



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

Programa de Maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto del tratamiento con un concentrado de arándano sobre alteraciones inducidas por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) tanto *in vivo* como *in vitro*

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Bioquímicas)

P r e s e n t a
Q.F.B. Mercedes Imelda Dávalos Salas



México D.F.

2006

Octubre



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Reconocimientos

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Doctora María Elena Ibarra Rubio en el laboratorio de Bioquímica Clínica en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. María Elena Ibarra Rubio

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

El Proyecto fue apoyado por La Dirección General de Asuntos del Personal Académico bajo el PAPIIT IN224805.

Durante los estudios de maestría la sustentante gozó de una beca otorgada por CONACYT (185508).

Durante 6 meses del desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo otorgado por el Colegio de Profesores y la sección 024 del AAPAUNAM por haber ganado la cátedra "Jacobo Gómez Lara" en el año 2005.

El Jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Bioquímicas) estuvo constituido por:

Presidente Dr. Jesús Aguirre Linares

Vocal Dra. Marta Menjívar Iraheta

Secretario Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Suplente Dr. José Pedraza Chaverri

Suplente Dr. Rolando E. Hernández Muñoz

Contenido.

1	RESUMEN	3
2	ABREVIATURAS	4
3	INTRODUCCIÓN	6
	- Estrés oxidativo y cáncer	6
	▪ Peróxido de hidrógeno como un segundo mensajero	7
	▪ Daño a lípidos.	8
4	Factor nuclear κ B, cáncer y estrés oxidativo	9
	- Cáncer renal	12
	▪ Nitritotriacetato de hierro	15
	- Antioxidantes y cáncer	17
	▪ Polifenoles	18
	▪ Arándano	20
5	JUSTIFICACIÓN	22
6	HIPÓTESIS	23
7	OBJETIVOS	23
8	MATERIAL Y MÉTODOS	25
	- Diseño experimental	26
	▪ Estudios <i>in vivo</i>	26
	▪ Estudios <i>in vitro</i>	28
	- Determinaciones	30
9	RESULTADOS	33
	- Tratamientos <i>in vivo</i>	35
	- Tratamientos <i>in vitro</i>	40
10	DISCUSIÓN	49
11	CONCLUSIONES	56
12	ANEXOS	57
13	BIBLIOGRAFÍA	73

LISTA DE ABREVIATURAS

Al-NTA	Nitrilotriacetato de aluminio
AP-1	Proteína activadora 1
CCR	Carcinoma celular renal
COX-2	Ciclooxigenasa 2
c-myc	Proto oncogen con potencial neoplásico, homólogo del oncogen aviar retroviral v-myc
cyclin B1	Proteína reguladora del ciclo celular
D-MEM	Medio de cultivo de Dulbecco modificado por Tagle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	Dinitrofenlhidrazina
DTT	Ditiotriitol
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
EMSA	Ensayo de cambio de movilidad electroforética
ERK	Proteína cinasa regulada por señales extracelulares
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FeNTA	Nitrilotriacetato de hierro
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HNE	4-hidroxinonal
HO•	Radical hidroxilo
i.g.	Intragástrico
I κ B	Proteína inhibidora de NF- κ B
IKK	Proteína cinasa de I κ B
i.p.	Intraperitoneal
JCA	Jugo concentrado de arándano
LPS	Lipopolisacárido
MAP3K, MAPKK y MAPK	Proteínas cinasa activadas por mitógenos
MDA	Malondialdehido
MMP	Metaloproteinasa de matriz extracelular
NEMO	Modulador esencial de NF- κ B, también conocido como IKK γ
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NIK	Proteína cinasa inductora de NF- κ B
ODC	Ornitina descarboxilasa
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
PBS	Amortiguador de fosfatos y solución salina
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PTK	Proteína cinasa de tirosina
P65	Subunidad proteica de NF- κ B
Raf	Proteína que hidroliza GTP, tiene actividad de cinasa de serina y treonina y es activada por la proteína Ras.
Ras	Proteína que hidroliza GTP, codificada en el encogen ras (rat sarcoma)
SDS	Dodecilsulfato de sodio

SFB	Suero fetal de bovino
SSI	Solución salina isotónica

RESUMEN

Hay evidencias que relacionan el estrés oxidativo con el cáncer, lo cual ha generado interés por el uso de antioxidantes en su prevención y/o tratamiento. Algunas frutas, como el arándano (*Vaccinium macrocarpon*), tienen gran contenido de antioxidantes, entre los que se distinguen los polifenoles. Se ha visto que éstos tienen capacidades aún mayores a las de los antioxidantes clásicos como las vitaminas E y C. Con base en esto, se investigó si el daño oxidativo inducido por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA), se podía prevenir con jugo concentrado de arándano (JCA), tanto *in vivo* (en ratas) como *in vitro* (en células de epitelio tubular proximal de riñón de cerdo LLC-PK1). Así mismo, se investigó *in vitro* la activación del factor de transcripción NF- κ B y la capacidad celular de crecimiento independiente de adhesión después del tratamiento con FeNTA y si el JCA tenía efecto sobre las alteraciones inducidas.

Se estudiaron cuatro grupos: Control, JCA, FeNTA y JCA+FeNTA. *In vivo* se probaron dos dosis y tiempos de pretratamiento con JCA: 2 y 5 mL JCA/Kg de peso corporal cada 24 h durante 10 y 15 días respectivamente. *In vitro* el tratamiento durante 48 h con JCA dilución 1:180 y con FeNTA 500 μ M fue simultáneo. En los dos modelos, el antioxidante JCA generó distintas respuestas, en algunos casos opuestas. El JCA redujo parcialmente la lipoperoxidación *in vivo* y la evitó *in vitro*. Exacerbó la oxidación de proteínas *in vivo* y la impidió *in vitro*. Así mismo, el JCA exacerbó *in vivo* la generación de H₂O₂. La concentración de H₂O₂ no se determinó *in vitro* porque no se encontró una metodología adecuada. Se encontró *in vitro*, con la técnica de Western blot, que el FeNTA induce la activación del factor de transcripción NF- κ B, sugiriendo que esta puede ser una de las causas de su carcinogenicidad. Así mismo, la activación del factor se incrementó en presencia del JCA en los grupos JCA y JCA+FeNTA. El esquema de tratamiento con FeNTA empleado en las células LLC-PK1 fue capaz de generar estrés oxidativo, pero las células no adquirieron la capacidad de crecer independientes de adhesión, es decir, no adquirieron características de células cancerosas, por lo cual no fue posible evaluar los efectos del JCA en este proceso.

Entonces, *in vitro*, se comprobó que el JCA tiene propiedades antioxidantes y se demostró que tiene un efecto protector contra el daño oxidativo causado por FeNTA. En cambio, los resultados de los estudios *in vivo* muestran efectos prooxidativos del JCA en combinación con el FeNTA. Por lo que, para proponer al JCA como tratamiento en humanos es necesario realizar más estudios.

INTRODUCCIÓN.

ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER

El desequilibrio entre la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o de nitrógeno (ERN) y los sistemas antioxidantes endógenos conducen a un estado celular conocido como estrés oxidativo, lo que provoca de forma exacerbada el daño oxidativo a lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (que en última instancia pueden conducir al desarrollo de algunas patologías o a la muerte celular). Se ha demostrado entonces, que las ERO tienen un papel clave en las rutas fisiopatológicas de una amplia variedad de enfermedades como diabetes mellitus, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide y cáncer, y en procesos fisiológicos como el envejecimiento [Khan y cols, 2004].

El cáncer se define como el crecimiento tisular producido por la proliferación descontrolada y continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Esta enfermedad, que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen. El cáncer involucra cambios permanentes en el genoma o mutaciones que conducen a la activación de oncogenes y a la inhibición de genes supresores de tumores [Bishop y Weimberg, 1996; Hanahan y Weimberg, 2000].

Basándose en observaciones de cáncer humano y en modelos animales, se puede decir que el desarrollo de tumores proviene de un proceso de múltiples etapas análogo a la evolución Darwiniana, en el cual una sucesión de cambios genéticos, desde mutaciones puntuales hasta cambios en el complemento cromosómico, confieren algún tipo de ventaja para el crecimiento celular, lo que conduce a la transformación progresiva de células normales en células cancerosas malignas [Bergers y cols, 1999; Foulds, 1954; Hanahan y Weimberg, 2000; Kinzler y Vogelstein, 1996; Nowell, 1976; Renan, 1993]. Es

decir, generalmente una sola mutación no basta para convertir una célula normal en una célula cancerosa, por el contrario, se ha visto que la carcinogénesis (la generación del cáncer) requiere que ocurran varias alteraciones en el linaje de una célula [Alberts y cols, 2002]. Estos cambios pueden ser provocados por diferentes clases de agentes: (a) carcinógenos, que entre otras lesiones provocan cambios en la secuencia de nucleótidos; (b) radiación, que generalmente causa rupturas en los cromosomas y traslocaciones; (c) virus, que introducen versiones oncogénicas de genes que controlan el ciclo celular [Alberts y cols, 2002]; y (d) alteraciones en la regulación epigenética que incluyen cambios en los patrones de metilación (hipo e hipermetilación) que modifican la expresión génica [Feinberg, 2004]. Se ha sugerido que los diferentes genotipos de células cancerosas son una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente dirigen el crecimiento celular maligno: 1) autosuficiencia en señales de crecimiento, 2) insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, 3) evasión de la muerte celular programada o apoptosis, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogénesis continua e invasión de tejidos adyacentes y 6) metástasis [Hanahan y Weimberg, 2000].

Cada vez hay más evidencias que relacionan al cáncer con el estrés oxidativo. Entre las hipótesis que sustentan que el estrés oxidativo es un factor importante en el desarrollo de cáncer están **a)** la que propone al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como un segundo mensajero necesario para la activación de factores de transcripción que son sensibles al estado redox de la célula; **b)** la que relaciona el daño a lípidos y los subproductos de este evento con el inicio de cáncer y **c)** la que propone que el daño directo al DNA es un factor importante en la carcinogénesis. En este trabajo nosotros nos enfocaremos en las dos primeras, las cuales se describen a continuación.

a) El H_2O_2 como un segundo mensajero.

Se sabe que las células cancerosas, particularmente aquellas que son altamente invasivas o metastásicas, requieren un cierto nivel de estrés oxidativo para mantener un desbalance entre proliferación y apoptosis. Se ha encontrado que muchos tipos de

células cancerosas generan constitutivamente grandes, aunque tolerables, cantidades de H_2O_2 , el cual aparentemente pueden funcionar como molécula de señalización en la vía de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPK) para activar constantemente factores de transcripción. Entre estos factores está el factor nuclear kappa B (NF- κ B), la proteína activadora 1 (AP-1) y c-myc, que son sensibles a estrés oxidativo y activan genes que están involucrados tanto en la supervivencia como en la proliferación de las células (figura 1). Existen evidencias que demuestran que si el exceso de H_2O_2 se atrapa por compuestos que tienen actividad antioxidante, se suprimen los genes de respuesta a estrés oxidativo y consecuentemente se inhibe la proliferación de células cancerosas [Loo, 2003].

b) Daño a lípidos. Relación de los subproductos de lipoperoxidación con el inicio de cáncer.

Existen muchas observaciones que apoyan fuertemente que los productos de la oxidación de lípidos (dienos conjugados, lípidos hidroperóxidos y productos de degradación como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNE)), están asociados íntimamente con el desarrollo del cáncer. Se ha demostrado que los subproductos de la lipoperoxidación reaccionan, por ejemplo, con el DNA renal para formar aductos [Gago-Dominguez y cols, 2002; Toyokuni y cols, 1994a; Umemura y cols, 1990] y la reparación deficiente del daño al DNA inducido por estos aductos puede conducir a mutaciones en protooncogenes y/o genes supresores de tumores, lo cual es una etapa crítica en el proceso de conversión de las células normales a células con fenotipo maligno [Umemura y cols, 1996]. Existen algunos ejemplos específicos en humanos en los cuales se han relacionado estas observaciones con el desarrollo de cáncer [Basso y cols, 1994; Okamoto y cols, 1994], así como el consumo de antioxidantes con su disminución [Lindblad y cols, 1999; Yuan y cols, 1998]. Más aún se ha propuesto que el aumento en la lipoperoxidación observada en las personas obesas e hipertensas es el mecanismo responsable, al menos en parte, del aumento en el riesgo que corren estos pacientes a desarrollar carcinoma celular renal [Gago-Dominguez y cols, 2002].

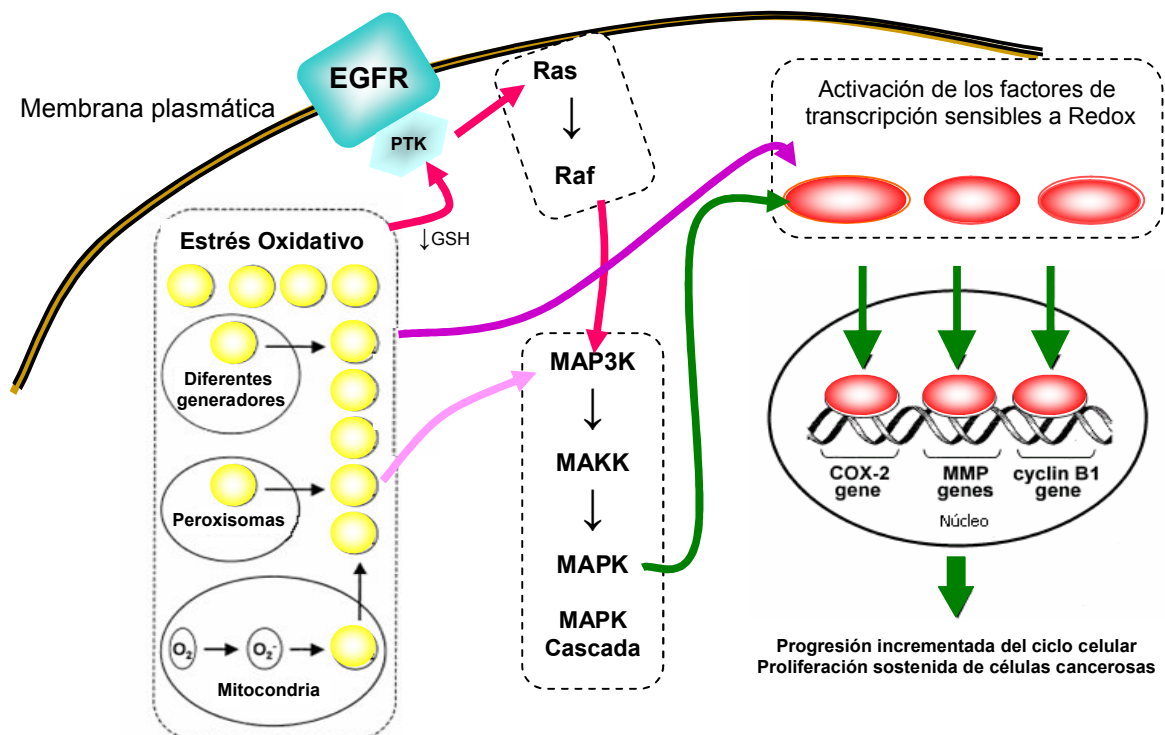


Figura 1.- Papel del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en las células cancerosas. EGFR, receptor del factor de crecimiento epidermal; PTK, proteína cinasa de tirosina; Ras y Raf, proteínas que hidrolizan GTP; MAP3K, MAPKK y MAPK, proteínas cinasas activadas por mitógenos; NF- κ B, factor nuclear κ B; AP-1, proteína activadora 1; c-myc, oncogen perteneciente a la familia de fosfoproteínas nucleares; COX-2, ciclooxigenasa 2; MMP, metaloproteínasa de matriz extracelular; cyclin B1, proteína reguladora del ciclo celular [Modificado de Loo, 2003].

FACTOR NUCLEAR κ B, CÁNCER Y ESTRÉS OXIDATIVO

Entre los factores de transcripción íntimamente relacionados con el cáncer y sensibles al estado redox está el factor nuclear κ B (NF- κ B), descubierto por Sen y Baltimore en 1986 como un factor necesario para la transcripción de la cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas en las células B [Bharti y Aggarwal, 2002; Magnani y cols, 2000]. El NF- κ B está presente en el citosol de casi todos los tipos celulares en forma inactiva, con excepción de células B maduras y células plasmáticas en las cuales el factor está localizado en el núcleo unido al DNA [Magnani y cols, 2000].

El NF- κ B constituye una familia de proteínas diméricas de unión a DNA. En mamíferos se encuentran cinco miembros de la familia NF- κ B: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105) y NF- κ B2 (p52 y su precursor p100). Estas proteínas pueden

existir como homo o heterodímeros y muestran una región de 300 aminoácidos N-terminal muy conservada, denominada dominio de homología Rel (RHD, por sus siglas en inglés) que es responsable de la dimerización, la traslocación nuclear, la unión al DNA, la transcripción de genes [Ruland y Mak, 2003] y la interacción con miembros de la familia de proteínas inhibidoras de NF- κ B (I κ B). Esto último gracias a que las proteínas I κ B contienen múltiples copias de repetidos de ankirina los cuales interactúan con el RHD de las proteínas Rel/NF- κ B [Li y Karin, 1999].

La activación de NF- κ B es regulada por múltiples vías de señalización en cascada, y la contribución de cada vía en la inducción de NF- κ B es dependiente de la naturaleza del estímulo [Li y cols, 1999]. En la figura 2 se muestran dos vías de señalización para la activación de NF- κ B [Hayden y Ghosh, 2004]. Esta activación es controlada por la fosforilación secuencial, ubiquitinación y degradación proteosomal de las proteínas I κ B, y la consecuente exposición de una región en NF- κ B denominada señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) [Je y cols, 2004; Magnani y cols, 2000]. Se sabe que son muchas las cinasas que fosforilan I κ B en residuos específicos de serinas amino terminales, de las cuales, las más estudiadas son las I κ B cinasas (IKK) [Storz y cols, 2004]. Estas cinasas de proteína son un complejo multiproteico compuesto por al menos tres subunidades: IKK α (IKK-1), IKK β (IKK-2) que actúan como la subunidad catalítica, e IKK γ también conocido como modulador esencial de NF- κ B (NEMO, por sus siglas en inglés) [Li y cols, 1999]. Éstas, a su vez, son fosforiladas y activadas por una o más cinasas hacia arriba en la cascada, por ejemplo por la cinasa inductora de NF- κ B (NIK) [Je y cols, 2004].

Los factores transcripcionales de la familia Rel/NF- κ B regulan numerosos genes celulares y virales, juegan un papel importante en respuestas de estrés, inmunes, de inflamación y en procesos de sobrevivencia, muerte celular y reparación tisular [Li y Karin, 1999; Nakanishi y Toi, 2005]. Asimismo, hay evidencia sustancial que indica que el NF- κ B regula la oncogénesis y la progresión de tumores [Garkavtsev y cols, 2004; Greten y cols 2004; Pikarsky, 2004]. Por ejemplo, el producto del gen de cilindromatosis

familiar *CYLD*, que es supresor de tumores, funciona como regulador negativo de NF- κ B, es decir, la proteína *CYLD* normalmente se une a IKK γ (o NEMO) e inhibe la fosforilación y degradación de I κ B, manteniendo así inactivo a NF- κ B en el citoplasma. La inhibición de *CYLD* incrementa la activación de NF- κ B y su pérdida promueve el desarrollo de cáncer en familias con cilindromatosis familiar [Brummelkamp y cols, 2003].

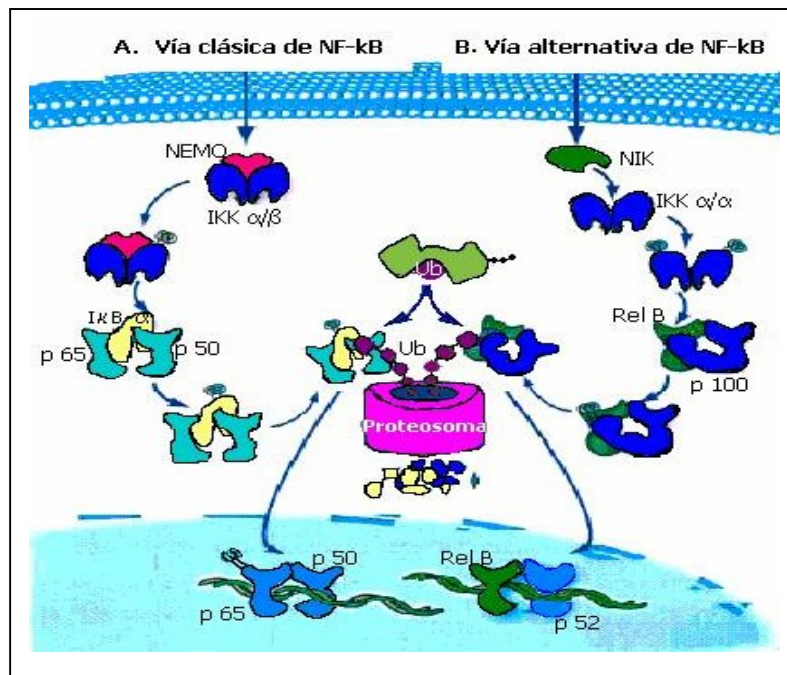


Figura 2.- Vías clásica y alternativa de la activación de NF- κ B. NEMO= modulador esencial de NF- κ B (IKK γ); NIK= cinasa inductora de NF- κ B; p50, p65, p100 y Rel B= proteínas que conforman NF- κ B; Ub= Ubiquitina

Por otra parte, se ha demostrado que la activación de NF- κ B se da a tiempos cortos. Li y Karin en 1999, demostraron en un modelo con fibroblastos de embrión de ratón que la activación de NF- κ B ocurre desde los 10 minutos después de ser estimulados con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) o la interleucina 1 (IL-1) [Li y cols, 1999]. Así mismo, hay evidencia de que la actividad de NF- κ B es regulada por los niveles intracelulares de ROS, aunque el mecanismo molecular involucrado aún no está bien esclarecido [Li y Karin, 1999]. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que en una variedad de tipos celulares, NF- κ B actúa como un sensor de estrés oxidativo. Por

ejemplo, células expuestas a H₂O₂ o inducidas para producir especies reactivas de oxígeno intracelulares, muestran una potente activación de NF-κB [Fan y cols, 2003]. En otro estudio se encontró que la activación de NF-κB en respuesta al estrés oxidativo es concomitante con la fosforilación de tirosina en varios intermediarios de la vía de señalización IKK/NF-κB [Storz y cols, 2004]. Además, se ha demostrado que las ERO actúan como moléculas de señalización en células mesangiales cultivadas con alta concentración de glucosa [Ha y Lee, 2000] y se ha visto que estas células muestran un aumento en la cantidad de p65 en el núcleo y la traslocación de NF-κB se aprecia desde los 30 minutos con un máximo a 1 hora, mientras que las mismas células tratadas con antioxidantes (pirrolidina ditiocarbamato, N-acetil-L-cisteína, difeniliodonio y rotenona) muestran una reducción efectiva en la activación de NF-κB [Sheu y cols, 2004]. En otros experimentos con extractos nucleares de riñón de ratas inyectadas con lipopolisacárido (LPS), se realizó un ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) donde se detectó actividad de NF-κB a 1, 3 y 6 horas después de la administración del LPS y se encontró que las proteínas presentes en el extracto fueron p50 y p65 [Pocock y cols, 2003]. La activación de NF-κB en el glomérulo fue sustentada adicionalmente por experimentos en los cuales se demostró la presencia de gran cantidad de proteína IκB fosforilada, es decir, inactiva [Pocock y cols, 2003]. Así mismo, se han encontrado evidencias de que los productos de la lipoperoxidación inducen la activación de NF-κB. En un modelo de lipoperoxidación en células endoteliales de próstata YPEN-1, se detectó un incremento en la actividad de NF-κB 1 hora después de la estimulación con HNE, continuó hasta 2 h y declinó a las 3 h después de la estimulación con HNE [Je y cols, 2004].

CÁNCER RENAL

El cáncer se ha convertido desde hace tiempo en un problema muy serio de salud pública en el mundo y, por supuesto, en nuestro país. Entre los tipos de cáncer menos estudiados está el cáncer renal, del cual, el carcinoma celular renal (CCR) es el más común. Hay cinco tipos principales de CCR, que se identifican mediante el examen del

tumor bajo el microscopio: célula clara, papilar, cromóforo, de ducto colector y no clasificado [Brenner, 2000]. En la tabla 1 se muestran datos estadísticos del cáncer renal en México, obtenidos del compendio de cáncer del 2001 del registro histopatológico de neoplasias malignas de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud.

Tabla 1.- Datos de morbilidad y mortalidad de cáncer renal en México en 2001

	Morbilidad								
	<i>Hombres</i>			<i>Mujeres</i>			<i>Total</i>		
	Casos	Reg/hab ¹		Casos	Reg/hab	%	Casos	Reg/hab	%
Cáncer Renal	872	1.7	2.2	705	1.4	1.1	1577	1.6	1.5
Todas las neoplasias	35 677	71.3	100	66 980	131.5	100	102 657	101.6	100

	Mortalidad								
	<i>Hombres</i>			<i>Mujeres</i>			<i>Total</i>		
	Def	%	Tas ³	Def	%	Tasa	Def	%	Tasa
Cáncer Renal	746	2.7	1.5	542	1.86	0.0	1289	2.29	1.3
Todas las noplacias	27 029	100	54	29 160	100	57.2	56 213	100	55.7

Datos obtenidos del compendio de cáncer 2001 de la Dirección General de Epidemiología

¹ Númro de casos registrados por 100 000 habitantes

² Número de defunciones

³ Tasa por 100 000 habitantes

Nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)

El modelo experimental de carcinogénesis renal más usado es el inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). El nitrilotriacetato (NTA) es un ácido aminocarboxílico tribásico contaminante de agua, derivado de los detergentes [Leibold y cols, 2002]. Funciona como agente quelante de calcio, magnesio, zinc y hierro para formar con este último al FeNTA, que es una molécula pequeña y de muy fácil absorción [Preece y cols, 1989], es nefrotóxico y promotor de tumores renales [Rahman y cols, 2003].

El FeNTA inyectado intraperitonealmente es absorbido en la vena portal a través del mesotelio y pasa a la circulación vía hepática [Singh y cols, 2003]. Debido a su bajo peso molecular, es fácilmente filtrado a través del glomérulo hacia el lumen de los túbulos proximales. En las células epiteliales del túbulo, el Fe^{3+}NTA es reducido a Fe^{2+}NTA por los productos de degradación del glutatión, cisteína y cisteinglicina [Preece y cols, 1989].

Las ERO generadas por FeNTA en las células epiteliales del túbulo proximal, se obtienen vía reacción de Fenton-Haber Weiss (figura 3); también se generan, en las células del lado luminal del túbulo proximal, especies oxidantes de hierro como iones ferrilo (FeO^+), cinéticamente equivalentes al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) [Singh y cols, 2003].

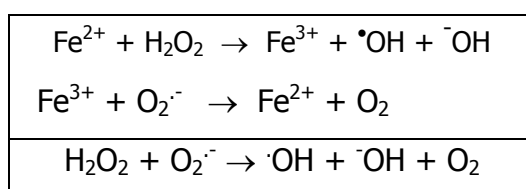


Figura 3.- Reacción de Fenton- Haber Weiss

Estas especies reactivas inducen alteraciones tisulares y disfunciones renales como incremento de la creatinina sérica y el nitrógeno de urea en suero [Singh y cols, 2003], y conducen a un aumento en la peroxidación de lípidos con una disminución concomitante en el nivel de glutatión tisular y otros antioxidantes, así como a la alteración en el funcionamiento de las enzimas metabolizadoras de ERO [Rahman y cols, 2003] y a la formación de los productos oxidativos del DNA como la 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OH-dG) [Bahnemann y cols, 1998; Rahman y cols, 2003;

Singh y cols, 2003; Toyokuni, 1996; Toyokuni y cols, 1990; 1994a; 1994b; 1995; 1997; Uchida y cols, 1995; Umemura y cols, 1990] y de proteínas [Oberley, 2002].

Por otro lado, la administración crónica de FeNTA lleva al desarrollo de cáncer en el riñón. Los tumores renales inducidos por FeNTA en ratas, parecen ser la contraparte del CCR humano [Gago-Dominguez y cols, 2002; Li y cols, 1987]. Similar a lo que ocurre en el cáncer humano de células renales, la incidencia de cáncer en ratas macho es dos veces mayor que en hembras [Deguchi y cols, 1995; Li y cols, 1987]. Una de las hipótesis para explicar la carcinogenicidad de FeNTA es la inducción del estrés oxidativo y la acumulación de proteínas detoxificadoras de ERO modificadas con productos de lipoperoxidación como HNE [Iqbal y cols, 1995; Rahman y cols, 2003]. Se ha demostrado que la inducción de estrés oxidativo en el riñón de ratas tratadas con FeNTA activa a la ciclooxigenasa e incrementa la síntesis de prostaglandinas, las cuales tienen un papel importante en el desarrollo de la hiperplasia tisular [Rahman y cols, 2003]. Además, en el cáncer inducido por FeNTA hay evidencias que puntualizan a la lipoperoxidación en túbulos renales proximales como posible mecanismo de carcinogénesis renal para este modelo en roedores. Una de estas evidencias es que cuando se administra nitrilotriacetato de aluminio (Al-NTA) a ratas, se producen en las células renales las mismas anomalías histológicas (necrosis tubular proximal) pero sin la lipoperoxidación [Ebina y cols, 1984 y 1986; Li y cols, 1987; Okada y cols, 1987] y las ratas no presentan tumores renales [Ebina y cols, 1984].

Por otra parte, algunos autores han demostrado que la administración de FeNTA induce la síntesis y actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) renal y hepática [Rahman y cols, 2003] y la síntesis de la quinona reductasa [Kandil y cols, 2002], enzimas que se ha demostrado están involucradas en la proliferación de tumores y en la inactivación de ciertos carcinógenos, respectivamente, además de que se incrementa la incorporación de [³H] timidina al DNA [Rahman y cols, 2003].

Hasta ahora hay solo un artículo [Chen y cols, 2001] donde se demuestra una relación entre el FeNTA y el factor de transcripción NF-κB que parece estar mediada, en parte, por el estrés oxidativo. En dicha publicación se reporta que en cultivos de

células de túbulo proximal expuestas a 400 μM de FeNTA, se indujo tanto la expresión del mensajero como la síntesis de la proteína sintasa de óxido nítrico inducible, lo cual correlacionó con un incremento en la actividad de unión de NF- κ B al DNA. Así mismo, se observó que en presencia de pirrolidina ditiocarbamato, un inhibidor de NF- κ B, estas alteraciones inducidas por FeNTA se previnieron. Entonces, el modelo de FeNTA es un modelo ya establecido pero poco caracterizado. Las evidencias apuntan a que el estrés oxidativo es responsable, al menos en parte, de su carcinogenicidad, pero no se conocen los mecanismos moleculares directamente involucrados en la malignización celular.

ANTIOXIDANTES Y CÁNCER

Como ya se mencionó anteriormente, cada vez son más las evidencias que relacionan al estrés oxidativo con enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer. Por todas estas evidencias, se han hecho estudios utilizando diversos antioxidantes para prevenirlo e incluso combatirlo. Por ejemplo, se ha reportado que incrementando el consumo de selenio se disminuye el riesgo de desarrollar cáncer de próstata [Brooks y cols, 2001; Criqui y cols, 1991; Helzlsouer y cols, 2000; Li y cols, 2004; Van den Brandt y cols, 2003; Yoshizawa y cols, 1998] y si se aumenta el consumo de folato en la dieta se disminuye el riesgo de desarrollar cáncer de colon [Giovannucci y cols, 1998; Glynn y cols, 1996; Kato y cols, 1999] y de seno [Zhang y cols 2003]. Se han probado también la melatonina, el resveratrol y el aceite de ajo, entre otros antioxidantes, encontrándose que disminuyen el daño al DNA, la lipoperoxidación y el abatimiento de antioxidantes celulares tanto *in vivo* [Okada, 2003] como *in vitro* [Matos y cols, 2000], así como la incidencia de cáncer *in vivo* causados por FeNTA. En el modelo experimental de FeNTA, experimentos con roedores mostraron que la vitamina E, un antioxidante natural importante [Zhang y cols, 1997], y el consumo de un extracto antioxidante del lirio blanco de agua [Khan N y Sultana S, 2005 a], inhiben los efectos inducidos por FeNTA como la lipoperoxidación, la formación de productos derivados de la oxidación del DNA, la generación de H_2O_2 , la actividad renal de ODC y la síntesis de DNA, así como el desarrollo de cáncer en riñones. Por otra parte, después del tratamiento con

melatonina, resveratrol o vitamina E también se observó la reducción de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (oxo8dG) un marcador de daño oxidativo al DNA inducido por la administración de bromato de potasio, otro carcinógeno renal [Cadenas y Barja, 1999].

Históricamente se ha relacionado el consumo de frutas y vegetales con la salud. Se ha encontrado que algunas hortalizas como el brócoli, coles de Bruselas, col, coliflor, zanahoria, cebolla, tomate, espinaca, ajo y algunas bayas como el arándano, incluidas en la dieta humana, tienen gran contenido de antioxidantes, entre los cuales se distinguen los polifenoles de varios tipos [Blomhoff, 2005]. Además, se sabe que algunos antioxidantes y otros compuestos presentes en las plantas pueden mejorar la defensa endógena antioxidante a través de la inducción de algunas enzimas antioxidantes y del metabolismo de fase II, por ejemplo la gamma-glutamylcistein sintetasa [Blomhoff, 2005; Moskaug y cols, 2005]. Entonces, con una dieta rica en estos alimentos se asegura la ingestión de varios fotoquímicos fenólicos, lo que se ha visto que contribuye a reducir el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como el cáncer [Shahidi y cols, 1992; Umemura y cols, 1990].

Polifenoles

El interés por estos compuestos se debe, entre otras cosas, a su gran capacidad antioxidante y a los efectos que esto puede tener en la salud humana. Los polifenoles son compuestos secundarios del metabolismo de las plantas que surgen por dos vías principales: la vía del acetato y la del chiquimato, y varían desde moléculas simples, como el ácido fenólico hasta moléculas altamente polimerizadas como los taninos [Bravo 1998]. Se pueden dividir en 10 categorías principales entre las que se encuentran los flavonoides, que son los polifenoles más comunes en las plantas. Los flavonoides (incluyendo las proantocianidinas) poseen propiedades anticarcinogénicas, antivirales, antibacteriales, antiinflamatorias, antialérgicas y vasodilatadoras, y se cree que esto se debe, al menos en parte, a sus propiedades antioxidantes [Fine, 2000; Stoner y Mukhtar, 1995]. Se ha demostrado que las proantocianidinas (figura 4) reaccionan con el HO[•] y otras ERO como el H₂O₂, inhiben la peroxidación de lípidos, la agregación de plaquetas, disminuyen la fragilidad y permeabilidad capilar, afectan sistemas enzimáticos que incluyen la fosfolipasa A2, la

ciclooxigenasa y la lipooxigenasa [Fine, 2000], quelan moléculas de hierro libre, inhiben enzimas como hialuronidasa, elastasa y colagenasa, que pueden degradar estructuras del tejido conectivo, e inhiben no-competitivamente a la xantina oxidasa que es un generador importante de radicales libres [Murray y Pizzorno, 1999].

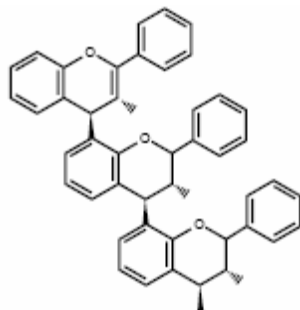


Figura 4 Estructura química general de las proantocianidinas o taninos condensados [Fine 2000].

Así mismo, se ha propuesto que la efectividad de los compuestos fenólicos depende, en parte, de su reacción con los radicales peroxilo y de la estabilización del radical fenoxilo, formados en las reacciones de lipoperoxidación, (figura 5) [Khan y cols, 2004].

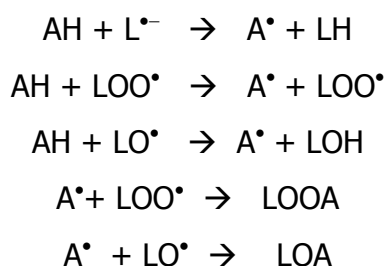


Figura 5. Participación de antioxidantes en la peroxidación lipídica. Donde, AH= antioxidante, L^{\bullet} = radical lípido, LO^{\bullet} = radical fenoxilo, LOO^{\bullet} = radical peroxilo.

Arándano

El arándano (*Vaccinium macrocarpon*) es una de las frutas nativas de Norteamérica. La fruta madura se usó por los nativos americanos para el tratamiento de malestares de vejiga y riñón. Los inmigrantes ingleses llamaron a la fruta "cranberry" porque el tallo y la flor se parecían a la cabeza, cuello y pico de una grulla. Las aplicaciones terapéuticas de los arándanos, incluyendo el alivio de malestares estomacales como vómito, pérdida de apetito y escorbuto, están documentadas desde el siglo XVII. Así mismo, antes de la aparición de los antibióticos, el arándano se empleó como un tratamiento popular contra las infecciones del tracto urinario [Lynch, 2004].

Actualmente se ha demostrado que el arándano previene la adhesión bacteriana de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario y en úlceras estomacales [Burger y cols, 2000], protege contra oxidación de lipoproteínas [Wilson y cols, 1998], reduce el colesterol en circulación [Reed y cols, 2001] y exhibe actividad anticancerígena *in vitro* [Bomser y cols, 1996]. Muchos de estos efectos biológicos se han atribuido o relacionado con un alto contenido y una amplia variedad de compuestos antioxidantes en la fruta [Foo y cols, 2000], incluyendo antocianidinas, proantocianidinas (taninos condensados), flavonol glucósidos, ácidos fenólicos de bajo peso molecular y ácidos orgánicos [Seeram y cols, 2004; Vinson y cols, 2001]. En un estudio comparativo con frutas como manzana, uva roja, durazno, piña, plátano, pera, limón y naranja, se reportó que el arándano presenta el más alto contenido de compuestos fenólicos (tabla 2). Además, el arándano tiene la actividad antioxidante más alta y el mayor efecto inhibitorio de la proliferación en células Hep-G2 de cáncer de hígado humano [Sun y cols, 2002]. Así mismo se ha demostrado que el jugo de arándano atrapa radicales de oxígeno como el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), HO^{\bullet} , otras ERO como H_2O_2 y singulete de oxígeno (1O_2) [Wang y Jiao, 2000]. Bomser y cols en 1996 y Kandil y cols en 2002, reportaron que los extractos de las especies de *Vaccinium*, ricos en proantocianidinas y que contienen otros flavonoides, son capaces de inhibir la inducción de la ODC.

Tabla 2.- Contenido fenólico en diferentes frutas.

Fruta	Contenido fenólico soluble (mg/100 g)
Arándano	507.0
Manzana	272.1
Uva roja	182.0
Fresa	147.8
Limón	66.3
Durazno	65.3
Naranja	56.8
Plátano	56.1
Pera	53.6
Piña	40.4

Expresado como mg de equivalentes de ácido gálico /100 g de fruta fresca

También se han reportado propiedades antiangiogénicas [Roy y cols, 2002] y antiproliferativas de las especies de *Vaccinium*, particularmente de arándano [Seeram y cols, 2004]. Como bien se sabe, todos estos son eventos íntimamente relacionados con el desarrollo de cáncer por lo que en el presente trabajo se consideró de gran interés investigar si todas o alguna de estas propiedades atribuídas al arándano tienen influencia en el modelo de daño agudo inducido por FeNTA.

JUSTIFICACIÓN

Durante la exposición a FeNTA, que es el modelo experimental más usado de carcinogénesis renal, se producen grandes cantidades de especies oxidativas que parecen ser responsables, al menos en parte, de la carcinogenicidad de este compuesto. El cáncer renal es poco estudiado y su diagnóstico es difícil en etapas tempranas, por lo que estudios que lleven a su prevención adquieren gran importancia. En este trabajo se consideró de interés determinar si, utilizando alimentos que formen parte de la dieta humana, es posible proteger contra la generación del estrés oxidativo inducido por FeNTA y algunas de sus consecuencias tempranas. Se eligió el arándano debido a que presenta una gran cantidad de compuestos antioxidantes y acciones benéficas específicamente en el tracto urinario. Se propuso estudiar los efectos del jugo concentrado de arándano tanto *in vivo* como *in vitro*, con la finalidad de evaluar bajo diferentes condiciones su efecto sobre el daño inducido por FeNTA, y así tratar de entender los mecanismos moleculares involucrados en la carcinogenicidad de este compuesto. Más aún, se investigó si este carcinógeno modifica la activación de factores de transcripción potencialmente oncogénicos y sensibles a regulación redox como el NF- κ B, y si el arándano es capaz de evitar dicha modificación.

HIPÓTESIS

El arándano, por sus propiedades antioxidantes, puede prevenir el daño oxidativo y reducir las alteraciones probablemente involucradas en el desarrollo de cáncer inducidas por nitrilotriacetato de hierro en riñón de rata y células renales en cultivo.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto del tratamiento con un jugo concentrado de arándano sobre el daño oxidativo y alteraciones que podrían llevar al desarrollo de cáncer renal inducido por nitrilotriacetato de hierro en riñón de rata y en células renales en cultivo.

PARTICULARES

In vivo

- Establecer en el laboratorio el modelo de roedores tratados con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).
- Determinar el daño oxidativo a proteínas y a lípidos (como factor de riesgo a carcinogénesis) inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) y si el jugo concentrado de arándano puede prevenirlo.
- Medir la generación de H_2O_2 por ser una de las ERO más claramente relacionada con el cáncer, y si el tratamiento con jugo concentrado de arándano tiene algún efecto.

In vitro

- Establecer en el laboratorio el modelo de células renales (LLC-PK1) en cultivo tratadas con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).
- Determinar el daño oxidativo a proteínas y a lípidos inducido por FeNTA y si el arándano puede prevenirlo.

- Probar si el FeNTA induce la capacidad crecimiento independiente de adhesión de las células LLC-PK1 y si el jugo concentrado de arándano es capaz de disminuir o evitar este efecto.
- Determinar si la actividad del factor de transcripción NF- κ B, el cual, se ha demostrado que responde al estrés oxidativo y que está involucrado en la señalización intracelular en procesos de carcinogénesis y metástasis, se modifica por la exposición a este carcinógeno renal y si el arándano protege contra esta modificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El jugo concentrado (6.6 veces) de arándano, que es la materia prima con que se preparan los jugos comerciales, fue generosamente donado por Ocean Spray Cranberries, Inc. (Lakeville-Middleboro, MA, EUA). La sal de sodio del ácido nitrilotriacético ($C_6H_7NO_6Na_2$), el nitrato de hierro ($Fe(NO_3)_3$), reactivo de Folin & Ciocalteu's phenol, albúmina sérica bovina (ASB), el naranja de xilenol, el hidroxitolueno butilado (BHT), la leupeptina, la pepstatina A, la aproptinina, la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH), el sulfato de estreptomina, la guanidina, el 1,1,3,3 tetrametoxipropano, el tris-HCl, el 1-metil-2-fenilindol, el acetonitrilo, el fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), la acrilamida, la metilénbisacrilamida, el persulfato de amonio, el TEMED, el cloruro de magnesio ($MgCl_2$), el ditioneitol (DTT), el fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), el HEPES, el glicerol, el tris-base, el ácido bórico, el cloruro de sodio (NaCl) y el cloruro de potasio (KCl) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA). El carbonato de sodio (Na_2CO_3), el fosfato monobásico (NaH_2PO_4) y dibásico (Na_2HPO_4) de sodio, el hidróxido de sodio (NaOH), el sulfato de cobre ($CuSO_4$), el sulfato ferroso amoniacal ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$), el metanol, el etanol, el ácido sulfúrico (H_2SO_4), el ácido clorhídrico (HCl), el EDTA- Na_2 , el acetato de etilo, el ácido tricloroacético y el acetonitrilo se compraron a JT Baker, México. El tartrato de sodio y potasio ($KNaC_4H_4$) fue de la marca Mallinckrodt. Los anticuerpos que se emplearon en el inmunoensayo tipo western blot contra actina e $I\kappa B\alpha$ fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EUA). El suero fetal de bovino (SFB), la tripsina-EDTA (0.05 % tripsina, 0.53 mM EDTA(4Na), el medio de Dulbecco modificado por Eagle (D-MEM) y el coctel de antibióticos (penicilina estreptomina y neomicina) fueron de la marca Gibco Invitrogen Corp. El agar bacteriológico (bacto agar) fue de la marca DIFCO (Sparks, MD, EUA). El poly(dI-dC)(poly(dI-dC)) se compró a Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ, EUA). El oligonucleótido biotinilado se compró a Panomics Inc. (Redwood City, CA, EUA). El estuche para el ensayo quimioluminiscente de cambio de movilidad electroforética (EMSA) se adquirió de Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, IL, EUA). La película

radiográfica fue de la marca Kodak, placa azul de rayos X para propósitos médicos generales. El oligonucleótido de doble cadena marcado con fósforo-32 que se empleó en los ensayos de EMSA fue generosamente proporcionado por el Doctor Alejandro Zentella Dehesa.

Material biológico

Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 250 g de peso obtenidas de Harlan México, las cuales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Química durante el tiempo del estudio en cajas de acrílico con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12 h (6:00 am – 6:00 pm). Los animales se alimentaron con una dieta estándar y agua *ad libitum*.

Para los estudios *in vitro* se utilizaron células de la línea LLC-PK1 de epitelio de túbulo proximal renal de cerdo, obtenidas de la American Type Culture Collection, donadas por el Doctor Marco A Velasco Velázquez.

Diseño experimental

- Estudios *in vivo*

En términos generales el diseño experimental fue el siguiente:

Se formaron cuatro grupos experimentales cada uno con 5-7 ratas, las cuales se pesaron antes y durante cada protocolo. La preparación de las soluciones de FeNTA y de JCA administradas se describe en el anexo 1. De los cuatro grupos de animales dos se pretrataron con jugo concentrado de arándano (JCA) diez o quince días previos al tratamiento con FeNTA. Los animales se sacrificaron por decapitación luego del correspondiente tratamiento con el vehículo (bicarbonato de sodio 0.5 M, pH 7.4) o con el carcinógeno (FeNTA). Las condiciones específicas se describen más adelante en cada protocolo. Se obtuvieron los riñones y se separó la corteza. Se homogenizaron 300 mg de corteza en amortiguador de fosfatos, se congelaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso para la determinación de lipoperoxidación. Así mismo, se homogenizaron 100 mg de corteza en amortiguador de fosfatos, se centrifugó y el sobrenadante se congeló y se almacenó a -80°C hasta su uso para la determinación de H₂O₂. El resto de la corteza se

congeló rápidamente en nitrógeno líquido y almacenó a -80°C hasta su uso para la determinación de proteínas oxidadas.

Se realizaron dos protocolos para determinar las condiciones ideales de tratamiento con FeNTA donde se generara el mayor estrés oxidativo medido como el daño oxidativo a proteínas (contenido de grupos carbonilo) y/o a lípidos (concentración de malondialdehído MDA) y la producción de H_2O_2 .

I. Estandarización de la dosis y tiempo de tratamiento con FeNTA.

Grupos:

- 1) Control.
- 2) FeNTA 10 mg Fe^{3+} /kg peso corporal. Sacrificio 1 h.
- 3) FeNTA 10 mg Fe^{3+} /kg peso corporal. Sacrificio 3 h.
- 4) FeNTA 15 mg Fe^{3+} /kg peso corporal. Sacrificio 1 h.
- 5) FeNTA 15 mg Fe^{3+} /kg peso corporal. Sacrificio 3 h.

II. Curso temporal con FeNTA 15 mg Fe^{3+} /kg peso corporal.

Grupos:

- 1) Control.
- 2) FeNTA 1 h.
- 3) FeNTA 3 h.
- 4) FeNTA 6 h.
- 5) FeNTA 9 h

El FeNTA se administró (i.p.) al tiempo cero y las ratas se sacrificaron según el tiempo correspondiente a su grupo.

Una vez determinadas las condiciones de estudio (dosis de FeNTA y tiempo de tratamiento) se llevaron a cabo los siguientes protocolos experimentales.

Protocolo 1. Efecto de la administración de jugo concentrado de arándano sobre alteraciones producidas por FeNTA.

Las ratas se dividieron en cuatro grupos: 1) Control, se le administró por vía intraperitoneal (i.p.) vehículo y por vía intragástrica (i.g.) agua; 2) JCA, se le administró por vía i.p. vehículo y por vía i.g. jugo concentrado de arándano (JCA); 3) FeNTA, se le administró por vía i.p. FeNTA y por vía i.g. agua; 4) JCA + FeNTA, se les administró por vía i.p. FeNTA y por vía i.g. JCA.

La administración de agua o JCA en una dosis de 2 mL/kg de peso corporal/24 h fue durante diez días previos a la administración de FeNTA. La determinación de la dosis de JCA se describe en el anexo 1. El FeNTA se administró una sola vez en una dosis de 15 mg Fe³⁺/kg de peso y las ratas se sacrificaron 1 hora después de la inyección.

Protocolo 2. Efecto del aumento de la dosis y tiempo de administración de JCA sobre alteraciones producidas por FeNTA.

Se estudiaron los mismos grupos que en el protocolo anterior pero la administración de agua o JCA en una dosis de 5 mL/kg de peso corporal/ 24 h durante quince días previos a la administración de FeNTA. La dosis de FeNTA y el tiempo de sacrificio también fueron iguales.

En ambos protocolos experimentales se determinó el daño oxidativo a proteínas (contenido de grupos carbonilo) y a lípidos (concentración de malondialdeído MDA) y la producción de H₂O₂ en corteza renal.

- Estudios *in vitro*

La dosis de FeNTA (500 μM) y el tiempo óptimo (48 h) de tratamiento de las células LLC-PK1 se determinaron previamente, en el laboratorio del Doctor Velasco mediante curvas de dosis y tiempo-respuesta. Los parámetros que se midieron para decidir la dosis y tiempo óptimos de tratamiento fueron el número y la proliferación celular, ya que si éstos se modifican significa que el tratamiento con FeNTA sí tiene efectos en el metabolismo normal de las células, por ejemplo, el aumento en la incorporación de 5-

bromo-2-desoxiuridina (BrdU) indica que está aumentada división celular. Así mismo, previamente se determinó también la concentración subtóxica de arándano (dilución final en el medio de cultivo, 1:180) en la que los cultivos celulares no sufrían ninguna alteración.

Con base en estos experimentos se diseñó el siguiente protocolo experimental: Las células LLC-PK1 se cultivaron en cajas de Petri de 100 mm de diámetro y con medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle (D-MEM) suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB). El tratamiento se inició con cultivos 80-90 % confluentes y se dejó durante 48 h. Se trabajó con los siguientes grupos de células: 1) Control (C), tratadas solo con medio de cultivo D-MEM; 2) JCA, tratadas con JCA en medio D-MEM; 3) FeNTA, tratadas con FeNTA en medio D-MEM; 4) JCA + FeNTA, tratadas simultáneamente con JCA y FeNTA en medio D-MEM. Todas las soluciones administradas a los cultivos se filtraron previamente con membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.22 μm . El FeNTA se disolvió en amortiguador de fosfatos y solución salina (PBS), se ajustó el pH a 7.4 con bicarbonato de sodio en polvo y se administró en el medio D-MEM a una concentración final de 500 μM en un volumen final de 8 mL. El JCA se diluyó 1:180 veces con medio de cultivo D-MEM en un volumen final de 8 mL. Se probó previamente que estas condiciones ejercieran el efecto esperado en este sistema con cajas de 100 mm de diámetro. La preparación detallada del FeNTA y el JCA con el que se trataron los cultivos se describe en el anexo 1. Al término de las 48 h de tratamiento, se cosecharon las células con tripsina-EDTA. Se realizó este esquema para cada determinación (daño oxidativo a proteínas y a lípidos, crecimiento independiente de adhesión, y activación de NF- κ B por niveles de I κ B α en proteína citoplásmica y EMSA en la fracción de proteína nuclear. Para evaluar el crecimiento independiente de adhesión, las células cosechadas se embebieron en agar al 0.3 %, se transfirieron a un sistema de placas recubiertas con agar al 8 % y se observó su comportamiento durante 19 días. Las técnicas detalladas se describen en el anexo 2.

DETERMINACIONES

La descripción paso a paso de cada una de las técnicas se encuentra en el anexo 2

Daño oxidativo a proteínas (in vivo e in vitro)

- Contenido de grupos carbonilo

Una alternativa para evidenciar la presencia de estrés oxidativo es medir los productos estables finales de las reacciones oxidativas, ejemplo de ello son los grupos carbonilo (C=O) que se originan por acción de las ERO sobre las proteínas convirtiendo algunos aminoácidos (leucina, valina, lisina, arginina, prolina, treonina e isoleucina) en derivados carbonilo. Además, los grupos carbonilo también son productos de reacciones de rompimiento de enlaces peptídicos, e incluso de la interacción de los residuos de aminoácidos con productos de lipoperoxidación como el 4-hidroxinonenal o el MDA. Esta determinación se llevó a cabo basándose en la reactividad de los grupos carbonilo con dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas de proteína, las cuales absorben la luz a 370 nm. En las mismas muestras se determinó el contenido de proteínas por absorción a 280 nm para expresar el contenido de grupos carbonilo en nmol/mg proteína.

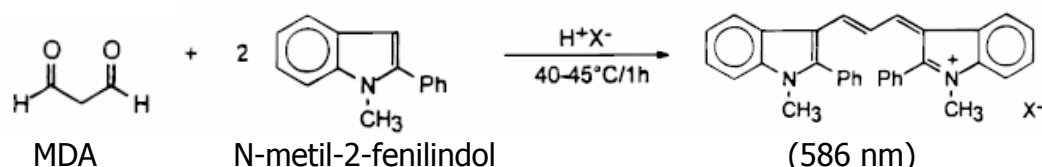
DNPH + Proteína carbonilada → Hidrazona de proteína (370 nm)

Daño oxidativo a lípidos (in vivo e in vitro)

- Concentración de malondialdehído (MDA)

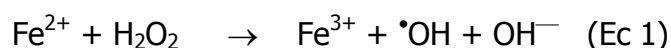
Uno de los marcadores clásicos de estrés oxidativo es la determinación de subproductos de la peroxidación de lípidos. Estos subproductos pueden atacar directamente al DNA y a proteínas y llevar finalmente a la pérdida de la función e integridad de las membranas. El MDA es uno de los productos derivados de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados y ésteres relacionados. Esta determinación se llevó a cabo con un método colorimétrico específico para MDA en el que esta molécula reacciona con N-metil-2-fenilindol en medio ácido a 45°C, lo que genera un compuesto colorido que absorbe a 586 nm. En las mismas muestras se determinó el contenido de proteínas

totales por el método de Lowry para expresar la cantidad de MDA en nmol/mg proteína.



Generación de peróxido de oxígeno H_2O_2 (in vivo)

Esta determinación se llevó a cabo por el método de FOX que está basado en la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} por el peróxido de hidrógeno en condiciones ácidas (Ec 1). El ión férrico se une con el naranja de xilenol (3,3'-bis[N,N-di(carboximetil)-aminometil]-o-cresolsulfona-fenofaleína, sal sódica) para formar un complejo estable colorido que se puede medir a 560 nm (Ec 2)



Donde: XO = naranja de xilenol; $\text{Fe}^{3+}\text{--HO}$ = complejo colorido

Activación del factor de transcripción NF- κ B (in vitro)

- Ensayo de cambio de movilidad electroforética

La interacción de proteínas con el DNA es el punto central para el control de muchos procesos celulares incluyendo la replicación, la recombinación, la reparación y la transcripción del DNA. Una técnica básica para estudiar la activación de factores de transcripción es el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés). El EMSA está basado en la observación de que el complejo estable proteína-DNA migra más lentamente que fragmentos libres de DNA a través de geles de poliacrilamida. La evaluación de la activación de NF- κ B se realizó mediante este ensayo, ya que este factor tiene la capacidad de unirse con una secuencia específica de DNA sólo cuando está activo. La secuencia consenso del oligonucleótido de doble cadena, marcado radiactivamente o biotinilado, al cual se une NF- κ B y que se utilizó en el

presente trabajo es 5'-AGTTGAGG GGACTTTCCCAGGC-3' [Chan y Murphy, 2003].

- Inmunoensayo tipo Western blot

Dado que el inhibidor I κ B normalmente mantiene secuestrado e inactivo al factor NF- κ B en el citoplasma, un método indirecto para medir su activación, es determinar si está presente I κ B α en extractos de proteínas citoplásmicas.

Capacidad de proliferación en ausencia de adhesión (in vitro)

Uno de los indicadores de transformación celular es la capacidad de crecer independiente de contacto célula-célula y/o célula-matriz. El ensayo se basa en retar a la célula, después de un tratamiento, a crecer y formar colonias sobre un sustrato semi-sólido como el agar suave (concentración de 0.3-0.4 %). Las células de la línea LLC-PK1 que se emplearon para los estudios *in vitro* necesitan estar adheridas a un sustrato sólido para crecer, por lo tanto si son capaces de proliferar después de algún tratamiento en condiciones de poca adherencia como las que ofrece la matriz de agar, esto dará cuenta de que las células sufrieron una transformación.

ESTADÍSTICA

Los datos se analizaron por análisis de varianza de una vía (ANOVA). Posteriormente se utilizó la prueba de Newman-Keuls para determinar las diferencias significativas entre los grupos. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

I. Estandarización de la dosis y tiempo de tratamiento con FeNTA

Para montar las condiciones de tratamiento con FeNTA decidimos llevar a cabo el siguiente protocolo. Se trataron 11 ratas con FeNTA a dosis de 10 y 15 mg Fe³⁺/kg de peso corporal durante una y tres horas. Después de este tiempo las ratas se sacrificaron y se obtuvieron las muestras de tejido renal para la determinación del daño oxidativo a proteínas. La proteína total se trató con 2,4-Dinitrofenilhidracina para detectar los grupos carbonilo. Se observó que el mayor contenido de grupos carbonilo se detectó en los grupos tratados con FeNTA 10 mg Fe³⁺/kg de peso corporal durante 3 h y con FeNTA 15 mg Fe³⁺/kg de peso corporal durante 1 h. Además, se encontró diferencia significativa entre los grupos FeNTA 10 y 15 mg Fe³⁺/kg de peso corporal tratados durante 1 h siendo mayor el valor en este último grupo (figura 6).

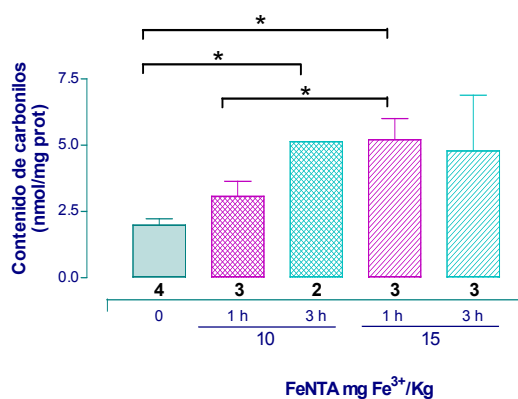


Figura 6.- Efecto de la administración de FeNTA a diferentes concentraciones y tiempos sobre la oxidación de proteínas renales medida como contenido de grupos carbonilo. Cada barra representa la media \pm ES. El número de datos analizados (n) está en la base de cada columna. * $p < 0.05$

II. Curso temporal con FeNTA 15 mg Fe³⁺/kg peso corporal.

Se llevó a cabo un segundo experimento, sacrificando a los animales a diferentes tiempos después de la administración del carcinógeno, con la finalidad de encontrar el tiempo en que se detecta la mayor cantidad de proteínas oxidadas, MDA y H₂O₂. En esta

prueba se utilizó FeNTA a dosis de 15 mg Fe³⁺/kg de peso corporal y el sacrificio de las ratas ocurrió entre 1 y 9 horas después de la administración del carcinógeno.

En la figura 7 A se observa que el daño oxidativo a proteínas aumentó más de tres veces respecto al control una hora después de la inyección del carcinógeno, siendo este el valor más alto de todos. Después de tres horas el valor disminuyó, aunque nunca regresó al nivel basal. En la figura 7 B es evidente el incremento del daño oxidativo a lípidos en el grupo de 1 h, mientras que ninguno de los otros grupos (3, 6 y 9 h) fue significativamente diferente del control. El H₂O₂ solo se detectó en el grupo de 1 h (figura 7 C). Estos resultados en conjunto muestran una coincidencia en los tres marcadores de estrés oxidativo, detectándose el mayor daño después de 1 h de la administración del FeNTA.

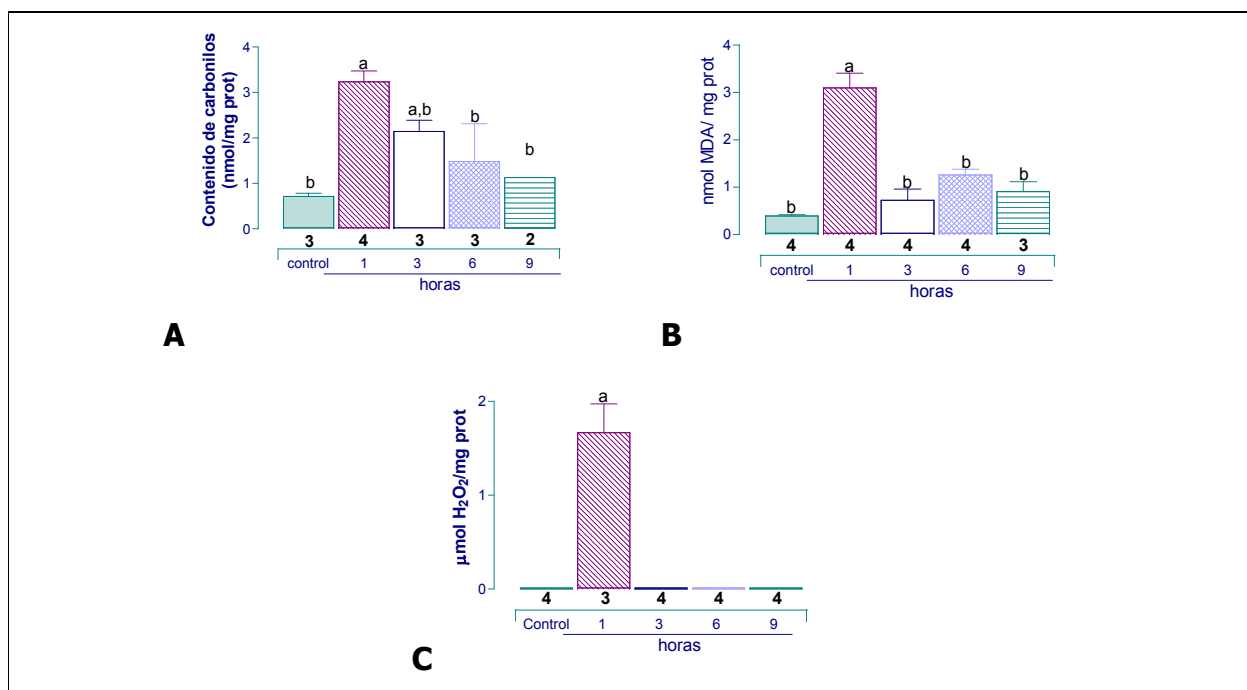


Figura 7.- Efecto de la administración de FeNTA (15 mg Fe³⁺/kg de peso corporal) a diferentes tiempos sobre: **A** la oxidación de proteínas, **B** la lipoperoxidación y **C** el contenido de peróxido de hidrógeno renal. Cada barra representa la media \pm ES. Las columnas con letras diferentes presentan diferencias significativas. El número de datos analizados (n) está en la base de cada columna.

Estos resultados indican que el mayor estrés oxidativo se presentó una hora después de inyectar a las ratas con el carcinógeno a una dosis de 15 mg de Fe³⁺/kg de peso

corporal. Con base en esto se decidió utilizar estas condiciones en los experimentos subsecuentes.

TRATAMIENTOS CON ARÁNDANO Y FeNTA *IN VIVO*

Protocolo 1. Efecto de la administración de jugo concentrado de arándano sobre alteraciones producidas por FeNTA.

Este protocolo se llevó a cabo con el tiempo de sacrificio (1 h) y dosis de FeNTA (administración ip única de 15 mg Fe³⁺/kg de peso corporal) determinados en las pruebas piloto. La dosis del JCA fue de 2 mL/kg de peso corporal/24 h durante 10 días vía intragástrica. En la figura 8 se muestra el peso corporal de los animales a lo largo del estudio. En ningún día se encontró diferencia significativa entre los pesos de los diferentes grupos.

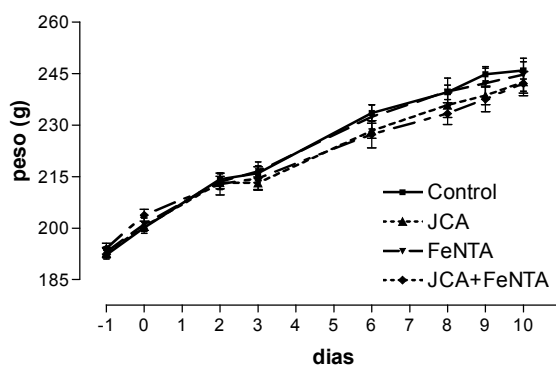


Figura 8.- Peso corporal de las ratas de los grupos estudiados durante 10 días que fue el periodo de administración del antioxidante a una dosis de 2 mL/kg de peso corporal/24 h (grupos JCA y JCA + FeNTA) o agua (grupos Control y FeNTA). Cada punto representa la media \pm ES. Control n=5, JCA n=6, FeNTA n=6, JCA+FeNTA n=7

En la determinación de grupos carbonilo no hubo diferencia estadística entre los grupos Control y JCA, mientras que aumentó significativamente en los grupos FeNTA y JCA + FeNTA, siendo mayor el último (figura 9 A). En la figura 9 B se muestra el daño

oxidativo a lípidos, donde se puede ver que los valores de los grupos Control y JCA son iguales, y que la concentración de malondialdehído aumentó en los grupos FeNTA y JCA + FeNTA teniendo valores similares entre ellos. El contenido renal de H_2O_2 (figura 9 C) mostró un comportamiento similar a la oxidación de lípidos: no hubo diferencias entre los grupos Control y JCA, y aumentó significativamente y de manera similar en los grupos FeNTA y JCA + FeNTA. Estos resultados indican que el JCA en la dosis y el tiempo empleados (2 mL/kg de peso corporal/24 h durante 10 días), no ofreció protección contra la oxidación de proteínas y de lípidos, ni contra el aumento en el contenido renal de H_2O_2 , incluso exacerba el daño a proteínas. Dados estos resultados se decidió realizar otro protocolo aumentando la dosis y el tiempo de exposición al antioxidante, con la finalidad de investigar si la oxidación de proteínas observada era dependiente de la dosis y tiempo de tratamiento con el JCA y si había algún efecto sobre la oxidación de lípidos y la producción de H_2O_2 .

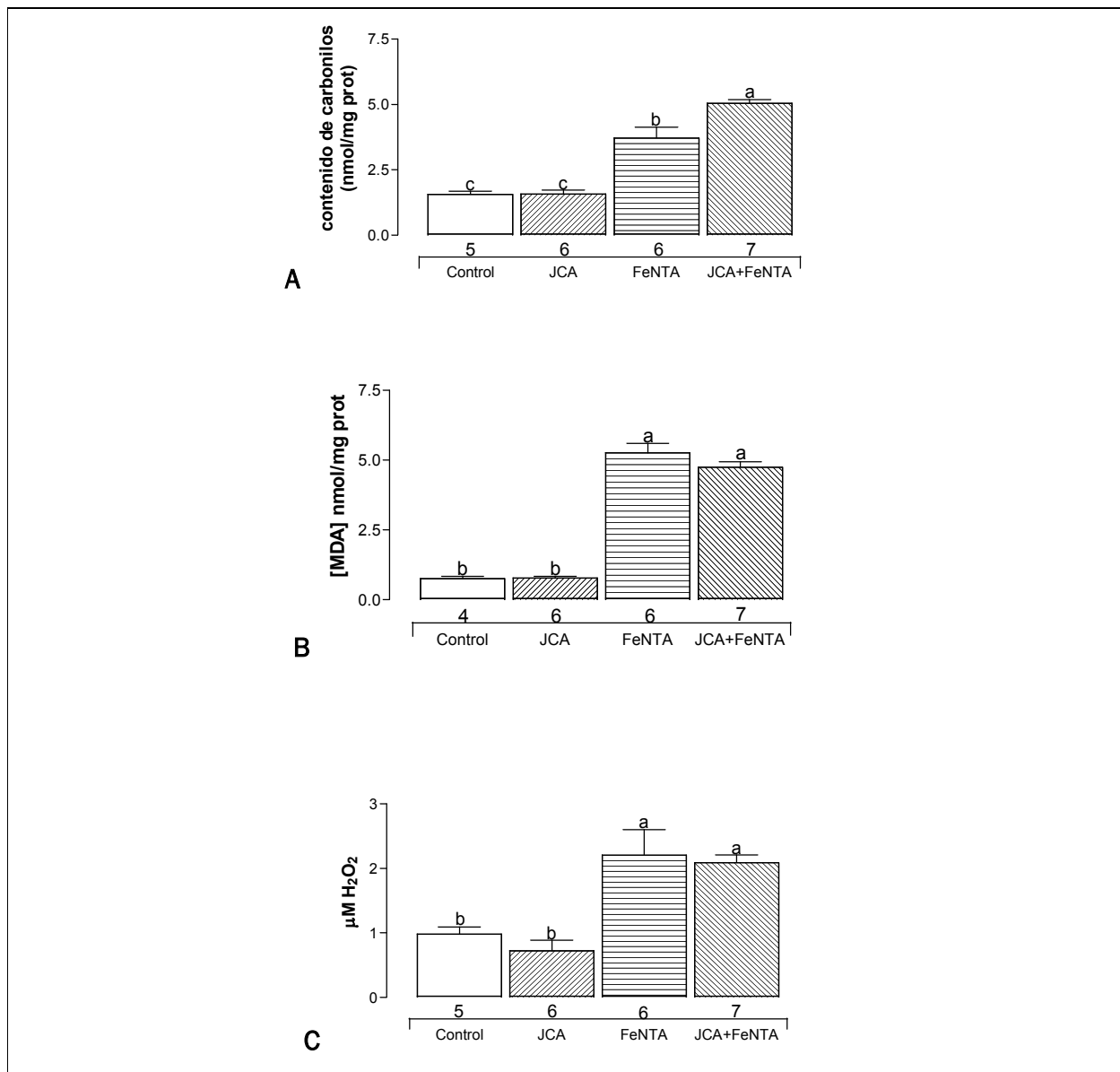


Figura 9.- Efecto del pretratamiento con JCA (2 mL/Kg de peso corporal/24 h) durante 10 días y la administración de FeNTA (15mg Fe^{3+} /Kg peso) sobre: **A** la oxidación de proteínas, **B** la lipoperoxidación y **C** el contenido renal de peróxido de hidrógeno renal. Cada barra representa la media \pm ES. Las columnas con letras diferentes presentan diferencias significativas. El número de datos analizados (n) está en la base de cada columna.

Protocolo 2. Efecto del aumento de la dosis y tiempo de administración de JCA sobre alteraciones producidas por FeNTA.

Dados los resultados del protocolo anterior, se montó un nuevo experimento con 24 ratas, de las cuales 13 se trataron con JCA y el resto con agua durante 15 días a una dosis de 5 mL/kg de peso corporal/24 h.

En la figura 10 se presenta el peso corporal de los animales durante el estudio. No hubo diferencia significativa entre los pesos de los diferentes grupos. En la determinación del daño oxidativo a las proteínas que se muestra en la figura 11 A, se puede observar que no hubo diferencias en el contenido de grupos carbonilo de los grupos Control y JCA, mientras que aumentó significativamente en los grupos FeNTA y JCA + FeNTA, siendo mayor el aumento en este último. En la figura 11 B se muestra el daño oxidativo a lípidos, en el cual no hubo diferencia entre los grupos Control y JCA, mientras que aumentó el contenido de MDA en el grupo FeNTA y se observó una protección parcial en el grupo pretratado con JCA (JCA + FeNTA). En la determinación de H_2O_2 (figura 11 C) se observó un comportamiento similar a la oxidación de proteínas, es decir no hubo diferencia entre el grupo Control y JCA, y aumentó significativamente en los grupos FeNTA y JCA + FeNTA, siendo mayor el aumento en este último grupo.

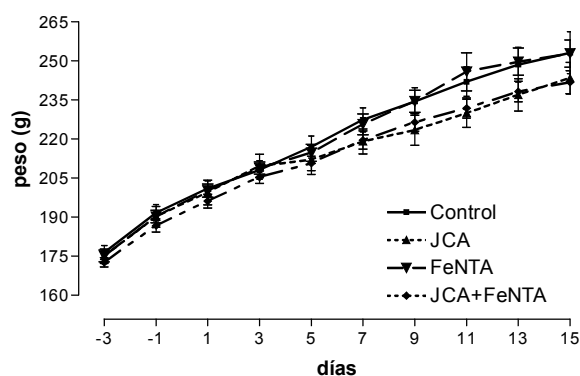


Figura 10.- Peso corporal de las ratas de los grupos estudiados durante 15 días que fue el periodo de administración del antioxidante a una dosis de 5 mL/kg de peso corporal/24 h (grupos JCA y JCA + FeNTA) o agua (grupos Control y FeNTA). Cada punto representa la media \pm ES. Control n=5, JCA n=6, FeNTA n=6, JCA+FeNTA n=7

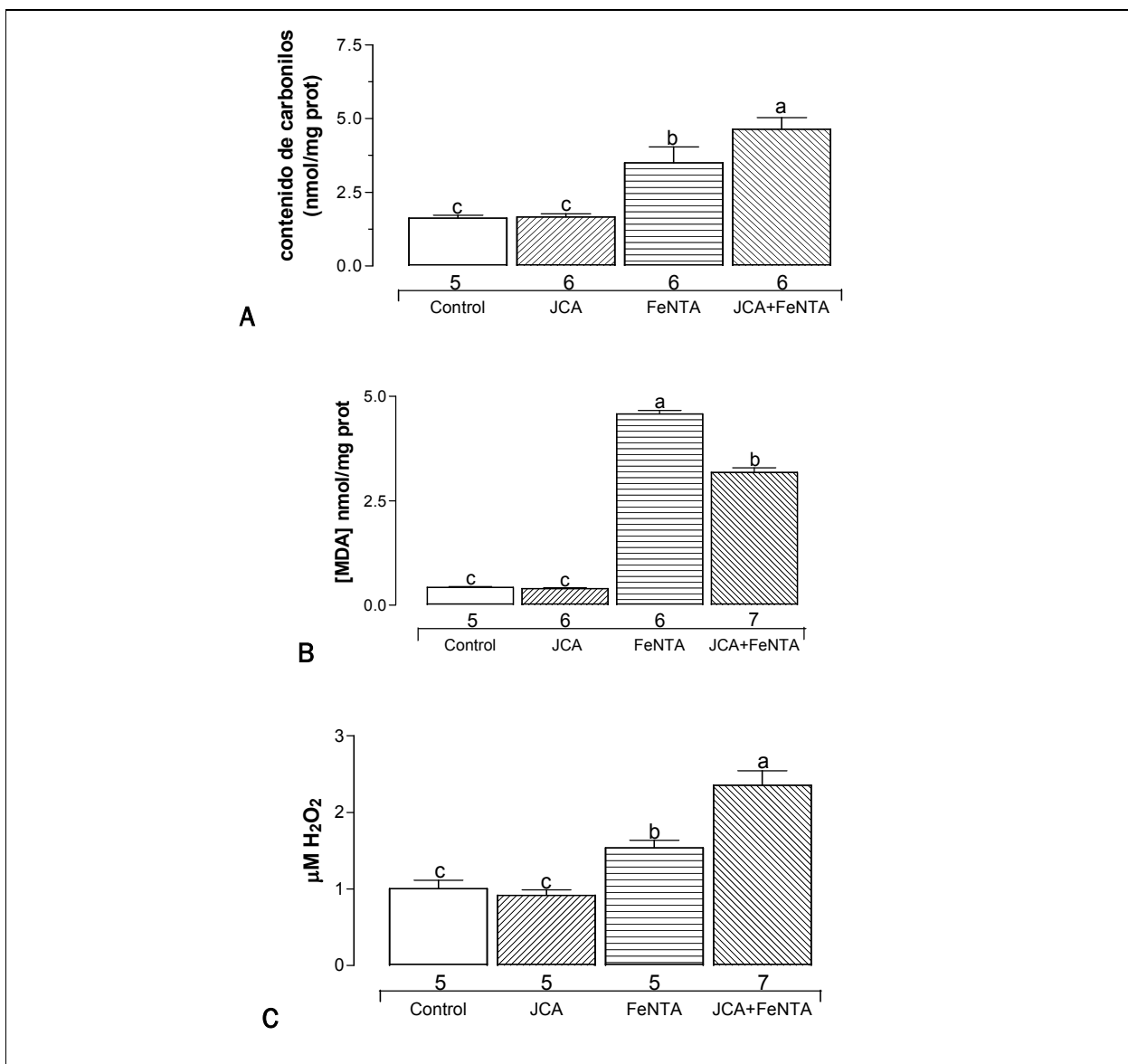


Figura 11.- Efecto del pretratamiento con arándano (5 mL/kg de peso corporal/24 h) durante 15 días y la administración de FeNTA (15 mg Fe^{3+} /kg de peso corporal) sobre: **A** la oxidación de proteínas, **B** la lipoperoxidación y **C** el contenido de peróxido de hidrógeno renal. Cada barra representa la media \pm ES. Las columnas con letras diferentes presentan diferencias significativas. El número de datos analizados (n) está en la base de cada columna.

En resumen, respecto al daño oxidativo a lípidos, únicamente en el protocolo 2 (con dosis y tiempo de tratamiento con JCA mayores) se observó una protección parcial, encontrándose una disminución del daño de un 30.6 %. Esto podría indicar una relación

dosis-respuesta en la protección contra la lipoperoxidación. Sin embargo, el daño oxidativo a proteínas se exacerbó de manera similar en el grupo JCA + FeNTA en ambos protocolos. La producción de H_2O_2 solo se exacerbó en el protocolo 2. En ningún caso, el arándano *per se* (grupo JCA) alteró los valores de los parámetros estudiados, lo cual sugiere que bajo las condiciones estudiadas los componentes del arándano pueden ejercer cierto papel pro-oxidante cuando están en contacto en el FeNTA.

TRATAMIENTOS CON ARÁNDANO Y FeNTA *IN VITRO*

Estos protocolos se realizaron con la concentración sub tóxica de JCA (dilución 1:180) y la concentración efectiva (500 μ M) y tiempo óptimo (48 h) de exposición a FeNTA determinados en las curvas dosis y tiempo-respuesta realizadas previamente en el laboratorio en micro placas de titulación (datos no mostrados).

- *Daño oxidativo a proteínas*

Para poder evaluar el daño oxidativo a proteínas *in vitro* fue necesario ajustar el número de células requerido para ser detectado por la técnica a seguir. Se utilizaron diferentes cantidades de células sin tratamiento y se encontró que con $4 \cdot 10^3$ células/ μ L se obtuvo una cantidad de proteína insuficiente para la detección de carbonilos y que con $1.6 \cdot 10^4$ células/ μ L se obtuvo la cantidad de proteína total mínima requerida para la detección de residuos carbonilados (figura 12).

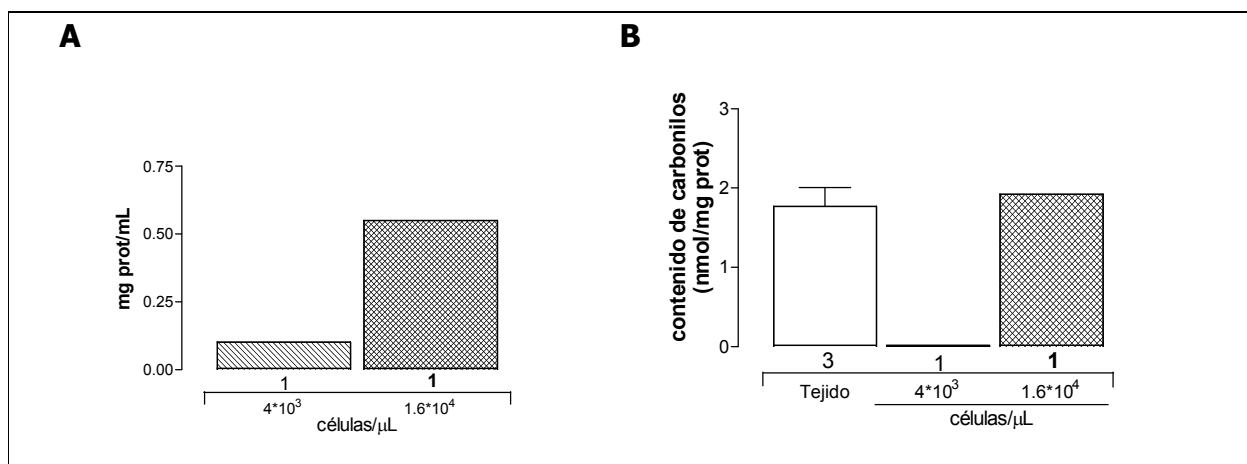


Figura 12.- Estandarización de la técnica para determinar el contenido de carbonilos *in vitro*. **A** determinación de proteína total en diferentes cantidades de células. **B** determinación del contenido de carbonilos en homogenado de tejido renal de ratas control (La barra representa la media \pm ES) y de 4×10^3 y 1.6×10^4 células/μL LLC-PK1. El número de muestras (n) está en la base de cada columna.

Se probaron la concentración y el tiempo determinados previamente para analizar el comportamiento del estrés oxidativo en el nuevo sistema con cajas de Petri de 100 mm. Se realizó un curso temporal durante 0, 12, 24, 48 y 72 h con 5×10^6 células tratadas con FeNTA 500 μM en 16 mL de medio D-MEM suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB). Los resultados se muestran en la figura 13, donde se ve que el contenido de grupos carbonilo aumentó desde las 48 h y fue más alto a las 72 horas, aunque a este último tiempo más del 90 % de las células estaban muertas o muy deterioradas y no sabemos exactamente si el aumento es resultado del tratamiento o de un estrés adicional generado por el proceso de la muerte celular. Por lo tanto, se estableció 48 h como tiempo de tratamiento en el que se genera estrés oxidativo.

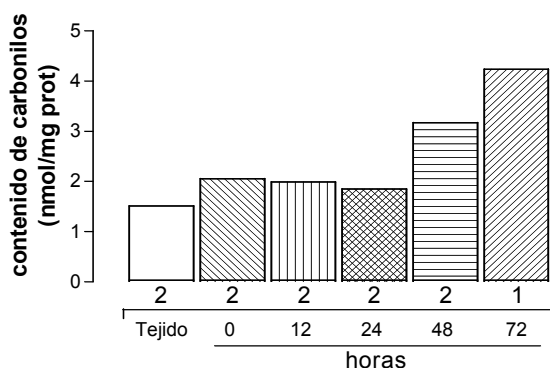


Figura 13.- Efecto del tratamiento con FeNTA 500 μ M sobre el contenido de grupos carbonilo en $5 \cdot 10^6$ células LLC-PK1 a diferentes tiempos. Cada barra representa la media \pm ES. El número de muestras (n) está en la base de cada columna.

Las condiciones en que se realizaron los siguientes protocolos entonces fueron: JCA a una dilución final 1:180 y FeNTA a una concentración final de 500 μ M en 8 mL de medio D-MEM suplementado con 10 % de SFB. En la figura 14 está representado el promedio del contenido de grupos carbonilo obtenido de 8 experimentos independientes; aquí se observa que los valores de los grupos Control y JCA fueron similares, que hubo un aumento significativo en el grupo tratado con FeNTA y que hubo una disminución a valores similares a los del grupo Control en las células que se trataron simultáneamente con antioxidante y carcinógeno (JCA + FeNTA), es decir, se observó una protección total contra el daño oxidativo a proteínas.

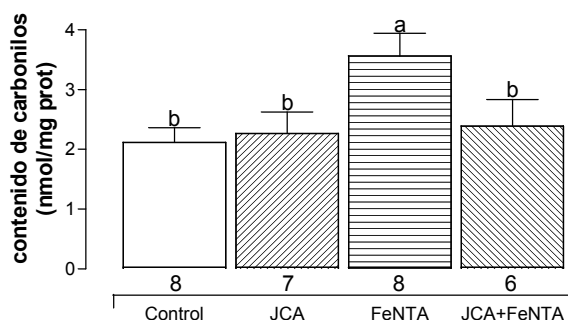


Figura 14.- Efecto del tratamiento con arándano (dilución final 1:180) y la administración simultánea de FeNTA (500 μ M) sobre la oxidación de proteínas en $5 \cdot 10^6$ células LLC-PK1. Volumen de medio 8 mL. Cada barra representa la media \pm ES. Las columnas con letras diferentes presentan diferencias significativas. El número de muestras (n) está en la base de cada columna.

- *Daño oxidativo a lípidos*

Para realizar la cuantificación de lipoperoxidación primero se determinó la cantidad necesaria de células sin tratamiento para detectar la concentración basal de MDA, siendo $1 \cdot 10^7$ células suficientes para la técnica utilizada. Estos resultados se muestran en la figura 15. Establecido esto se realizaron los protocolos y el contenido de MDA en las células de cada grupo experimental se muestra en la figura 16, donde se ve claramente que el tratamiento con FeNTA incrementó la lipoperoxidación significativamente y que el JCA fue capaz de prevenir completamente este daño, mientras que no se ve diferencia entre los grupos Control y JCA.

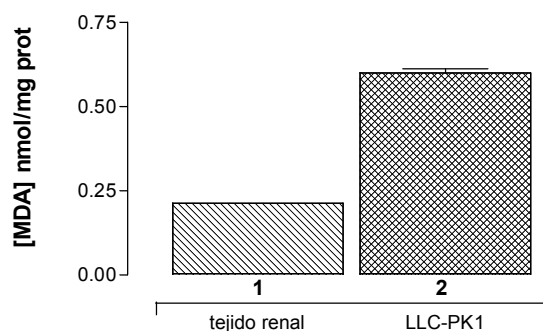


Figura 15.- Estandarización del número de células necesario para determinar la concentración de MDA en homogenado de corteza renal de ratas control y en $1 \cdot 10^7$ células sin tratamiento. Volumen de medio 8 mL. La barra representa la media \pm ES. El número de muestras (n) está en la base de cada columna.

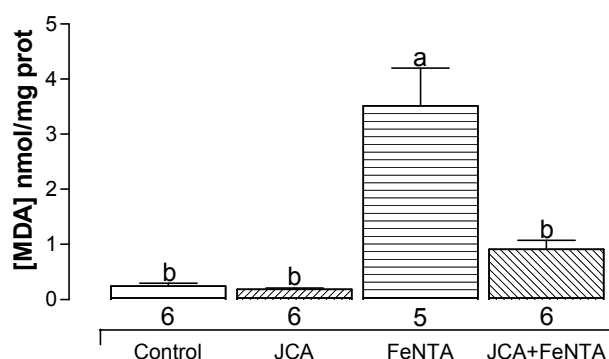


Figura 16.- Efecto del tratamiento con arándano (dilución final 1:180) y la administración simultánea de FeNTA (500 μ M) sobre la lipoperoxidación en $1 \cdot 10^7$ células LLC-PK1. Cada barra representa la media \pm ES. Las columnas con letras diferentes presentan diferencias significativas. El número de muestras (n) está en la base de cada columna.

Entonces, se ha demostrado que el tratamiento de células LLC-PK1 con el carcinógeno renal FeNTA genera estrés oxidativo que daña proteínas y lípidos, y que el tratamiento simultáneo de estas células renales con JCA en una dilución 1:180 previene este daño.

Determinación de la activación de factores de transcripción.

- Separación de fracción nuclear y citoplásmica.

Lo primero para realizar los ensayos de EMSA y Western blot, es obtener las proteínas nucleares y citoplásmicas, lo cual en nuestro modelo (células LLC-PK1), después de probar diferentes procedimientos para cosechar las células y diferentes tiempos de congelación para lisarlas, se encontraron las condiciones óptimas (metodología descrita en el anexo 2) en las que se obtienen los núcleos en buenas condiciones y se obtiene por separado la fracción citoplásmica. Aunque, en la mayoría de las preparaciones de la fracción nuclear todavía se ven algunos núcleos atrapados en una malla, que podría ser parte del citoesqueleto o matriz extracelular, son adecuadas para los ensayos de cambio de movilidad electroforética (figura 17).

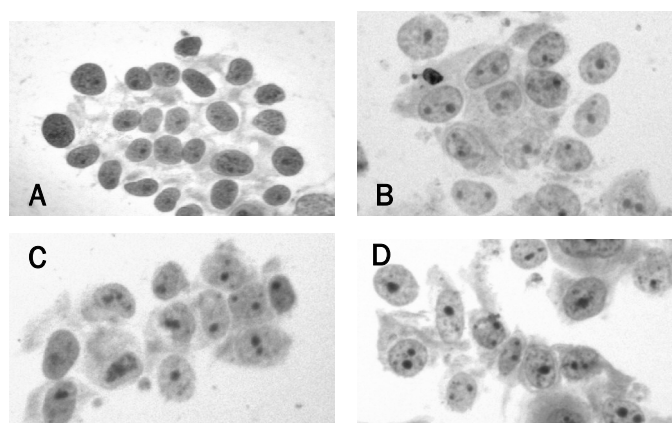


Figura 17.-Fotografías de extractos nucleares de células LLC-PK1. Se observan núcleos de células **A** sin tratamiento, **B** tratadas con JCA, **C** tratadas con FeNTA y **D** tratadas simultáneamente con JCA y FeNTA. Todos los tratamientos se llevaron a cabo durante 48 h en 8 mL de D-MEM suplementado con 10% de SFB. El JCA se utilizó a una dilución final 1:180 y el FeNTA a una concentración final de 500 μ M.

En el EMSA el aumento de la banda significa activación de NF- κ B, en el Western blot del inhibidor de NF- κ B, I κ B α , la disminución de la banda (degradación de I κ B α) es lo que significa activación del factor.

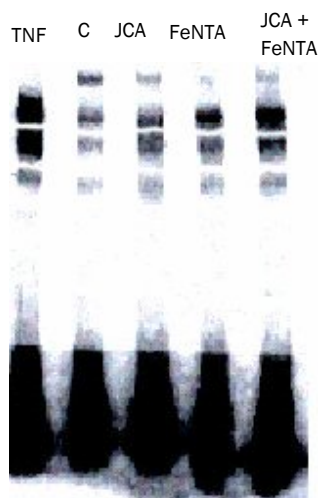
- EMSA de NF- κ B

En este ensayo, las diferencias de activación entre los distintos grupos no fueron significativas. Sin embargo, se observó una tendencia hacia el aumento de la activación del factor NF- κ B en las células del grupo JCA, mayor en el grupo FeNTA y aún mayor en el grupo JCA+FeNTA (figura 18 A y B). En la figura 18 A también se observa un control positivo de activación, una muestra de células tratadas con TNF 10 ng/ μ L.

- Inmunoensayos tipo Western blot para I κ B α

Con el propósito de analizar, de manera indirecta, la activación de NF- κ B, se determinó la cantidad de I κ B α citosólica. Como control positivo de la degradación de I κ B α se trataron células con TNF α y se encontró que la cantidad de I κ B α desaparece por completo en estas células. En el grupo JCA hubo una disminución significativa respecto al grupo Control y disminuyó aún más en los grupos FeNTA y JCA+FeNTA (figura 19). Estos resultados coinciden y confirman las observaciones obtenidas con el EMSA.

A



B

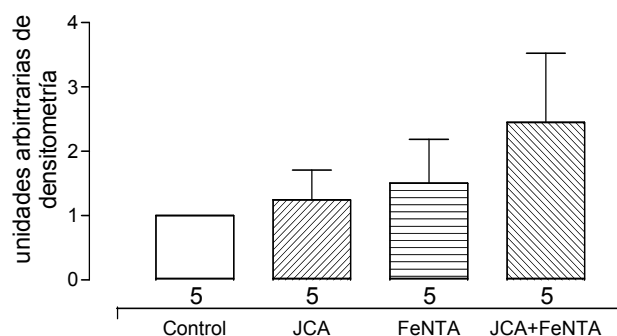


Figura 18.- **A** Imagen representativa del EMSA para NF- κ B. **B** Análisis densitométrico de las imágenes digitalizadas de los ensayos de EMSA. Cada barra representa la media \pm ES. El número de muestras (n) está en la base de cada columna.

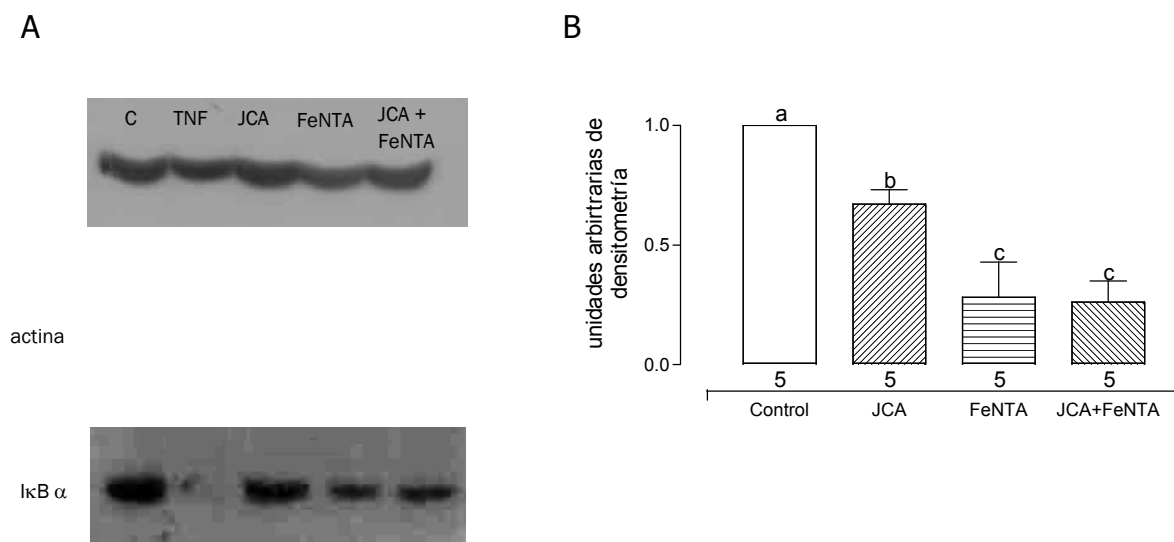


Figura 19.- **A** Autorradiografía representativa del inmunoensayo tipo Western blot para actina (arriba) e I κ B α (abajo). **B** Análisis densitométrico de las imágenes digitalizadas de las autorradiografías. Cada barra representa la media \pm ES. Las columnas con letras diferentes presentan diferencias significativas. El valor de *n* está en la base de cada columna.

Crecimiento independiente de adhesión

La posible transformación celular se evaluó con el ensayo de crecimiento independiente de adhesión, en el cual solo crecen las células malignas o las que adquieren esta capacidad y proliferan sin estar adheridas a un sustrato sólido. A continuación, en la figura 20, se muestran fotografías de células de fibrosarcoma murino (L929) sin ningún tratamiento, embebidas en agar suave al 0.3 % y sembradas en las placas con agar al 0.8 %. En el día de la siembra (día 0) se observa que las células están vivas y la mayoría de ellas están aisladas, después de 19 días, se aprecia claramente un mayor número de células vivas y varias colonias formadas. Estas células se emplearon como control positivo para la formación de colonias.

Células L929

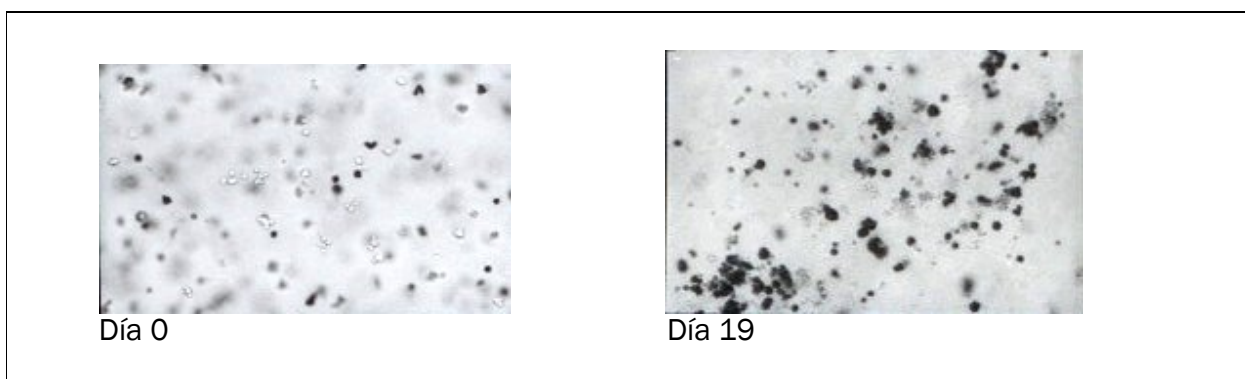


Figura 20. Células de fibrosarcoma murino (L929) embebidas en agar al 0.3 % y depositadas en placas cubiertas con agar al 0.8 %. Las imágenes corresponden a los días 0 (izquierda) y 19 (derecha) del experimento.

En la figura 21 se muestran fotografías de los 4 grupos experimentales de células LLC-PK1, al inicio (día 0) y final de este estudio (día 19). En el día 0 las células están vivas y la mayoría de ellas están aisladas, en el día 19 se observan todos los cultivos sin cambio en el número de células aisladas y no se aprecia ninguna colonia formada, lo que sugiere que las células no están vivas. Entonces, se puede decir que el tratamiento de las células LLC-PK1 con FeNTA y/o con JCA durante 48 h no las transforma de tal manera que puedan crecer libres o independientes de adhesión.

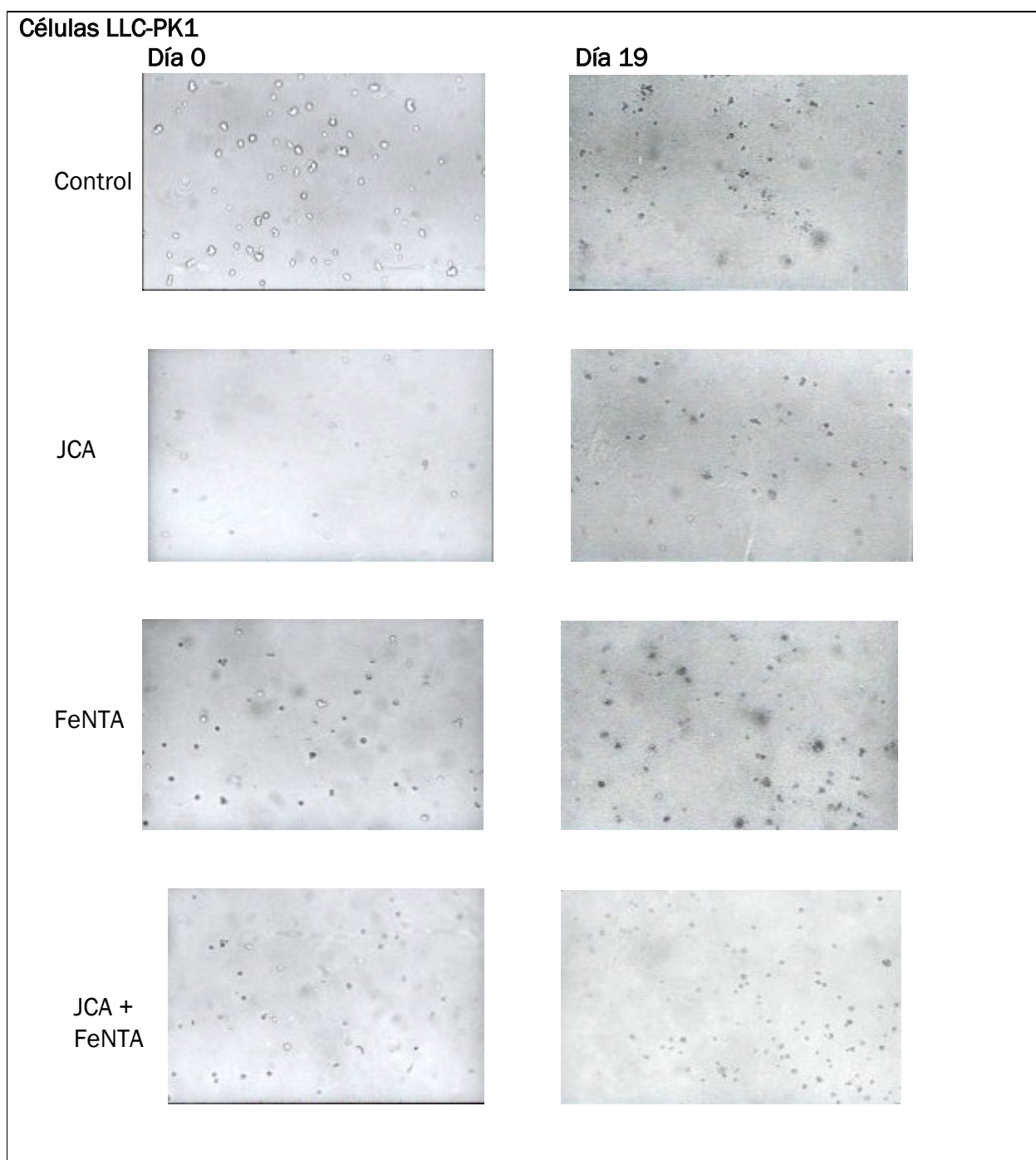


Figura 21. Prueba de crecimiento independiente de adhesión. Células (LLC-PK1) de epitelio tubular proximal normal de cerdo embebidas en agar suave al 0.3 % y depositadas en placas cubiertas con agar al 0.8 %, después de los tratamientos correspondientes de cada grupo experimental. Las imágenes corresponden a los días 0 (columna izquierda) y 19 (columna derecha) después de la siembra.

DISCUSIÓN

El consumo de una gran variedad de frutas y vegetales y una dieta balanceada contribuyen en gran medida a mantener una buena salud e incluso, en muchos casos, a restablecerla. Esto constituyó el punto de partida para decidir trabajar con el arándano en el presente estudio. Esta baya contiene importantes cantidades de antioxidantes [Foo y cols 2000; Seeram y cols, 2004; Vinson y cols, 2001], y se ha utilizado históricamente para aliviar malestares estomacales, alteraciones del hígado y, particularmente problemas del tracto urinario entre otros problemas de salud [Lynch, 2004]. Entonces, se buscó una presentación del fruto que fuera accesible en nuestro país y que pudiera ser consumida por el público en general, como lo es el jugo. No se eligió estudiar los efectos de un compuesto aislado y puro, precisamente para investigar el efecto de alimentos que forman parte de la dieta humana común y así tener evidencias científicas y concretas para promover el consumo de éstos con fines preventivos.

El primer paso para realizar la investigación *in vivo* fue montar el esquema agudo de tratamiento con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). Se encontró que una sola administración a una dosis de 15 mg Fe³⁺/kg de peso, genera el mayor estrés oxidativo 1 hora después de la inyección. En estas condiciones se causó el daño a proteínas y lípidos y los resultados concuerdan con lo reportado en la literatura [Bahnmann y cols, 1998; Oberley, 2002; Rahman y cols, 2003; Singh y cols, 2003; Toyokuni, 1996; Toyokuni y cols, 1990; 1995; Uchida y cols, 1995; Umemura y cols, 1990]. En el presente trabajo se cuantificó, además, la cantidad de peróxido de hidrógeno, una ERO que se ha relacionado íntimamente con la carcinogénesis [Loo, 2003], la cual se incrementó en el riñón de las ratas tratadas, coincidiendo con los otros dos marcadores de daño oxidativo y con un reporte en la literatura [Khan y Sultana, 2005b].

En el primer protocolo experimental *in vivo* se probó el JCA a una dosis elegida arbitrariamente, puesto que en la literatura no hay reportes de experimentos donde se emplee el JCA. En este protocolo, el JCA no ejerció ningún efecto antioxidante sobre el

daño a los lípidos ni influyó en la generación de H_2O_2 inducidos por FeNTA. En el caso de las proteínas, el aumento de grupos carbonilo fue mayor en el grupo JCA + FeNTA que en el grupo FeNTA. Dados estos resultados se decidió realizar otro protocolo aumentando la dosis y el tiempo de exposición al antioxidante, con la finalidad de investigar si la oxidación de proteínas observada era dependiente de la dosis y tiempo de tratamiento con el JCA, y si había algún efecto sobre la oxidación de lípidos y la producción de H_2O_2 . En este protocolo, a diferencia del anterior, se observó que el JCA protegió parcialmente contra la oxidación de lípidos. Sin embargo, la oxidación de proteínas y la generación de peróxido se incrementaron cuando se trató con JCA + FeNTA que solo con FeNTA.

Es claro que la combinación JCA + FeNTA, en el caso de proteínas y H_2O_2 , está favoreciendo un comportamiento contrario a lo esperado. De acuerdo con reportes de tratamientos con otros compuestos antioxidantes como melatonina [Karbownik y cols, 2001; Qi y cols, 1999], curcumina (diferuloilmetanol) [Iqbal y cols, 2003; Okazaki y cols, 2005], catequina [Chopra y cols, 2004], ácido nordihidroguairético [Ansar y cols, 1999], extractos de la planta de higo (*Ficus racemosa*) y de lirio blanco (*Nimphaea alba*) [Khan y Sultana, 2005 a,b], lo esperado con el JCA era la prevención de los efectos oxidativos. Está reportado que existen compuestos polifenólicos que bajo ciertas circunstancias pueden ejercer actividades prooxidantes [Galati y O'Brien, 2004]. Dichas circunstancias pueden ser la reacción de los polifenoles y/o sus metabolitos con el FeNTA, o la reacción de los polifenoles con algún otro compuesto presente en el JCA y/o en el organismo en presencia de FeNTA. Estas especulaciones están apoyadas por el hecho de que en el grupo tratado solo con el JCA no se observan efectos adversos; es decir, los valores de la oxidación de lípidos y proteínas y de la generación de H_2O_2 , siempre son iguales a los valores del grupo Control. Una explicación del comportamiento contrastante del JCA en el grupo JCA + FeNTA, es decir, aumento de la oxidación de proteínas y la generación de H_2O_2 , pero prevención de la lipoperoxidación, podría ser que los eventos son independientes. Aunque, la lipoperoxidación disminuye en la fase de propagación, debido a la neutralización de los radicales libres por los polifenoles

[Fine, 2000; Khan y cols, 2004], parte del FeNTA puede seguir estando presente en las células renales y, por lo tanto, ejerciendo sus efectos oxidativos. Es decir, generando H_2O_2 , o induciendo la síntesis de algunas proteínas generadoras de radicales como la xantina oxidasa [Khan y Sultana, 2005 a,b], entre otras alteraciones. Las moléculas de MDA y HNE que se estén generados, no obstante la disminución de la lipoperoxidación, están en la posibilidad de ejercer sus efectos nocivos para el organismo, entre ellos formar aductos con proteínas [Traverso y cols, 2004]. Así mismo, es probable que algunos polifenoles con propiedades prooxidantes potenciales [Galati y O'Brien, 2004] estén presentes en el JCA y que únicamente en combinación con el FeNTA ejerzan esta actividad. Para comprobar cualquiera de estas posibles explicaciones, será necesario hacer otro tipo de experimentos como un curso temporal para monitorear el comportamiento del recambio proteico, porque como se sabe, las modificaciones oxidativas como los grupos carbonilo no se pueden reparar. Se tienen que degradar estas proteínas modificadas y sintetizar nuevas [Stadtman y Levine, 2000]. También sería útil cuantificar la cantidad de aductos proteicos formados con MDA o HNE ya que éstos además pueden disminuir la síntesis de proteínas [Toyokuni, 1996]; o bien comprobar con algún sistema *in vitro* el carácter prooxidante del JCA cuando se combina con FeNTA midiendo la generación de ERO por métodos bioquímicos o electroquímicos. Otro punto importante a considerar es que en el tejido renal se llevan a cabo importantes funciones metabólicas y de detoxificación y probablemente esto sea un factor adicional que modifique el comportamiento de los polifenoles presentes en el JCA cuando se combinan con el FeNTA y que no ocurra cuando solo se administra JCA. Además, sería necesario investigar qué otros eventos están ocurriendo en este tejido en las ratas del grupo JCA + FeNTA, por ejemplo, si se están dañando las células y de qué manera, si se están necrosando o sufriendo apoptosis, el estado del sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático y si hay alguna otra alteración morfofuncional. Está reportado en la literatura que el tratamiento subagudo con FeNTA (inyecciones diarias durante 14 días) causa necrosis de las células renales [Preece y cols, 1989], activa a la ciclooxigenasa (enzima importante en la hiperplasia tisular) [Rahman y cols, 2003], induce la síntesis y activación de la ornitina descarboxilasa renal y hepática

(enzimas involucradas en la proliferación de tumores) [Rahman y cols, 2003] y la síntesis de la quinona reductasa (enzima importante en la inactivación de ciertos carcinógenos) [Kandil y cols, 2002], además de que se incrementa la incorporación de [³H] timidina al DNA [Rahman y cols, 2003], pero no se conocen aún los efectos sobre la fisiología celular de la combinación JCA + FeNTA en tratamientos agudos como el que se realizó en esta investigación. Bajo las condiciones de los protocolos *in vivo* (tiempos de tratamiento y dosis de JCA empleadas) aún no se puede establecer una relación clara dosis-respuesta, por lo que sería necesario realizar experimentos con otras condiciones, cambiando y combinando tiempos y dosis de tratamiento con JCA, por ejemplo, usando dosis iguales o menores a las del protocolo 1 y tiempos mayores de 15 días.

El primer paso para la investigación *in vitro* fue adecuar el sistema celular con la cantidad de células y volumen de medio de cultivo óptimos para llevar a cabo los tratamientos. Además, se tuvieron que establecer las condiciones específicas para realizar las determinaciones de lipoperoxidación y oxidación de proteínas. En los protocolos experimentales se observó, a diferencia de los estudios *in vivo*, que la oxidación de lípidos y proteínas se redujo significativamente cuando se trató simultáneamente a las células con JCA + FeNTA que cuando se trató únicamente con FeNTA. Estos resultados eran esperados dadas las propiedades antioxidantes, capacidad atrapadora de radicales y ERO como H₂O₂ y singulete de oxígeno (¹O₂), que han sido reportadas del jugo de arándano [Wang y Jiao, 2000] y de sus extractos fenólicos [Murphy y cols, 2003; Seeram y cols, 2004; Sun y cols, 2002; Yan y cols, 2002; Zheng y Wang, 2003]. Un comportamiento particular se observó cuando se investigó la activación del factor de transcripción NF-κB, que se determinó tanto por Western blot del inhibidor de NF-κB, IκBα, donde la disminución de la banda (degradación de IκBα) significa activación de NF-κB, como por EMSA donde el aumento de la banda es lo que significa activación del factor. En el grupo de células tratadas con JCA, la proteína IκBα ya muestra una disminución significativa respecto al control, esta disminución es más pronunciada en FeNTA y aún más en el grupo JCA + FeNTA. Así mismo, en el EMSA, aunque en ningún caso se alcanzó significancia estadística, se observó un aumento

progresivo de la activación de NF- κ B en los grupos JCA, FeNTA y JCA + FeNTA. Entonces, los dos ensayos apuntan hacia el aumento de la actividad del factor NF- κ B.

En este modelo, el resultado esperado en el grupo JCA + FeNTA era la prevención de la activación de NF- κ B, no obstante, lo que llama la atención es la exacerbación de la activación del factor que ocurrió en este grupo. La activación de NF- κ B en el grupo de células tratadas solo con FeNTA concuerda con un reporte donde éste activa a NF- κ B [Chen y cols, 2001] y con otros reportes donde se encontró que el factor se activa por medio de estrés oxidativo [Lee y cols, 2004; Muller y cols, 1997; Storz y cols, 2004; Sheu y cols, 2004; Wang y cols, 2002] y al utilizar diferentes antioxidantes como pirrolidina ditiocarbamato, N-acetilcisteína, resveratrol, vitamina E y algunos polifenoles como el galato de epigallocatequina, se redujo significativamente la activación de NF- κ B [Bharti y Aggarwal, 2002; Kundu y Surh, 2004; Sen y cols, 2006; Surh y cols, 2005].

El otro resultado interesante es la inducción de la activación del factor en el grupo JCA, porque, como se aprecia en los resultados de los marcadores de estrés oxidativo en el presente estudio, el JCA *per se* no genera estrés oxidativo en las células. Esto significa que el JCA está promoviendo la activación de NF- κ B por un mecanismo que, bajo estas circunstancias, aún no conocemos. Los resultados de los grupos JCA y JCA + FeNTA refrendan la idea de que en el jugo hay compuestos que están propiciando la activación de NF- κ B por algún otro mecanismo que no necesariamente es estrés oxidativo y cuando se combinan el jugo y el FeNTA la activación del factor es aún mayor. El mecanismo que se propone es la interacción de los polifenoles presentes en el JCA con alguna proteína de la vía de activación de NF- κ B, de tal manera que cambie la conformación y este cambio promueva que la proteína se active y se propague la activación de las proteínas siguientes en la vía hasta la liberación de NF- κ B de su inhibidor, es decir, hasta su activación. Esta idea está apoyada con evidencia en la literatura que sugiere que los efectos celulares de los flavonoides están mediados por su interacción con proteínas que son parte de cascadas de señalización [Williams y cols, 2004].

El objetivo del ensayo de crecimiento independiente de adhesión (CIA), fue investigar si las células LLC-PK1 se transformaban por el tratamiento con FeNTA durante 48 h. Se eligió este tiempo igual que en los otros estudios porque en esas condiciones ya se observan cambios en los parámetros evaluados. En los organismos los procesos de transformación celular llevan mucho tiempo, porque por un lado es necesario que ocurran muchos cambios genéticos y fisiológicos específicos así como adaptaciones necesarias para que las células sean capaces de vivir con las nuevas condiciones [Bergers y cols, 1999; Foulds, 1954; Hanahan y Weimberg, 2000; Kinzler y Vogelstein, 1996; Nowell, 1976; Renan, 1993] y por otro lado, la exposición a las agentes tóxicos generalmente no es continua. Entonces, este ensayo se realizó pensando que las células en cultivo estarían en un estado de estrés constante en el grupo tratado con FeNTA, y por lo tanto, con una alta probabilidad de sufrir el suficiente daño al DNA capaz de favorecer su transformación. En los resultados se muestra claramente que las células no adquirieron la capacidad de crecer independientes de adhesión. Por lo tanto, podemos decir que el tratamiento celular no fue suficiente para transformar a las células y probablemente si se cambia el esquema del tratamiento, por ejemplo, si se les trata con pulsos con FeNTA y periodos cortos de recuperación se podría saber en qué tiempo las células adquieren la capacidad de crecer libres de adhesión.

Se estudiaron dos modelos, *in vivo* e *in vitro*, con la finalidad de evaluar bajo diferentes condiciones los efectos del tratamiento con jugo concentrado de arándano sobre el daño inducido por FeNTA procurando así tener un panorama más amplio. En ambos sistemas se analizaron la oxidación de proteínas y de lípidos e *in vivo* se determinó la generación de H₂O₂ porque, como está documentado, estas alteraciones pueden estar relacionadas con la carcinogenicidad del FeNTA, pero no se sabía el papel del JCA en estos modelos experimentales. En los estudios *in vivo* los dos compuestos están sujetos a las condiciones fisiológicas de todo un organismo, a los procesos de biotransformación que en éste se lleven acabo tales como la absorción, metabolismo, distribución y excreción, por lo tanto el efecto en el sitio blanco dependerá de su biodisponibilidad. Es una manera de saber cuales son las consecuencias de cuando un compuesto exógeno actúe

en el órgano de estudio después del tratamiento de dicho compuesto por el organismo. La información que se puede generar con los estudios *in vitro* es el efecto directo de los compuestos (FeNTA y JCA) tal cual, es decir, sin ninguna biotransformación previa al llegar a su sitio blanco (las células renales). Específicamente en este estudio *in vitro* se probó que el jugo concentrado de arándano, a partir del cual se preparan los jugos comerciales tiene propiedades antioxidantes, lo cual no se había demostrado antes. En suma, resulta muy útil realizar estudios *in vitro* e *in vivo*, ya que se puede obtener información diferente de cada uno. *In vitro*, se comprobó que el JCA tiene propiedades antioxidantes y se demostró que tiene un efecto protector contra el daño oxidativo causado por FeNTA. En cambio, los resultados de los estudios *in vivo* muestran efectos prooxidativos del JCA en combinación con FeNTA. Si únicamente se consideran los estudios *in vitro*, el papel del JCA es benéfico. En contraste, si solo se consideran los estudios *in vivo*, el JCA resulta ser en algunos casos dañino. Por lo tanto, si en algún momento se quisiera proponer al JCA, como tratamiento para algunos padecimientos humanos será necesario realizar más estudios.

CONCLUSIONES

1. Se establecieron dos modelos de estrés oxidativo inducido por FeNTA, uno *in vivo* y otro *in vitro*.
2. En los dos modelos, el antioxidante JCA generó distintas respuestas, en algunos casos opuestas:
 - a. El JCA redujo la lipoperoxidación parcialmente *in vivo* y la evitó *in vitro*.
 - b. El JCA exacerbó la oxidación de proteínas *in vivo* y la impidió *in vitro*.
 - c. *In vivo*, el JCA exacerbó la generación de H₂O₂. La concentración de H₂O₂ no se determinó *in vitro* porque no se encontró una metodología adecuada.
3. Se encontró *in vitro*, con la técnica de Western blot, que el FeNTA induce la activación del factor de transcripción NF- κ B, sugiriendo que esta puede ser una de las causas de su carcinogenicidad. Así mismo, la activación del factor incrementó en presencia del JCA en los grupos JCA y JCA+FeNTA.
4. El esquema de tratamiento con FeNTA empleado en las células LLC-PK1 fue capaz de generar estrés oxidativo, pero no de inducir las características de células cancerosas, por lo cual no fue posible evaluar los efectos del JCA en este proceso.

ANEXO 1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE FeNTA Y ARÁNDANO

Preparación de la solución de FeNTA para estudios in vivo.

La sal disódica del ácido nitrilotriacético (NTA) y el nitrato de hierro ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) se disolvieron por separado en una solución de bicarbonato de sodio 0.12 M. La solución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ se mezcló en una proporción 1:2 con la solución de NTA, de tal manera que la relación molar del hierro con el NTA es de 1:4. El pH se ajustó a 7.4 con bicarbonato de sodio en polvo [Bahnmann y cols, 1998; Oberley, 2002; Rahman y cols, 2003; Singh y cols, 2003; Toyokuni, 1996; Toyokuni y cols, 1997; Uchida y cols, 1995; Umemura y cols, 1990].

Preparación del JCA para los estudios in vivo.

En la literatura científica existe poca información respecto al consumo humano de arándano, y menos aún en modelos experimentales, por lo que la determinación de la dosis administrada se decidió arbitrariamente. Las dosis elegidas para los protocolos experimentales 1 y 2 fueron 2 y 5 mL/kg de peso/24 h, respectivamente, de tal manera que el volumen administrado fuera adecuado para la rata. El JCA concentrado se diluyó 1:1 con una solución de azúcar comercial al 60 % y se administró a la rata el doble de volumen correspondiente para conservar la dosis deseada. Se decidió hacer esto porque el JCA es muy ácido y los animales lo rechazaban y con esta solución dulce mejoró su aceptación. Está reportado en la literatura, según el American Institute of Nutrition, que esta cantidad de azúcar no influye en el metabolismo normal de los animales [Ryu y Cha, 2003].

Preparación de FeNTA para los estudios in vitro

Se preparó una solución concentrada de FeNTA (26.67 mM) en amortiguador de fosfatos y solución salina (PBS) con una relación molar $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$:NTA 1:4. Se filtró con una membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.22 μm . A partir de este concentrado se preparó una solución de FeNTA 5 mM en medio de Dulbecco modificado por Eagle (D-MEM) con 10 % de suero fetal de bovino (SFB) y se adicionó en proporción 1:10 a los cultivos de tal manera que la concentración final fuera 500 μM en un volumen total de 8 mL.

Preparación de JCA para los estudios in vitro

El jugo concentrado (6.6 veces) de arándano (JCA), se filtró con una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0.22 μm , se diluyó 1:30 con D-MEM suplementado con 10 % de SFB y se adicionó a los cultivos de tal manera que su dilución final fuera 1:180 en un volumen total de 8 mL para cada caja de 100 mm de diámetro.

ANEXO 2 METODOLOGÍA DETALLADA

1. *Cuantificación del contenido de grupos carbonilo en proteínas* [Levine y cols, 1990; Reznick y Packer, 1994; Stadman, 1992].

- Procedimiento:

- Homogenizar 100 mg de corteza renal en 900 μL o 5×10^6 células en 300 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM con inhibidores de proteasas (leupeptina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aprotinina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y pepstatina 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $\text{pH}=7.4$
- Centrifugar las muestras 20 min a 9000 x g a 4°C en tubos de microcentrífuga.
- Recuperar el sobrenadante, el cual será la muestra.
- Adicionar 200 μL de sulfato de estreptomicina al 10% a 600 μL de muestra e incubar 12 h a 4°C.
- Centrifugar 10 min a 3000 x g a 4°C.
- Por cada muestra se preparan dos tubos:
 - Blanco: 150 μL muestra + 600 μL HCl 2.5 M
 - Problema: 150 μL muestra + 600 μL dinitrofenilhidrazina 10 M
- Agitar en vortex e incubar 1h a temperatura ambiente en oscuridad agitando cada 15 minutos.
- Adicionar 750 μL de ácido tricloroacético al 20%. Agitar en vortex e incubar los tubos a 4°C por 10 min.
- Centrifugar por 10 min a 3200 x g a 4°C.
- Descartar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado con 600 μL de ácido tricloroacético al 10% a temperatura ambiente.
- Centrifugar los tubos 10 min a 4600 x g a 4°C.
- Decantar el sobrenadante.
- Realizar 3 lavados con 600 μL etanol- acetato de etilo (1:1)
- Centrifugar los tubos 15 min a 6000 x g a 4°C.
- Dejar que se evapore el etanol.
- Resuspender el botón en 1mL de guanidina 6 M.
- Preparar una curva utilizando albúmina sérica bovina (ASB) a una concentración de 4 mg/mL disuelta en guanidina 6 M según la siguiente tabla:

	[ASB] _{Final} mg/mL	μL ASB	μL guanidina
B	0	0	1000
1	0.26	65	935
2	0.5	125	875
3	1	250	750
4	2	500	500

- Leer a 280 nm solo los tubos "blanco de las muestras" (tratados con HCl) e interpolar en esta curva. Para determinar el contenido de proteínas totales.
- Luego leer a 370 nm todas las muestras (blanco y problemas).
- En ambos casos calibrar con guanidina 6 M.

- Cálculo del contenido de carbonilos:

$$\left(Abs_{problema} - Abs_{blanco} \right) \left(\frac{45.45}{mg.proteína} \right) = \frac{nmol}{mg.proteína}$$

El factor 45.45 es el inverso del coeficiente de extinción molar de la solución de DNPH empleada en esta técnica.

2. *Cuantificación de la concentración de MDA* [Esterbauer y Cheeseman, 1990; Liu y cols, 1997].

- Procedimiento:

- La muestra es el sobrenadante que resulta de homogenizar 100 mg de corteza renal en 1 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM pH =7.4 y centrifugar 10 min a 1300 x g o bien el homogenizado de 5*10⁶ células en 500 μL del mismo amortiguador.
- Preparar a partir de una solución comercial concentrada una solución de tetrametoxipropano (TMOP) 10 mM en amortiguador de tris-HCl 20 mM pH 7.4
- Preparar una solución de TMPO 20 μM diluyendo 1:500 con agua la solución anterior.
- Preparar una curva estándar con la solución de TMPO 20 μM según la siguiente

tabla:

Tubo	TMPO 20 μ M (μ L)	Agua o buffer (μ L)	Concentración final de TMOP (μ M)
Blanco	0	200	0
(a)	10	190	0.2
(b)	20	180	0.4
1	25	175	0.5
2	50	150	1.00
3	100	100	2.00
4	150	50	3.00
5	200	0	4.00

Nota: añadir puntos (a) y (b) cuando se trabaja con células LLCPK 1.

- Preparar una solución de 1-metil-2-fenilindol 10 mM disuelto en acetonitrilo.
- Añadir un volumen (6 mL) de metanol 100% a tres volúmenes (18 mL) de la solución de 1-metil-2-fenilindol 10 mM (solución A).
- Poner en tubos de ensayo 200 μ L de muestra.
- Añadir a cada tubo (estándares y muestras) 650 μ L de la solución A.
- Agitar suavemente en vortex.
- Adicionar a cada tubo 150 μ L de HCl 37 % (12 N).
- Mezclar bien y tapar los tubos.
- Incubar a 45° C durante 60 min.
- Centrifugar los tubos a 13000 x g por 10 min a temperatura ambiente, para obtener un sobrenadante claro.
- Transferir el sobrenadante a una celda.
- Leer la absorbancia a 586 nm.
- Determinar la concentración de proteína de cada muestra por el método de Lowry (punto 4).

- Blanco de muestra

Se sugiere preparar un blanco por cada muestra para corregir su contribución a la densidad óptica determinada a 586 nm. Este blanco se prepara adicionando 650 μ L

de acetonitrilo/metanol (75/25 %) en lugar de la solución A. La adición del ácido y la incubación de la muestra se llevan a cabo como se describió previamente.

- Cálculos:

Usando los datos obtenidos se calcula la absorbancia neta de las muestras a 586 nm restando el valor obtenido del blanco de muestra y se calcula la concentración del analito en cada muestra de la siguiente manera:

$$[MDA] = \left[\frac{Abs - b}{m} \right] fd$$

donde:

Abs = absorbancia neta de la muestra

b = intercepto de la ecuación de la línea de la curva patrón

m = pendiente de la ecuación de la línea de la curva patrón

fd = factor de dilución = $1000 \div 200 = 5$

3. Determinación de la concentración de H_2O_2 [Jiang y cols, 1992; Long y Halliwell, 2001]

- Procedimiento:

- La muestra es el sobrenadante que se obtiene al homogenizar 100 mg de corteza renal en 0.9 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM pH = 7.4 y centrifugar 20 min a 30000 x g a 4°C.
- Diluir 285 μ L de H_2O_2 30% con H_2O desionizada en un volumen total de 100 mL para obtener una solución 25 μ M.
- Diluir esta solución 1:250 con agua para obtener una solución de H_2O_2 100 μ M, a partir del cual se prepara una curva estándar como sigue:

$[H_2O_2]_{final}$ μ M	μ L de H_2O_2 100 μ M	μ L de H_2O
0	-	1000
2.5	25	975
5.0	50	950
10	100	900
25	250	750
50	500	500
75	750	250

- Mezclar en tubos nuevos de microcentrífuga de 1.5 mL, lo siguiente:

- 0.01 mL de metanol.
- 0.09 mL de cada uno de los estándares de H₂O₂ o de la muestra.
- 0.90 mL de la solución FOX (ver adelante).
- Agitar en vortex 5 seg.
- Incubar 30 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 15000 x g durante 10 min a temperatura ambiente.
- Incubar 30 min a temperatura ambiente.
- Medir la densidad óptica a 560 nm.
- Determinar la concentración de proteína total por el método de Lowry (punto 4).

- Preparación del reactivo de Fox.

Mezclar 9 volúmenes de reactivo 1 con 1 volumen de reactivo 2.

Reactivo 1= Hidroxitolueno butilado 4 mM en metanol.

Pesar 0.015686g y disolver en 18 mL de MeOH.

Reactivo 2= Naranja de xilenol 1 mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56 mM.

Pesar 1.52 mg de naranja de xilenol.

Pesar 2.0 mg de sulfato ferroso amoniacal.

Disolver ambos en 2.0 mL de H₂SO₄ 250 mM

- Cálculos

Calcular concentración de H₂O₂ presente en cada muestra, interpolando en la curva estándar.

Expresar los resultados en $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ de proteína.

4. *Determinación de proteínas totales por el método de Lowry* [Dunn, 1992; Lowry y cols, 1951].

- Procedimiento:

- Preparar una curva estándar con albúmina sérica bovina al 0.05% de la siguiente manera:

	[ASB] _{final}	ASB (μl)	H ₂ O (μl)
B	0	0	200
1	5	10	190
2	10	20	180
3	15	30	170
4	25	50	150
5	35	70	130
6	50	100	100

- Diluir con agua según el tipo de muestra que se trate. La muestra es el sobrenadante que se obtiene después de centrifugar por 20 min a 9000 x g a 4°C el homogeneizado de corteza renal o el homogeneizado de las células LLC-PK1.

Muestra	Homogenizado (p/v)	Dilución necesaria
Tejido	1:10	1:150**
Células	5x10 ⁶ /500 μL	1:150

**10 μL muestra +1490 μL de agua.

- Numerar tubos de vidrio de 12 x 75 mm o de 13 x 100 mm (las determinaciones se hacen por duplicado).
- Colocar en cada tubo 0.2 mL de la muestra diluída.
- A todos los tubos añadir 1 mL de solución C (incluyendo los tubos del blanco y de la curva estándar).
- Agitar y esperar 10 minutos.
- A todos los tubos añadir con agitación simultánea 100 μL de solución D.
- Esperar 30 minutos.
- Medir la densidad óptica a 660 nm.

- Calibrar contra el blanco.

- Solución A.

Pesar 20 g Na_2CO_3 , 4 g NaOH y 0.2 g tartrato de sodio y disolver todos los reactivos en 1000 mL de agua destilada.

*Almacenar a temperatura ambiente.

- Solución B.

Pesar 0.5 g CuSO_4 y disolver en 100 mL de agua destilada.

*Almacenar a temperatura ambiente.

- Solución C. (preparar al momento del ensayo).

Por cada tubo: 1 mL de solución A + 0.02 mL de solución B

- Solución D. (preparar al momento del ensayo).

Reactivo de Folín 1N.

5. Obtención de proteína nuclear y citoplásmica de células LLC-PK1 para los ensayos de EMSA y Western blot, respectivamente.

- Procedimiento:

- Terminado el tratamiento de las células ($2.5-3 \times 10^6$), retirar el medio de cultivo de Dulbecco modificado por Eagle (D-MEM) de las cajas de Petri de 100 mm de diámetro.
- Lavar cada caja con 2-3 mL de amortiguador de fosfatos y solución salina (PBS) frío.
- Despegar las células con 2-3 mL de solución comercial de tripsina-EDTA (0.05 % tripsina, 0.53 mM EDTA(4Na)) fría con golpecitos a la caja durante 5 min.
- Inactivar la solución de tripsina-EDTA con 2-3 mL de D-MEM suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB).
- Transferir la suspensión con las células a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL
- Centrifugar a 300 x g por 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 1 mL de PBS-EDTA frío.
- Centrifugar por 5 minutos a 1200 x g.
- Descartar todo el sobrenadante sin perturbar el botón.
- Congelar con N_2 líquido durante 6 a 8 minutos.

- Adicionar 100 μL de amortiguador hipotónico (Hepes 10 mM pH = 7.9, KCl 10 mM, MgCl_2 1.5 mM y ditioneitol (DTT) 1 mM) resuspender suavemente las células con micropipeta.
- Observar con microscopio de campo claro el estado de los núcleos, mezclando 5 μL de muestra con 5 μL de colorante azul de tripano al 0.4 %
- Colectar los núcleos centrifugando por 10 min a 1500 x g a 4°C.
- El botón contiene los núcleos y el sobrenadante es la fracción citoplásmica que se analiza por Western blot para $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$.
- Separar el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga de 0.5 mL.
- Extraer las proteínas nucleares resuspendiendo el botón en 15-20 μL de amortiguador hipertónico con alta fuerza iónica (Hepes 20 mM pH = 7.9, NaCl 0.4 mM, MgCl_2 1.5 mM, glicerol 25 %, EDTA 0.2 mM, DTT 1 mM y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 0.5 mM), el volumen depende de la cantidad de células y del tamaño del botón obtenido hasta este paso.
- Incubar por 30 min a 4°C con agitación suave en plataforma angular.
- Centrifugar 20 min a 25000 x g a 4°C.
- Recuperar el sobrenadante que contiene las proteínas nucleares. Transferir a otro tubo y mezclar 1:1 con amortiguador hipertónico con glicerol (Hepes 20 mM pH = 7.9, KCl 0.4 mM, glicerol 20 %, EDTA 0.2 mM, DTT 1 mM y PMSF 0.5 mM)
- Tomar 2 μL para determinar proteína por Bradford que se explica el apartado 10.
- Dosificar en tubos con 20 μL de muestra.
- Almacenar a -80°C hasta su uso.

6. Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

- Procedimiento para el ensayo radiactivo (P^{32})

- Del extracto nuclear se utilizaron 10 μg de proteína para el ensayo, en un volumen total de 14 μL
- Preparar un coctel con lo siguiente por cada muestra:

Amortiguador hipertónico con glicerol	2 μ L
Poli (dI-dC)• Poli (dI-dC) 1 μ g/ μ L	1 μ L
ASB 10 mg/mL	1 μ L
DTT 1 M	1 μ L
Volumen total	5 μ L

- Para cada reacción de unión mezclar en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL lo siguiente:

Coctel	5 μ L
H ₂ O + proteína	14 μ L
Oligo ATP γ ³² 0.125 μ Cu/ μ L	1 μ L
Volumen total.	20 μ L

- Incubar 20 min a temperatura ambiente.
- Adicionar 1 μ L de amortiguador de carga.
- Para la electroforesis utilizar una cámara vertical para geles de 18 x 16 cm.
- Preparar un gel de poliacrilamida no desnaturizante como se describe en el apartado 9.
- Llenar la cámara con amortiguador tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM (amortiguador TBE) y precorrer por 1 h aplicando 100 voltios.
- Cargar las muestras en el gel y correr a 100 voltios hasta que el frente del colorante haya migrado hasta dos terceras partes del gel.
- Una vez que el corrimiento se ha terminado, colocar el gel en papel Whatman y secar por dos horas en un sistema para secado de geles modelo 583 acoplado a una bomba de vacío HydroTech de Bio Rad.
- Dejar enfriar el gel 45 minutos para poder sacarlo y evitar que se agriete.
- Exponer toda la noche el gel a un contenedor con una pantalla de almacenamiento de fósforo para detección de radiactividad (marca Amersham número de catálogo 63-0033-58).
- El Revelado se hizo utilizando un sistema explorador modelo Typhoon de Amersham y se analizaron los datos por densitometría con el programa SigmaScan

Pro4 para análisis de imágenes.

- Procedimiento para el ensayo quimioluminiscente

- Se utilizó un estuche comercial "LightShift Chemiluminescent EMSA Kit" de PIRCE.
- Obtener las muestras como ya se explicó en el apartado 5 y prepararlas según las especificaciones del fabricante.
- Para la electroforesis utilizar una cámara vertical Mini Protean 3 de Bio Rad para geles 8 x 7 cm.
- Precorrer el gel de poliacrilamida no desnaturizante (preparado como se describe en el apartado 9) por 30-60 minutos aplicando 100 voltios.
- Cargar las muestras en el gel y aplicar 100 voltios hasta que el frente del colorante haya migrado hasta dos terceras partes del gel.
- Una vez que el corrimiento termine, transferir a una membrana de nylon aplicando 380 mA por 30 min, utilizando un módulo de transferencia Mini Trans-Blot Cell de Bio Rad.
- Fijar las muestras a la membrana con un equipo UV cross linker a 120 mJ/cm² por 45-60 segundos.
- Detectar DNA biotinilado adicionando el sustrato con luminol vol:vol, según las instrucciones del fabricante.
- Revelar utilizando película radiográfica marca Kodak y analizar los datos por densitometría con el programa SigmaScan Pro4 para análisis de imágenes.

7. Inmunoensayo tipo Western blot de la proteína I κ B α en células LLC-PK1

- Procedimiento

- La proteína citoplásmica se obtiene como se explica antes en el apartado 5.
- En tubos de microcentrífuga de 0.5 mL colocar 40 μ g de proteína citoplásmica y 6 μ L del amortiguador de carga 5 veces concentrado (amortiguador tris 60 mM pH = 6.8, dodecil sulfato de sodio 2 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0.01 % y ditiotreitol 100 mM) y ajustar con agua a un volumen de 30 μ L.
- Incubar las muestras en un baño con agua a 100°C durante 5 minutos y luego ponerlas rápidamente en hielo.

- Centrifugar 5 segundos a 4°C a 800 x g.
- Cargar muestras en el gel de poliacrilamida desnaturalizante (la preparación se describe más adelante en el apartado 9).
- Llenar la cámara para electroforesis con el amortiguador de corrida (tris base 0.25 M, glicina 1.9 M y SDS 1%, pH = 8.3)
- Correr a 80 voltios durante 1 hora o hasta que la proteína de interés esté en la mitad del gel.
- Preparar la membrana de PVDF sumergiéndola 30 segundos en metanol, enjuagarla con agua y finalmente con amortiguador de transferencia (tris base 25 mM, glicina 190 mM y metanol 10 %).
- Transferir las proteínas a la membrana armando el sistema de transferencia que consiste en colocar en un caset o contenedor una esponja, un papel filtro, el gel, la membrana, un papel filtro y una esponja.
- Colocar este sistema en un módulo de transferencia Trans-Blot Cell de Bio Rad con amortiguador de tris base 25 mM, glicina 190 mM y metanol 10 % aplicando 80 voltios a 15°C durante toda la noche.
- Enjuagar brevemente la membrana con 10 mL de amortiguador tris base 20 mM y NaCl 150 mM, pH = 7.5 (amortiguador TBS).
- Todos los pasos siguientes son con agitación suave en una plataforma angular.
- Bloquear la membrana con 10 mL de amortiguador TBS pH = 7.5, Tween 0.1% y leche descremada al 5 % durante 1 hora.
- Lavar con 10 mL de amortiguador TBS pH = 7.5 y Tween 0.1% durante 5 minutos.
- Incubar 1 h con anticuerpo primario diluido 1:1000 en 10 mL de amortiguador TBS pH = 7.5, Tween 0.1% y ASB 1 %
- Lavar el exceso de anticuerpo primario con 10 mL de amortiguador TBS pH = 7.5 y Tween 0.1% de la siguiente manera:
 - 2 lavados de 10 minutos.
 - 3 lavados de 5 minutos.
- Incubar durante 1 h con anticuerpo secundario diluido 1:10000 en 10 mL de amortiguador TBS pH = 7.5, Tween 0.1% y leche descremada al 5 %
- Lavar exceso de anticuerpo secundario con 10 mL de amortiguador TBS pH = 7.5

y Tween 0.1% de la siguiente manera:

- 1 lavado 10 minutos.
- 3 lavados 5 minutos.
- Lavar durante 5 con 10 mL de amortiguador TBS pH = 7.5
- Eliminar el amortiguador TBS pH = 7.5
- Adicionar el sustrato con luminol vol:vol (1 mL:1 mL)
- Incubar durante 5 minutos.
- Escurrir la membrana y colocarla en una bolsa transparente para evitar que se humedezca la película radiográfica.
- Revelar utilizando una película radiográfica marca Kodak y analizar los datos por densitometría con el programa SigmaScan Pro4 para análisis de imágenes.

8. *Determinación del crecimiento independiente de adhesión* [Ke y cols, 2004].

- Procedimiento:
- Cubrir con 0.6 mL de agar bacteriológico (bacto agar o agar suave) al 0.8 % disuelto en D-MEM con SFB al 10 % los 24 pozos de 15 mm de diámetro cada uno de las placas para cultivo celular y dejar solidificar.
- Mantener la placa en la incubadora a 37°C hasta que se siembren las células y durante todo el tiempo del experimento.
- Una vez terminado el tratamiento de 48 h, cosechar y contar las células de cada grupo experimental.
- Embeber en bacto agar al 0.3 % disuelto en D-MEM con SFB al 10 %, 4 cantidades diferentes de células por duplicado (3000, 6000, 12000 y 25000).
- Sembrar en las placas previamente tratadas con bacto agar al 0.8 %, células de cada grupo experimental.
- Sembrar en las mismas condiciones que para las LLC-PK1, células de fibrosarcoma murino L929 como control positivo para esta prueba.
- En el día 19 después de la siembra, observar con microscopio de campo claro y fotografiar para documentar los resultados del experimento.

9. *Preparación de los Geles*

- Gel de poliacrilamida 5% no desnaturizante (para EMSA)

- Mezclar los siguientes reactivos en este orden:

<i>EMSA</i>	<i>Radiactivo</i>	<i>Quimioluminiscente</i>
TBE (1X)	34.8 mL	6.525 mL
Agua desionizada	--	6.525 mL
Acrilamida 40%	5 mL	1.884 mL
Persulfato de amonio 10 %	250 μ L	93.86 μ L
TEMED	19 μ L	7.11 μ L
Volumen total	40 mL	15 mL

- Agitar cuidadosamente evitando hacer burbujas de aire.
- Verter la mezcla a los vidrios, cuidando de no introducir burbujas de aire.
- Cuidadosamente, insertar un peine limpio.
- Dejar polimerizar el gel.

- Gel de poliacrilamida desnaturizante (para Western blot)

- Mezclar en este orden los siguientes reactivos:

	Separador (10 %)	Concentrador (4 %)
Acrilamida 30 % : bisacrilamida 0.8 %	5 mL	1.7 mL
Amortiguador Tris 1.5 M pH = 8.8	3.75 mL	--
Amortiguador Tris 0.5 M pH = 6.8	--	2.5 mL
Agua desionizada	6.2 mL	5.7 mL
Volumen total	15 mL	10 mL
SDS 10%	150 μ L	100 μ L
TEMED	10 μ L	10 μ L
Persulfato de amonio 10%	50 μ L	40 μ L

- Agitar cuidadosamente evitando hacer burbujas de aire.
- Verter la mezcla del gel separador a los vidrios, cuidando de no introducir burbujas de aire.
- Dejar polimerizar el gel.
- Verter la mezcla del gel concentrador a los vidrios, cuidando de no introducir

burbujas de aire.

- Cuidadosamente, insertar un peine limpio.
- Dejar polimerizar el gel.

10. Determinación de proteínas totales por el método de Bradford [Kruger, 1994].

- Procedimiento:

- La muestra es el extracto proteico obtenido según la técnica para la que se requiera.
- Preparar en tubos limpios de microcentrífuga de 1.5 mL una curva estándar utilizando ASB 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, de la manera siguiente:

Concentración final de ASB	ASB μL	H ₂ O μL
2 μg	2	798
4 μg	4	796
8 μg	8	792
16 μg	16	784

- En tubos limpios de microcentrífuga de 1.5 mL, colocar:
 - 3 μL de muestra si es proteína nuclear o 5 μL si es proteína citoplásmica.
 - Agua desionizada 797 o 795 μL
- Agitar con vortex.
- Adicionar a todos los tubos (estándares y muestras) 200 μL del reactivo comercial de Bradford.
- Agitar en vortex.
- Medir la densidad óptica a 595 nm.
- Calcular la concentración de proteína interpolando en esta curva los valores de densidad óptica.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002) Molecular Biology of the Cell 4th edition. Garland Science Taylor and Francis Group. 1313-62.
- Ansar S, Iqbal M, Athar M. (1999) Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitrilotriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. *Carcinogenesis* 20: 599-606.
- Bahnemann R, Leibold E, Kittel B, Mellert W, Jackh R. (1998) Different Patterns of Kidney Toxicity after Subacute Administration of Na-Nitrilotriacetic Acid and Fe-Nitrilotriacetic Acid to Wistar Rats. *Toxicol Sci* 46: 166-75.
- Basso D, Panozzo MP, Plebani M, Meggiato T, Zaninotto M, Piccoli A, Fogar P, Ferrara C, Del Favero G, Burlina A. (1994) Lipid peroxidation and renal tubular damage in chronic pancreatic diseases: is there any relationship?. *J Med* 25: 91-104.
- Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D. (1999) Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 284: 808-12.
- Bharti AC, Aggarwal BB. (2002) Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol* 64: 883-8.
- Bishop JM and Weinberg RA. (1996) *Scientific American Molecular Oncology*. New York Scientific Amer Med.
- Blomhoff R. (2005) Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Semin Cancer Biol* 14: 427-32.
- Bomser J, Madhavi DL, Singletary K, Smith MA. (1996) In vitro anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Med* 62: 212-6.
- Bravo L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev* 56: 317-33.
- Brenner BM. (2000) *The kidney*. Saunders Company. 6a ed. USA.
- Brooks JD, Metter EJ, Chan DW, Sokoll LJ, Landis P, Nelson WG, Muller D, Andres R, Carter HB. (2001) Plasma selenium level before diagnosis and the risk of prostate cancer development. *J Urol* 166: 2034-38.
- Brummelkamp TR, Nijman SMB, Dirac AMG, Bernards R. (2003). Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF- κ B. *Nature* 424: 797-801.
- Burger O, Ofek I, Tabak M, Weiss EI, Sharon N, Neeman I. (2000) A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29: 295-301.
- Cadenas S, Barja G. (1999) Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO_3 . *Free Radic Biol Med* 26: 1531-7.
- Chan EL, Murphy JT. (2003) Reactive oxygen species mediate endotoxin-induced human dermal endothelial NF-kappaB activation. *J Surg Res* 111: 120-6.
- Chen L, Wang Y, Kairaitis LK, Wang Y, Zhang BH, Harris DC. (2001) Molecular mechanisms by which iron induces nitric oxide synthesis in cultured proximal tubule cells. *Exp Nephrol* 9: 198-204.

- Chopra K, Singh D, Chander V. (2004) Nephrotoxicity and its prevention by catechin in ferric nitrilotriacetate promoted oxidative stress in rats. *Hum Exp Toxicol* 23: 137-43.
- Criqui MH, Bangdiwala S, Goodman DS, Blaner WS, Morris JS, Kritchevsky S, Lippel K, Mebane I, Tyroler HA. (1991) Selenium, retinol, retinol-binding protein, and uric acid. Associations with cancer mortality in a population-based prospective case-control study. *Ann Epidemiol* 1: 385-93.
- Deguchi J, Miyamoto M, Okada S. (1995) Sex hormone-dependent renal cell carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in Wistar rats. *Jpn J Cancer Res* 86: 1068-71.
- Dunn MJ. (1992) Protein determination of total protein concentration. Harris ELV and Angal S Eds. *Protein Purification Methods*, Oxford: IRL Press.
- Ebina Y, Okada S, Hamazaki S, Midorikawa O. (1984) Liver, kidney, and central nervous system toxicity of aluminum given intraperitoneally to rats: a multiple-dose subchronic study using aluminum nitrilotriacetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 75: 211-8.
- Ebina Y, Okada S, Hamazaki S, Ogino F, Li JL, Midorikawa O. (1986) Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of iron- and aluminum-nitrilotriacetate complexes in rats. *J Natl Cancer Inst* 76: 107-13.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186: 407-21.
- Fan C, Li Q, Ross D, Engelhardt JF. (2003) Tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha activates NF kappa B through a redox-regulated and c-Src-dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation. *J Biol Chem* 278: 2072-80.
- Feinberg AP. (2004) The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* 14: 427-32.
- Fine AM. (2000) Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications. *Altern Med Rev* 5: 144-51.
- Foo LY, Howell AB, Vorsa N. (2000) The structure of cranberry proanthocyanidins, which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry* 54: 173-81.
- Foulds L. (1954) The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 14: 327-39.
- Gago-Dominguez M, Castelao JE, Yuan JM, Ross RK, Yu MC. (2002) Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States). *Cancer Causes Control* 13: 287-93.
- Galati G, O'Brien PJ. (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 37: 287-303.
- Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, Xu L, Winkler F, Brown E, Barnett GH, Jain RK. (2004). The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature* 428: 328-32
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Fuchs C, Rosner BA, Speizer FE, Willett WC. (1998) Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann Intern Med* 129: 517-24.

- Glynn SA, Albanes D, Pietinen P, Brown CC, Rautalahti M, Tangrea JA, Gunter EW, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR. (1996) Colorectal cancer and folate status: a nested case-control study among male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 487-94.
- Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. (2004) IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118: 285–96.
- Ha H, Lee HB. (2000) Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int Suppl* 77: S19-25.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hayden MS, Ghosh S. (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18: 2195-224.
- Helzlsouer KJ, Huang HY, Alberg AJ, Hoffman S, Burke A, Norkus EP, Morris JS, Comstock GW. (2000) Association between alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, selenium, and subsequent prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 92: 2018-23.
- Iqbal M, Giri U, Athar M. (1995) Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) is a potent hepatic tumor promoter and acts through the generation of oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 557-63.
- Iqbal M, Okazaki Y, Okada S. (2003) In vitro curcumin modulates ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) and hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced peroxidation of microsomal membrane lipids and DNA damage. *Teratog Carcinog Mutagen Suppl* 1: 151-60.
- Je JH, Lee JY, Jung KJ, Sung B, Go EK, Yu BP, Chung HY. (2004) NF-kappa B activation mechanism of 4-hydroxyhexenal via NIK/IKK and p38 MAPK pathway. *FEBS Lett* 566: 183-9.
- Kandil FE, Smith MA, Rogers RB, Pepin MF, Song LL, Pezzuto JM, Seigler DS. (2002) Composition of a chemopreventive proanthocyanidin-rich fraction from cranberry fruits responsible for the inhibition of 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA)-induced ornithine decarboxylase (ODC) activity. *J Agric Food Chem* 50: 1063-9.
- Karbownik M, Lewinski A, Reiter RJ. (2001) Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 735-53.
- Kato I, Dnistrian AM, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore RE, Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jacquotte A, Riboli E. (1999) Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women: a nested case-control study. *Br J Cancer* 79: 1917-22.
- Ke N, Albers A, Claassen G, Yu DH, Chatterton JE, Hu X, Meyhack B, Wong-Staal F, Li QX. (2004) One-week 96-well soft agar growth assay for cancer target validation. *Biotechniques*. 36: 826-8, 830, 832-3.
- Khan N and Sultana S. (2005 a) Anticarcinogenic effect of *Nymphaea alba* against oxidative damage, hyperproliferative response and renal carcinogenesis in Wistar rats. *Mol Cell Biochem* 271: 1–11.
- Khan N, Sultana S. (2005 b) Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sci* 77: 1194-210.

- Khan N, Sharma S, Sultana S. (2004) Attenuation of potassium bromate-induced nephrotoxicity by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats: chemoprevention against free radical-mediated renal oxidative stress and tumor promotion response. *Redox Rep* 9: 19-28.
- Kinzler KW, Vogelstein B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-70.
- Kundu JK, Surh YJ. (2004) Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kappaB and AP-1 as potential targets. *Mutat Res* 555: 65-80.
- Kruger NJ. (1994) The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 32: 9-15.
- Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, Park JS, Cho HJ. (2004) Spinal NF-kB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur J Neurosci* 19: 3375-81.
- Leibold E, Deckardt K, Mellert W, Potthoff-Karl B, Grundler O, Jackh R. (2002) NTA and Fe(III)NTA: differential patterns of renal toxicity in subchronic studies. *Hum Exp Toxicol* 21: 445-52.
- Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. (2000) Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol* 99: 15-24.
- Li H, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Morris JS, Willett WC, Gaziano JM, Ma J. (2004) A prospective study of plasma selenium levels and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 96: 696-703.
- Li JL, Okada S, Hamazaki S, Ebina Y, Midorikawa O. (1987) Subacute nephrotoxicity and induction of renal cell carcinoma in mice treated with ferric nitrilotriacetate. *Cancer Res* 47: 1867-9.
- Li N, Karin M. (1999) Is NF-kappa B the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 13: 1137-43.
- Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M. (1999) The IKK beta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* 189: 1839-45.
- Lindblad P, Chow WH, Chan J, Bergstrom A, Wolk A, Gridley G, McLaughlin JK, Nyren O, Adami HO. (1999) The role of diabetes mellitus in the etiology of renal cell cancer. *Diabetologia* 42: 107-12.
- Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN. (1997) Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. *Anal Biochem* 245: 161-6.
- Long LH, Halliwell B. (2001) Antioxidant and prooxidant abilities of foods and beverages. *Methods Enzymol* 335: 181-90.
- Loo G. (2003) Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *J Nutr Biochem* 14: 64-73.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.
- Lynch DM. (2004) Cranberry for prevention of urinary tract infections. *Am Fam Physician* 70: 2175-7.

- Magnani M, Crinelli R, Bianchi M, Antonelli A. (2000) The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor- κ B (NF- κ B). *Curr Drug Targets* 1: 387-99.
- Matos H, Di Mascio P, Medeiros MH. (2000) Protective effect of lycopene on lipid peroxydation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch Biochem Biophys* 383: 56-9.
- Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad MC, Blomhoff R. (2005) Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* 81: 277S-83S.
- Muller JM, Rupec RA, Baeuerle PA. (1997) Study of gene regulation by NF-kappa B and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates. *Methods* 11: 301-12.
- Murphy BT, MacKinnon SL, Yan X, Hammond GB, Vaisberg AJ, Neto CC. (2003) Identification of triterpene hydroxycinnamates with in vitro antitumor activity from whole cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *J Agric Food Chem* 51: 3541-5.
- Murray M, Pizzorno J. (1999) Procyanidolic oligomers. In: *The Textbook of Natural Medicine*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone. pp 899-902.
- Nakanishi C, Toi M. (2005) Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 5: 297-309.
- Nowell PC. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-8.
- Oberley T. (2002) Oxidative Damage and Cancer. *Am J Pathol* 160: 403-8.
- Okada S, Hamazaki S, Ebina Y, Li JL, Midorikawa O. (1987) Nephrotoxicity and its prevention by vitamin E in ferric nitrilotriacetate-promoted lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 922: 28-33.
- Okada S. (2003) Prevention of free-radical mediated tissue damage and carcinogenesis induced by low-molecular-weight iron. *Biometals* 16: 99-101.
- Okamoto K, Toyokuni S, Uchida K, Ogawa O, Takenawa J, Kakehi Y, Kinoshita H, Hattori-Nakakuki Y, Hiai H, Yoshida O. (1994) Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 58: 825-9.
- Okazaki Y, Iqbal M, Okada S. (2005) Suppressive effects of dietary curcumin on the increased activity of renal ornithine decarboxylase in mice treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Biochim Biophys Acta* 1740: 357-66.
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. (2004) NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431: 461-6.
- Pocock J, Gomez-Guerrero C, Harendza S, Ayoub M, Hernandez-Vargas P, Zahner G, Stahl RA, Thaiss F. (2003) Differential activation of NF-kappa B, AP-1, and C/EBP in endotoxin-tolerant rats: mechanisms for in vivo regulation of glomerular RANTES/CCL5 expression. *J Immunol* 170: 6280-91.
- Preece NE, Hall DE, Howarth JA, King LJ, Parke DV. (1989) Effects of acute and sub-chronic administration of iron nitrilotriacetate in the rat. *Toxicology* 59: 37-58.
- Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Kim SJ, García JJ. (1999) Inhibitory effects of melatonin on ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation and oxidative damage in the rat kidney. *Toxicology* 139: 81-91.

- Rahman A, Ahmed S, Vasenwala SM, Athar M. (2003) Glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor, abrogates ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress and renal damage. *Arch Biochem Biophys* 418: 71-9.
- Reed JD, Krueger CG, Porter ML. (2001) Cranberry juice powder decreases low-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolemic swine. *FASEB J* 15: LB54.
- Renan MJ. (1993) How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 7: 139-46.
- Reznick AZ, Packer L. (1994) Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233: 357-63.
- Roy S, Khanna S, Alessio HM, Vider J, Bagchi D, Bagchi M, Sen CK. (2002) Anti-angiogenic property of edible berries. *Free Radic Res* 36: 1023-31.
- Ruland J, Mak TW. (2003) From antigen to activation: specific signal transduction pathways linking antigen receptors to NF-kappaB. *Semin Immunol* 15: 177-83.
- Ryu MH, Cha YS. (2003) The effects of a high-fat or high-sucrose diet on serum lipid profiles, hepatic acyl-CoA synthetase, carnitine palmitoyltransferase-I, and the acetyl-CoA carboxylase mRNA levels in rats. *J Biochem Mol Biol* 36: 312-8.
- Seeram NP, Adams LS, Hardy ML, Heber D. (2004) Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *J Agric Food Chem* 52: 2512-7.
- Sen P, Chakraborty PK, Raha S. (2006) Tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate impedes the anti-apoptotic effects of low-grade repetitive stress through inhibition of Akt and NFkappaB survival pathways. *FEBS Lett* 580: 278-84.
- Shahidi F, Wanasundara PK. (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32: 67-103.
- Sheu ML, Ho FM, Chao KF, Kuo ML, Liu SH. (2004) Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to high glucose leads to regulation of reactive oxygen species-related nuclear factor-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Mol Pharmacol* 66: 187-96.
- Singh D, Chander V, Chopra K. (2003) Carvedilol, an antihypertensive drug with antioxidant properties, protects against glycerol-induced acute renal failure. *Am J Nephrol* 23: 415-21.
- Stadtman ER. (1992) Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220-4.
- Stadtman ER, Levine RL. (2000) Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 899: 191-208.
- Stoner GD, Mukhtar H. (1995) Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J Cell Biochem Suppl* 22: 169-80.
- Storz P, Doppler H, Toker A. (2004) Protein kinase C delta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappa B in oxidative stress signaling. *Mol Cell Biol* 24: 2614-26.
- Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 50: 7449-54.
- Surh YJ, Kundu JK, Na HK, Lee JS. (2005) Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. *J Nutr* 135: 2993S-3001S.
- Toyokuni S, Okada S, Hamazaki S, Minamiyama Y, Yamada Y, Liang P, Fukunaga Y, Midorikawa O. (1990) Combined histochemical and biochemical analysis of sex

hormone dependence of ferric nitrilotriacetate-induced renal lipid peroxidation in ddY mice. *Cancer Res* 50: 5574-80.

- Toyokuni S, Mori T, Dizdaroglu M. (1994 a) DNA base modifications in renal chromatin of Wistar rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Int J Cancer* 57: 123-8.
- Toyokuni S, Uchida K, Okamoto K, Hattori-Nakakuki Y, Hiai H, Stadtman ER. (1994 b) Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2616-20.
- Toyokuni S, Mori T, Hiai H, Dizdaroglu M. (1995) Treatment of Wistar rats with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, causes DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in their renal chromatin. *Int J Cancer* 62: 309-13.
- Toyokuni S. (1996) Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic Biol Med* 20: 553-66.
- Toyokuni S, Luo XP, Tanaka T, Uchida K, Hiai H, Lehotay DC. (1997) Induction of a wide range of C(2-12) aldehydes and C(7-12) acylolins in the kidney of Wistar rats after treatment with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Free Radic Biol Med* 22: 1019-27.
- Traveso N, Meninis S, Maineri EP, Patriarca S, Odetti P, Cottalasso D, Marinari UM, Pronzato MA. (2004) Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59: B890-5.
- Uchida K, Fukuda A, Kawakishi S, Hiai H, Toyokuni S. (1995) A renal carcinogen ferric nitrilotriacetate mediates a temporary accumulation of aldehyde-modified proteins within cytosolic compartment of rat kidney. *Arch Biochem Biophys* 317: 405-11.
- Umemura T, Sai K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y. (1990) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA). *Carcinogenesis* 11: 345-7.
- Umemura T, Hasegawa R, Sai-Kato K, Nishikawa A, Furukawa F, Toyokuni S, Uchida K, Inoue T, Kurokawa Y. (1996) Prevention by 2-mercaptoethane sulfonate and N-acetylcysteine of renal oxidative damage in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Jpn J Cancer Res* 87: 882-6.
- Van den Brandt PA, Zeegers MP, Bode P, Goldbohm RA. (2003) Toenail selenium levels and the subsequent risk of prostate cancer: a prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 866-71.
- Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. (2001) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *J. Agric Food Chem* 49: 5315-21.
- Wang SY, Jiao H. (2000) Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *J Agric Food Chem* 48: 5677-84.
- Wang T, Zhang X, Li JJ. (2002) The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol* 2: 1509-20.
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 36: 838-49.

- Wilson T, Porcari J, Harbin D. (1998) Cranberry extract inhibits low-density lipoprotein oxidation. *Pharmacol Lett* 62: 381-6.
- Yan X, Murphy BT, Hammond GB, Vinson JA, Neto CC. (2002) Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *J Agric Food Chem* 50: 5844-9.
- Yoshizawa K, Willett WC, Morris SJ, Stampfer MJ, Spiegelman D, Rimm EB, Giovannucci E. (1998) Study of prediagnostic selenium level in toenails and the risk of advanced prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 90: 1219-24.
- Yuan JM, Gago-Dominguez M, Castela JE, Hankin JH, Ross RK, Yu MC. (1998) Cruciferous vegetables in relation to renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 77: 211-6.
- Zhang D, Okada S, Yu Y, Zheng P, Yamaguchi R, Kasai H. (1997) Vitamin E inhibits apoptosis, DNA modification, and cancer incidence induced by iron-mediated peroxidation in Wistar rat kidney. *Cancer Res* 57: 2410-4.
- Zhang SM, Willett WC, Selhub J, Hunter DJ, Giovannucci EL, Holmes MD, Colditz GA, Hankinson SE (2003) Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95: 373-80.
- Zheng W, Wang SY. (2003) Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J Agric Food Chem* 51: 502-9.