



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
MOLECULAR**

**Efecto de un extracto de pitaya sobre la
inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* y la
nefrotoxicidad en ratas, inducidos por cisplatino**

Tesis que presenta

Yadira Yazbe Ramírez Rodríguez

Para obtener el grado de

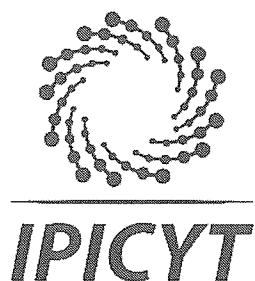
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectoras de la Tesis:

Dr. Lina Raquel Riego Ruiz

Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva

San Luis Potosí, S.L.P., 9 de Julio de 2019



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Efecto de un extracto de pitaya sobre la inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* y la nefrotoxicidad en ratas, inducidos por cisplatino**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Yadira Yazbe Ramírez Rodríguez** y aprobada el nueve de julio del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Codirectora de la tesis



Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva
Codirectora de la tesis



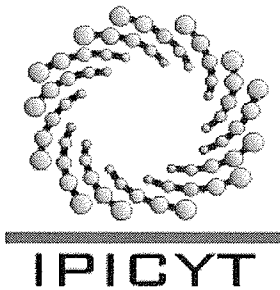
Dr. Angel Gabriel Alpuche Solís
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa de la División de Biología Molecular y en el Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales del Centro de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas (CIIDZA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz y la Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva, apoyada por el proyecto FORDECYT 29635, otorgado a la Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (637582) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 195 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 9 días del mes de julio del año 2019, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretaria	IPICYT
Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Yadira Yazbe Ramírez Rodríguez

sobre la Tesis intitulada:

*Efecto de un extracto de pitaya sobre la inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* y la nefrotoxicidad en ratas, inducidos por cisplatino*

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:03 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 9 días del mes de julio de 2019.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

Se la dedico al forjador de mi camino, a mi padre celestial, el que me acompaña y siempre me levanta de mis continuos tropiezos, al creador de mis padres y de las personas que más amo. Señor, guarda mi corazón cerca de ti y guíame día con día en el camino que lleva hacia ti.

A mis padres y hermanos por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad. Me formaron con reglas y libertades, las cuales me guiaron constantemente para alcanzar mis objetivos. Este nuevo logro es en gran parte gracias a ustedes, he logrado concluir con éxito un proyecto que en un principio parecía imposible e interminable, sin embargo, siempre estuvieron ahí apoyándome y motivándome para no abandonar ese camino.

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. (IPICYT).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A la Dra. Daniela Trujillo por su apoyo y oportunidad que me dio para realizar este proyecto. Por su paciencia, confianza, dedicación y amistad que me brindó e hicieron de mí una mejor persona. Siempre le estaré agradecida.

A la Dra. Lina Riego por abrirme las puertas y permitirme crecer durante este periodo. Por su apoyo y asesoría, y por brindarme un ejemplo de cómo ser una gran investigadora.

Al Dr. Ángel Alpuche por sus comentarios que fueron de gran aporte a mi proyecto.

A la Dra. Karina Robledo por su apoyo, paciencia y dedicación para transmitirme sus conocimientos, por su amistad, y principalmente, por enseñarme que para todo problema hay una solución.

Al técnico del laboratorio Nicolás Gómez y a mis compañeros de trabajo por su apoyo y motivación.

A mis compañeros de generación por brindarme su amistad, apoyo y grandes experiencias en todo este tiempo.

Y a todas esas personas que me brindaron su cariño, amistad y apoyo incondicional. Rafael Pérez, Valeria Escandón, Juan Carlos Gámez, Rodolfo y Graciela Lomelí, Karen Ramos, Gilberto Merchant, Ana Victoria, Diana Ambriz y Sophia Barrientos.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas y figuras	viii
Anexos	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xii
Abstract	xiii
1. Introducción	1
1.1 Insuficiencia renal aguda	1
1.2 Cisplatino	2
1.2.1 Mecanismo de acción del CP	3
1.2.2 Nefrotoxicidad de CP	3
1.3 <i>Stenocereus</i> (Pitaya)	5
2. Materiales y Métodos	6
3. Resultados y Discusión	12
4. Conclusiones	20
5. Bibliografía	21

Lista de tablas y figuras

Tablas

1. Capacidad antioxidante de 30 μ L de extracto de jugo de pitaya 25

Figuras

1. Estructura química de cis-diamminodicloruroplatino (II); cisplatino (CP) 26
2. Fruta de *Stenocereus sp.* 27
3. Representación gráfica de las diluciones logarítmicas seriadas empleadas en *S. cerevisiae* expuesta a distintas concentraciones de CP 28
4. Ensayo de protección del EJP en *S. cerevisiae* expuesta a CP 29
5. Efecto de CP en el crecimiento celular de *S. cerevisiae* 30
6. Evaluación del efecto del extracto de pitaya sobre la inhibición del crecimiento celular de *S. cerevisiae* inducido por CP 31
7. Efecto del CP sobre el peso corporal 32
8. Marcadores de función renal en ratas administradas con 4, 6 y 8 mL de extracto de jugo de pitaya 33
9. Estrés oxidante y la actividad de catalasa 34
10. Efecto del EJP sobre el peso corporal 35
11. Marcadores de función renal en ratas con nefrotoxicidad inducida por CP 36
12. Estrés oxidativo en animales con nefrotoxicidad por CP 37
13. Determinación de nitritos en homogenados de tejido renal 38

Anexos

Anexo 1. Reevaluación de un nuevo lote de CP en <i>S. cerevisiae</i>	39
Anexo 2. Efecto del extracto de jugo de pitaya en <i>S. cerevisiae</i>	40

Abreviaturas

1M2F.	1-metil-2-fenilindol
AAPH.	2,2-azobis (2-aminopropanon)
ANOVA.	Análisis de la varianza
Bak.	Bcl2-antagonist/killer 1
Bax.	Bcl2-asociadas a proteínas x
Bcl 2.	Linfoma de células B2
BHT.	Butil-hidroxitolueno
BUN.	Nitrógeno ureico sanguíneo
CeA.	Núcleo central de la amígdala
CAT.	Catalasa
CP.	Cisplatino
DMSO.	Dimetilsulfóxido
DNA.	Ácido desoxirribonucleico
EJP.	Extracto de jugo de pitaya
EROs.	Especies reactivas de oxígeno
Fe²⁺.	Hierro (II)
Fe³⁺.	Hierro (III)
FeCl₃.	Cloruro de hierro
FG.	Filtrado glomerular
FRAP	Capacidad de reducción férrica del plasma
GPx.	Glutación peroxidasa
GR.	Glutación reductasa
GSH.	Glutación reducido
GSSG.	Glutación disulfuro (oxidado)
HCl.	Ácido clorhídrico
H₂O₂.	Peróxido de hidrógeno
i.p.	Intraperitoneal
IPBN.	Núcleo parabrial lateral
IRA.	Insuficiencia renal aguda
K.	Constante de reacción de primer orden

MDA.	Malondialdehído
MMR.	Sistema de reparación de errores de emparejamiento
NADPH.	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT.	Nitroazul tetrazolio
NOM.	Norma Oficial Mexicana
Nrf2.	Factor nuclear eritroide-2-asociado al factor 2
NTS.	Núcleo de tracto solitario
O₂⁻.	Ion Superóxido
OH⁻.	Radical hidroxilo
OD.	Densidad óptica
ORAC.	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
NO.	Óxido Nítrico
PBS.	Amortiguador de fosfatos-salina
PO₄.	Fosfato
pre-Tx.	Pre-tratamiento
RNA.	Ácido ribonucleico
SOD.	Superóxido dismutasa
STZ.	Estreptozotocina
TMPO.	1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano
TPTZ.	Tripiridil-s-triazina
Trolox.	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
Tx.	Tratamiento
UFC.	Unidades Formadoras de Colonias
V.	Vehículo
v.o.	Vía oral
YPD.	Extracto de levadura, peptona y dextrosa

RESUMEN

Efecto de un extracto de pitaya sobre la inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* y la nefrotoxicidad en ratas, inducidos por cisplatino

El cisplatino es un antineoplásico usado para el tratamiento de tumores sólidos. Este compuesto tiene un alto potencial de nefrotoxicidad causada principalmente por la generación de estrés oxidante, a través del incremento en las especies reactivas de oxígeno, principalmente el ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Algunos estudios han comprobado que hay compuestos bioactivos que ayudan a contrarrestar los efectos oxidantes inducidos por cisplatino. Estos compuestos bioactivos se encuentran en frutas como la pitaya, fruto endémico de México y que ha sido poco estudiado. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de un extracto de jugo de pitaya sobre la nefrotoxicidad e inhibición del crecimiento celular inducido por el cisplatino. El estudio se realizó en dos modelos experimentales, ratas y levaduras. Ratas Wistar expuestas a cisplatino presentaron disfunción renal, ya que se detectó un incremento en los niveles de creatinina plasmática y nitrógeno ureico sanguíneo, además de un aumento significativo en los niveles de lipoperoxidación, aunque no hubo cambios estadísticamente significativos en la actividad de las enzimas antioxidantes. El tratamiento con el extracto de jugo de pitaya (4mL/día) previno la disfunción renal y lipoperoxidación, probablemente por un aumento de los niveles de óxido nítrico (vasodilatador) que pudiera intervenir en el efecto renoprotector. Por otro lado, en *Saccharomyces cerevisiae* el cisplatino, en diferentes concentraciones, inhibió el crecimiento celular. Este crecimiento celular se recuperó cuando las levaduras fueron tratadas con el extracto de jugo de pitaya. Por lo tanto, el cisplatino causa disfunción renal en ratas e inhibición del crecimiento celular en levaduras, efectos que disminuyeron cuando se usó el extracto de jugo de pitaya.

Palabras clave: Antineoplásico, disfunción renal, inhibición de crecimiento, óxido nítrico, pitaya.

ABSTRACT

Effect of a pitaya extract on the inhibition of *S. cerevisiae* growth and nephrotoxicity in rats, induced by cisplatin.

Cisplatin is an antineoplastic agent for solid tumors treatment. This compound has a high nephrotoxicity potential caused mainly by the generation of oxidative stress, through the increase in reactive oxygen species, mostly superoxide ion ($O_2^{\cdot-}$). Some studies have shown that there are bioactive compounds that help to reduce the oxidative effects induced by cisplatin. These compounds can be found naturally in fruits such as pitaya, a poorly studied endemic fruit from Mexico. Therefore, this work aim was to determine the protective effect of a pitaya juice extract on the nephrotoxicity and inhibition of cell growth induced by the cisplatin. The study was done in two experimental models, rats and yeast. Wistar rats exposed to cisplatin presented renal dysfunction evaluated by an increase in the levels of creatinine and by the detection of blood urea nitrogen. In addition, there was a significant increase in the levels of lipid peroxidation but no statistically significant changes in antioxidant enzymes activities. The treatment with pitaya juice extract (4mL/day) was able to prevent renal dysfunction, possibly by the increase of nitric oxide levels (vasodilator), which may allow a renoprotective effect. On the other hand, different doses of cisplatin caused growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*. This cell growth was recovered when yeast was treated with pitaya juice extract. Therefore, cisplatin causes renal dysfunction in rats and inhibition of cell growth in yeast, both effects are diminished by pitaya juice extract administration.

Key words: Antineoplastic, renal dysfunction, growth inhibition, nitric oxide, pitaya.

1. INTRODUCCIÓN

Los riñones son órganos vitales que realizan distintas funciones para mantener la sangre limpia y químicamente equilibrada¹. Estos órganos juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis mediante la regulación del equilibrio hidroelectrolítico, la regulación de la osmolaridad de los líquidos corporales y de las concentraciones de los electrolitos, la regulación del equilibrio ácido-base, la excreción de los productos de desecho del metabolismo y de las sustancias químicas extrañas, entre otras funciones. Estos procesos se llevan a cabo a través de su unidad funcional, la nefrona, en sus diferentes segmentos: glomérulo, túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal, conductos conectores y colectores².

1.1 Insuficiencia renal aguda

La insuficiencia renal aguda (IRA) se define como una brusca disminución en el filtrado glomerular (FG), con cúmulo de productos de degradación e incapacidad de mantener la homeostasis hidroelectrolítica³. En el estudio “Epidemiología de la Insuficiencia Renal en México”, dado a conocer por la Secretaría de Salud en el 2010, se destacó que cada año se suman, al menos 40,000 nuevos casos de IRA en el país. Sin embargo, debido a una falta de cultura de prevención, éste padecimiento ha tenido un crecimiento acelerado en los últimos años (11% anual), lo que ha llevado a duplicar la incidencia en la población mexicana como lo reporta un estudio comparativo del Sistema de Datos Renales de Estados Unidos⁴. De acuerdo con este estudio, México tiene una de las tasas más altas de incidencia, >500 enfermos por cada millón de habitantes⁴. El Instituto Nacional de Estadística y Geografía en el 2017, señaló que la insuficiencia renal aguda es la 5ta. causa de muerte entre la población mexicana, ya que anualmente mueren cerca de 12 mil personas por complicaciones derivadas de la insuficiencia renal⁵. Las causas de la IRA son múltiples, entre ellas se encuentran: diabetes mellitus, hipertensión

arterial, glomerulopatías, hipovolemia, infecciones, sepsis, el uso de diversos fármacos considerados agentes nefrotóxicos, entre otros².

El riñón es una de las principales vías de eliminación de los fármacos y otros productos de degradación (alimentos y tejidos activos, como los músculos), y por ello, fácilmente vulnerable¹. Los glomérulos y los túbulos proximales son los más frecuentemente afectados⁶. Entre los fármacos nefrotóxicos se destaca el uso de antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos, inmunosupresores y quimioterapéuticos². Estos últimos, conllevan una serie de efectos secundarios debido a que no sólo ejercen su efecto sobre las células tumorales, sino también sobre células sanas. Entre los quimioterapéuticos más utilizados en la práctica clínica en México, se encuentra el cisplatino, con un alto potencial de neurotoxicidad, ototoxicidad, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad⁶.

1.2 Cisplatino

El cisplatino (CP), cis-diaminodicloroplatino (II) (Fig. 1), es un compuesto de platino con fórmula $[\text{PtCl}_2 (\text{NH}_3)_2]$ utilizado para el tratamiento de cáncer. La quimioterapia basada en platino es curativa en la mayoría de los pacientes con cáncer de ovario, vejiga, cuello uterino, cabeza, cuello y pulmón⁷. A pesar de su efecto antineoplásico, el uso clínico está limitado ya que aproximadamente el 20% de los pacientes que reciben el tratamiento de CP desarrollan una disfunción renal grave, que a menudo conduce a IRA⁸, la cual, se caracteriza por un incremento de creatinina sérica y de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN), alteraciones de la hemodinamia, caída de la tasa de filtración glomerular, así como hipomagnesemia e hiperuricemia, antes de que se produzca una necrosis tubular^{2,9}. La nefrotoxicidad se asocia con la acumulación de CP en los riñones, la cual es cinco veces mayor en comparación con otros tejidos. Aunque los compuestos de platino están unidos a las proteínas en el plasma, la mayoría del CP no está unido y se filtra libremente por el glomérulo. Después de la filtración, las células renales secretan CP de la sangre a la luz tubular, por lo que los efectos tóxicos ocurren principalmente en los túbulos proximales renales^{2,8}.

1.2.1 Mecanismo de acción del CP

El CP se inyecta por vía intravenosa. Una vez en el suero sanguíneo se cree que el compuesto entra en las células, dada su carga total neutra, por difusión pasiva a través de la membrana celular, ya que su captación es lineal, no saturable y no se observa competencia con análogos de platino⁷. Una vez en el interior de la célula, uno de los átomos de cloro del CP se reemplaza por una molécula de agua, formando el catión $[Pt (H_2O) (NH_3)_2 Cl]^+$ que al estar cargado positivamente, no puede salir de la célula. Este catión puede reaccionar con las macromoléculas intracelulares originando aductos con proteínas, RNA y DNA¹⁰. El DNA es la diana principal del CP, de modo que, el átomo de platino forma enlaces covalentes con la posición N7 de las bases de purina para formar entrecruzamientos 1,2 ó 1,3 intra-hebra y en menor porcentaje, entrecruzamientos entre hebras⁷. Estas uniones hacen que la cadena de DNA se distorsione y este cambio es reconocido por el sistema de reparación de errores de apareamiento (MMR). Las proteínas del sistema MMR reconocen los aductos de CP en la cadena molde y tratan de reparar el daño en la cadena de nueva síntesis. Esta reparación puede causar la acumulación de cadenas apareadas incorrectamente generando una detención del ciclo celular y/o una señal de apoptosis^{7,10}.

1.2.2 Nefrotoxicidad del CP

El sistema de transporte celular del CP en el riñón, está mediado por el transportador orgánico de cationes 2 y el transportador de cobre 1². El 60% de CP administrado es recuperado por los lisosomas de la membrana apical, contribuyendo al aumento de la concentración de CP en las células epiteliales del túbulo renal proximal, principalmente al segmento S3 del túbulo proximal^{11,12}. El CP se acumula en las mitocondrias de estas células generando especies reactivas de oxígeno (EROs) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Las EROs son altamente reactivas en la célula e interactúan con los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, causando así un amplio

espectro de daños. Estas especies son productos del metabolismo normal celular. El problema reside cuando las concentraciones de EROs se incrementan induciendo un estrés oxidante, lo cual activa los sistemas de defensa^{7,12} como: enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión transferasa (GT), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT)), y mecanismos de defensa no enzimáticos (glutatión (GSH), coenzima Q, ubiquinona). Sin embargo, el CP reduce la expresión del factor nuclear eritroide-2-asociado al factor 2 (Nrf2), el cual induce la expresión de genes que codifican proteínas citoprotectoras como las enzimas antioxidantes, encargadas de reducir los niveles de EROs y evitar así el daño celular^{11,22}. Por otro lado, diferentes estudios han demostrado la acción directa del CP sobre la activación de la familia de proteínas del linfoma de células B 2 (Bcl 2). Tales proteínas son proapoptóticas, tratándose de proteínas como Bcl 2-asociadas a proteínas x (Bax) y Bcl 2-antagonist/killer 1 (Bak). La activación de esta ruta apoptótica conlleva a una alteración en la permeabilidad de la mitocondria, provocando una liberación de citocromo c, así como la activación de las caspasas 3 y 9, siendo las enzimas responsables de la apoptosis en las células^{7,11}.

El CP, se ha usado ampliamente en diferentes modelos experimentales^{13,14}, con el fin de estudiar y prevenir los efectos secundarios a su aplicación. Entre estos modelos se encuentra *S. cerevisiae*, que presenta un metabolismo predominantemente fermentativo en condiciones aeróbicas y se considera un modelo eucariota para explorar el complejo mecanismo de respuesta frente a estrés oxidante¹⁵. Además de los oxidantes, como el H₂O₂ o menadiona, los metales u otros compuestos que contienen metales, como el CP, también inducen la respuesta a estrés oxidativo en las células de levaduras.

Por otra parte, en ratas, se ha observado la presencia de disfunción y deterioro de la estructura de la mitocondria, el agotamiento del sistema de defensa antioxidante y la muerte celular por apoptosis⁷.

Al mismo tiempo, se han descrito maniobras terapéuticas efectivas para proteger y/o prevenir de los efectos adversos del CP, como el uso de pirazol, compuesto orgánico encontrado principalmente en la especie de planta *Rhizophora apiculata*

y el uso de la curcumina, compuesto fenólico presente en la planta *Cúrcuma longa*^{2,12}. Sin embargo, además de su disponibilidad es reducida, ninguno de estos compuestos se encuentra en la dieta común de los mexicanos.

1.3 *Stenocereus sp.* (Pitaya)

El género *Stenocereus*, son cactus columnares de las regiones áridas y semiáridas de México que producen un fruto comestible llamado pitaya (Fig. 2)^{16,17}. Este fruto se ha utilizado para la producción de mermeladas, nieves y bebidas debido a su importante valor nutricional, es rico en fibra y en proteína en comparación con otros frutos, presenta muy bajo valor calórico. Hasta ahora, las investigaciones realizadas en pitaya se han enfocado en la caracterización de la composición química y en el fenotipo de los frutos. García-Cruz et al., (2012) estudiaron el contenido de compuestos bioactivos, principalmente betalaínas (betacianinas y betaxantinas) y compuestos fenólicos, así como la actividad antioxidante de la pulpa de dos variedades de pitaya. Ellos observaron que el contenido de betalaínas en la pitaya es diferente entre las dos variedades de frutos analizados (pitaya roja y anaranjada). Además que existe una mayor proporción de betalaínas en comparación con fenoles solubles totales (347.30 ± 20.98 vs 166.5 ± 14.40 mg equivalentes de ácido gálico/100g de pulpa fresca), por lo que concluyen que las betalaínas son los compuestos que más contribuyen a la actividad antioxidante¹⁸.

En estudios etnobotánicos de la Mixteca Baja, han reportado que la pitaya se utiliza en patologías como diabetes mellitus, hipertensión arterial y le han atribuido propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes¹⁹. A pesar de esto, se considera un fruto poco estudiado y aprovechado por lo que sería interesante evaluar si hay efectos funcionales en el tratamiento de ciertas patologías asociadas a daño por inflamación, bacterias y/o estrés oxidante. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar el efecto de un extracto de jugo de pitaya (EJP) sobre la inhibición del crecimiento celular en *S. cerevisiae* y la nefrotoxicidad en ratas Wistar, inducidos por CP.

2. Materiales y Métodos

2.1 Reactivos y medios de cultivo

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA.): CP [Cis-diaminoplatino (II) dicloruro], L-glutati3n reducido (GSH), L-glutati3n disulfuro (GSSG), glutati3n reductasa (GR), β -nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato (NADPH), alb3mina de suero bovino, 1-metil-2-fenilindol (1M2F) y 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMPO). De Fluka (St. Louis, MO, EUA): Xantina, xantina oxidasa, nitroazul tetrazolio (NBT), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) y dimetil sulfoxido. De JT Baker (Xalostoc, Edo. M3xico, M3xico): per3xido de hidr3geno (H₂O₂). Se adquiri3 una soluci3n de formaldehido al 37% de Fermont (Monterrey, NL, M3xico). De Spinreact (Girona, Espa3a) se obtuvieron los kits comerciales para la medici3n de nitr3geno ureico sangu3neo (BUN) (Sera-pak urea) y creatinina (Sera-pak creatinina). Todos los dem3s reactivos fueron de grado anal3tico y disponibles comercialmente. El kit comercial para el ensayo de 3xido n3trico (NO) fue de BioAssay Systems (Hayward, CA, E.U.A).

La cepa utilizada de *S. cerevisiae* fue BY4742. Las c3lulas de levadura se cultivaron en medio rico YPD l3quido (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L y glucosa 2% (p/v)). Para el medio s3lido a3adimos agar 20 g/L (Sigma-Aldrich). Cuando se requiri3, el medio rico YPD l3quido y el medio s3lido fueron suplementados con carbenicilina y estreptomycinina en una concentraci3n inicial de 100 mg/mL. El CP fue utilizado a una concentraci3n inicial de 200 mM en DMSO.

2.2 Extracto de jugo de pitaya (EJP)

Los frutos de pitaya se obtuvieron durante la temporada de abril-mayo del 2018 en el mercado de Santa Mar3a del R3o, San Luis Potos3 (21°48'N 100°45'O). Se seleccionaron frutos sanos, sin da3o aparente ni manchas. La pitaya fue pesada con (4.5 kg) y sin c3scara (2.47 kg), la cual fue retirada manualmente. El jugo de pitaya se extrajo usando un colador con un tamiz de poro de di3metro de 1.0 mm para eliminar las semillas (1.5 L). Finalmente, el jugo fue centrifugado en una

centrífuga (BECKMAN COULTER, Avanti J-20i) por 10 min a 15,000 x g a 10°C²⁰. El sobrenadante fue usado como extracto (950 mL), el cual fue almacenado en alícuotas de 50 mL a -80°C hasta su uso.

2.3 Ensayos de la actividad antioxidante del EJP *in vitro*

2.3.1 Ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). Para el ensayo se utilizaron 25 µL de EJP o de Trolox (1mM) como estándar, a los cuales se les adicionó 150 µL de fluoresceína (4 µM) y se incubó por 30 min a 37 °C. Posteriormente se añadieron 25 µL de 2,2-azobis (2-aminopropanon) [APPH (153 mM)] e inmediatamente se midió la fluorescencia por 60 min a 485 nm de excitación y 520 nm de emisión²¹ utilizando un lector de microplacas multimodo Synergy HT (Biotek instruments, Winooski, VT, EUA). Los resultados se expresan como Trolox equivalente/ g de muestra fresca.

2.3.2 Ensayo de capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP) Básicamente, a una muestra de 30 µL de EJP o de amortiguador de acetatos (300 mM, pH 3.6, 0% de atrapamiento) se le adicionó 300 µL de una mezcla de reacción [Tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM, FeCl₃ 20 mM y amortiguador de acetatos 300 mM, pH 3.6]. La mezcla se incubó por 15 min a temperatura ambiente, la reducción de hierro a pH bajo produce un complejo ferroso con TPTZ color azul. La intensidad del color formado es directamente proporcional a la cantidad del producto formado y se estima registrando la absorbancia a 593 nm. Los resultados se expresan como Trolox equivalente / g de muestra fresca²².

2.4 Diseño experimental (*Saccharomyces cerevisiae*)

2.4.1 Ensayo de sensibilidad de *S. cerevisiae* a CP

Se inocularon 5 mL de medio rico YPD con la cepa BY4742 de *S. cerevisiae*. El cultivo se incubó a 28°C durante 48 h con agitación constante. Posteriormente, se ajustaron 5 mL de medio YPD fresco a una OD_{600nm} de 0.5 y se agregaron las concentraciones de CP a evaluar (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.5, y 3 mM). Como control del efecto tóxico del DMSO en la levadura se agregó el volumen más alto utilizado para disolver 3 mM de CP. Se realizan exposiciones durante 2, 4, 8 y 12 h. Al terminar cada tiempo de exposición, se centrifugó 1 mL de cada cultivo. El pellet fue lavado y resuspendido en 1 mL de agua destilada estéril. Se ajustó la OD_{600nm} a 0.5 y se realizaron diluciones logarítmicas seriadas en una caja de 96 pozos hasta la dilución 10⁻⁵ (Fig. 3). Una vez realizadas las diluciones, se colocaron volúmenes iguales de cada dilución por goteo en YPD sólido. Las cajas de petri se incubaron a 28°C durante 48 h.

2.4.2 Ensayo de protección del EJP en *S. cerevisiae* expuesta a CP

Se trataron las células de *S. cerevisiae* BY4742 con tres concentraciones de CP (0, 1.5 y 3 mM) y se les administró tres dosis de EJP (0, 1 y 2 mL) en 3 formas: como pre-tratamiento (pre-Tx) a la exposición de CP, tratamiento (Tx) durante la exposición a CP y ambos esquemas (pre-Tx y Tx) (Fig. 4). Para lo anterior, tres tubos con 5 mL de medio rico YPD fueron inoculados con la cepa BY4742, a los cuales se les administró 3 dosis de EJP (0, 1 y 2 mL). Además, para quitar los posibles microorganismos contaminantes, se les agregó una concentración de carbenicilina y estreptomicina (1:1) de 100 µl/mL. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 48 h con agitación constante. Posteriormente, de cada pre-Tx, se ajustaron 5 mL de medio YPD fresco a una OD_{600nm} de 0.5, se agregó 0, 1.5, y 3 mM de CP y se administraron 0, 1 y 2 mL de EJP nuevamente. Se dejaron crecer a 28°C por 4 h en agitación constante. Al terminar el tiempo de exposición, se centrifugó 1 mL de cada cultivo. El pellet fue lavado y resuspendido en 1 mL de agua destilada estéril. Se ajustó la OD_{600nm} a 0.5 y se realizaron diluciones

logarítmicas seriadas (1:10) en tubos eppendorf hasta obtener 1×10^3 cel/mL. Se platearon 200 μ L y 150 μ L de la dilución que tiene 1×10^3 cel/mL y 50 μ L de la dilución que tiene 1×10^4 cel/mL en cajas de petri separadas con YPD sólido adicionado con estreptomicina y carbenicilina. Se incubaron a 28°C durante 48 h y se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC). El ensayo se realizó por triplicado biológico y técnico.

2.5 Diseño experimental (murino)

Ensayo 1: *Determinación de la dosis renoprotectora del EJP*: se llevó a cabo una curva dosis respuesta, en donde se incluyeron 20 ratas Wistar macho (200 a 250 g) que se alimentaron con una dieta estándar y agua purificada estéril, bajo la Norma Oficial Mexicana (NOM-062—ZOO-1999) y con la aprobación de la Comisión de Bioética y Manejo de Animales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., con número de protocolo 007 del 17 de septiembre del 2017. Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos (n=4): el primer grupo recibió solución salina intraperitoneal (i.p) como vehículo (V) y el segundo grupo recibió una sola dosis de CP (6 mg/Kg; i.p). Los restantes tres grupos recibieron CP en el mismo esquema y dosis, y además diariamente se les administró 4, 6 y 8 mL del EJP, respectivamente. La administración de EJP fue por vía orogástrica (v.o), 3 días previos y 3 días posteriores a la administración de CP. A las 72 horas de la administración de CP las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (90 mg/Kg, i.p) y fueron sacrificadas. Se recolectó una muestra de sangre de la aorta en tubos heparinizados, la cual se utilizó para los estudios fisiológicos. Posteriormente, se extrajo el riñón izquierdo, el cual fue congelado inmediatamente en nitrógeno líquido para análisis bioquímicos y de Western blot. El riñón derecho fue macroscópicamente seccionado de manera transversal, se fijó en formaldehído al 10% para posteriormente realizar análisis histológicos.

Ensayo 2. *Evaluación del EJP para prevenir la nefrotoxicidad*: Una vez que se estableció que 4 mL/día de EJP ejercía un efecto renoprotector, se incluyeron 24 ratas Wistar macho divididas aleatoriamente en 4 grupos (n=6), el primer grupo (V)

recibió solución salina (i.p), el segundo grupo sólo recibió EJP (4mL/día, v.o), y el tercer y cuarto grupo recibieron una sola dosis de CP (6mg/Kg, i.p). Además, el cuarto grupo recibió EJP (4mL/día, v.o). De igual manera, fueron sacrificadas 72 horas después de la administración del CP. Se recolectaron muestras de sangre y tejido renal para realizar los mismos estudios fisiológicos, bioquímicos e histopatológicos como en el primer ensayo de curva dosis-respuesta.

2.6 Estudios fisiológicos

2.6.1 Niveles de creatinina sérica y BUN

Para evaluar la disfunción renal, las muestras de sangre obtenidas fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante 10 minutos, se colectó el plasma y se guardaron a -20°C para posteriormente medir los niveles de creatinina sérica y BUN mediante espectrometría y kits comerciales, los cuales están basados en ensayos colorimétricos. La medición de BUN y el nivel de creatinina se realizaron con el protocolo estándar²³.

2.6.2 Niveles de óxido nítrico (NO)

Se determinaron en muestras de tejido renal (100 mg) que fueron homogenizadas en 1 mL de amortiguador de fosfatos-salina (PBS; pH 7.4). Se centrifugaron a 10,000 x g a 4 °C, recuperando el sobrenadante para el ensayo. Este ensayo se utilizó para medir la producción de NO, potente vasodilatador, luego de la reducción de nitrato a nitrito utilizando el método Griess. El nitrito es detectado por la formación de un color rojo rosado a 540 nm. Los resultados se expresaron en pmol/µg de proteína.

2.7 Estudios Bioquímicos

2.7.1 Niveles de malondialdehído (MDA)

Se pesaron 100 mg de tejido renal y se homogenizaron en 1 mL de amortiguador de PO₄ (50 mM, pH 7.4) suplementado con 10 µL de butil-hidroxitolueno (BHT, 0.5

mM). Las muestras se centrifugaron a 3,000 x g durante 10 min a 4°C, se colectó el sobrenadante y se guardó a -80°C hasta su uso. Posteriormente se llevó a cabo el ensayo, primero se preparó una solución de trabajo de 1-metil-2-fenilindol (1MF2; 15.4 mM), en una mezcla de acetonitrilo-metanol (3:1). Se realizó una curva estándar de 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMPO) a concentraciones de 0, 0.74, 1.48, 2.96, 5.91, 11.82, 23.64 nmol/mL. Se tomaron 200 µL de cada estándar y homogenado de las muestras, se adicionaron 650 µL de la solución 1MF2 y 150 µL de HCl concentrado. Las muestras y la curva de TMPO fueron incubadas a 45°C durante 40 min. Después fueron centrifugadas a 3,000 x g por 5 min a 4°C. Finalmente se tomó lectura mediante espectrofotometría a una absorbancia de 586 nm.

2.7.2 Actividad de enzimas antioxidantes

Se determinaron en homogenados renales, los niveles de actividad de enzimas antioxidantes. La actividad de catalasa (CAT) se analizó mediante la desaparición de H₂O₂ 10 mM a 240 nm, los resultados se expresaron en *k*/mg de proteína, siendo *k* la constante de reacción de primer orden ²⁴. Para el caso de la superóxido dismutasa (SOD) se realizó un ensayo de inhibición utilizando el sistema generador de aniones superóxido xantina-xantina oxidasa para reducir NBT como molécula indicadora, los resultados se expresaron como U/mg de proteína ²⁵. El contenido de proteína total se determinó usando el método colorimétrico de Lowry²⁶.

2.8 Métodos estadísticos

Todos los datos fueron expresados como media ± error estándar. La importancia de las diferencias entre los grupos se evaluó usando ANOVA de una vía y para múltiples comparaciones se utilizó la prueba Bonferroni. Los valores se consideraron significativos si $p < 0.05$. Los datos se analizaron usando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA 92037 USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de la capacidad antioxidante del EJP “*in vitro*”.

Diversos estudios han descrito que la pitaya es un fruto con un gran contenido de compuestos fitoquímicos bioactivos como fenoles, carotenoides, glucósidos y betalaínas, lo cual le aporta una actividad antioxidante importante^{18,27,28}. Con base en el estudio de García-Cruz et al. (2012), donde le atribuyen una actividad antioxidante a los compuestos fenólicos y a las betalaínas contenidas en la pitaya, se evaluó la capacidad antioxidante mediante los ensayos de ORAC y FRAP de un EJP fresco y otro congelado por 5 meses. En la Tabla 1 se muestra que el EJP congelado fue 1.3 veces más capaz de atrapar radicales de oxígeno y 2.4 veces más capaz de reducir iones Fe^{3+} a Fe^{2+} en comparación del EJP fresco. Además, se midió la capacidad antioxidante de un EJP filtrado el cual fue 1.2 veces menos capaz de atrapar radicales de oxígeno y 1.7 veces menos capaz de reducir iones Fe^{3+} a Fe^{2+} en comparación del EJP congelado. De acuerdo con nuestros resultados, el almacenamiento del EJP a $-80^{\circ}C$ por 5 meses conservó e incluso mejoró su capacidad antioxidante en comparación del EJP fresco. Este comportamiento en extractos ha sido reportada por varios autores, quienes la han relacionado con la reducción de la acción enzimática por la baja temperatura, en específico la actividad de la polifenoloxidasas^{29,30}. A este respecto, Ochoa, *et al.* (2012) evaluaron el efecto del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre la calidad de tuna roja [*Opuntia ficus indica* (L.) Miller]. Es decir, el fruto se almacenó a 4 ± 1 , 9 ± 2 y $28 \pm 2^{\circ}C$ para determinar su vida útil y semanalmente se realizó la caracterización fisicoquímica, enzimática, antioxidante y microbiológica durante el almacenamiento, hasta observar características no aptas para el consumo. Ellos determinaron que el tiempo y la temperatura de almacenamiento son factores que afectan de manera estadísticamente significativa a la pérdida de peso del fruto, la textura y la actividad de la polifenoloxidasas en la cáscara de la tuna. El contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante no presentaron diferencia significativa en las diferentes temperaturas de almacenamiento. Sin embargo, si

aumento la actividad antioxidante de manera significativa con el tiempo de almacenamiento²⁹.

3.2 Determinación del efecto del EJP sobre la inhibición del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* expuestas a CP

3.2.1 Evaluación del crecimiento celular de *S. cerevisiae* expuesta a CP

Evaluamos el efecto de diferentes concentraciones de CP (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.5, y 3mM) en *S. cerevisiae* mediante la técnica de goteo y pudimos observar que a las 2 h de exposición a CP la levadura no muestra diferencias significativas en su crecimiento en ninguna de las concentraciones aplicadas (Fig. 5A). Sin embargo, a las 4, 8 y 12 h de exposición a CP se observa un menor crecimiento celular a partir de la concentración 1.5 mM de CP en comparación con el control (Fig. 5B, 5C, 5D). Estos resultados sugieren que la exposición de 4 h con las concentraciones de 1.5 y 3 mM de CP es suficiente para causar una inhibición en el crecimiento de *S. cerevisiae*.

Resultados similares se observaron en un estudio donde tres cepas de *S. cerevisiae* fueron expuestas a CP con el fin de evaluar los genes relacionados con la resistencia a este fármaco. Para evaluar el porcentaje de sobrevivencia como primer etapa del estudio, las cepas fueron tratadas con concentraciones finales de CP que variaron desde 0.1 a 1 mmol/L durante 24 h a 30°C (concentración inicial 50 mM). Mediante el conteo de UFC, los resultados de sobrevivencia mostraron que a partir de la concentración de 0.1 mM las tres cepas presentaron una inhibición significativa de su crecimiento de más del 60%⁷. En otro estudio, la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*, ajustada a un OD_{600nm} de 0.2, fue expuesta a tres concentraciones finales de CP: 0, 50 y 100 µM (concentración inicial 500 mM en DMSO) por 6 horas a 30°C. Al finalizar, se midió nuevamente la OD_{600nm} con el objetivo de evaluar su crecimiento y se observó que el cultivo que recibió una concentración de 0 µM de CP obtuvo un OD de 2.5, el de 50 µM un OD de 1.5 y el de 100 µM un de OD 0.2, resultados que muestran que CP inhibe el crecimiento celular de *S. cerevisiae*³¹.

Para los siguientes ensayos se utilizó un lote de CP diferente por lo que nuevamente se realizó el ensayo de goteo para verificar que el efecto del CP fuera el mismo (Anexo 1).

3.2.2 Evaluación del efecto del EJP en *S. cerevisiae* con exposición a CP.

Una vez establecida la concentración de CP y el tiempo de exposición, evaluamos si el EJP tiene un efecto protector sobre *S. cerevisiae* expuesta a CP. Inicialmente realizamos un ensayo en donde el EJP fue administrado en 3 dosis (0, 1 y 2 mL) y en tres formas diferentes (ver Materiales y Métodos). Mediante el conteo de UFC pudimos observar que los cultivos que recibieron Tx con EJP durante la exposición a CP por 4 h presentaron una mayor cantidad de UFC en comparación con las que no recibieron ningún Tx de EJP. Sin embargo, en los cultivos controles (0 mM de CP) que recibieron un pre-Tx con EJP por 48 h se mostró una disminución en la cantidad de UFC (Anexo 2). Lo mismo se puede observar en los que recibieron ambos tratamientos (pre-Tx y Tx). Esto indica que es probable que el Tx con EJP durante la exposición a CP por 4 h es suficiente para ejercer una protección, y una exposición prolongada al EJP puede causar inhibición en el crecimiento celular de *S. cerevisiae*. Para entender este último resultado, una revisión realizada por Herbach, M., *et al* (2006) estudió los factores que gobiernan la estabilidad de las betalaínas utilizando jugo de pitaya. Describieron que las betalaínas son inestables en presencia de oxígeno y pierden estabilidad con el aumento de temperatura y periodo de calentamiento provocando niveles altos de nitratos y oxalatos, compuestos que al estar elevados pueden causar toxicidad³².

Dado a nuestros resultados anteriores, decidimos repetir por duplicado biológico el ensayo donde los cultivos recibieron Tx con EJP durante la exposición a CP. En la Figura 6 se puede observar un aumento significativo en el crecimiento celular en los cultivos que fueron tratados con EJP (1 y 2 mL) y expuestos a CP (1.5 y 3 mM), siendo la dosis de 2 mL la más efectiva, en comparación con los cultivos expuestos a CP, que no recibieron ningún Tx con EJP. A demás se observó que el Tx con EJP por 4 h no causó inhibición en el crecimiento celular a los cultivos

controles (0 mM). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el EJP ejerce una protección a *S. cerevisiae* contra la inhibición en el crecimiento inducido por CP.

3.3 Establecimiento de la dosis nefroprotectora del extracto de jugo de pitaya (curva dosis/respuesta)

3.3.1 Efecto de la administración de CP y EJP sobre el peso corporal.

Como se observa en la Figura 7, se llevó a cabo el registro del peso corporal de los animales durante 7 días, donde se observó que el grupo de animales tratados con CP, presentaron una pérdida significativa de peso a partir de las 48h de administrar el fármaco en comparación con el grupo V como era de esperarse; efecto que no se modificó en los animales que recibieron 4, 6 y 8 mL/día de EJP. Previamente se ha reportado que tanto los animales como los humanos que reciben este antineoplásico presentan anorexia y pérdida de peso derivado de la activación de las neuronas en el núcleo del tracto solitario (NTS), el núcleo parabrual lateral (IPBN) y el núcleo central de la amígdala (CeA), las cuales son estructuras que participan en la integración de diversas funciones viscerales y autónomas como la ingesta y el gusto³³, por lo tanto, es de esperar que los animales puedan desarrollar una pérdida de peso, como lo observamos en los grupos de nuestro estudio tratados con CP.

3.3.2 Evaluación del efecto de la administración del EJP sobre la función renal.

La creatinina sérica y BUN son útiles para la detección de la nefrotoxicidad inducida por compuestos exógenos, estos parámetros se utilizan como marcadores de la función renal ³⁴. Los niveles altos en la concentración de creatinina sérica en roedores se puede atribuir a la reducción en el filtrado glomerular del riñón y reflejar disfunción de los túbulos renales³⁵. Por lo tanto, en nuestro estudio se observó que la administración de 6 mg/Kg, i.p de CP indujo disfunción renal, evidenciado por un aumento en los niveles de creatinina sérica (Fig. 8A) y BUN (Fig. 8B) en comparación con el grupo V. Sin embargo, los grupos

que recibieron CP más 4, 6 u 8mL de EJP (v.o) mostraron niveles en intervalos normales de creatinina sérica y BUN con las 3 dosis evaluadas, sugiriendo que el EJP a partir de los 4 mL/día previene la caída de la función renal ocasionada por la administración de CP. En apoyo a este resultado, Sutariya *et al* (2017) reportaron que la administración de betaxantinas aisladas de la tuna en ratas administradas con estreptozotocina (STZ), ocasionaron una reducción significativa en los niveles de creatinina y BUN. Además que la administración de betaxantinas ejerce un efecto anti-fibrótico contra la nefropatía diabética inducida por STZ, comparada con las ratas control diabéticas, a las cuales se les administró solo STZ³⁶.

3.3.3 Evaluación de estrés oxidativo y la actividad de la enzima antioxidante catalasa.

Para evaluar el grado de estrés oxidante, se cuantificaron los niveles de lipoperoxidación mediante el ensayo de MDA. La administración de CP aumentó 33% los niveles de MDA en comparación con el grupo V (Fig. 9A). Sin embargo, los grupos que recibieron 4, 6 y 8 mL/día del EJP redujeron significativamente los niveles de MDA; siendo más evidente en los animales tratados con 4 mL/día. Además, se evaluó la actividad de la catalasa. En la Figura 9B, se muestra que la administración de CP redujo de manera significativa la actividad de esta enzima antioxidante en comparación con el grupo V. La administración de 8 mL/día de EJP previno la caída de la actividad de la catalasa, sin embargo, en los grupos que recibieron 4 y 6 mL/día de EJP no se mostraron cambios en la actividad de esta enzima. A pesar de este último resultado, se determinó que para continuar con el estudio y evaluar el efecto renoprotector contra la nefrotoxicidad inducida por CP, se utilizaría la dosis de 4 mL/día debido a que este grupo de animales presentó una reducción significativa en los niveles de lipoperoxidación y pudieran estar implicados otros mecanismos antioxidantes y no necesariamente la actividad de catalasa; aunado a que el volumen de 8 mL puede desencadenar una mayor distensión abdominal en las ratas.

3.4 Determinación del efecto renoprotector de 4mL/día del EJP en la nefrotoxicidad inducida por CP.

3.4.1 Evaluación del efecto de la administración del EJP sobre el peso corporal

En el segundo ensayo, el peso corporal de los animales administrados con CP presentó una reducción a partir de las 48 h de su administración y el peso del grupo de animales administrados solo con el EJP no se modificó (Fig. 10).

3.4.2 Evaluación de la disfunción renal inducida por CP en ratas

Determinamos la disfunción renal mediante la cuantificación de creatinina sérica y BUN. Observamos que solo la administración del EJP presentó niveles normales de ambos marcadores. Sin embargo, en el grupo que recibió 6 mg/Kg i.p de CP en una sola dosis, se observó un incremento significativo en los niveles de creatinina sérica (Fig. 11A; 1.03 ± 0.06 vs. V, 0.45 ± 0.03) y BUN (Fig. 11B; 45.18 ± 4.3 vs. V, 25.56 ± 1.72) en comparación con el grupo V. Por otro lado, en el grupo que recibió CP más 4 mL/día de EJP (CP + EJP 4 mL, v.o) se observó que el extracto previno el incremento en los niveles de creatinina sérica y BUN. Por lo tanto, CP indujo disfunción renal que creemos pudo prevenirse por la administración del EJP.

3.4.3 Evaluación del efecto antioxidante del EJP en ratas con nefrotoxicidad por CP

La evidencia de daño renal inducido por CP a través de un mecanismo de estrés oxidativo causado por un aumento de MDA (un potencial biomarcador de la peroxidación lipídica) y los niveles reducidos de GR, CAT, SOD y GPx se han demostrado en varios estudios^{37,2,38}. Prabhu *et al.* (2013) mostraron que la administración de 10 mg/Kg por 10 días de 1,2-diazol, un compuesto orgánico derivado de *Rhizophora apiculata*, tiene un efecto renoprotector contra la administración de CP, evidenciado por una disminución en los niveles de MDA así como un aumento estadísticamente significativo en los niveles de GSH y en la

actividad de CAT, SOD y GPx comparadas con el grupo de ratas administradas con 7.5 mg/Kg, i.p de CP ¹².

En los resultados que se presentan de este estudio observamos que la administración de una dosis sencilla de CP indujo estrés oxidante, debido a un incremento significativo del 38% en los niveles de MDA (índice de lipoperoxidación; Fig. 12A) y que la administración del EJP previno esa lipoperoxidación. Sin embargo, al momento de evaluar la actividad de enzimas antioxidantes como CAT y SOD, no observamos cambios significativos en alguno de los cuatro grupos estudiados (Fig. 12B y 12C). Con el fin de explorar si otra vía sobre la respuesta antioxidante se encontraba implicada, evaluamos la capacidad antioxidante en plasma por medio del ensayo ORAC (Fig. 12D). Sin embargo, tampoco se mostraron cambios significativos entre los grupos experimentales estudiados.

3.4.4 Evaluación del efecto vasoactivo del EJP en ratas con nefrotoxicidad por CP.

Se han propuesto diferentes estrategias para inhibir la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. Recientemente, se ha discutido el papel de la modulación del óxido nítrico en la fisiopatología de la insuficiencia renal aguda. Se descubrió que la inhibición de la síntesis de óxido nítrico agrava la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino. Por otro lado, estudios han descrito que la L-arginina, un precursor del óxido nítrico, ejerce un efecto protector y mejora las funciones renales en diversas formas de lesión renal aguda y crónica inducidas por fármacos como la ciclosporina y gentamicina³⁹. Debido a lo anterior, se realizó la determinación cuantitativa y colorimétrica del NO, utilizando la reacción de Griess. Dado que el NO se oxida a nitrito y nitrato, es una práctica común cuantificar el NO₂ / NO₃ total como medida del nivel de NO. En los resultados se observó un incremento notable de 15 veces en los niveles de NO₂ / NO₃ del grupo que recibió solo EJP en comparación con el grupo V, y un incremento de 5 veces en el grupo de CP+EJP en comparación con el grupo CP (Fig. 13). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el EJP puede llegar a ejercer un efecto vasodilatador, el cual puede

permitir un efecto renoprotector ante el CP y por lo tanto pudiera ser útil para evaluar su efecto sobre modelos experimentales de hipertensión arterial.

4. Conclusiones

1. La congelación del EJP aumenta su capacidad antioxidante, y su manipulación durante el proceso del filtrado afecta negativamente su capacidad antioxidante.
2. La administración de CP produce disfunción renal, evidenciado por un incremento en los niveles de creatinina sérica y BUN, asociados a la generación de estrés oxidativo, debido al aumento en los niveles de lipoperoxidación.
3. El extracto de jugo de pitaya presenta propiedades renoprotectoras, normalizando los niveles séricos de los marcadores de función renal y estrés oxidativo, es decir, dentro de los rangos normales.
4. La administración del extracto de jugo de pitaya aumenta los niveles de NO, sustancia que ejerce un efecto vasodilatador, el cual podría permitir un efecto renoprotector ante el CP.
5. Por otro lado, la exposición de *S. cerevisiae* en CP causa inhibición en el crecimiento, sin embargo, el extracto de jugo pitaya ejerce un efecto protector permitiendo su crecimiento.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse. Los riñones y cómo funcionan. *National Institutes Health*. **9**, 16 (2009).
2. Joyce, T. Efecto del tratamiento antioxidante sobre el estrés oxidante y el daño renal en la nefrotoxicidad experimental. 85 pág. (2015). UNAM, Ciudad de México, México.
3. Monedero, P., García-Fernández, N., Pérez-Valdivieso, J., Vives, M., Lavilla, J. Insuficiencia renal aguda. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*. **58**, 365–374 (2011).
4. Gobierno del Estado de México y Secretaría de Salud. Enfermedades Renales. *Visión CEVECE* (2017).
5. Instituto Nacional de Geografía y Estadística. Comunicado de prensa número 525/18. 31 Oct. 1–3 (2018).
6. Ferreiro, J., García, J., Barceló, R. & Rubio, I. Quimioterapia: efectos secundarios. *Gaceta Médica de Bilbao*. **100**, 69–74 (2003).
7. Rodríguez-Lombardero, S. Caracterización funcional de SKY1 y su papel en la resistencia de las levaduras a cisplatino. 309 pág. (2012). Universidad de La Coruña. La Coruña, España.
8. van Angelen, A., Glaudemans, B., van der Kemp, A., Hoenderop, J. & Bindels, R. Cisplatin-induced injury of the renal distal convoluted tubule is associated with hypomagnesaemia in mice. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **28**, 879–889 (2013). doi: 10.1093/ndt/gfs499
9. Rodríguez-Macías E. Fisiopatología de la insuficiencia renal aguda por cisplatino. *Revista Electrónica de Biomedicina*. **3**, 43–46 (2013).
10. Kartalou, M. & Essigmann, J. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **478**, 1–21 (2001). doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00142-7
11. Rodríguez-Gómez M. Uso de cisplatino y derivados de platino en quimioterapia. 20 pág. (2014). Universidad Complutense. Madrid, España.
12. Prabhu, V., Kannan, N. & Guruvayoorappan, C. 1,2-Diazole prevents cisplatin-induced nephrotoxicity in experimental rats. *Pharmacological*

- Reports*. **65**, 980–990 (2013). doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71079-X
13. Nasr, A. Protective effect of aged garlic extract against the oxidative stress induced by cisplatin on blood cells parameters and hepatic antioxidant enzymes in rats. *Toxicology Reports*. **1**, 682–691 (2014). doi: 10.1016/j.toxrep.2014.09.003
 14. Quesada, A., Segarra, A., Montoro-Molina, S., de Gracia, M., Osuna, A., O'Valle, F., *et al.* Glutamyl aminopeptidase in microvesicular and exosomal fractions of urine is related with renal dysfunction in cisplatin-treated rats. *PLoS One*. **12**, e0175462 (2017). doi.org/10.1371/journal.pone.0175462
 15. Macedo-Márquez, A. La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *saccharomyces cerevisiae*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. **15**, 97–103 (2012).
 16. Corzo-Rios, L., Bautista-Ramírez, M., Gómez y Gómez, Y. & Torres-Bustillos, L. Frutas de cactáceas: Compuestos bioactivos y sus propiedades nutraceuticas. *Propiedades Funcionales hoy*. **0**, 35–66 (2017).
 17. Balderas, V., Palafox, L., Castro, A. & Saucedo, C. Evaluación de las propiedades físicas y calidad organoléptica y nutricional de frutos de pitaya (*Stenocereus pruinosus*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*. **3**, 86–92 (2016).
 18. García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y. & Valle-Guadarrama, S. Betalains, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Pitaya De Mayo (*Stenocereus Griseus* H.). *Revista Fitotecnia Mexicana*. **35**, 1–5 (2012).
 19. Morales, L., César del C., Aguirre, R., Rogelio, J. Clasificación tradicional, aprovechamiento y distribución ecológica de la pitaya mixteca en México. *Interciencia*. **26**, 18–24 (2001).
 20. Fernández-López, J., Roca, M., Angosto, J. & Obón, J. betaxanthin-rich extract from cactus pear fruits as yellow water-soluble colorant with potential application in foods. *Plant Foods for Human Nutrition*. **73**, 146–153 (2018).
 21. Rafiq, M., Azeemuddin, M., Anturlikar, S., Viswanatha, G. & Patki, P. Application of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay in the estimation of antioxidant value of botanicals. *Oxidants and Antioxidants in*

- Medical Science*. **2**, 87–90 (2012). doi:10.5455/oams.200812.br.002
22. Benzie, I., Strain, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. **239**, 70–76 (1996). doi.org/10.1006/abio.1996.0292
 23. Young, D., & Friedman, R. *Effects of disease on clinical laboratory tests*. *Clinical Chemistry*. **26** (2001).
 24. Aebi, H. Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology*. **105**, 121–126 (1984). doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
 25. Oberley, L & Spitz, D. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. In *Methods in Enzymology*. **105**, 457–464 (1984). doi:10.1016/S0076-6879(84)05064-3
 26. Lowry, H., Rosebrough, N., Farr, L., Randall, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **193**, 275 (1951).
 27. Hern, D., Subcoordinaci, R. & Taxon, A. Catálogos de Autoridades Taxonómicas. 33 pág. (2014). CONABIO
 28. Beltrán-Orozco, M., Oliva-Coba, G., Gallardo-Velázquez T., Osorio-Revilla, G. Ascorbic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and white types of pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). *Agrociencia*. **43**, 153–161 (2009).
 29. Ochoa, C. & Guerrero, J. Efecto del Almacenamiento a Diferentes Temperaturas sobre la Calidad de Tuna Roja (*Opuntia ficus indica* (L.) Miller). *Información Tecnológica*. **23**, 117–128 (2012).
 30. Balois-Morales, R., Colinas-León, M., Peña-Valdivia, C., Chávez-Franco, S. Sistema de estrés oxidativo, fenoles-polifenol oxidasa-peroxidasa, de frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) almacenados con frío. *Revista Chapingo Serie Horticultuta*. **13**, 115–120 (2007).
 31. Inapurapu, S., Kudle, K., Bodiga, S. & Bodiga, V. L. Cisplatin cytotoxicity is dependent on mitochondrial respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. **20**, 83–89 (2017). doi: 10.22038/ijbms.2017.8099
 32. Herbach, K. M, Stintzing, F. & Carle, R. Betalain stability and degradation -

- Structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*. **71**, 41–50 (2006). doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00022.x
33. Alhadeff, A., Holland, A., Zheng, H., Rinaman, L., Grill, J., Jonghe B. Excitatory Hindbrain–Forebrain Communication Is Required . Iranian Journal of Basic Medical Sciences Med -Induced Anorexia and Weight Loss. *Journal of Neuroscience*. **37**, 362–370 (2017).
 34. Wang, F., Liu, F., Liu, H., Chen, W., Si, X., Ma X. Effects of immunological and hematological parameter in mice exposed to mixture of volatile organic compounds. *Inhalation Toxicology*. **28**, 164–169 (2016).
 35. Chavez-Osorio, F. Efecto de la inhalación de vaores de formaldehido en ratones y la administración de un antioxidante como medida de proteccion del daño renal. 45 pág. (2018). Universidad de Guanajuato, campus Irapuato-Salamanca.
 36. Sutariya, B. & Saraf, M. Betanin, isolated from fruits of *Opuntia elatior* Mill attenuates renal fibrosis in diabetic rats through regulating oxidative stress and TGF- β pathway. *Journal of Ethnopharmacology*. **198**, 432–443 (2017). doi: 10.1016/j.jep.2016.12.048
 37. Kumar, S. & Tchounwou, P. Molecular mechanisms of cisplatin cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Oncotarget*. **6**, 40734–40746 (2015). doi: 10.18632/oncotarget.5754
 38. Zhao, K. & Wen, L. DMF attenuates cisplatin-induced kidney injury via activating Nrf2 signaling pathway and inhibiting NF-kB signaling pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. **2**, 8924–8931 (2018). doi: 10.26355/eurrev_201812_16662.
 39. Saleh, S. & El-Demerdash, E. Protective Effects of L-Arginine against Cisplatin-Induced Renal Oxidative Stress and Toxicity: Role of Nitric Oxide. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. **97**, 91–97 (2005). doi: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto_114.x

Tabla 1. Capacidad antioxidante de 30 μ L de extracto de jugo de pitaya.

Ensayo	Muestra	ORAC Eq Trolox/mg	FRAP Eq Trolox/mg
Extracto fresco	EJP	1300	5
	EJP filtrada	-	-
Extracto congelado (5meses)	EJP	1791	12
	EJP filtrada	1496	7

Capacidad antioxidante total de los extractos de jugo de pitaya (EJP) por los ensayos de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP). Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico, análogo de la vitamina E (Trolox).



Figura. 1. Estructura química de cis-diamminodichloruroplatino (II); Cisplatino (CP).

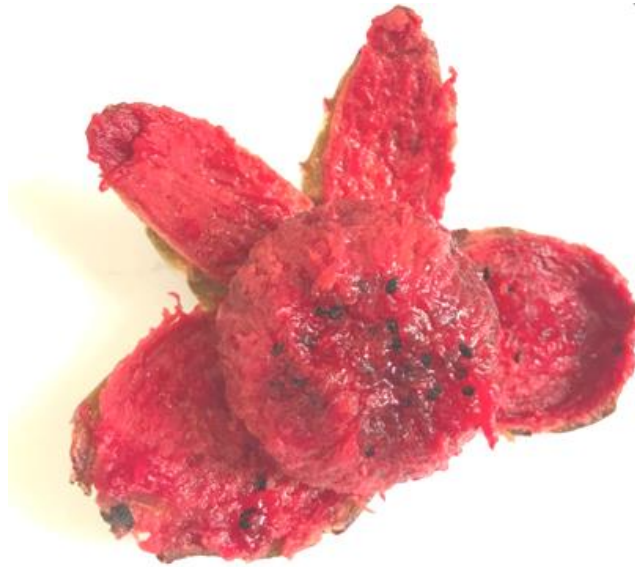


Figura. 2. Fruta de *Stenocereus* sp.

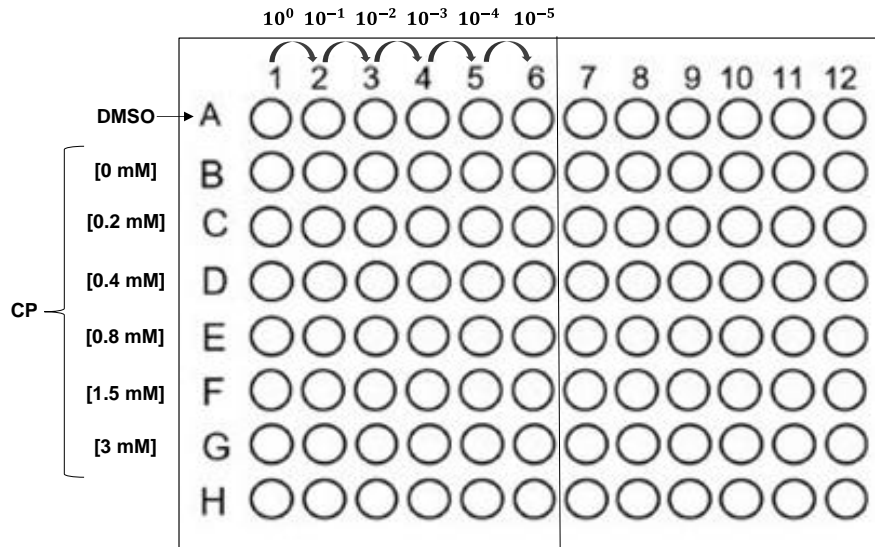
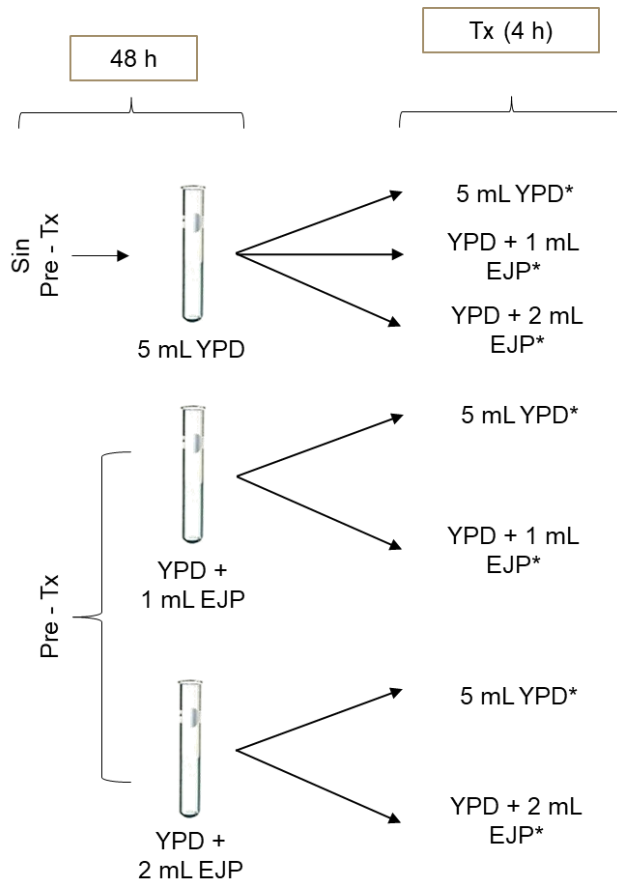


Figura. 3. Representación gráfica de las diluciones logarítmicas seriadas empleadas en *S. cerevisiae* expuesta a distintas concentraciones de CP.

De izquierda a derecha se observan diluciones logarítmicas seriadas y de arriba hacia abajo DMSO (control) y las diferentes concentraciones utilizadas de CP.



*cada uno con las tres concentraciones de CP (0 mM, 1.5 mM, 3mM)

Figura. 4. Ensayo de protección del EJP en *S. cerevisiae* expuesta a CP.

S. cerevisiae (BY4742) expuesta a tres concentraciones de CP (0, 1.5 y 3 mM), administrada con tres dosis de EJP (0, 1 y 2 mL) en 3 formas: como pre-tratamiento (pre-Tx) a la exposición de CP (48 h), tratamiento (Tx) durante la exposición a CP (4h) y ambos tratamientos (pre-Tx y Tx).

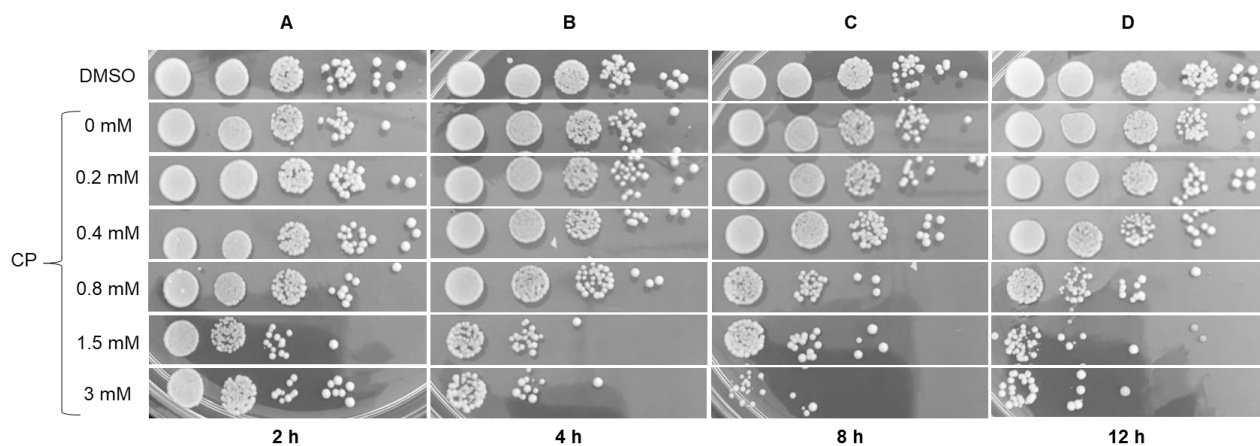


Figura. 5. Efecto de CP en el crecimiento celular de *S. cerevisiae*.

Sensibilidad de *S. cerevisiae* a diferentes dosis de CP (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.5, y 3 mM) a distintos tiempos de exposición (2 h, panel A; 4h, panel B; 8 h, panel C y 12 h, panel D) en la cepa BY4742. En cada imagen se observa de arriba hacia abajo el control con DMSO y las dosis de CP evaluadas, y de izquierda a derecha las diluciones logarítmicas seriadas.

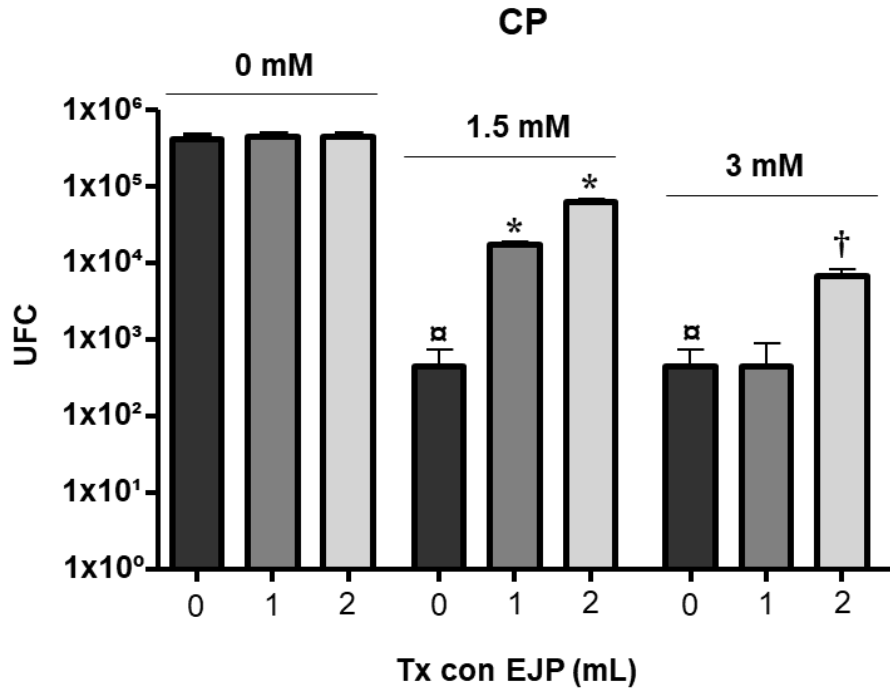


Figura. 6. Evaluación del efecto del extracto de pitaya sobre la inhibición del crecimiento celular de *S. cerevisiae* inducido por CP.

Se muestran las unidades formadoras de colonias (UFC) de los cultivos tratados con 0, 1 y 2 mL de EJP durante la exposición a 0, 1.5 y 3 mM de CP por 4h. α p<0.001 vs. 0 mM, * p<0.001 vs. 1.5 mM, † p<0.001 vs. 3mM.

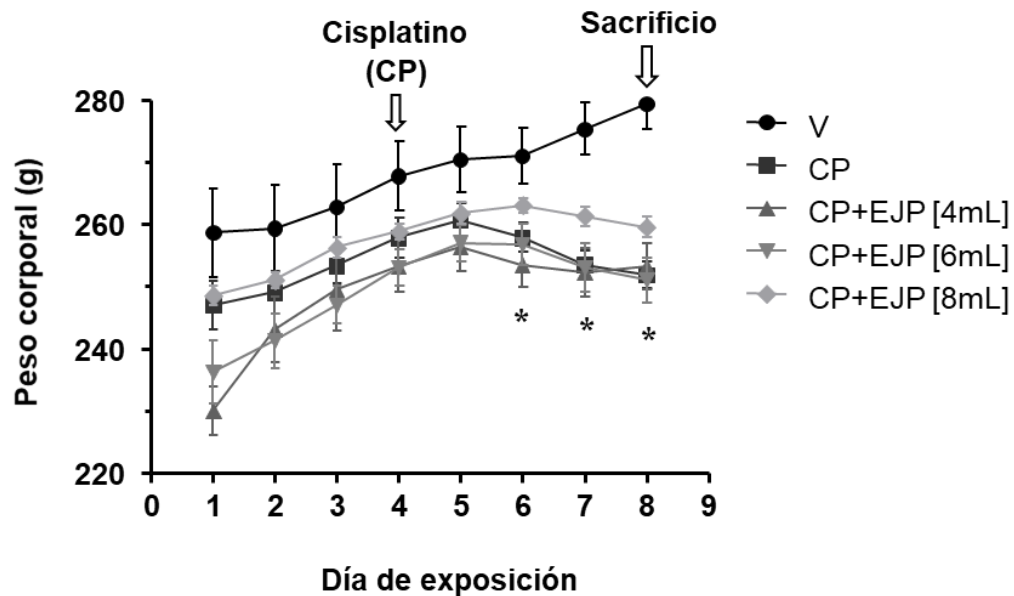


Figura. 7. Efecto del CP sobre el peso corporal.

Los datos representan el promedio de cada grupo \pm error estándar (n=4). Vehículo (V), 6 mg/Kg de cisplatino (CP), 6 mg/Kg de CP + 4, 6 y 8 mL de extracto de jugo de pitaya (CP + EJP). * $p < 0.001$ vs. V.

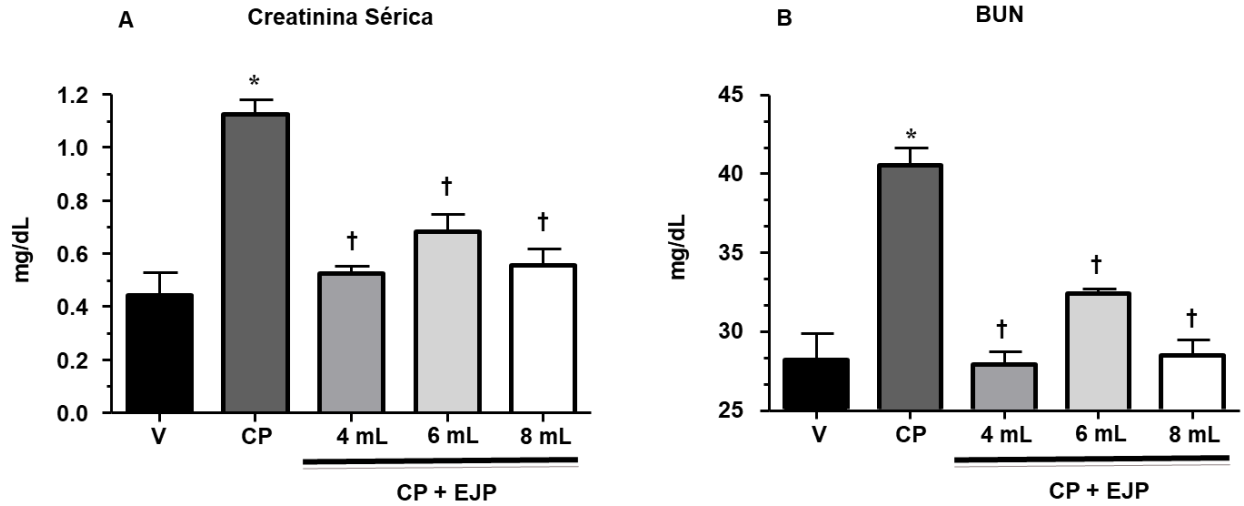


Figura. 8. Marcadores de función renal en ratas administradas con 4, 6 y 8 mL de extracto de jugo de pitaya.

Efecto de la administración del extracto de pitaya en los niveles de creatinina plasmática (A) y nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) (B). Los valores representan los promedios de cada grupo \pm error estándar (n=4). Vehículo (V), 6 mg/Kg de cisplatino (CP), 6 mg/Kg de CP + 4, 6 y 8 mL de extracto de jugo de pitaya (CP + EJP). * $p < 0.001$ vs. V, † $p < 0.001$ vs. CP.

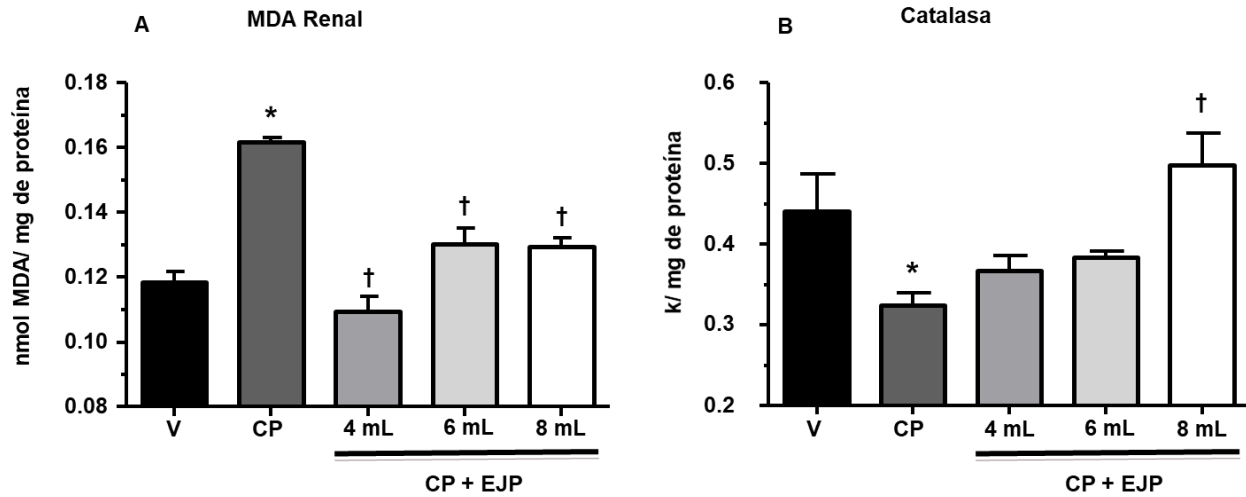


Figura. 9. Estrés oxidante y la actividad de catalasa.

Niveles de malondialdehído (MDA) (A) y la actividad de catalasa (B) en homogenados renales. Vehículo (V), 6 mg/Kg de cisplatino (CP), 6 mg/Kg de CP + 4, 6 y 8 mL de extracto de jugo de pitaya (CP + EJP). Los valores representan los promedios de cada grupo \pm error estándar (n=4).

* $p < 0.001$ vs. V, † $p < 0.001$ vs. CP. Constante de reacción de primer orden, unidad de actividad de la catalasa (k).

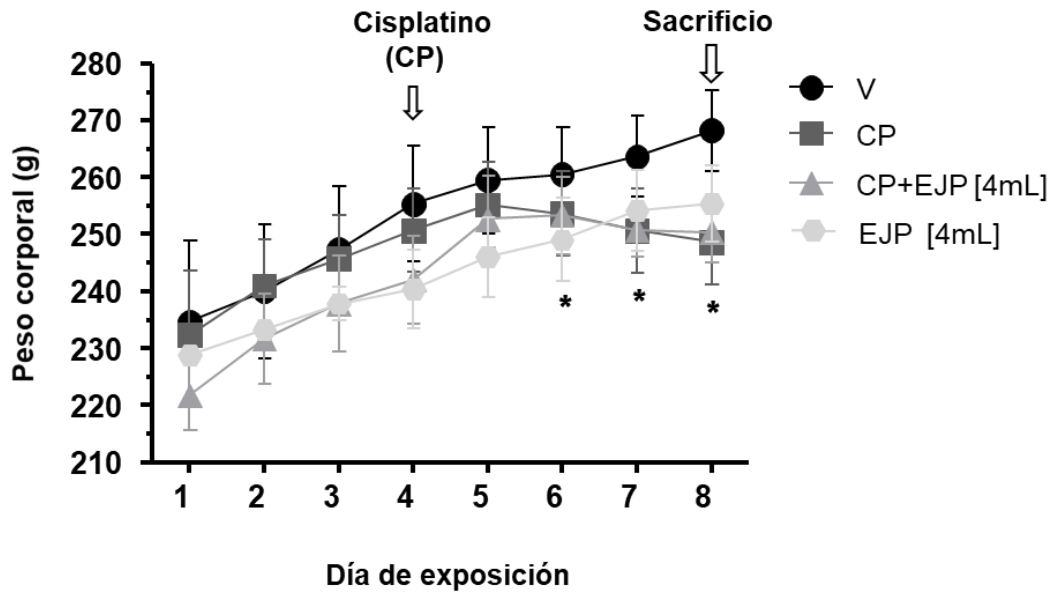


Figura. 10. Efecto del EJP sobre el peso corporal.

Los valores representan los promedios de cada grupo \pm error estándar (n=6). Vehículo (V), 6 mg/Kg de cisplatino (CP), 6 mg/Kg de CP + 4 mL de extracto (CP + EJP 4mL) y 4 mL de extracto (EJP 4mL). * $p < 0.001$ vs. V.

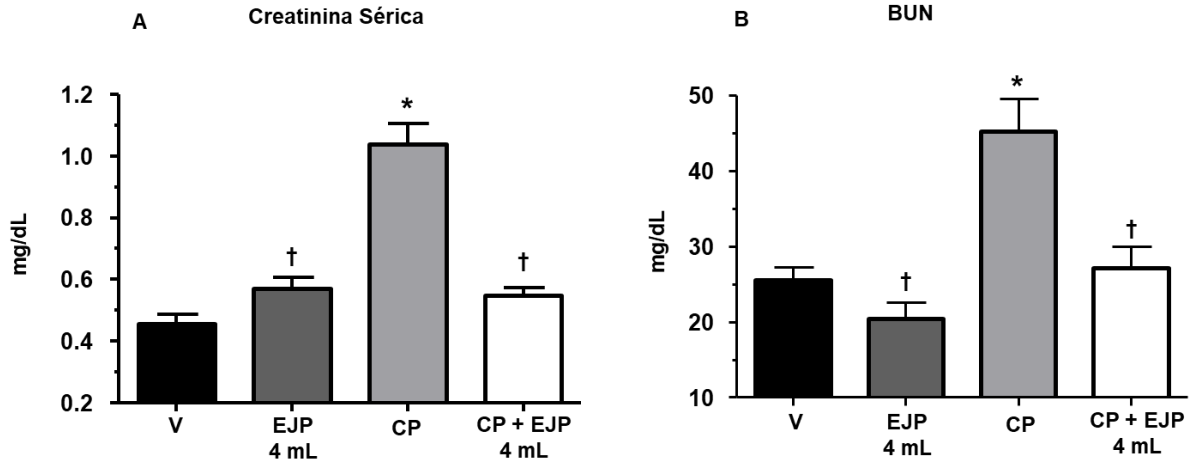


Figura. 11. Marcadores de función renal en ratas con nefrotoxicidad inducida por CP.

Niveles séricos de creatinina (A) y nitrógeno ureico (BUN) (B). Vehículo (V), 6 mg/Kg de cisplatino (CP), 6 mg/Kg de CP + 4 mL de extracto (CP + EJP 4mL) y 4 mL de extracto (EJP 4mL). Los valores son los promedios ± error estándar (n=6)

*p<0.001 vs. V, † p<0.001 vs. CP.

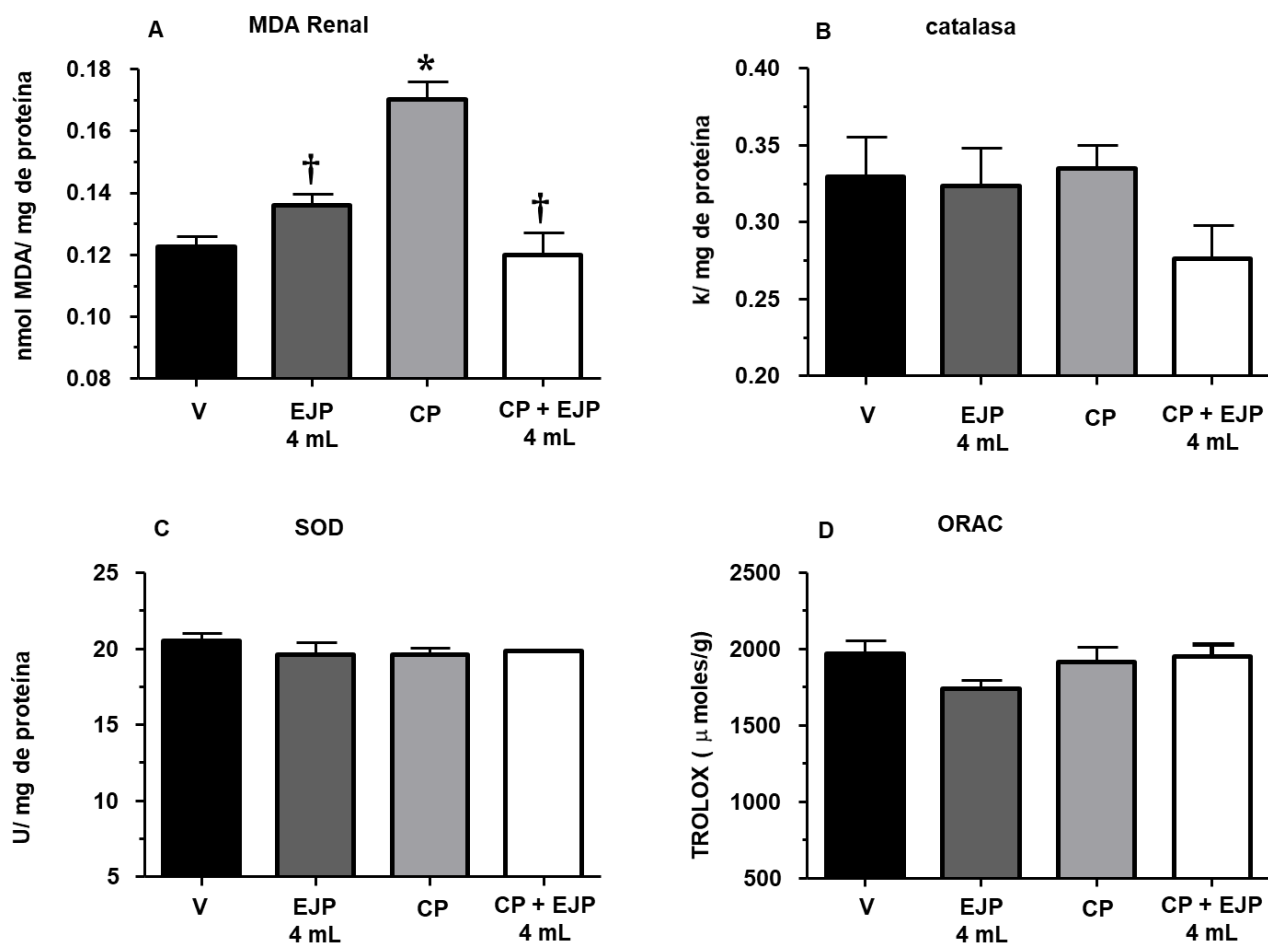


Figura. 12. Estrés oxidativo en animales con nefrotoxicidad por CP.

Los niveles de malondialdehído, índice de lipoperoxidación (MDA) (A), la actividad de las enzimas antioxidantes en homogenados renales: catalasa (B), superóxido dismutasa (SOD) (C) y la capacidad antioxidante evaluada por el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (D) Los valores son los promedios \pm error estándar (n=6). Vehículo (V), 6 mg/Kg de cisplatino (CP), 6 mg/Kg de CP + 4 mL de extracto (CP + EJP 4mL) y 4 mL de extracto (EJP 4mL).

* $p < 0.001$ vs. V, † $p < 0.001$ vs. CP. Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico, análogo de la vitamina E (Trolox).

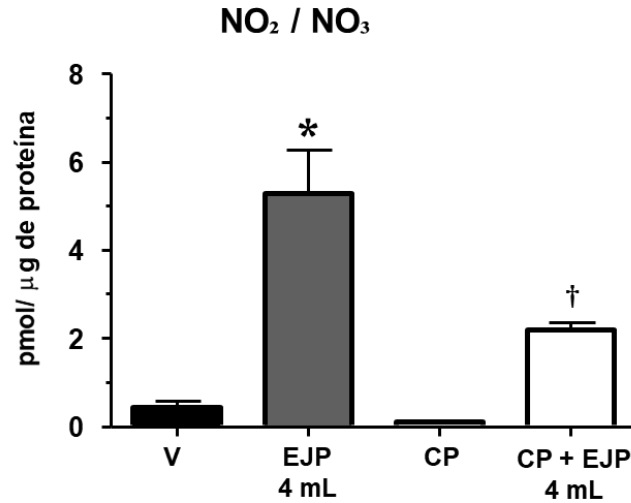
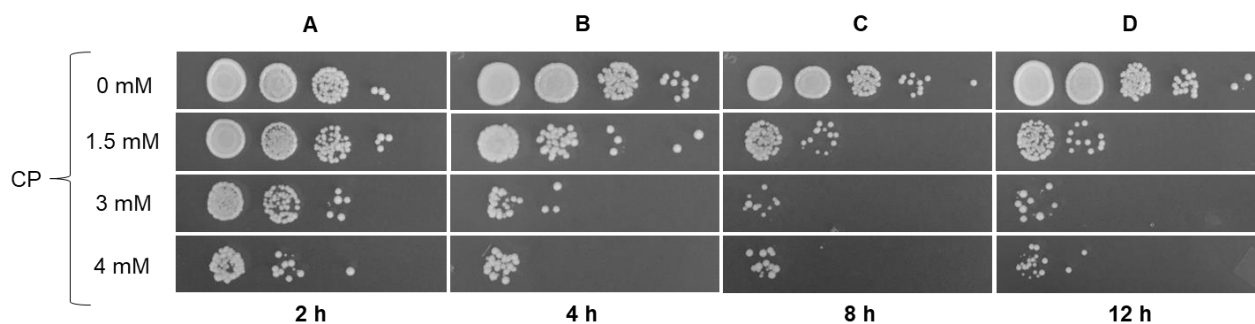


Figura. 13. Determinación de nitritos en homogenados de tejido renal.

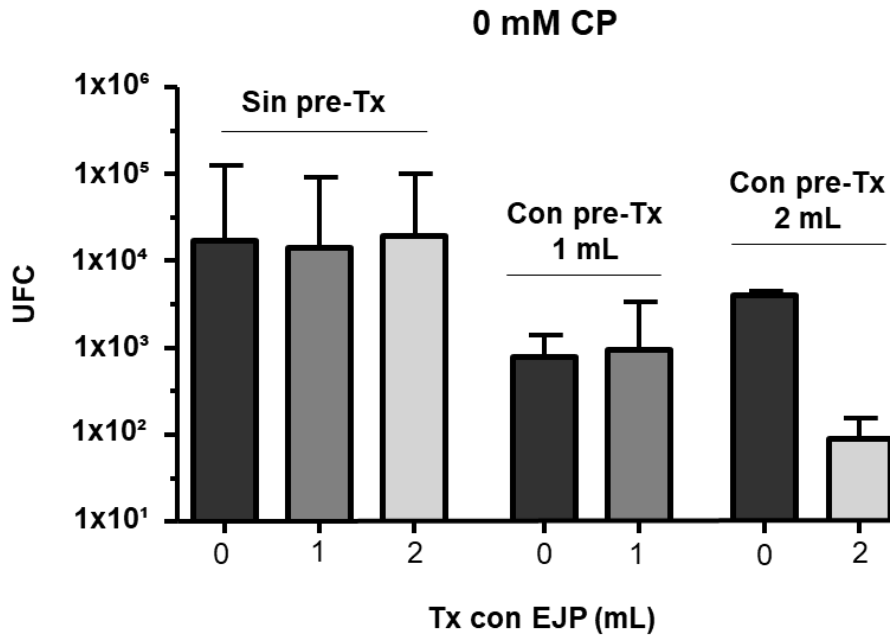
Los nitritos se midieron como indicadores de los niveles de óxido nítrico (NO). Los niveles de NO aumentaron en los grupos administrados con EJP. Vehículo (V), 6 mg/Kg de cisplatino (CP), 6 mg/Kg de CP + 4 mL de extracto de jugo de pitaya (CP + EJP) y 4 mL de extracto (EJP 4mL). Los valores son los promedios \pm error estándar (n=6). * $p < 0.001$ vs. V, † $p < 0.001$ vs. CP.

6. ANEXOS



Anexo 1. Reevaluación de un nuevo lote de CP en *S. cerevisiae*.

Evaluación del efecto de un nuevo lote de CP en *S. cerevisiae* (BY4742). Se utilizaron las concentraciones anteriormente evaluadas de CP (0, 1.5 y 3mM) agregando además una concentración de 4 mM. Los tiempos de exposición a evaluar fueron los mismos (2 h, panel A; 4 h, panel B; 8 h, panel C y 12 h, panel D). En cada imagen se observa de arriba hacia abajo las dosis de CP y de izquierda a derecha las diluciones logarítmicas seriadas.



Anexo 2. Efecto del extracto de jugo de pitaya en *S. cerevisiae*

Se muestran las unidades formadoras de colonias (UFC) de los cultivos controles tratados con 0, 1 y 2 mL de EJP antes y durante la exposición de 0 mM de CP por 4 h (Pre-Tx y Tx)