se encontraron incrementos no significativos en la concentración urinaria de glucosa a partir de las 48 h y decrementos en la concentración de fosfatos en la orina en todos los tiempos estudiados, aunque no significativos (Figura 8-23, 8-24 y tabla 8-3).



\* Proteínas y Creatinina en Orina.

Las concentraciones urinarias de proteínas no presentaron cambios significativos respecto al grupo control (figura 8-25 y tabla 8-3); pero la concentración de creatinina en la orina se incrementó significativamente ( $P < 0.01$ ) a las 96 y 120 h (62% y 69% respectivamente), (figura 8-26 y tabla 8-3).

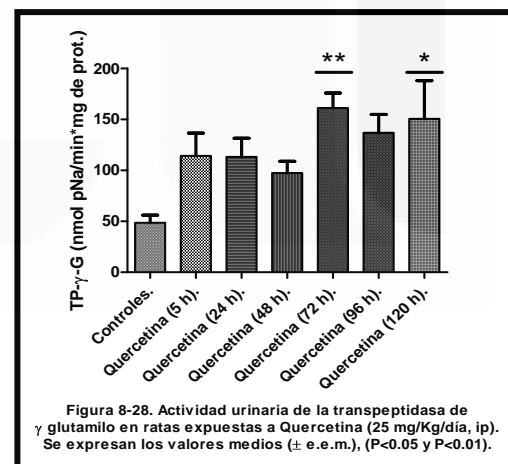
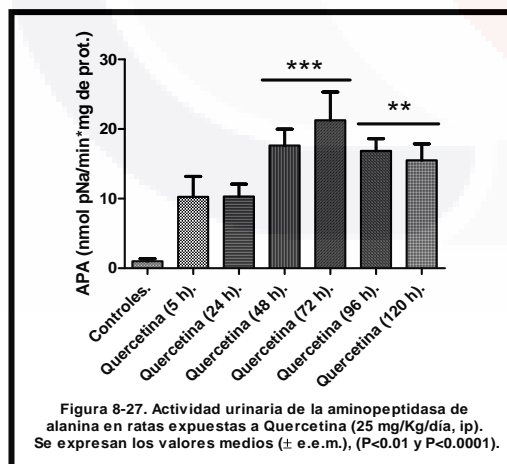


\* Actividades Urinarias de la Aminopeptidasa de Alanina, Transpeptidasa de  $\gamma$ -Glutamilo y Dipeptidilaminopeptidasa IV.

La actividad de la aminopeptidasa de alanina en la orina aumentó en todos los tiempos estudiados con cambios significativos (P<0.01 y P<0.0001) desde las 48 hasta las 120 h (1628%, 1983%, 1552% y 1420% respectivamente), (figura 8-27 y tabla 8-3).

De manera semejante, la actividad urinaria de la transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo también aumentó en todos los tiempos con cambios significativos (P<0.05 y P<0.01) a las 72 y 120 h (232% y 210% respectivamente), (figura 8-28 y tabla 8-3).

La dipeptidilaminopeptidasa IV tuvo un comportamiento semejante a las enzimas anteriores: su actividad urinaria aumentó en todos los tiempos con cambios significativos (P<0.05 y P<0.01) a las 5h, 24 y 72 h (1618%, 1262%, 1643%, respectivamente), (figura 8-29 y tabla 8-3).



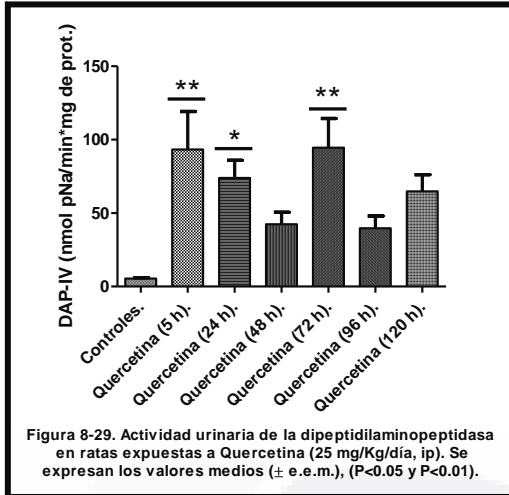


Figura 8-29. Actividad urinaria de la dipeptidilaminopeptidasa en ratas expuestas a Quercetina (25 mg/Kg/día, ip). Se expresan los valores medios (± e.e.m.), (P<0.05 y P<0.01).

\* Glutación, Malondialdehído y ATP en Riñones.

Respecto al grupo control, la concentración renal de glutación disminuyó 71% (P<0.0001), mientras que la concentración de malondialdehído tuvo un incremento del 633% (P<0.0001), (figuras 8-30, 8-31 y tabla 8-4). Para el ATP no hubo diferencias significativas (tabla 8-4 y figura 8-32).

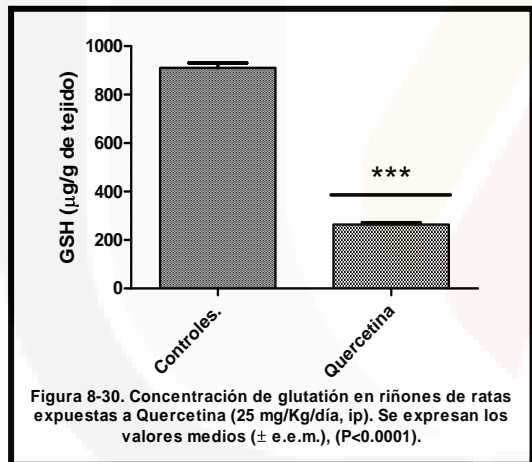


Figura 8-30. Concentración de glutación en riñones de ratas expuestas a Quercetina (25 mg/Kg/día, ip). Se expresan los valores medios (± e.e.m.), (P<0.0001).

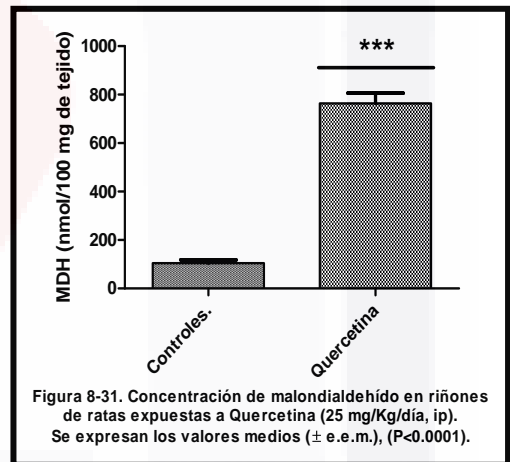


Figura 8-31. Concentración de malondialdehído en riñones de ratas expuestas a Quercetina (25 mg/Kg/día, ip). Se expresan los valores medios (± e.e.m.), (P<0.0001).

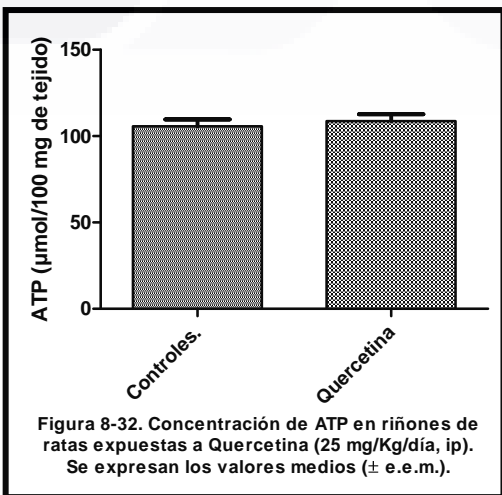


Figura 8-32. Concentración de ATP en riñones de ratas expuestas a Quercetina (25 mg/Kg/día, ip). Se expresan los valores medios (± e.e.m.).

**Tabla 8-3.** Evaluación del daño renal producido por la quercetina (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.) en ratas Wistar macho. Se presentan los valores de la media ( $\pm$  e.e.m.), (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).

PARÁMETROS	Control	Periodos de Tiempo.					
		5 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Flujo Urinario ( $\mu$ l/min)	9.72 ( $\pm 1.95$ )	8.67 ( $\pm 2.22$ )	6.33 ( $\pm 1.00$ )	5.74 ( $\pm 1.18$ )	10.19 ( $\pm 2.06$ )	6.56 ( $\pm 1.10$ )	7 ( $\pm 1.34$ )
Osmolaridad ( $\mu$ osmoles/L)	808.88 ( $\pm 168.46$ )	830.67 ( $\pm 127.15$ )	1119.56 ( $\pm 117.65$ )	1217.33 ( $\pm 147.83$ )	794.78 ( $\pm 208.42$ )	1182.11 ( $\pm 111.76$ )	1151.67 ( $\pm 140.58$ )
Flujo urinario de Sodio ( $\mu$ Eq/min)	578.08 ( $\pm 75.71$ )	803.44 ( $\pm 216.99$ )	1107.30 ( $\pm 160.51$ )	1103.52 ( $\pm 174.34$ )	849.63 ( $\pm 138.16$ )	1106.15 ( $\pm 145.94$ )	1047.56 ( $\pm 138.30$ )
Flujo urinario de Potasio ( $\mu$ Eq/min)	862.25 ( $\pm 91.73$ )	985.43 ( $\pm 228.39$ )	1055.72 ( $\pm 145.99$ )	923.52 ( $\pm 156.21$ )	899.93 ( $\pm 180.66$ )	1112.99 ( $\pm 157.05$ )	1097.83 ( $\pm 137.95$ )
[ ] de Glucosa (mg/dL)	3.05 ( $\pm 0.85$ )	2.74 ( $\pm 0.60$ )	2.17 ( $\pm 0.51$ )	4.08 ( $\pm 0.47$ )	4.17 ( $\pm 1.07$ )	4.58 ( $\pm 0.31$ )	4.68 ( $\pm 0.36$ )
[ ] de Fosfato ( $\mu$ g/mL)	2273.02 ( $\pm 647.85$ )	1312.60 ( $\pm 358.24$ )	1788.51 ( $\pm 273$ )	1937.99 ( $\pm 229.22$ )	1031.41 ( $\pm 292.34$ )	2038.18 ( $\pm 239.97$ )	1278.66 ( $\pm 225.21$ )
[ ] de Proteína (mg/ml)	4.83 ( $\pm 0.65$ )	4.84 ( $\pm 0.67$ )	5.24 ( $\pm 0.48$ )	5.77 ( $\pm 0.55$ )	4.26 ( $\pm 0.66$ )	5.99 ( $\pm 0.41$ )	6 ( $\pm 0.50$ )
[ ] de Creatinina (mg/dL)	133.26 ( $\pm 22.81$ )	155.56 ( $\pm 15.49$ )	194.45 ( $\pm 8.69$ )	165.88 ( $\pm 12.60$ )	149.21 ( $\pm 18.57$ )	215.48** ( $\pm 9.82$ )	225.80** ( $\pm 14.71$ )
Actividad de la aminopeptidasa de alanina (nmol Apa pNa/min*mg de Proteína)	1.02 ( $\pm 0.35$ )	10.27 ( $\pm 2.91$ )	10.32 ( $\pm 1.76$ )	17.63*** ( $\pm 2.35$ )	21.25*** ( $\pm 4.06$ )	16.85** ( $\pm 1.76$ )	15.50** ( $\pm 2.36$ )
Actividad de la transpeptidasa de $\gamma$ -glutamilo (nmol $\gamma$ -G pNa/min*mg de Proteína)	48.56 ( $\pm 7.48$ )	114.25 ( $\pm 22.40$ )	113.22 ( $\pm 18.37$ )	97.45 ( $\pm 11.53$ )	161.21** ( $\pm 14.63$ )	136.88 ( $\pm 18$ )	150.50* ( $\pm 37.63$ )
Actividad de la dipeptidilaminopeptidasa IV (nmol Gli-Prolil pNa/min*mg de Proteína)	5.43 ( $\pm 0.59$ )	93.30** ( $\pm 25.92$ )	73.94* ( $\pm 12.05$ )	42.43 ( $\pm 8.13$ )	94.62** ( $\pm 19.78$ )	39.73 ( $\pm 8.27$ )	64.75 ( $\pm 11.39$ )

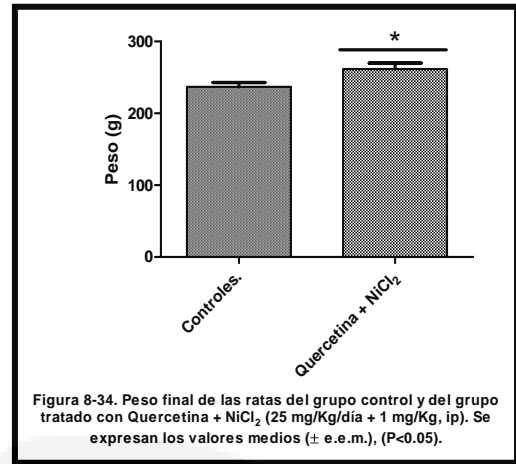
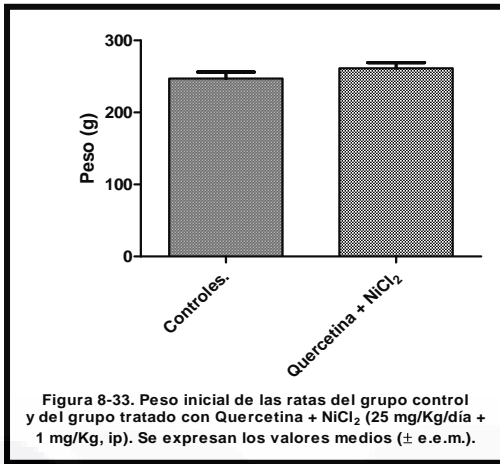
**Tabla 8-4.** Evaluación del daño renal producido por la quercetina (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.) en ratas Wistar macho. Se presentan los valores de la media ( $\pm$  e.e.m.), (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).

Grupos	PARÁMETROS				
	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	[ ] de GSH ( $\mu$ g / g de tejido)	[ ] de Malondialdehído (nmol / 100 mg de tejido)	[ ] de ATP ( $\mu$ mol / 100 mg de tejido)
Control	247.125 ( $\pm 9.07$ )	236.88 ( $\pm 6.06$ )	910 ( $\pm 20.57$ )	104.26 ( $\pm 13.56$ )	105.67 ( $\pm 3.96$ )
Quercetina	235.22 ( $\pm 5.12$ )	268.89** ( $\pm 5.64$ )	263.59*** ( $\pm 7.99$ )	764.08*** ( $\pm 41.76$ )	108.72 ( $\pm 3.97$ )

### 8.3 DAÑO RENAL TRATAMIENTO PREVENTIVO (quercetina 25 mg/Kg/día, 5 días, i.p. + NiCl<sub>2</sub> 1 mg/Kg, i.p.).

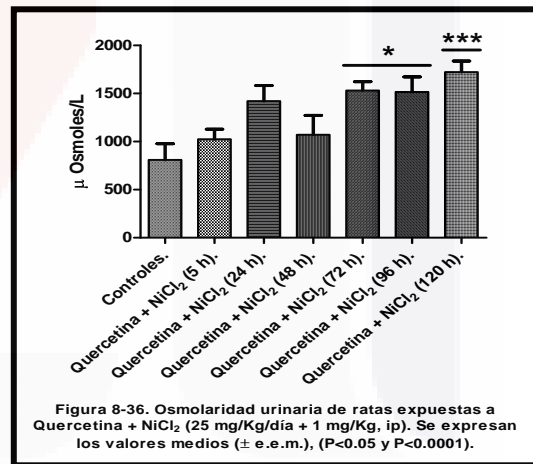
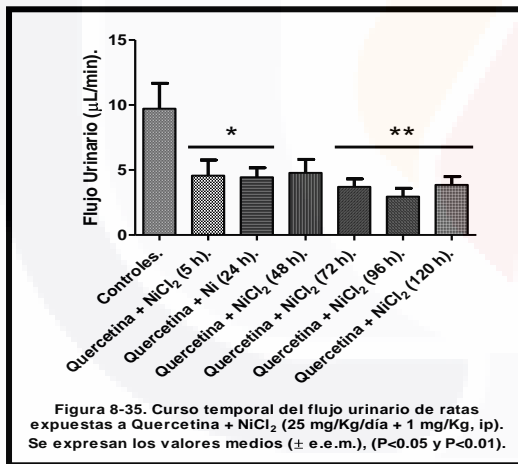
\* Peso corporal.

Al inicio del trabajo, los grupos estudiados no presentaron diferencias significativas en el valor medio del peso (tabla 8-6 y figura 8-33). Al final del trabajo, hubo un incremento significativo del 10% ( $P < 0.05$ ) en el peso de los animales tratados con quercetina + NiCl<sub>2</sub> (figura 8-34 y tabla 8-6).



\* Flujo Urinario y Osmolaridad.

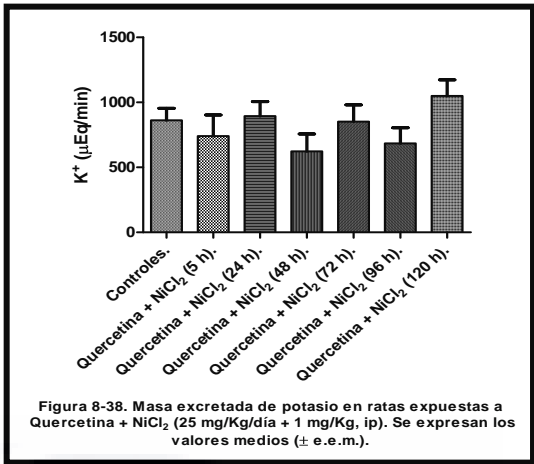
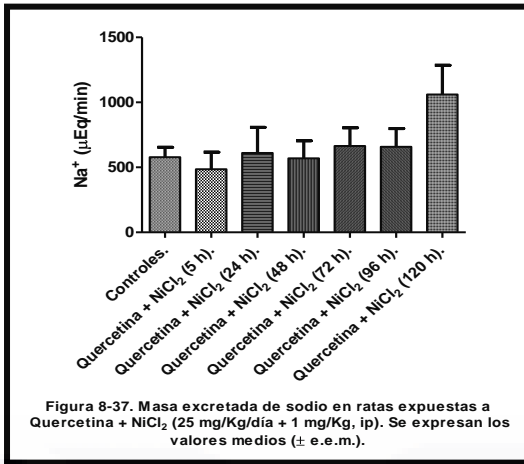
Con relación al control, el flujo urinario de los animales tratados con quercetina + NiCl<sub>2</sub> disminuyó en todos los tiempos estudiados, pero solo cinco de ellos fueron significativos (P<0.05 y P<0.01): el de 5 hrs con 53%, 24 h con 54%, 72 h con 62%, 96 h con 70% y 120 h con 60% (figura 8-35 y tabla 8-5). Para la osmolaridad, se presentó un incremento en todos los tiempos pero solo fueron significativos (P<0.05 y P<0.0001) los de 72, 96 y 120 h (89%, 87% y 113% respectivamente), (figura 8-36 y tabla 8-5).



\* Masa Excretada de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup>.

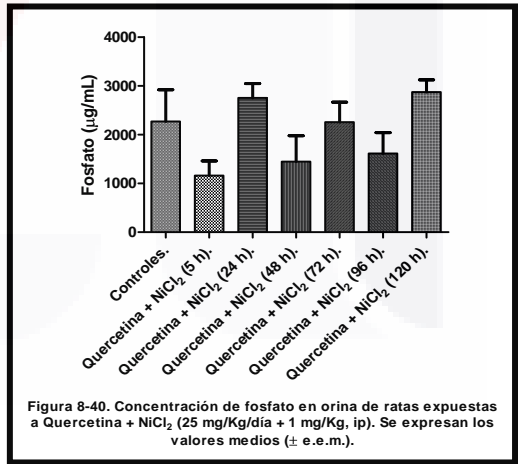
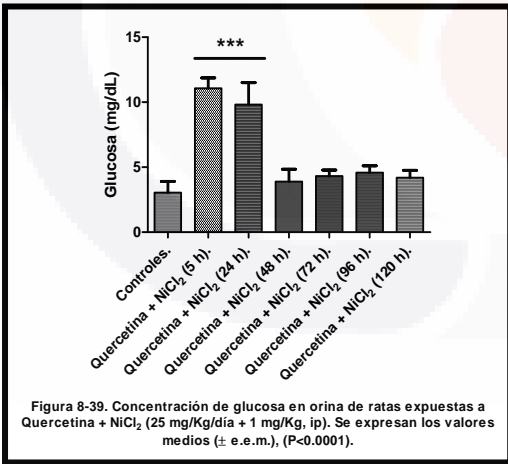
En el caso de las masas excretadas de sodio y potasio, no hubo diferencias significativas (figuras 8-37, 8-38 y tabla 8-5).

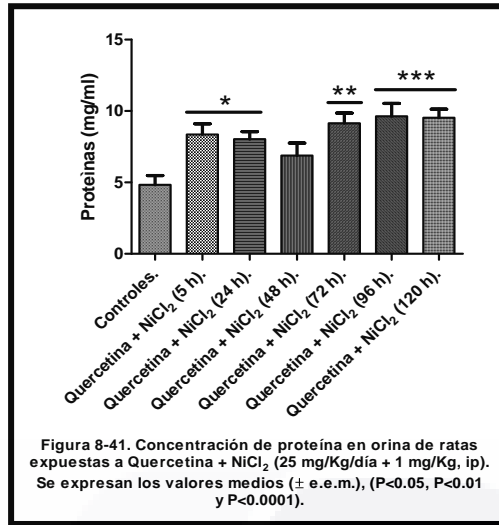




\* Glucosa, Fosfato y Proteínas en Orina.

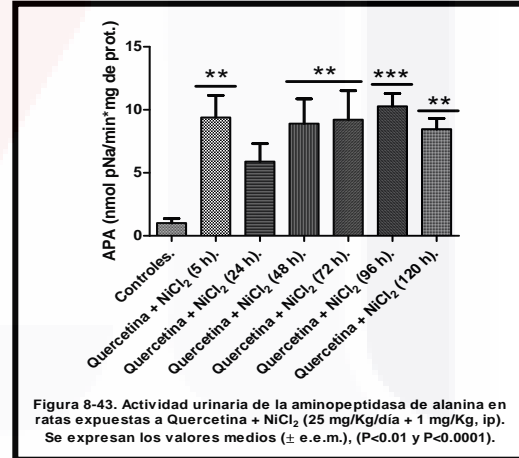
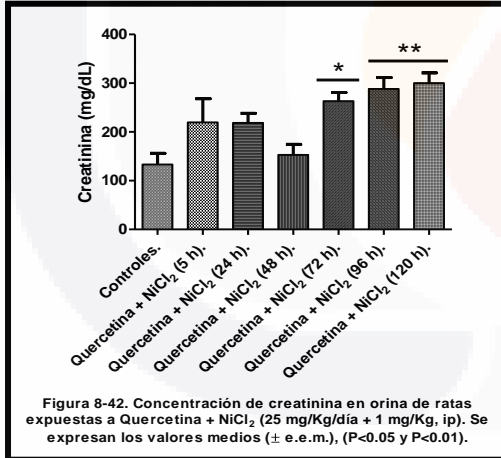
Respecto al grupo control, la concentración urinaria de glucosa tuvo un incremento altamente significativo ( $P < 0.0001$ ) a las 5 y 24 h (263% y 222%, respectivamente), en los animales tratados con quercetina + NiCl<sub>2</sub> (figura 8-39 y tabla 8-5); a su vez, la concentración de fosfatos en la orina no presentó cambios significativos, aunque se puede observar una disminución de la concentración a las 5, 48 y 96 h (figura 8-40 y en la tabla 8-5). Para las proteínas, en los animales tratados con quercetina + NiCl<sub>2</sub> se observó un incremento de la concentración urinaria en todos los tiempos, sin embargo solo cinco de éstos fueron significativos ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  y  $P < 0.0001$ ): a las 5 h con 73%, 24 h con 66%, 72 h con 89%, 96 h con 99% y 120 h con 97% (figura 8-41 y tabla 8-5).





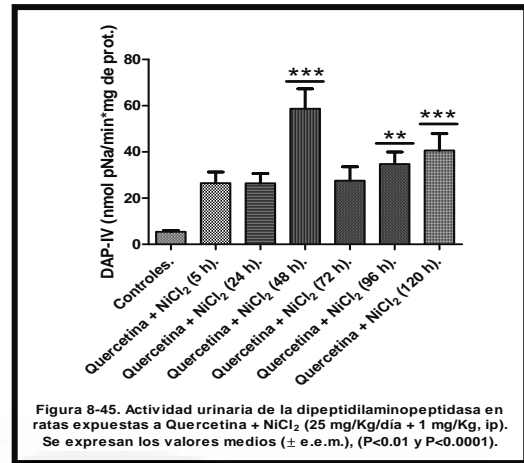
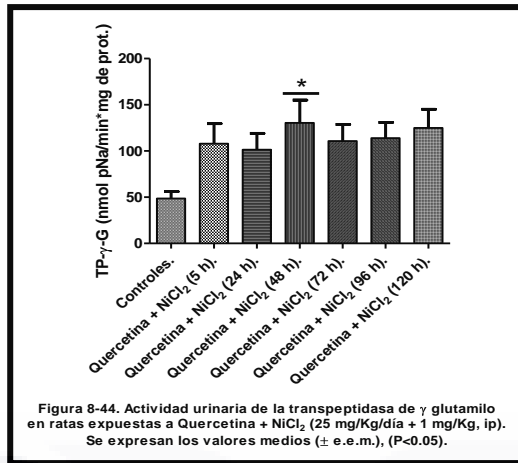
\* Creatinina en orina y actividad urinaria de la Aminopeptidasa de alanina.

Respecto al grupo control, la concentración urinaria de creatinina de los animales tratados con quercetina + NiCl<sub>2</sub> aumentó en todos los tiempos estudiados, aunque solo los tres últimos presentaron significancia estadística (P<0.05 y P<0.01): a las 72 h con 98%, 96 h con 116% y 120 h con 125% (figura 8-42 y tabla 8-5). Para la actividad de la aminopeptidasa de alanina hubo un incremento en todos los tiempos, con diferencias significativas (P<0.01 y P<0.0001) a las 5 h (821 %), 48 h (774%), 72 h (804%), 96 h (908 %) y 120 h (730%), (figura 8-43 y tabla 8-5).



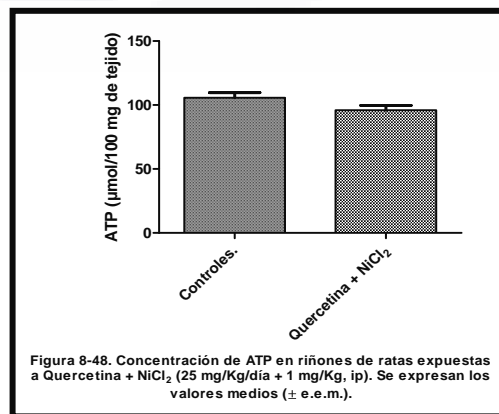
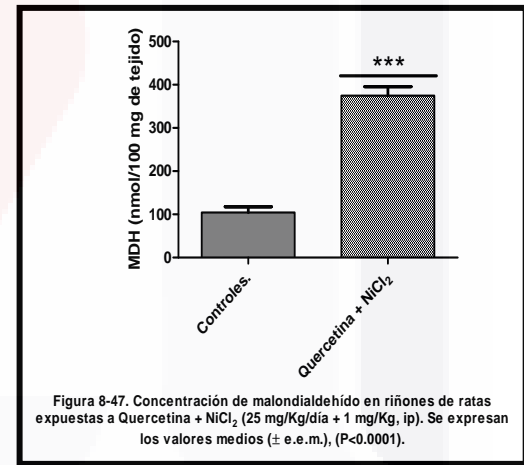
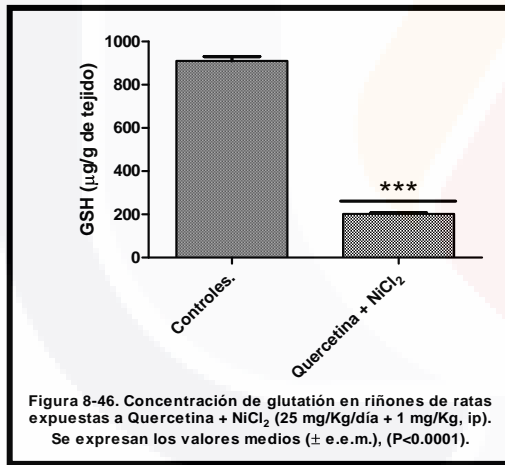
\* Actividades urinarias de la Transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo y Dipeptidilaminopeptidasa IV.

En los animales tratados con quercetina + NiCl<sub>2</sub>, la actividad urinaria de la Transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo aumentó significativamente (P<0.05) a las 48 h (169%), (figura 8-44 y tabla 8-5). A su vez, la actividad de la dipeptidilaminopeptidasa IV en la orina aumentó de manera significativa (P<0.01 y P<0.0001) a las 48 h (981%), 96 h (540%) y 120 h (648%), (figura 8-45 y tabla 8-5).



\* Glutación, Malondialdehído y ATP en Riñones.

En los riñones y con relación al valor medio del grupo control: a) la concentración de glutación disminuyó 78% (P<0.0001) y b) la concentración de malondialdehído tuvo un incremento altamente significativo de 260% (P<0.0001), (figuras 4-46, 8-47 y tabla 8-6). Para el ATP no hubo diferencias significativas (tabla 8-6 y figura 8-48).



**Tabla 8-5.** Efecto de la quercetina (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.) sobre el daño renal producido por el NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, i.p.) en ratas Wistar machos (tratamiento preventivo). Se presentan los valores de la media (± e.e.m.), (\*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001).

PARÁMETROS	Control	Periodos de Tiempo.					
		5 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Flujo Urinario (µl/min)	9.72 (±1.95)	4.57* (±1.20)	4.44* (±0.73)	4.78 (±1.04)	3.71** (±0.61)	2.95** (±0.64)	3.86** (±0.63)
Osmolaridad (µosmoles/L)	808.88 (±168.46)	1023.43 (±105.92)	1421 (±161.92)	1070.17 (±201.53)	1530.57* (±91.12)	1516* (±156.38)	1722.57*** (±115.75)
Flujo urinario de Sodio (µEq/min)	578.08 (±75.71)	485.10 (±131.98)	610.44 (±197.10)	569.78 (±134.26)	664.81 (±139.24)	658.10 (±140.31)	1060.62 (±225.49)
Flujo urinario de Potasio (µEq/min)	862.25 (±91.73)	740.08 (±163.34)	894.01 (±112.05)	623.18 (±133.59)	852.01 (±128.77)	683.96 (±119.95)	1049.59 (±123.47)
[ ] de Glucosa (mg/dL)	3.05 (±0.85)	11.07*** (±0.80)	9.82*** (±1.68)	3.89 (±0.96)	4.32 (±0.46)	4.58 (±0.53)	4.20 (±0.55)
[ ] de Fosfato (µg/mL)	2273.02 (±647.85)	1161.44 (±298.94)	2754.27 (±294.76)	1448.95 (±528.66)	2257.44 (±411.40)	1614.90 (±427.16)	2876.60 (±247.97)
[ ] de Proteína (mg/ml)	4.83 (±0.65)	8.35* (±0.76)	8.03* (±0.53)	6.88 (±0.87)	9.14** (±0.71)	9.63*** (±0.90)	9.53*** (±0.60)
[ ] de Creatinina (mg/dL)	133.26 (±22.81)	219.39 (±48.80)	218.46 (±19.83)	152.98 (±21.54)	263.27* (±17.70)	288.27** (±23.31)	300.01** (±21.21)
Actividad de la aminopeptidasa de alanina (nmol Apa pNa/min*mg de Proteína)	1.02 (±0.35)	9.39** (±1.75)	5.89 (±1.43)	8.91** (±1.96)	9.22** (±2.30)	10.28*** (±1.02)	8.47** (±0.85)
Actividad de la transpeptidasa de γ-glutamilo (nmol γ-G pNa/min*mg de Proteína)	48.56 (±7.48)	107.96 (±21.56)	101.37 (±17.78)	130.43* (±24.65)	110.79 (±17.95)	113.98 (±16.95)	124.90 (±20.17)
Actividad de la dipeptidilaminopeptidasa IV (nmol Gli-Prolil pNa/min*mg de Proteína)	5.43 (±0.59)	26.52 (±4.80)	26.45 (±4.16)	58.68*** (±8.61)	27.56 (±6.01)	34.74** (±5.22)	40.63*** (±7.29)

**Tabla 8-6.** Efecto de la administración de la quercetina (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.) sobre el daño renal producido por el NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, i.p.) en ratas Wistar machos (tratamiento preventivo). Se presentan los valores de la media (± e.e.m.), (\*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001).

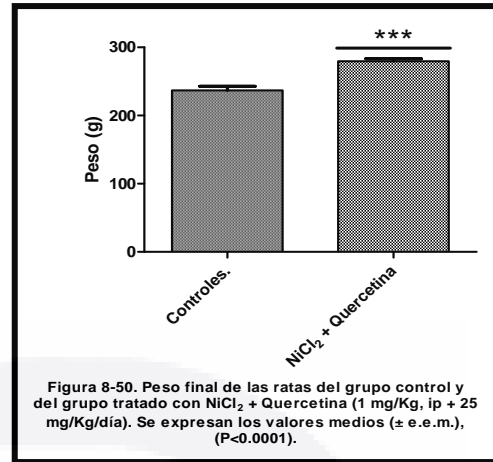
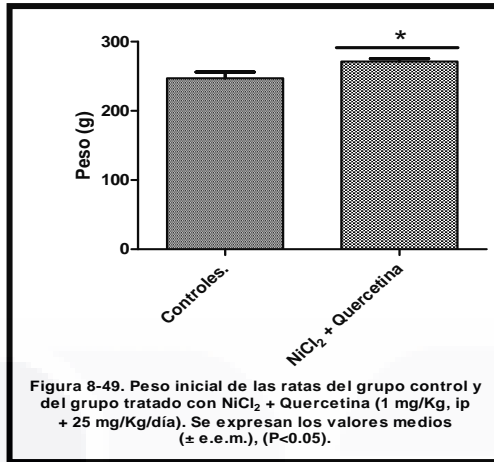
Grupos	PARÁMETROS				
	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	[ ] de GSH (µg / g de tejido)	[ ] de Malondialdehído (nmol / 100 mg de tejido)	[ ] de ATP (µmol / 100 mg de tejido)
Control	247.125 (±9.07)	236.88 (±6.06)	910 (±20.57)	104.26 (±13.56)	105.67 (±3.96)
Quercetina + NiCl <sub>2</sub>	261.44 (±7.62)	261.56* (±8.36)	201.89*** (±5.14)	374.85*** (±20.59)	95.91 (±3.79)

#### 8.4 DAÑO RENAL TRATAMIENTO TERAPÉUTICO (NiCl<sub>2</sub> 1 mg/Kg, i.p. + quercetina 25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.).

\* Peso corporal.

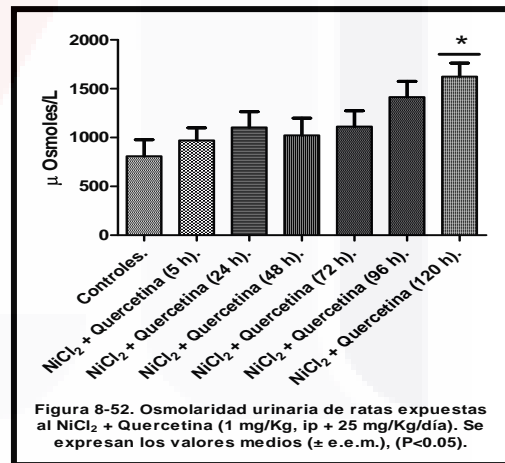
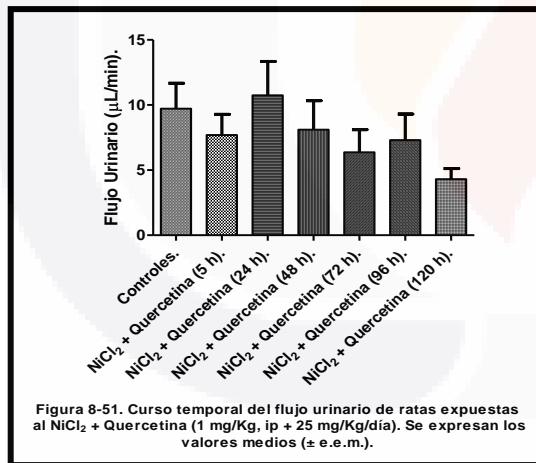
El peso medio inicial del grupo tratado con NiCl<sub>2</sub> + quercetina fue ligeramente superior al peso medio de los animales controles (P<0.05), (tabla 8-8 y figura 8-49);

además, el peso final también presentó un incremento significativo ( $P < 0.0001$ ), (figuras 8-50 y tabla 8-8).



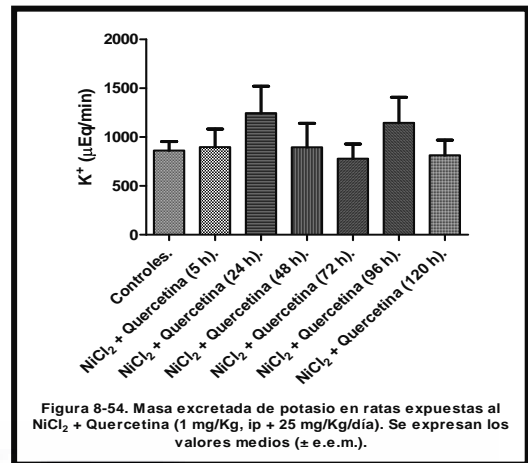
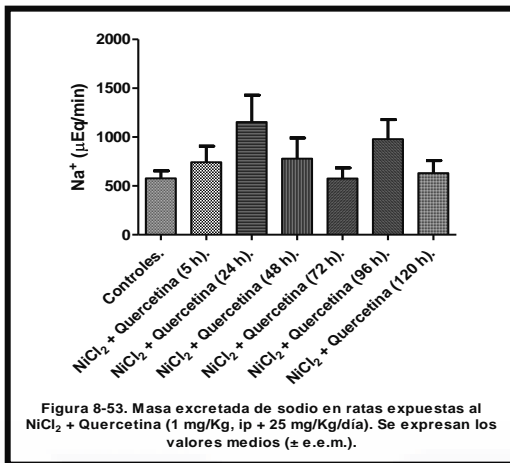
\* Flujo Urinario y Osmolaridad.

Con relación al grupo control, en los animales tratados con NiCl<sub>2</sub> + quercetina el flujo urinario presentó una tendencia a disminuir aunque sin diferencias significativas en ninguno de los tiempos estudiados (figura 8-51 y tabla 8-7); en cambio, para la osmolaridad hubo un incremento en todos los tiempos con diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) a las 120 h (101%), (figura 8-52 y tabla 8-7).



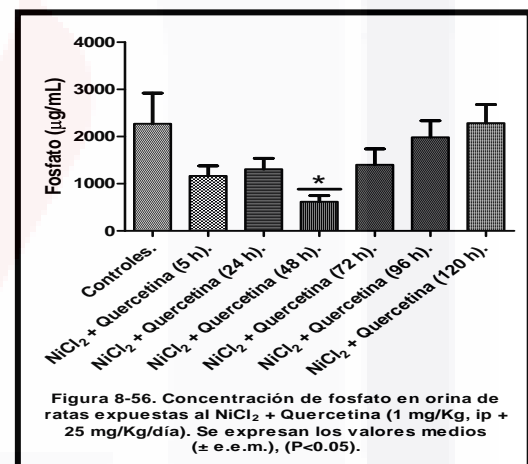
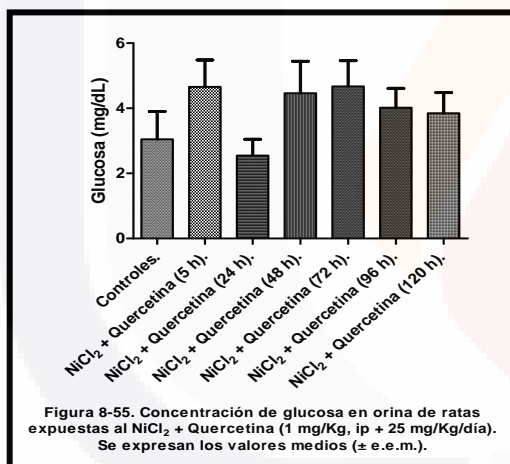
\* Masas Excretadas de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup>.

Respecto al grupo control, en los animales tratados con NiCl<sub>2</sub> + quercetina las masas excretadas de sodio y de potasio no presentaron diferencias significativas, sin embargo, se observó un incremento en ambos parámetros para los tiempos de 24 y 96 h (Na<sup>+</sup> de 100% y 69%, respectivamente y K<sup>+</sup> de 45% y 33%, respectivamente), (figuras 8-53, 8-54 y tabla 8-7).



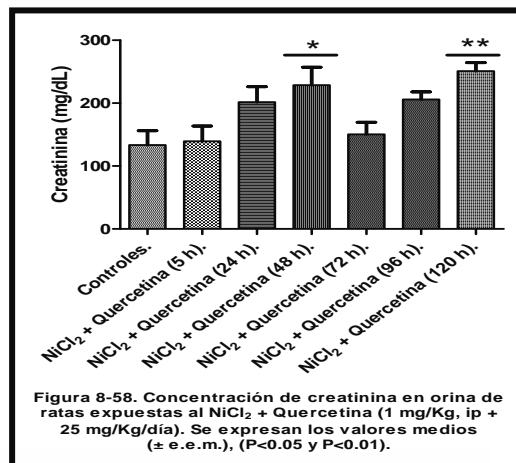
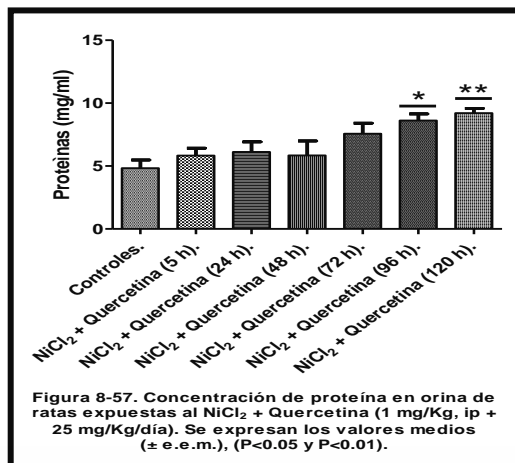
\* Glucosa y Fosfatos en Orina.

Respecto al valor medio del grupo control, en los animales tratados con NiCl<sub>2</sub> + quercetina la concentración de glucosa en la orina no presentó diferencias significativas; sin embargo, hubo incrementos en los tiempos de 5, 48 y 120 h (figuras 8-55 y tabla 8-7); a su vez, la concentración urinaria de fosfatos presentó una tendencia a disminuir con diferencias significativas (P<0.01) a las 48 h (73%), (figura 8-56 y tabla 8-7).



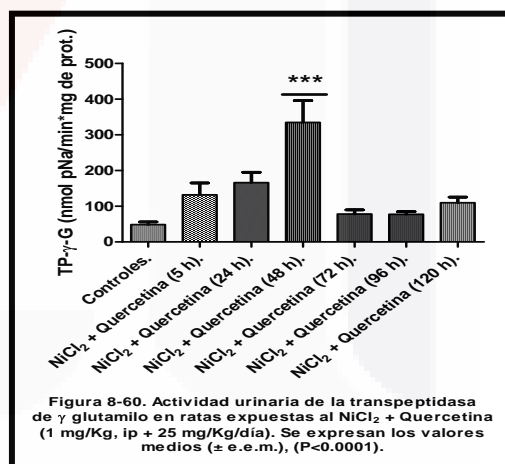
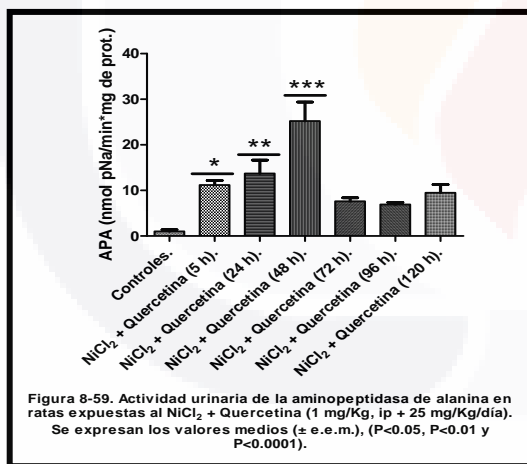
\* Proteínas y Creatinina en Orina.

En los animales tratados con NiCl<sub>2</sub> + quercetina la concentración urinaria de proteínas se incrementó de manera progresiva con diferencias significativas (P<0.05 y P<0.01) a las 96 h (78%) y 120 h (91%), (figura 8-57 y tabla 8-7); de manera semejante, la concentración de creatinina en la orina aumentó paulatinamente con diferencias significativas (P<0.05 y P<0.01) a las 48 h (72%) y 120 h (88%), (figura 8-58 y tabla 8-7).

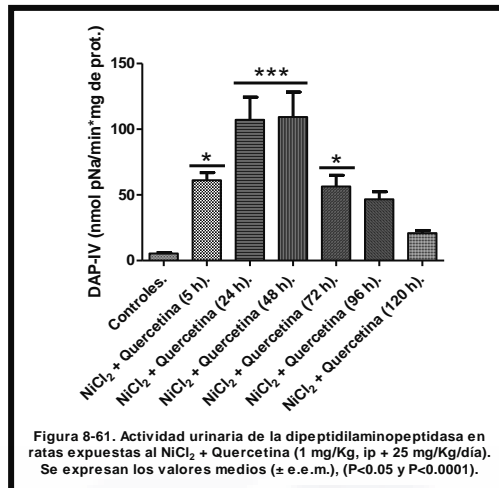


\* Actividades Urinarias de la Aminopeptidasa de Alanina, Transpeptidasa de  $\gamma$ -Glutamilo y Dipeptidilaminopeptidasa IV.

Respecto al grupo control, la actividad urinaria de las tres enzimas aumentó en todos los tiempos pero solo algunos de éstos fueron significativos: a) para la aminopeptidasa de alanina a las 5 h (995%), 24 h (1244%) y 48 h (2373%), ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  y  $P < 0.0001$ , respectivamente), (figura 8-59 y tabla 8-7), b) para la transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo a las 48 h (590%,  $P < 0.0001$ ) (figura 8-60 y tabla 8-7) y c) para la dipeptidilaminopeptidasa IV a las 5 h (1026%), 24 h (1874%), 48 h (1912%) y 72 h (938%), ( $P < 0.05$  y  $P < 0.0001$ ), (figura 8-61 y tabla 8-7).

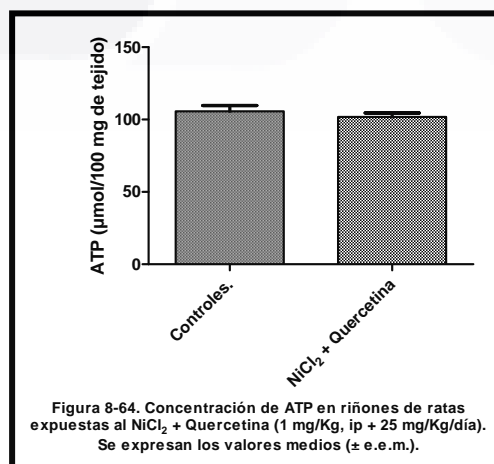
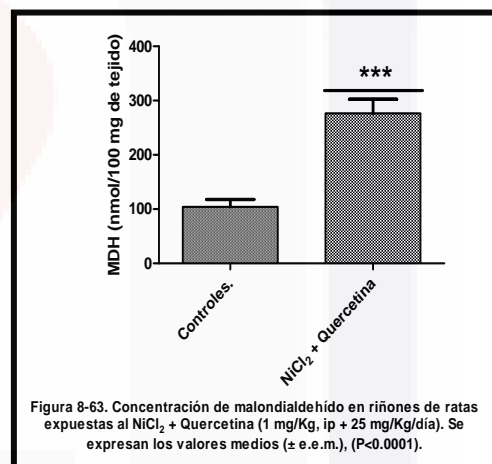
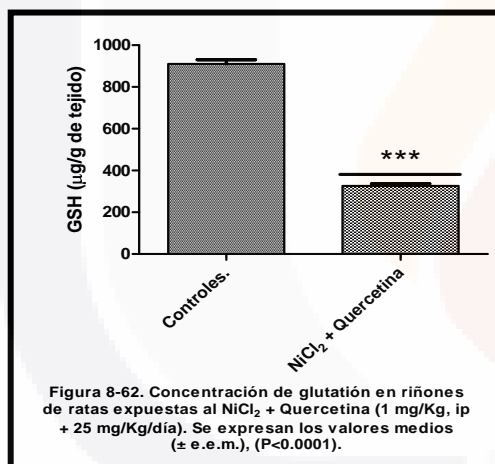






\* Glutación, Malondialdehído y ATP en Riñones.

En los riñones y con relación al valor medio del grupo control: a) la concentración de glutatión reducido disminuyó significativamente (64%, P<0.0001), b) la concentración de malondialdehído aumentó de manera altamente significativo (165%, P<0.0001), (figuras 8-62 y 8-63 y tabla 8-8) y c) para el ATP no hubo diferencia significativa (tabla 8-8 y figura 8-64).



**Tabla 8-7.** Efecto de la administración de la quercetina (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.) sobre el daño renal producido por el NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, i.p.) en ratas Wistar machos (tratamiento terapéutico). Se presentan los valores de la media (± e.e.m.), (\*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001).

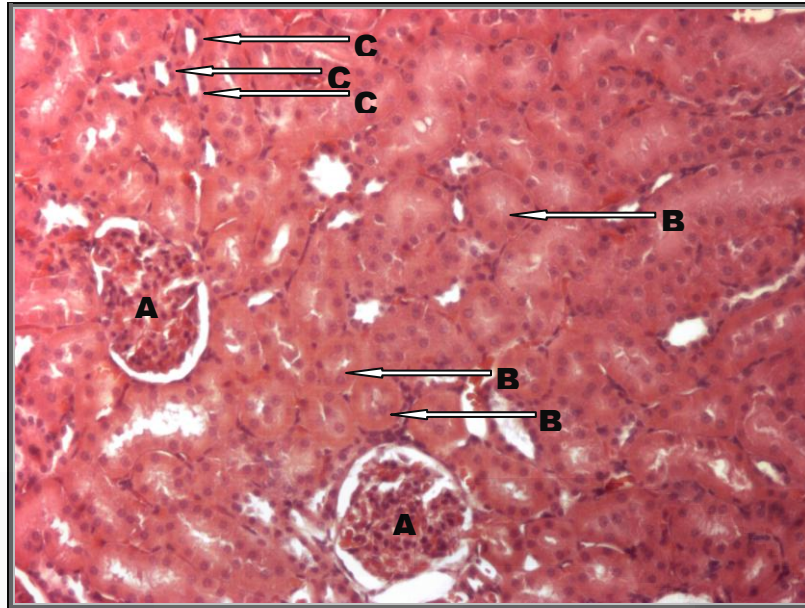
PARÁMETROS	Control	Periodos de Tiempo.					
		5 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Flujo Urinario (µl/min)	9.72 (±1.95)	7.70 (±1.58)	10.74 (±2.61)	8.11 (±2.22)	6.37 (±1.74)	7.30 (±2.01)	4.30 (±0.82)
Osmolaridad (µsmoles/L)	808.88 (±168.46)	971 (±127.83)	1104.11 (±160.25)	1022.89 (±176.50)	1113.11 (±160.25)	1414.22 (±161.33)	1623.56* (±138.62)
Flujo urinario de Sodio (µEq/min)	578.08 (±75.71)	741.67 (±166.31)	1154.81 (±275.06)	779.33 (±212.10)	576.11 (±108.08)	979.44 (±200.24)	631.48 (±126.91)
Flujo urinario de Potasio (µEq/min)	862.25 (±91.73)	897.89 (±184.58)	1246.46 (±275.10)	895.61 (±244.98)	779.68 (±150.10)	1146.29 (±261.29)	814.39 (±154.95)
[ ] de Glucosa (mg/dL)	3.05 (±0.85)	4.66 (±0.82)	2.55 (±0.50)	4.46 (±0.98)	4.67 (±0.79)	4.02 (±0.59)	3.85 (±0.63)
[ ] de Fosfato (µg/mL)	2273.02 (±647.85)	1163.52 (±214.23)	1308.96 (±229.58)	618.12* (±128.76)	1403.09 (±336.24)	1985.66 (±347.79)	2286.24 (±391.78)
[ ] de Proteína (mg/ml)	4.83 (±0.65)	5.83 (±0.59)	6.12 (±0.80)	5.85 (±1.14)	7.57 (±0.84)	8.62* (±0.53)	9.21** (±0.37)
[ ] de Creatinina (mg/dL)	133.26 (±22.81)	139.29 (±24.25)	201.59 (±24.54)	228.58* (±28.48)	150.40 (±19.14)	205.96 (±11.88)	250.80** (±13.61)
Actividad de la aminopeptidasa de alanina (nmol Apa pNa/min*mg de Proteína)	1.02 (±0.35)	11.17* (±1)	13.71** (±2.95)	25.22*** (±4.15)	7.62 (±0.78)	6.93 (±0.47)	9.47 (±1.81)
Actividad de la transpeptidasa de γ-glutamilo (nmol γ-G pNa/min*mg de Proteína)	48.56 (±7.48)	131.73 (±33.27)	166.06 (±29.26)	334.91*** (±61.08)	78.01 (±11.83)	77.42 (±7.28)	109.98 (±15.55)
Actividad de la dipeptidilaminopeptidasa IV (nmol Gli-Prolil pNa/min*mg de Proteína)	5.43 (±0.59)	61.16* (±5.79)	107.21*** (±17.20)	109.27*** (±18.99)	56.39* (±8.58)	46.68 (±5.78)	20.92 (±2.02)

**Tabla 8-8.** Efecto de la administración de la quercetina (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.) sobre el daño renal producido por el NiCl<sub>2</sub> (1 mg/Kg, i.p.) en ratas Wistar machos (tratamiento terapéutico). Se presentan los valores de la media (± e.e.m.), (\*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001).

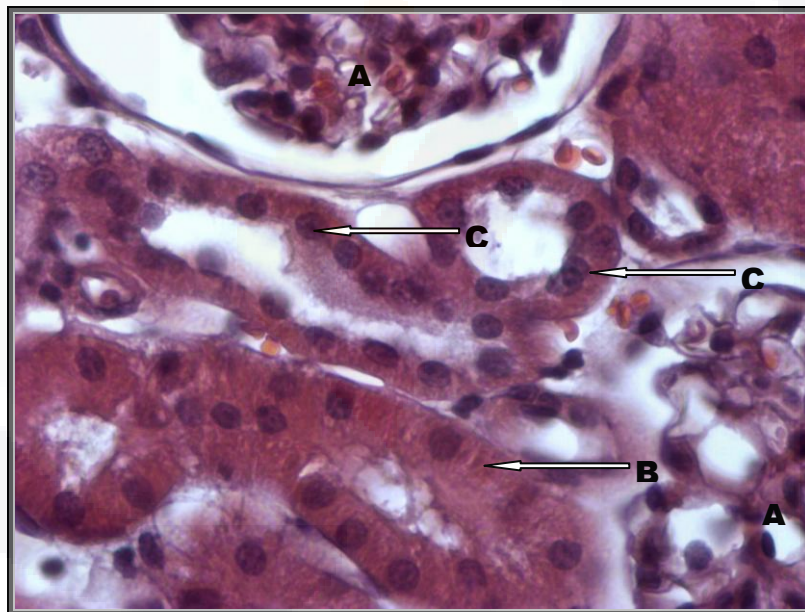
Grupos	PARÁMETROS				
	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	[ ] de GSH (µg / g de tejido)	[ ] de Malondialdehído (nmol / 100 mg de tejido)	[ ] de ATP (µmol / 100 mg de tejido)
Control	247.125 (±9.07)	236.88 (±6.06)	910 (±20.57)	104.26 (±13.56)	105.67 (±3.96)
NiCl <sub>2</sub> + Quercetina	271.33* (±4.06)	279.67*** (±3.72)	326.40*** (±9.94)	276.42*** (±26)	101.82 (±2.74)

## 8.5 ESTUDIO ESTRUCTURAL.

El estudio histológico de los riñones de ratas del grupo control mostró una estructura normal, como se muestra en las figuras 8-65 y 8-66.



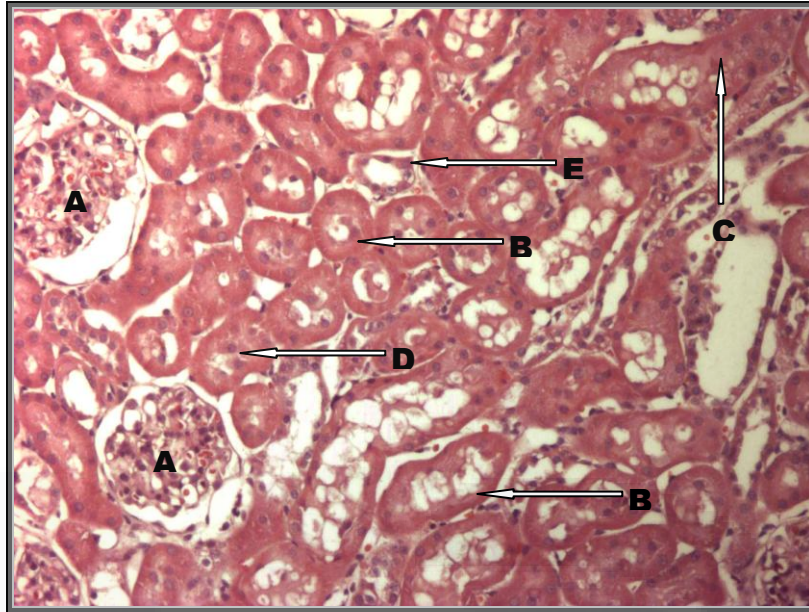
**Figura 8-65.** Corteza renal de rata control. Se observan: glomérulos (A), túbulos proximales (B) y túbulos distales (C). H/E, objetivo: 10X.



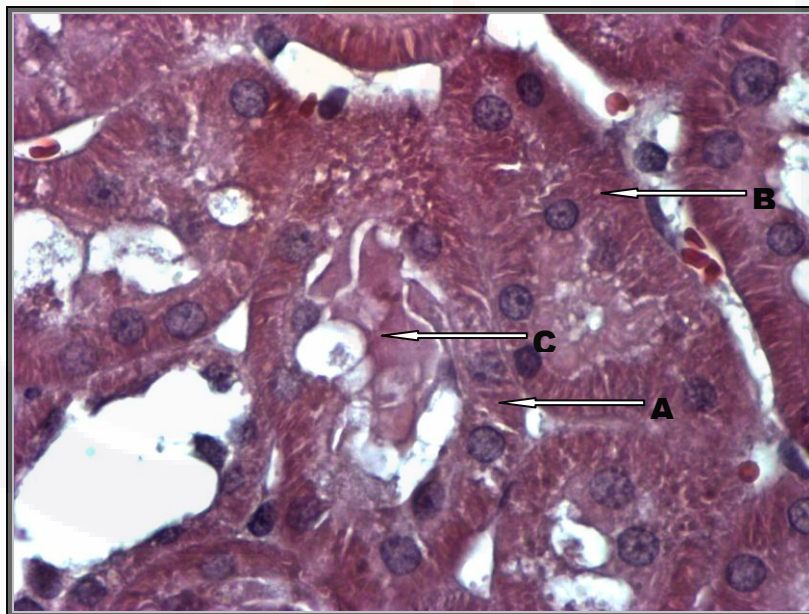
**Figura 8-66.** Corteza renal de rata control. Se observan: glomérulos (A), túbulos proximales (B) y túbulos distales (C). H/E, objetivo: 40X.

La corteza renal de las ratas tratadas con  $\text{NiCl}_2$  reveló alteraciones estructurales en el epitelio del túbulo proximal: edema celular, pérdida del borde en cepillo, lisis y desprendimiento de células hacia la luz tubular (figuras 8-67 y 8-68).



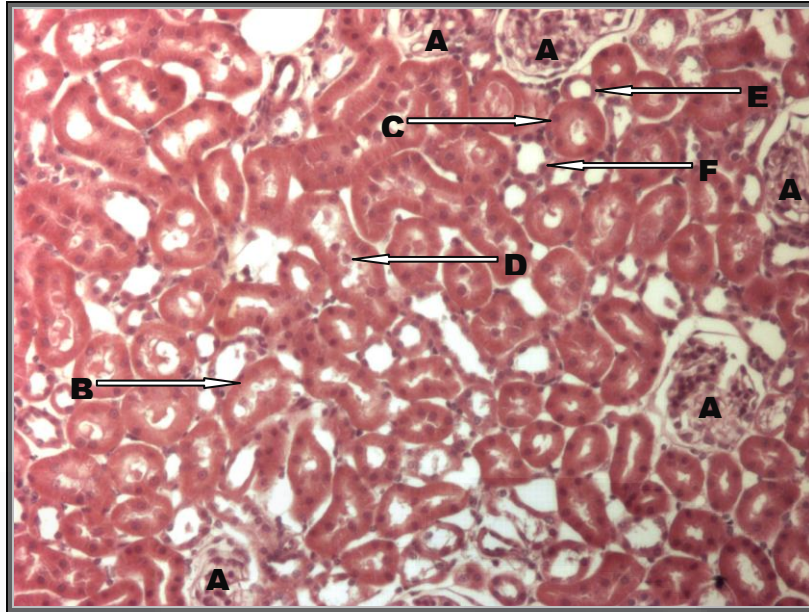


**Figura 8-67.** Corteza renal de rata tratada con  $\text{NiCl}_2$  (1 mg/Kg, i.p.). Se observan: glomérulos (A), túbulo proximales con pérdida del borde en cepillo (B), edema celular (C), desprendimiento de células hacia la luz (D) y túbulo distales (E). H/E, objetivo: 10X.

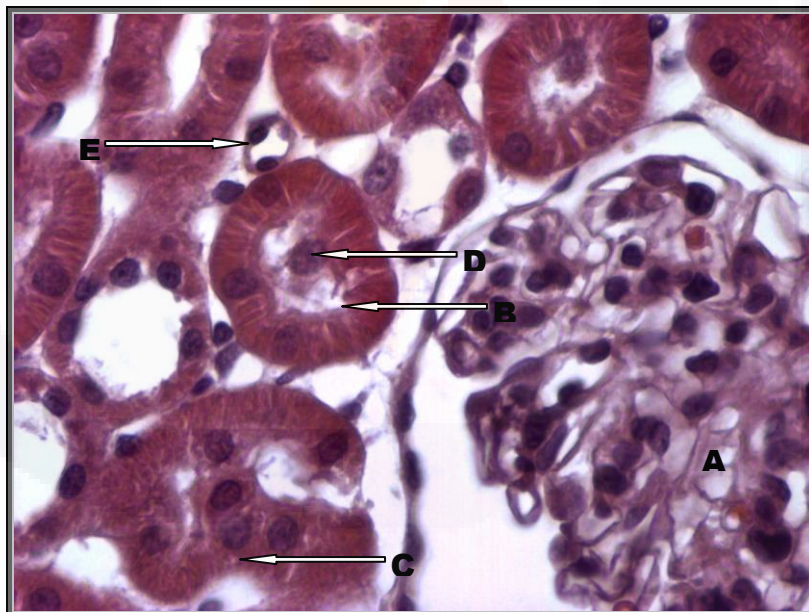


**Figura 8-68.** Corteza renal de rata tratada con  $\text{NiCl}_2$  (1 mg/Kg, i.p.). Se observan túbulo proximales con pérdida del borde en cepillo (A), edema celular (B) y desprendimiento de células hacia la luz (C). H/E, objetivo: 40X.

Respecto al grupo que recibió solamente  $\text{NiCl}_2$ , el análisis histológico de los riñones de los animales tratados con quercetina y quercetina +  $\text{NiCl}_2$  mostró: túbulo proximales en regeneración, disminución del edema celular, pérdida del borde en cepillo y disminución del número de células desprendidas y lisadas (figuras 8-69, 8-70, 8-71 y 8-72).

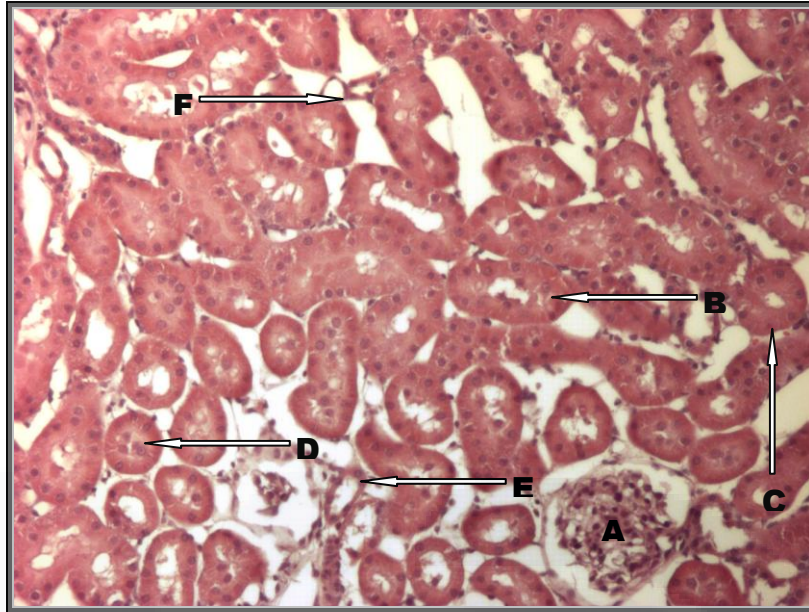


**Figura 8-69.** Corteza renal de rata tratada con quercetina (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.). Se observan glomérulos (A), túbulos proximales con pérdida del borde en cepillo (B), edema celular (C), desprendimiento de células hacia la luz (D), túbulos distales (E) y túbulos proximales en proceso de regeneración (F). H/E, objetivo: 10X.

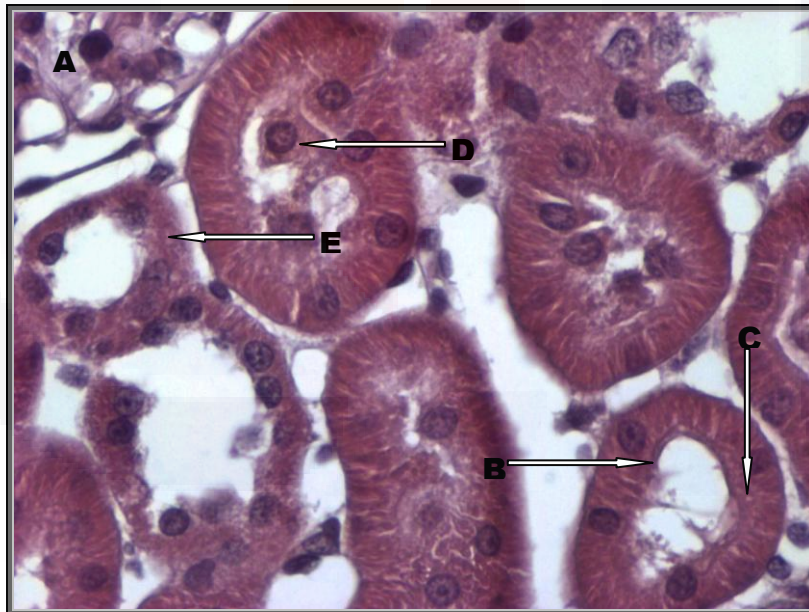


**Figura 8-70.** Riñón tratado con quercetina (25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.). Se observa un glomérulo (A), túbulos proximales con pérdida del borde en cepillo (B), edema celular (C), desprendimiento de células hacia la luz (D) y túbulos proximales en proceso de regeneración (E). H/E, objetivo: 40X.



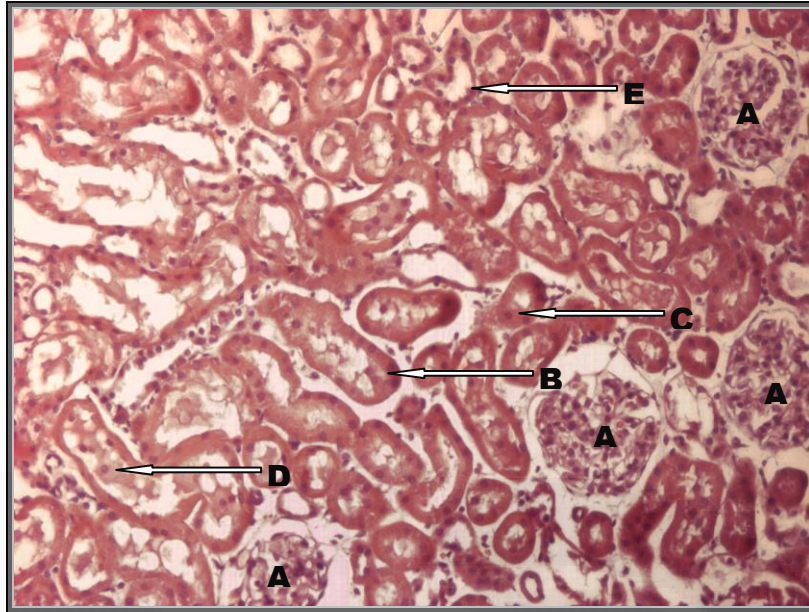


**Figura 8-71.** Corteza renal de rata con tratamiento preventivo (quercetina 25 mg/Kg/día, 5 días, i.p. + NiCl<sub>2</sub> 1 mg/Kg, i.p.). Se observa un glomérulo (A), túbulo proximal con pérdida del borde en cepillo (B), edema celular (C), desprendimiento de células hacia la luz (D), túbulo distales (E) y túbulo proximal en proceso de regeneración (F). H/E, objetivo: 10X.

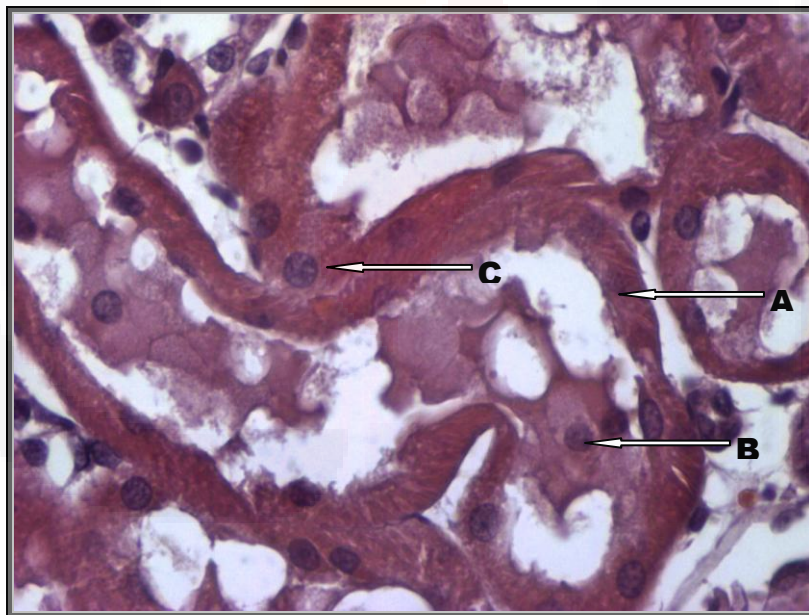


**Figura 8-72.** Corteza renal de rata con tratamiento preventivo (quercetina 25 mg/Kg/día, 5 días, i.p. + NiCl<sub>2</sub> 1 mg/Kg, i.p.). Se observa un glomérulo (A), túbulo proximal con pérdida del borde en cepillo (B), edema celular (C), desprendimiento de células hacia la luz (D) y túbulo distales (E). H/E, objetivo: 40X.

Por último, en la corteza renal de las ratas tratadas con NiCl<sub>2</sub> + quercetina se observó un daño estructural similar al del grupo tratado con NiCl<sub>2</sub> (figuras 8-73 y 8-74).



**Figura 8-73.** Corteza renal de rata con tratamiento terapéutico ( $\text{NiCl}_2$  1 mg/Kg, i.p. + quercetina 25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.). Se observan: glomerulos (A), túbulo proximal con pérdida del borde en cepillo (B), edema celular (C), desprendimiento de células hacia la luz (D), y túbulo distales (E). H/E, objetivo: 10X.



**Figura 8-74.** Corteza renal de rata con tratamiento terapéutico ( $\text{NiCl}_2$  1 mg/Kg, i.p. + quercetina 25 mg/Kg/día, 5 días, i.p.). Se observan: túbulo proximal con pérdida del borde en cepillo (A), desprendimiento de células hacia la luz (B) y edema celular (C). H/E, objetivo: 40X.



## 9. DISCUSIÓN

El níquel es un metal cuya toxicidad depende de la vía y tiempo de exposición, así como de la solubilidad de sus compuestos. Esta toxicidad puede ser inmunológica, neurológica, reproductiva y de efectos carcinógenos (Coogan et al, 1989). La exposición ocupacional al Ni ocurre en las minas, en los procesos relacionados con su refinación y durante la soldadura con este metal. Se ha reportado un aumento del riesgo de contraer cáncer en vías respiratorias para los mineros y trabajadores expuestos al Ni (Clemens y Landolph, 2003; WHO, 1991). En este contexto, la OMS ha seleccionado cinco sustancias de Ni como prioritarias para estudiar la evaluación de riesgos: polvo de níquel, sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4$ ), cloruro de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ), carbonato de níquel ( $\text{NiCO}_3$ ) y el nitrato de níquel [ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ].

En los humanos, independientemente de la ruta de exposición, la mayoría del Ni absorbido es excretado por los riñones (Nielsen et al, 1999). Dado que el daño renal temprano producido por el Ni ha sido poco estudiado, en este trabajo se analizó la toxicidad renal producida por este metal (a dosis bajas) y el efecto del antioxidante quercetina sobre ese daño.

### 9.1 Peso corporal.

Con relación al grupo control, este parámetro no se modificó en los animales tratados con  $\text{NiCl}_2$ . Sin embargo, aumentaron significativamente de peso: las ratas tratadas con quercetina, el grupo que recibió quercetina+ $\text{NiCl}_2$  (tratamiento preventivo) y las ratas tratadas con  $\text{NiCl}_2$ +quercetina (tratamiento terapéutico).

Al respecto, se puede señalar que en el ambiente aeróbico de los animales, las especies reactivas de oxígeno o ROS (como el radical hidroxil, el peróxido de hidrógeno, el radical superóxido, etc.) se forman de manera continua durante el metabolismo celular. De no ser inactivadas de manera oportuna y eficiente, las ROS atacan estructuras importantes de las de las células (como biomoléculas, mitocondrias, lípidos y proteínas), lo que puede conducir al daño o muerte celular. En este contexto, la quercetina, al actuar como antioxidante, puede proteger a las células contra el daño oxidativo producido por las ROS, lo que a su vez, mantiene su estructura y su funcionamiento (Eckert et al, 2003; Min y Ebeler, 2008).

### 9.2 Flujo urinario.

Respecto al valor medio del grupo control, el flujo urinario aumentó significativamente en las ratas tratadas con Ni a las 24 y 96 horas. Este parámetro no se modificó en los animales tratados con quercetina ni en el grupo que recibió  $\text{NiCl}_2$ +quercetina. Sin embargo, en el grupo tratado con quercetina+ $\text{NiCl}_2$ , el flujo urinario disminuyó de manera significativa a las 5, 24, 72, 96 y 120 horas.

Ha sido reportado que las sales inorgánicas del Ni, como el  $\text{NiCl}_2$  y el  $\text{NiSO}_4$ , pueden alterar la función de los riñones (Das et al, 2008). El daño renal puede manifestarse con la pérdida de la capacidad de concentración y dilución de la orina. Al

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

respecto, en intoxicaciones agudas de humanos con Ni se ha encontrado dañada la unión corticomedular (Sunderman et al, 1988). Este fenómeno puede afectar la capacidad de los riñones para concentrar la orina, motivo por el cual se genera poliuria. El fenómeno contrario, oliguria de las ratas tratadas con quercetina+NiCl<sub>2</sub>, puede relacionarse con un proceso de insuficiencia renal que involucra la interrupción de los mecanismos de contracorriente y/o la pérdida de la función de las nefronas. En este contexto, ha sido reportado que la exposición subaguda de ratas al NiSO<sub>4</sub> (agua de beber) disminuye significativamente el volumen de orina (Obone et al, 1999). Debe señalarse que este daño no fue revertido por la quercetina.

### 9.3 Osmolaridad de la orina.

La osmolaridad es la concentración total de solutos en la orina. En los mamíferos, su valor normal oscila entre 100-900 mOsm/Kg, en función de la concentración de vasopresina en sangre y de la velocidad de excreción urinaria de solutos. Valores de osmolaridad <700 mOsm/Kg pueden ser normales o anómalos según el estado de hidratación del individuo o el estado funcional de los riñones (Beers y Berkow, 1999). En este contexto, es importante señalar que no existen publicaciones relacionadas con el daño producido por el Ni sobre la osmolaridad de la orina.

En nuestro trabajo, con relación al grupo control, la osmolaridad disminuyó significativamente (dilución de la orina) en los animales tratados con NiCl<sub>2</sub> a las 24 horas (daño temprano). Este fenómeno puede estar relacionado con el aumento del flujo urinario producido por el Ni y con el incremento progresivo de la eliminación urinaria de glucosa (diuresis osmótica). Debe subrayarse que la pérdida de la capacidad renal para concentrar la orina, en presencia de un estímulo adecuado de vasopresina, se relaciona con daño tubulointersticial (nefritis tóxica); este fenómeno suele aparecer mucho antes de que aparezca un descenso en la velocidad de filtración glomerular (Beers y Berkow, 1999).

Por otra parte, la osmolaridad de la orina no se modificó en las ratas tratadas con quercetina. Sin embargo, en el grupo que recibió quercetina+NiCl<sub>2</sub>, la osmolaridad aumentó de manera significativa a las 72, 96 y 120 horas, mientras que en los animales tratados con NiCl<sub>2</sub>+quercetina, también hubo un incremento significativo a las 120 horas. Este fenómeno puede relacionarse con la pérdida de la capacidad de las nefronas para reabsorber los solutos presentes en el líquido tubular y con la oliguria encontrada en las ratas tratadas con quercetina+NiCl<sub>2</sub> (insuficiencia renal). En este contexto, ha sido reportado que la exposición subaguda de ratas al NiSO<sub>4</sub> en el agua de beber (13 semanas) disminuye significativamente el volumen de orina e incrementa el peso relativo de los riñones (Obone et al, 1999). Este daño no fue revertido por la quercetina.

### 9.4 Excreción urinaria de sodio y potasio.

Con relación al grupo control, la masa excretada de Na<sup>+</sup> disminuyó de manera significativa en los animales tratados con Ni a las 120 horas. Este parámetro no se modificó en los otros grupos experimentales: animales tratados con quercetina, ratas que recibieron quercetina+NiCl<sub>2</sub> y animales tratados con NiCl<sub>2</sub>+quercetina. La

disminución de la masa excretada de  $\text{Na}^+$  en los animales expuestos al Ni puede ser debida a una caída en la tasa de filtración glomerular, como consecuencia de una hipoperfusión renal, lo que disminuye la concentración de este electrolito en el líquido tubular (insuficiencia renal de tipo prerrenal). Aunque no se han reportado alteraciones hemodinámicas renales producidas por el Ni que fundamenten lo anteriormente expuesto, ha sido descrito que este metal es un potente vasoconstrictor de las arterias coronarias en animales de experimentación (Leach et al, 1985; Leach y Sunderman, 1985). Además, en experimentos *in vitro* se ha encontrado que el Ni se une a la membrana basal de los capilares glomerulares de bovinos (Templeton, 1987). Este fenómeno *in vivo* puede modificar el proceso de la filtración glomerular. Por otra parte, la masa excretada de potasio fue semejante en todos los grupos de animales de experimentación. Es pertinente señalar que al analizar la función renal de 26 trabajadores ocupacionalmente expuestos al Ni, el daño renal encontrado fue bajo (Sanford y Nieboer, 1992).

#### 9.5 Excreción urinaria de glucosa y fosfatos.

Con relación al valor medio del grupo control, la concentración urinaria de glucosa aumentó significativamente en las ratas tratadas con Ni, a las 48, 72 y 96 horas. Este parámetro no se modificó en los animales tratados con quercetina, ni en las ratas expuestas al  $\text{NiCl}_2$ +Quercetina. Sin embargo, en los animales tratados Quercetina+ $\text{NiCl}_2$  la concentración de glucosa en la orina aumentó significativamente a las 5 y 24 horas.

Por otra parte, respecto al valor medio del grupo control, la concentración de fosfatos en la orina no cambió de manera significativa en los grupos tratados con Ni, quercetina y Quercetina+ $\text{NiCl}_2$ . Sin embargo, en los animales tratados con  $\text{NiCl}_2$ +Quercetina este parámetro disminuyó de manera significativa a las 48 horas.

Ha sido descrito que en las células proximales de las nefronas, la reabsorción de glucosa y fosfatos está acoplada a la reabsorción de sodio, utilizando un acarreador transmembranal (sodio-glucosa o sodio-fosfatos) ubicado en la membrana luminal (Ullrich et al., 1974; Knox y Haramati, 1985). De esta manera, cuando se daña la estructura de la membrana luminal se altera el funcionamiento de los acarreadores y se bloquea la reabsorción de las sustancias transportadas.

En este contexto, ha sido reportado que el Ni genera radicales libres de oxígeno como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (Das et al, 2008). Estos radicales pueden dañar los lípidos de las membranas de las células produciendo lipoperoxidación. Al respecto, se ha demostrado que el Ni incrementa significativamente la lipoperoxidación en los riñones de ratas (43%) y ratones (100%) tratados con una sola dosis de acetato de níquel (170 nmoles/Kg, ip), a las 3-48 horas después de la exposición (Misra et al, 1990; Misra et al, 1991). Por otra parte, Dieter et al. (1988) describen que el daño renal agudo producido por el Ni incluye la pérdida de células epiteliales de las nefronas y la presencia de estructuras hialinas en la luz tubular, lo que sugiere la pérdida de proteínas.

Por otra parte, respecto a los efectos del tratamiento de las ratas con Quercetina+NiCl<sub>2</sub> (incremento de la concentración urinaria de glucosa a las 5 y 24 horas) es pertinente señalar la paradoja de la quercetina. Al respecto, se ha reportado que en el proceso protector de la quercetina como antioxidante (atrapadora de especies reactiva de oxígeno) puede ser convertida en un producto tóxico para las células debido a que: 1) disminuye los niveles de GSH, 2) incrementa la concentración citosólica de Ca<sup>++</sup> libre y 3) reacciona con los grupos tiol de las proteínas lo que puede conducir a su inactivación; el producto tóxico es la orto-quinona la cual forma dos aductos con el GSH: 6-GSQ y 8-GSQ (Boots et al., 2003; Boots et al, 2007). Por lo tanto, en ausencia de GSH, los derivados de la quercetina pueden reaccionar con los grupos tiol de las proteínas y dañar a las células.

#### 9.6 Excreción urinaria de proteínas.

La proteinuria es uno de los signos de enfermedad renal glomerular y tubular. Entre las causas fisiopatológicas de este problema se encuentran: el aumento de eliminación de células tubulares por necrosis, la disminución de la reabsorción tubular de proteínas de peso molecular bajo (microglobulinas) y el incremento de la filtración de proteínas por alteraciones de la permeabilidad de los capilares glomerulares (Beers y Berkow, 1999).

En este trabajo, respecto al valor medio del grupo control, la concentración de proteínas en la orina no se modificó en los grupos tratados con NiCl<sub>2</sub> ni con Quercetina. Con relación al Ni, estos resultados concuerdan con los datos publicados de un estudio de función renal realizado con 26 trabajadores expuestos al Ni: se encontró que en la mayoría de ellos la excreción urinaria de  $\beta$ 2-microglobulinas, proteínas totales y creatinina se encontraban dentro de límites normales (Sanford y Niebor, 1992); sin embargo, los mismos autores señalan que en animales de experimentación las sales de Ni pueden producir proteinuria moderada.

Además, la concentración urinaria de proteínas aumentó significativamente en los grupos tratados con Quercetina+NiCl<sub>2</sub> (5, 24, 72, 96 y 120 h) y con NiCl<sub>2</sub>+Quercetina (96 y 120 h). Al respecto, se puede inferir que dicho daño se dio por la suma de los efectos del níquel y de la Quercetina (Misra et al, 1990; Boots et al, 2007). Conviene señalar que en un modelo de ratas Wistar nefróticas (daño glomerular crónico producido por la adriamicina), la quercetina no disminuyó la proteinuria, ni la caída en la depuración renal de creatinina, así como tampoco el daño túbulointersticial de la corteza renal (Rangan et al, 2002).

#### 9.7 Creatinina en orina.

La creatinina es un producto de la descomposición de la creatina, sustancia que abunda en el músculo. La creatinina es eliminada totalmente por los riñones. La cuantificación de su concentración urinaria es útil para evaluar la función renal, aunque los resultados de esta determinación dependen de la edad y de la masa corporal del individuo. Los resultados anormales de la creatinina en la orina son inespecíficos, pero pueden deberse a trastornos fisiopatológicos como glomerulonefritis, insuficiencia

renal, distrofia muscular, azotemia prerrenal, disminución del flujo sanguíneo renal y obstrucción de las vías urinarias (Bazari, 2007).

En este trabajo, respecto al valor medio del grupo control, la concentración urinaria de creatinina aumentó significativamente en los grupos tratados con: Ni (a las 120 horas), quercetina (96 y 120 horas), Quercetina+NiCl<sub>2</sub> (72, 96 y 120 horas) y NiCl<sub>2</sub>+Quercetina (48 y 120 horas). En estudios experimentales de toxicidad subaguda se ha reportado que el Ni disminuye el peso corporal y daña al hígado y los riñones de los animales expuestos a este metal (Weber y Reid, 1969). Estos trastornos fisiopatológicos pueden estar relacionados con el incremento en la concentración urinaria de creatinina de nuestros animales de experimentación. Por otra parte, respecto a los efectos del tratamiento de las ratas con Quercetina+NiCl<sub>2</sub> o NiCl<sub>2</sub>+Quercetina (incremento de la concentración urinaria de creatinina) es pertinente recordar lo descrito en párrafos anteriores: la quercetina puede ser convertida en un producto tóxico para las células porque disminuye los niveles de GSH y aumenta la concentración citosólica de Ca<sup>++</sup> libre (Boots et al., 2003; Boots et al, 2007).

#### 9.8 Enzimuria.

Algunas alteraciones renales mantienen una relación estrecha con enzimas específicas excretadas en la orina. Esto se debe a que las enzimas no están distribuidas de manera uniforme a lo largo de las nefronas, existiendo incluso diferencias importantes en su localización celular. Tales diferencias pueden ser utilizadas para localizar áreas o sitios específicos de daño renal, por ejemplo, la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa, la alanina-aminopeptidasa y la fosfatasa alcalina son enzimas que se encuentran en la membrana del borde en cepillo de las células proximales y su presencia en la orina se ha utilizado para identificar el daño producido por los xenobióticos en este sitio de las nefronas (Jaramillo et al, 2006).

En nuestro estudio, con relación al grupo control, el NiCl<sub>2</sub> aumentó significativamente la actividad urinaria de la aminopeptidasa de alanina (APA) a las 72 y 96 horas, mientras que la dipipeptidilaminopeptidasa-IV (DAP-IV) tuvo incrementos no significativos a las 96 y 120 horas. Paradójicamente, la actividad urinaria de la transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo (TPG) disminuyó de manera significativa a las 5, 24 y 120 horas. Lo anterior indica que el Ni puede dañar a las células proximales de las nefronas. En efecto, la pérdida urinaria de las enzimas antes descritas o su inhibición afecta sus funciones celulares, ya que están involucradas en la reabsorción proximal de los aminoácidos filtrados en los glomérulos (Thompson y Meister, 1976; Rahfeld et al., 1991; Morgan et al., 1994). Al respecto, se ha reportado que el túbulo proximal presenta manifestaciones marcadas de toxicidad para la mayoría de los metales después de la exposición aguda o crónica (Fowler, 1996). También ha sido publicado que las enzimas localizadas en la membrana del borde en cepillo de las células proximales pueden ser dañadas por la exposición a los metales (Fatima et al, 2005).

Además, en nuestro trabajo, la quercetina aumentó de manera significativa la actividad urinaria de las tres enzimas estudiadas: APA (a las 48, 72, 96 y 120 horas), TGP (a las 72 y 120 horas) y DAP-IV (a las 5, 24 y 72 horas). Este fenómeno (enzimuria) también se presentó en las ratas tratadas con quercetina+NiCl<sub>2</sub> o con



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

NiCl<sub>2</sub>+quercetina. En este contexto, ha sido reportado que la quercetina, además de sus efectos antioxidantes, puede tener efectos pro-oxidantes nocivos para las células. En efecto, Rangan et al. (2002) demostraron que la exposición de ratas Wistar a la quercetina (0.5 y 2 % en el alimento, durante 22 días) incrementa significativamente la proteinuria y la producción de malondialdehído. Además, Dieter et al. (1988) describen que el daño renal agudo producido por el Ni incluye la pérdida de células epiteliales de las nefronas. Por lo tanto, en los animales tratados con quercetina y Ni se puede hablar de un daño sinérgico producido estas sustancias.

#### 9.9 Concentración renal de glutatión reducido (GSH).

Respecto al valor medio del grupo control, la concentración renal de GSH disminuyó significativamente en las ratas tratadas con: NiCl<sub>2</sub> (69 %), quercetina (71 %), quercetina+NiCl<sub>2</sub> (78 %) y NiCl<sub>2</sub>+quercetina (64 %).

La prevención de la oxidación es un proceso esencial en todos los organismos aeróbicos, de tal manera que la disminución de la protección antioxidante puede conducir a la citotoxicidad (Matés, 2000). Se ha descrito que en las células existen diferentes sistemas antioxidantes y el GSH forma parte de ellos (Maxwell, 1995). Las funciones del GSH incluyen: 1) detoxificación de compuestos endógenos y exógenos como las especies reactivas de oxígeno y los intermediarios reactivos, 2) mantenimiento de la estructura normal de las proteínas y otras moléculas (grupos tiol) y 3) proporcionar a las células equivalentes reductores del tipo NADPH (DeLeve y Kaplowitz, 1991).

En nuestro trabajo, la disminución de la concentración renal de GSH en todos los grupos estudiados puede estar relacionada con: a) un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno generado por el Ni (Valko et al, 2005; Das et al, 2008) y b) un aumento en el consumo de GSH por la biotransformación celular de la quercetina (Boots et al., 2003; Boots et al, 2007).

En este contexto, Ferraresi et al. (2005) al analizar los efectos anti y prooxidantes de la quercetina, en función del tiempo de exposición, describen que en periodos prolongados existe una actividad prooxidante. Robaszkiewicz et al. (2007) en estudios celulares *in vitro* encontraron que la quercetina disminuyó la producción de ERO en las células, pero indujo estrés oxidativo por la producción de peróxidos en el medio extracelular. Así, a concentraciones bajas la quercetina estimuló la proliferación celular e incrementó la capacidad antioxidante total de las células, mientras que a concentraciones altas disminuyó la supervivencia y viabilidad celular, el contenido de tioles, la capacidad antioxidante total y las actividades de las enzimas SOD, CAT y glutatión S-transferasa.

#### 9.10 Concentración de malondialdehído en los riñones.

En las células, la peroxidación lipídica ocurre cuando las especies reactivas de oxígeno atacan los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos membranales. En este proceso se libera malondialdehído (MDA) cuya concentración tisular o sérica es

proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados. Por lo tanto, el MDA es un buen indicador de peroxidación lipídica (Puig, 2003).

En nuestro trabajo, con relación al valor medio del grupo control, la concentración renal de malondialdehído aumentó significativamente en las ratas tratadas con: NiCl<sub>2</sub> (252 %), quercetina (633 %), quercetina+NiCl<sub>2</sub> (260 %) y NiCl<sub>2</sub>+quercetina (165 %). El aumento de la concentración renal de MDA en todos los grupos estudiados puede estar relacionado con: a) un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno generado por el Ni (Valko et al, 2005; Das et al, 2008) y b) un aumento en el consumo de GSH por la biotransformación celular de la quercetina (Boots et al., 2003; Boots et al, 2007).

En este contexto, Chakrabarti y Bai (1999) reportan que el NiCl<sub>2</sub> induce lipoperoxidación en células renales cultivadas *in vitro*. A su vez, Sunderman et al. (1985) y Misra et al. (1990) describen daño en el hígado y los riñones debido a la lipoperoxidación generada por el Ni. Otros estudios que reportan daño oxidativo ocasionado por el Ni son los realizados por Gupta et al. (2007) y M'Bemba-Meka et al. (2005). Por otra parte, respecto al efecto del tratamiento de las ratas con quercetina o quercetina+Ni (aumento de la concentración renal de MDA), en estudios *in vitro* e *in vivo* se ha encontrado que la biotransformación oxidativa de la quercetina genera metabolitos tóxicos para las células como la o-quinona y la o-semiquinona. Durante este proceso se forman aniones superóxido y disminuyen las concentraciones celulares de GSH (Metodiewa et al, 1999; Boots et al, 2007).

#### 9.11 Concentración renal de ATP.

Respecto al valor medio del grupo control, la concentración renal de ATP no presentó cambios significativos en ninguno de los grupos tratados (NiCl<sub>2</sub>, quercetina, quercetina+NiCl<sub>2</sub> y NiCl<sub>2</sub>+quercetina). Aunque existen trabajos que describen la capacidad de algunos flavonoides, entre ellos la quercetina, para dañar a las mitocondrias por inhibición o desacople de la cadena respiratoria (Dorta et al, 2006), bajo nuestras condiciones experimentales ese fenómeno no se presentó.

#### 9.12 Daño estructural de los riñones.

Los riñones fueron dañados por el Ni y por los radicales tóxicos derivados de la biotransformación de la quercetina. El mayor daño se presentó en la porción tubular proximal de las nefronas. En efecto, las células proximales de la corteza renal de las ratas tratadas con Ni y/o quercetina mostraron características típicas de necrosis como: intensa vacuolización citoplásmica (edema celular), pérdida del borde en cepillo y cambios nucleares. Además, los grupos de ratas que recibieron Ni o Ni+quercetina mostraron mayor cantidad de células y túbulos dañados, en comparación con los otros tratamientos. Este daño fue acompañado de glucosuria, enzimuria y aumento de las concentraciones de malondialdehído en mayor grado que en los otros grupos experimentales. Por otra parte, en los grupos tratados con quercetina y quercetina+Ni se observó un daño estructural menor.



Profundizando en este rubro, el análisis histológico mostró mayor daño en la corteza interna de los riñones que en la externa. Al respecto, aunque cada nefrona presenta los mismos elementos estructurales, se han reportado dos tipos de ellas: las nefronas corticales cuyos glomérulos se ubican en la parte externa de la corteza y las nefronas yuxtamedulares cuyos glomérulos se localizan en la región profunda de la misma, cerca de la médula (corteza interna). Existen diferencias en la irrigación sanguínea de estos dos tipos de nefronas. En efecto, experimentalmente ha sido demostrado que el flujo sanguíneo intrarrenal es mayor en la corteza (80-85 % del flujo renal total) y que disminuye a través de la región yuxtamedular hasta alcanzar menos del 10 % del flujo renal total en la médula (WHO, 1991). Además, se ha demostrado también que en los riñones la  $pO_2$  disminuye de manera significativa a medida que se profundiza en su tejido (Brezis et al, 1984).

Esta característica de irrigación de las nefronas yuxtamedulares podría estar relacionada con el mayor daño estructural que encontramos en el epitelio del segmento proximal de la región profunda de la corteza, ya que en situaciones de insuficiencia renal la hipoxia tisular favorece la formación de especies reactivas de oxígeno (Thadhani et al, 1996), a lo que habría que sumar el estrés oxidativo producido por el Ni (Das et al, 2008). Sin embargo, Sunderman et al (1988) reportaron un efecto contrario a lo observado en nuestro estudio, dado que ellos encontraron menor daño renal tubular en la región corticomedular en trabajadores de una planta de galvanoplastia, quienes accidentalmente bebieron agua contaminada con sulfato y cloruro de níquel. Este fenómeno se puede explicar con base a diferencias en el tiempo de exposición.

Con relación a la necrosis, cuando las células tubulares mueren se desprenden de la membrana basal y se ubican en la luz de los túbulos renales, donde son arrastradas por el fluido tubular y, finalmente, son eliminadas con la orina. Sin embargo, si la pérdida de células es muy grande, este proceso puede llegar a obstruir o tapan la luz de los túbulos agravando con ello el problema de insuficiencia renal, ya que se genera una presión hidrostática negativa que disminuye la intensidad de la filtración glomerular (Cotran, *et al*, 1999; Esteller y Cordero, 2001; Thadhani et al, 1996). Al respecto, en nuestro estudio, la luz de algunos túbulos presentó una cantidad relativamente elevada de células muertas.

Finalmente, debe señalarse que el daño estructural renal producido por el Ni, en intoxicaciones agudas o subagudas de animales de experimentación, ha sido reportado por otros autores (Mogilevskaya O, 1963; Mathur et al, 1977; Pereira et al, 1998).

## 10. CONCLUSIONES

1. Una dosis baja de Ni produce daño renal temprano a nivel funcional y estructural.
2. La quercetina es capaz de generar efectos tóxicos en los riñones debido a sus efectos pro-oxidantes.
3. El tratamiento preventivo con quercetina revierte parcialmente la toxicidad renal del níquel, principalmente el daño estructural (manifestación de efectos antioxidantes).
4. El tratamiento correctivo con quercetina generó efectos tóxicos en los riñones posiblemente por sinergia con los efectos pro-oxidantes del níquel.



## 11. GLOSARIO

**Actividad enzimática.** Se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en un minuto.

**Aminopeptidasa de alanina.** Enzima que cataliza la transferencia del grupo  $\gamma$ -glutamilo a una variedad de aminoácidos aceptores.

**Antioxidante.** Sustancia que bloquea el efecto negativo de los radicales libres. Ejemplo: vitaminas, minerales y enzimas.

**Borde en cepillo renal.** Conjunto de microvellosidades presentes en la superficie luminal de las células del túbulo renal.

**Creatinina.** Compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina, nutriente útil para los músculos.

**Dipeptidilaminopeptidasa-IV.** Enzima que hidroliza dipéptidos, principalmente cuando el segundo aminoácido del amino terminal ( $\text{H}_2\text{N-R-COOH}$ ) es la prolina.

**Enzimuria.** Presencia de enzimas en la orina.

**Estrés oxidativo.** Es causado por un desequilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante.

**Filtrado glomerular.** Volumen de fluido filtrado por unidad de tiempo desde los capilares glomerulares renales hacia el interior de la cápsula de Bowman.

**Flavonoide.** Término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como “vía biosintética de los flavonoides”, cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. La estructura base es un esqueleto C6-C3-C6.

**Lisis celular.** Rotura de la membrana celular.

**Malondialdehído.** Resulta una medida del proceso de oxidación, especialmente peroxidación lipídica.

**Nefrona.** Unidad estructural y funcional básica del riñón, responsable de la purificación de la sangre.

**Nefrotoxicidad.** Afectación renal por tóxicos, que se caracteriza por alteraciones funcionales o estructurales.

**Oxidación.** Pérdida de electrones por un átomo.

**Prooxidante.** Sustancia que puede producir subproductos del oxígeno del metabolismo que pueden dañar las células.

**Quelante.** Sustancia que en el cuerpo promueve la formación de complejos con iones de metales pesados, para de este modo evitar la toxicidad de éstos. A estos complejos se les conoce como quelatos.

**Quercetina.** Flavonoide antioxidante utilizado desde hace más de treinta años para reforzar la resistencia a las alergias alimentarias y respiratorias. Sus efectos biológicos se explican principalmente por su actividad antioxidante, por una sinergia específica con la vitamina C (quercetina y vitamina C se protegen y se regeneran mutuamente) y por una actividad antiinflamatoria diversificada y polivalente.



## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Adams H: Adenosine-5-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase. In *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer Ed.), Academic Press, pp 539-543, 1963.
- Amália PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS: Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci*, 52(10): 2616-21, 2007.
- Ambrose AM, Larson PS, Borzelleca JR, Hennigar GR, Jr: Long term toxicologic assessment of nickel in rats and dogs. *J Food Sci Technol* 1976; 13: 181-7.
- Anjaneyulu M, Chopra K: Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 31(4): 244-8, 2004.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry): Toxicological profile for nickel. Atlanta, GA, USA: ATSDR/U.S. Public Health Service, ATSDR/TP-88/19; 1988.
- Bauer JB: Carbohydrates and nitrogen compounds. In: *Clinical Laboratory Methods*. CB Mosby, St.Louis-USA, Chap. 21, 9<sup>th</sup> Edition, pp 472-505, 1982.
- Bazari H: Approach to the patient with renal disease. In: *Cecil Medicine* (Goldman L, Ausiello D, Eds), Saunders-Elsevier, 23<sup>rd</sup> Ed, Chap. 115, 2007.
- Beers MH, Berkow R (Eds): *El Manual Merck*, Sección 17-Trastornos Genitourinarios, pp 1807-1820, Harcourt, 1999.
- Bhamra RK, Costa M: Trace elements aluminum, arsenic, cadmium, mercury and nickel. *Environmental Toxicants. Human Exposures and Their Health Effects* (Lippmann M, Ed), Van Nostrand Reinhold Co, New York-USA, pp 575-632, 1992.
- Boots AW, Kubben N, Haenen G, Bast A: Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. *Biochem Biophys Res Commun*, 308(3): 560-565, 2003.
- Boots AW, Balk JM, Bast A, Haenen G: The reversibility of the glutathionyl-quercetin adduct spreads oxidized quercetin-induced toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007.
- Boots AW, Li H, Schins RP, Duffin R, Heemskerk JW, Bast A, Haenen GR: The quercetin paradox. *Toxicol Appl Pharmacol*, 222(1): 89-96, 2007.
- Brezis M, Rosen D, Silva P, Epstein FH: Renal ischaemia: a new perspective. *Kidney Int*, 26: 375-383, 1984.
- Chakrabarti SK, Bai C: Role of oxidative stress in nickel chloride-induced cell injury in rat renal cortical slices. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 1501-10.
- Chang WC: *Toxicology of Metals*. Lewis Publishers, USA, 1<sup>st</sup> Ed, 1996.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

-Clarkson TW, Shaikh ZA: General principles underlying the renal toxicity of metals. In Bach and Bonner, Nephrotoxicity-Assessment and Pathogenesis. Wiley & Sons, First Ed, pp 263-279, 1982.

Clemens F, Landolph JR: Genotoxicity of samples of nickel refinery dust. Toxicol Sci, 73(1): 114-123, 2003.

-Cohn VH, Lyle J: A fluorometric assay for glutathione. Anal Biochem, 14: 434-440, 1966.

-Coogan TP, Latta DM, Snow ET, Costa M: Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds, In: McClellan RO, editor. Critical reviews in toxicology, vol. 19. Boca Raton, FL: CRC Press; 1989. p. 341-84.

-Cotran RS, Kumar V, Collins T: Robbins' patología estructural y funcional. Madrid. McGraw-Hill Interamericana, pp 1475, 2000.

-Das M, Ray PK: Lipid antioxidant properties of quercetin in vitro. Biochem Int 17 (2): 203-209, 1988.

-Das KK, Das SN, Dhundasi SA: Nickel, its adverse health and oxidative stress. Indian J Med Res, 128: 412-425, 2008.

-DeLeve LD, Kaplowitz N: Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. Pharmacol. Ther. 52, 287-305, 1991.

-Dieter MP, Jameson CW, Tucker AN, Luster MI, French JE, Hong HL et al: Evaluation of tissue disposition, myelopoietic and immunologic responses in mice after long-term exposure to nickel sulphate in the drinking water. J Toxicol Environ Health, 24: 356-72, 1988.

-Dorta D, Calgaro-Helena AF, Antonio SC, Curti C: Structure-Activity of flavonoids with mitochondrial energetic process. Toxicol Sci, 90(1-S): 286, 2006.

-Drago Serrano ME, López López M, Saínz Espuñes TR: Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. Rev Mex Cs Farmac, 37(4): 58-68, 2006.

-Draper H, Hadley M: Methods of Enzymology, 186: 421, 1990.

-Eaton DC, Pooler JP: Vander's Renal Physiology. McGraw-Hill Medical. 6th edition. pp 214, 2004.

-Eckert A, Keil U, Kressmann S, Schindowski K, Leutner S, Leutz S, Müller WE: Effect of EGb 761 Ginkgo biloba extract on mitochondrial function and oxidative stress. Pharmacopsy, 36 Suppl 1: S15-23, 2003.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

-Erlejman AG, Verstraeten SV, Fraga CG, Oteiza PI: The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free radical research*, 38(12): 1311-20, 2004.

-Esteller A, Cordero M: *Fundamentos de fisiopatología*. 2da Ed. Madrid. McGrawHill Interamericana, pp 150-1, 2001.

-Fairhurst S, Illing HPA: The toxicity of nickel and its inorganic compounds. *Tox Rev*, 19: 204, 1987.

-Fatima S, Arivarasu NA, Banday AA, Yusufi AN, Mahmood R: Effect of potassium dichromate on renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. *Human and Experimental Toxicology*, 24: 631-638, 2005.

-Ferraresi R, Troiano L, Roat E, Lugli E, Nemes E, Nasi M, Pinti M, Fernandez MI, Cooper EL, Cossarizza A: Essential requirement of reduced glutathione (GSH) for the anti-oxidant effect of the flavonoid quercetin. *Free Radic Res*, 39 (11): 1249-58, 2005.

-Formica JV, Regelson W: Review of the biology of quercetin and related flavonoids. *Food Chem Toxicol* 33 (12): 1061 – 1080, 1995.

- Fowler BA: The nephropatology of metals. In: *Toxicology of Metals* (McCombs Ken, Ed), CRC Press, Inc, Chap 43, pp 721, 1996.

-Francescato HD, Coimbra TM, Costa RS, Bianchi L: Protective effect of quercetin on the evolution of cisplatin-induced acute tubular necrosis. *Kidney Blood Press Res*, 27(3): 148-58, 2004.

-García Saura MF, Galisteo M, Villar IC, Bermejo A, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J: Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Mol Cell Biochem*, 270: 147-155, 2005.

-Gitlitz PH, Sunderman FW, Goldblatt PJ: Aminoaciduria and proteinuria in rats after single intraperitoneal injection of Ni (II). *Toxicol Appl Pharmacol*, 34: 430-440, 1975.

-Goyer, RA: Toxic effects of metals. In Casarett and Doull's, *Toxicology-The Basic Science of Poisons* (Andur MO, Doull J, Klaassen CD, Eds.). Pergamon Press, New York, 5<sup>th</sup> Edition, Chap. 19, pp. 582-635, 1996.

-Graham DG: Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 1978: 14, 133-643.

-Gupta AD, Dhundasi SA, Ambekar JG, Das KK: Effect of Lascorbic acid on antioxidant defense system in testes of albino rats exposed to nickel sulphate. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 18: 87-95, 2007.

-Havsteen B: Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32: 1141-48, 1983.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

-Huk I, Brovkovich V, Nanobash Vili J, Weigel G, Neumayer C, Partyka L, Patton S, Malinski T: Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br J Surg* 85 (8): 1080-1085, 1998.

-IARC (International Agency for Research on Cancer): Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC, Lyons, France, Vol 49, pp 318-411, 1990.

-Jacobs BP, Browner WS: Ginkgo biloba a living fossil. *Am J Med*, 108: 341-342, 2002.

-Jaramillo Juárez F, Rodríguez Vázquez ML, Reyes Sánchez JL: Toxicología Renal. En: Toxicología Básica (Jaramillo Juárez F, Rincón Sánchez AR, Posadas del Río A, Eds.), Editado por UAA-U de G-UJED, Primera Edición, Cap. 9, pp 137-166, 2006.

-Jaramillo JF, Rincón SAR, Posadas RFA: Toxicología Básica. Ed. Textos Universitarios, México, Primera Edición, pp 331, 2006.

-Jovanovic SV, Simic MG: Antioxidant in nutrition. *Ann N Y Acad Sci*. 899: 326-34, 2000.

-Klaassen CD: Heavy metals and heavy metals antagonists. In Goodman & Gilman, The Pharmacological Bases of Therapeutics. McGraw-Hill, New York, 9<sup>th</sup> Edition, pp 1649-1673, 1996.

-Klaassen CD, Watkins JB: Efectos tóxicos de metales. En Casarett and Doull's, Manual de Toxicología. McGraw-Hill Interamericana, México, 5a. Edición, Cap. 23, pp 659-722, 2001.

-Knox FG, Haramati A: Renal regulation of phosphate excretion. In: The kidney (Seldin WD, Giebisch G, eds.), Raven Press NY, Vol. II, pp 1381-1396, 1985.

-Leach CN Jr, Linden JV, Hopfer SM: Nickel concentrations in serum of patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris. *Clin Chem*, 31: 556-560, 1985.

-Leach CN Jr, Sunderman FW Jr: Nickel contamination of human serum albumin solutions. *N Engl J Med*, 313: 1232, 1985.

-Lehky P, Lisowski J, Wolf DP, Wacker H: Pig kidney particulate aminopeptidase, a zinc metalloenzyme. *Biochim Biophys Acta*, 321: 274-281, 1973.

-Lock EA: Responses of the kidney to toxic compounds. In General & Applied Toxicology (Ballantyne B, Marris T, Turner P, Eds). Macmillan Press Ltd, London, Chap 21, pp 443-472, 1995.

-López DS y Arancibia SR: Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Rev Fac Med UNAM* Vol. 51 No. 3. pp. 104-107, 2008.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

-Massry SG, Glasscock RJ: Textbook of Nephrology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 4<sup>th</sup> Ed, pp 926-928. 2001.

-Matés JM: Effects of antioxidants enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol*, 153: 83-104, 2000.

-Mathur AK, Chandra SV, Behari J, Tandon SK: Biomedical and morphological changes in some organs of rats in nickel intoxication. *Arch Toxicol*, 37(2): 159-164, 1977.

-Maxwell RJ: Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49: 345-361, 1995.

-MERCK S.A. Industrias Químicas. Bioflavonoides: Quercetina y Rutina. Informe a Profesionales. 2000.

-Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaité E, Segura-Aguilar J: Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med*, 26(1-2): 107-16, 1999.

-Min K, Ebeler SE: Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentration relevant to physiological levels. *Food Chem Toxicol*, 46: 96-104, 2008.

-Misra M, Rodriguez RE, Kasprzak KS: Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology*, 64: 1-17, 1990.

-Misra M, Rodriguez RE, North SL, Kasprzak KS: Nickel-induced renal lipid peroxidation in different strains of mice: concurrence with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicol Lett*, 58(2): 121-133, 1991.

-Mogilevskaya O: Nickel. In: *Toksikologiya Redkikh Metalloy*, Gosudartsvennoe Izdatel'stvo, Meditsinskoi Literatury, Moskva, pp 100-110, 1963.

-Moon JH, Nakata R, Oshima S, Inakuma T, Terão J: Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am J Physiol Regulatory Interactive Comp Physiol*, 279: 461-467, 2000.

-Morales AI, Vicente-Sánchez C, Sandoval JM, Egidio J, Mayoral P, Arévalo MA, Fernández-Tagarro M, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F: Protective effect of quercetina on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is base on its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol*, 44(12): 2092-2100, 2006.

-Morgan EW, Yan B, Greenway D, Petersen DR, Parkinson A: Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterases (Hydrolases A and B). *Arch Biochem Biophys*, 315, 495-512, 1994.

-Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult RS: Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharmacy Pharmacol* 40:787-792, 1988.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

-M'Bemba-Meka P, Lemieux N, Chakrabarti SK: Role of oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and calcium homeostasis in nickel sulphate-induced human lymphocyte death *in vitro*. Chem Biol Interact 2005; 156: 69-80.

-Nielsen NH, Menné T, Kristiansen J, Christensen JM, Borg L, Poulsen LK: Effects of repeated skin exposure to low nickel concentrations: A model for allergic contact dermatitis to nickel on the hands. Br J Dermatol, 141: 676-82, 1999.

-Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn D, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen P: Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr, 74: 418-425, 2001.

-Obone E, Chakrabarty SK, Bai C, Malick MA, Lamantagne L, Subramanian KS: Toxicity and bioaccumulation of nickel sulphate in Sprague-Dawley rats following 13 weeks of subchronic exposure. J Toxicol Environ Health, 57: 379- 401, 1999.

-Pereira MC, Pereira ML, Sousa JP: Evaluation of nickel toxicity on liver, spleen, and kidney of mice after administration of high-dose metal ion. J Biomed Mater Res, 40(1): 40-47, 1998.

-Pérez Trueba G: Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev Cubana Invest Biomed, 22(1)-48-57, 2003.

-Peterson GL: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal Biochem, 83: 346-356, 1977.

-Pietri S, Seguin J, d'Arbigny P, Drieu K, Culcasi M: Ginkgo biloba extract (EGb 761) pre-treatment limits free radicals-induced oxidative stress in patients undergoing coronary bypass surgery. Cardiovasc Drugs Ther, 11:121-131, 1997.

-Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L: Laboratory methods in histotechnology. American registry of pathology, USA, 2<sup>th</sup> Ed, pp 274, 1994.

-Puig L: Concentraciones de malondialdehído en un grupo de diabéticos tipo 1 con retinopatía diabética. Av Diabetol, 19(2): 95-99, 2003.

-Rangan GK, Wang Y, Harris DC: Dietary quercetin augments activator protein-1 and does not reduce nuclear factor-kappa B in the renal cortex of rats with established chronic glomerular disease. Nephron, 90(3): 313-319, 2002.

-Rahfeld J, Schutkowski M, Faust J, Neubert K, Barth A, Heins J: Extended investigation of the substrate specificity of dipeptidyl peptidase IV from pig kidney. Biol Chem Hoppe-Seyler's, 372: 313-318, 1991.

-Reed DJ: Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury. Chem Res Toxicol, 3: 495-502, 1990.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

-Robaszkiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G: Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int*, 31(10): 1245-1250, 2007.

-Russo RO, Sánchez MS: Los flavonoides en la terapia vascular. *Rev Costarr Cardiol*, 8(1), 2006.

-Sanford WE, Nieboer E: Renal toxicity of nickel in humans. In: *Nickel and Human Health, Current Perspectives* (Nieboer E, Nriagu JO, Editors). *Advances in Environmental Science and Technology*, John Wiley and sons, Inc. NY, Vol. 25, pp 123-134, 1992.

-Sahu SC, Washington MC: Quercetin-induced lipid peroxidation and DNA damage in isolated rat-liver nuclei. *Cancer Letters* 58: 75-79, 1991.

-Sahu SC, Washington MC: Effect of antioxidants on quercetin-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Letters* 60:259-264, 1991.

-Sahu SC, Washington MC: Effect of ascorbic acid and curcumen on quercetin-induced nuclear DNA damage, lipid peroxidation and protein degradation. *Cancer Letters* 63: 237-241, 1992.

-Sankara S et al: Flavonoids of eight Bignoniaceus plants. *Phytochemistry*, 11: 1499, 1972.

-Sánchez-Pérez Y, Carrasco-Legleu C, García-Cuellar C, Pérez-Carreón J, Hernández-García S, Salcido-Neyoy M, Alemán-Lazarini L, Villa-Treviño S: Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*, 217(1): 25-32, 2005.

-Shirai M, Yamanishi R, Moon JH, Murota K, Terao J: Effect of quercetin and its conjugated metabolite on the hydrogen peroxide-induced intracellular production of reactive oxygen species in mouse fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(5): 1015-1021, 2002.

-Shoskes DA: Effect of flavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation* 66 (2): 147 – 152, 1998.

-Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, Girard P, Sercombe R: Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol* 57 (2): 199 – 208, 1999.

-Singh D, Chander V, Chopra K: Quercetin, a bioflavonoid, attenuates ferric nitrilotriacetate-induced oxidative renal injury in rats. *Drug Chem Toxicol*, 27(2): 145-156, 2004.

-Soria ML, Repetto G, Repetto M: Revisión general de la toxicología de los metales. En *Toxicología Avanzada* (Repetto M, Editor). Díaz de Santos, España, Cap. 8, pp 293-358, 1995.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

-Stanley E Manahan: Toxicological Chemistry and Biochemistry. Lewis Publishers. 3<sup>th</sup> Ed, New York, pp 217-219, 2003.

-Stohs SJ, Bagchi D: Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. *Free Radic Biol Med*, 18(2): 321-336, 1995.

-Summer JB: A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science*, 100: 413-414, 1944.

-Sunderman FW Jr, Dingle B, Hopfer SM, Swift T: Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution of nickel sulphate and nickel chloride. *Am J Ind Med*, 14: 257-266, 1988.

-Sunderman FW Jr, Marzouk A, Hopfer SM, Zaharia O, Reid MC: Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloridetreated rats. *Ann Clin Lab Sci* 1985; 15 : 229-36.

-Templeton DM: Interaction of toxic cations with the glomerulus: Binding of Ni to purified glomerular basement membrane. *Toxicol*, 43(1): 1-15, 1987.

-Terao J: Dietary flavonoids as antioxidants *in vivo*: Conjugated metabolites of epicatechin and quercetin participate in antioxidative defense in blood plasma. *J Med Invest* 46 (3-4): 159- 168, 1999.

-Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV: Acute renal failure. *New Eng J Med*, 334 (22): 1448-1460, 1996.

-Thompson GA, Meister A: Hydrolysis and transfer reaction catalyzed by  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase; evidence for separate substrate sites and for high affinity for L-cysteine. *Biochem Biophys Res Comm*, 71: 32-36, 1976.

-Trinder P: Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Am Clin Biochem*, 6: 24, 1969.

-Ullrick KJ, Rumrich G, Kloss S: Specificity and sodium-dependence of the active sugar transport in the proximal convolution of the rat kidney. *Pflugers Arch.*, 351: 35-38, 1974.

-USA Department of Health and Human Services (DHHS): *Seventh annual report on carcinogens: Summary 1994*. Research Triangle Park, NC, USA: DHHS, National Institute of Environmental Health Sciences; 1994. p. 262-9.

-Valko M, Morris H, Cronin MTD: Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 12: 1161-1208, 2005.

-Villar del Fresno: *Farmacognosia General*. Edit. Síntesis. España. 1999.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

-Wase AW, Goss DM, Boyd MJ: The metabolism of nickel. I. Spatial and temporal distribution of Ni <sup>63</sup> in the mouse. Arch. Biochem. Biophys. 51: 1, 1954.

-Weber CW, Reid BL: Nickel toxicity in young growing mice. J Anim Sci, 28: 620-623, 1969.

-WHO: Nickel. Environmental Health Criteria. International Programme in Chemical Safety. World Health Organization. Ginebra, Suiza, 1991.

-William P, Tuñón MJ, Collado PS, Herrmann S, Maroni N, Gonzalez-Gallego J: The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats biliary obstruction. J Hepatol 33: 742 – 750, 2000.

-Yao P, Nussler A, Liu L, Hao L, Song F, Schirmeier A, Nussler N: Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nfr2 pathways. J Hepatol, 47(2): 253-61, 2007.

-Yoshimoto T, Furukawa M, Yamamoto S, Horie T, Watanabe-Kohno S: Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. Biochem Biophys Res Commun 116 (2): 612-618, 1983.

-Ziemmerman M, Colciaghi F, Cattabeni F, Di Luca M: Ginkgo biloba extract-from molecular mechanisms to the treatment of Alzheimer's disease. Cell Mol Biol, 48:613-623, 2002.

[http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs/.5htm1](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs/.5htm1)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/queri.fcgi?cmd>

[http://www.enia.org/index.cfm/ci\\_id/3741.htm](http://www.enia.org/index.cfm/ci_id/3741.htm)