



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON UN EXTRACTO
DE SEMILLAS DE UVA SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO Y
OTRAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR EL
CARCINÓGENO RENAL NITRILOTRIACETATO DE
HIERRO (FeNTA) EN UN ESTUDIO *IN VIVO*.

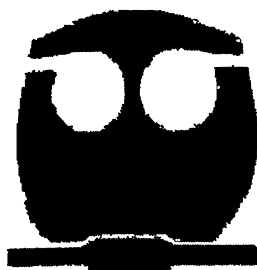
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A

ADRIANA CRUZ WHITE



TUTOR: DRA. MARIA ELENA IBARRA RUBIO

MEXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON UN EXTRACTO DE SEMILLAS DE UVA SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO Y OTRAS ACLARACIONES INDUCIDAS POR EL CARCINÓGENO RENAL NITRILOTIRACETATO DE HIERRO (FeNTA) EN UN ESTUDIO *IN VIVO*

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Doctora María Elena Ibarra Rubio en el laboratorio 120 del edificio F de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró esta tesis estuvo formado por:

Dra. María Elena Ibarra Rubio
Dra Victoria Chagoya de Sanchez
Dr Armando Roberto Tovar Palacio

El proyecto fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico bajo el programa PAPIIT números IN 224805 e IN 214307

Durante los estudios de Maestría la sustentante gozó de una beca otorgada por CONACYT (191505)

Se agradece la donación del extracto de semilla de uva a la compañía San Joaquín Valey Concentrates, Fresno CA, EEUU

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

Presidente	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Secretario	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Suplente	Dra. Lourdes Massieu Trigo
Suplente	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por todo su apoyo

A mi hermano, por toda su ayuda

A la Doctora Ibarra, por que cada día que paso en el laboratorio me guía para aprender algo nuevo

A la Doctora Chagoya y al Doctor Tovar, por los comentarios y aportaciones al proyecto.

A los que trabajaron conmigo en el laboratorio: Montse, Dorys y José, ya que sin su ayuda esto no habría sido posible

A la compañía de teatro "Aquí Estamos" por su amistad y cariño.

A mis amigas Susana, Sandra, Hazel, Isabel, Carola y Ceci, por sus sabias palabras, que siempre llegaban en el momento justo

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Analisis de varianza
AP1	Activador de proteínas 1
ATP	Adenosin trifosfato
BUN	Nitrógeno de urea en sangre
CAT	Catalasa
COX-2	Ciclooxigenasa-2
Cu-ZnSOD	Superóxido dismutasa de cobre y zinc
DNA	Ácido desirribonucleico
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
DPI	Difeniliodonio
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
FeNO₃	Nitrato de hierro
FeNTA	Nitritotriacetato de hierro
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSPE	Extracto de polifenoles de semilla de uva
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S transferasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50
ig	Intragástrica
ip	Intraperitoneal
MAPK	Proteín-quinasas activadas por mitógenos
MCT	Transportador de monocarboxilato
MDA	Malondialdehído
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MnSOD	Superóxido dismutasa de Manganeseo
MRP	Proteína asociada a resistencia a multidroga
NAC	N-acetil-L cisterna
NaHCO₃	Bicarbonato desodio
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NF-kB	Factor nuclear kapa B
ODC	Ornitina descarboxilasa
PDCT	Pirrolidina ditiocarbamato
PTK	Cinasa de tirosinas de proteínas
Transversion G-T	Transversión Guanina-Timina
SGLT1	Transportador de glucosa dependiente de sodio 1
Sitio AP	Sitios apúrico o apirimídico
SOD	Superóxido dismutasa
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral
XO	Xantina oxidasa

ÍNDICE

I RESUMEN	1
II INTRODUCCIÓN	3
1. ESTRÉS OXIDATIVO	3
2. CÁNCER Y ESTRÉS OXIDATIVO	4
2.1 Cáncer	4
2.2 Estrés oxidativo y cáncer	5
2.2.1 Daño oxidativo a lípidos y DNA	5
2.2.2 Peróxido de hidrógeno	7
2.2.3 Enzimas antioxidantes	8
2.3 NF- κ B, estrés oxidativo y cáncer	9
3. ANTIOXIDANTES Y CÁNCER	10
3.1 Polifenoles	10
3.1.1 Estructura	10
3.1.2 Metabolismo	11
3.1.3 Actividad antioxidante	12
3.1.4 Actividad anticancerígena	13
4. CÁNCER RENAL	15
4.1 Nitrilotriacetato de hierro	16
5. ANTECEDENTES DIRECTOS	18
III JUSTIFICACIÓN	19
IV HIPÓTESIS	19
V OBJETIVOS	19
GENERAL	19
PARTICULARES	19
VI METODOLOGÍA	20
1 DISEÑO EXPERIMENTAL	20
1.1 Pruebas piloto	20
1.2 Protocolos experimentales	20
2. DETERMINACIONES	21
2.1 Atrapamiento de anión superóxido	21
2.2 Oxidación de proteínas	21
2.3 Oxidación de lípidos	21
2.4 Niveles de H ₂ O ₂	22
2.5 Activación del factor de transcripción NF- κ B	23
2.6 Enzimas antioxidantes	23
2.6.1 Catalasa	23
2.6.2 Glutathion peroxidasa	24
2.6.3 Superóxido dismutasa	25
3. PREPARACIÓN DE FeNTA y GSPE	25
3.1 Preparación de FeNTA	25
3.2 Preparación y administración de GSPE	26
4. ESTADÍSTICA	27
VII RESULTADOS	28
1. ATRAPAMIENTO DE RADICAL SUPERÓXIDO	28
2. PRUEBA PILOTO	28

3. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	29
3.1 Protocolo I	29
3.2 Protocolo II	31
3.3 Protocolo III	33
3.4 Protocolo IV	34
3.5 Protocolo V	36
VIII DISCUSIÓN	40
IX CONCLUSIONES	47
ANEXO I CERTIFICADO DE ANÁLISIS GSPE	48
ANEXO II TÉCNICAS Y SOLUCIONES	49
1 ATRAPAMIENTO DE RADICAL SUPERÓXIDO	49
2 OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS	49
2.1 Preparación del homogenizado y técnica	49
2.2 Cálculos	50
2.3 Soluciones	51
3 OXIDACIÓN DE LÍPIDOS	52
3.1 Preparación del homogenizado	52
3.2 Técnica	52
3.3 Cálculos	53
3.4 Soluciones	53
4 NIVELES DE H₂O₂	54
4.1 Preparación del homogenizado	54
4.2 Técnica	55
4.3 Cálculos	56
4.4 Soluciones	56
5 MEDICIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	57
5.1 Preparación de las muestras	57
5.2 Técnica	57
5.3 Cálculos	58
5.4 Soluciones	58
6 ENZIMAS ANTIOXIDANTES	59
6.1 Catalasa	59
6.1.1 Técnica	59
6.1.2 Cálculos	60
6.1.3 Soluciones	60
6.2 Glutati3n peroxidasa	61
6.2.1 Técnica	62
6.2.2 Cálculos	62
6.2.3 Soluciones	62
6.3 Super3xido dismutasa total	63
6.3.1 Técnica	63
6.3.2 Cálculos	65
6.3.3 Soluciones	66
7 WESTERN BLOT	67
7.1 Extracci3n de prote3nas totales	67
7.2 Western blot	67
7.2.1 Preparaci3n de las muestras	68
7.2.2 Electroforesis	68

7.2.3 Transferencia a la membrana de nitrocelulosa	69
7.2.4 Incubación con los anticuerpos	69
7.2.5 Detección	70
7.3 Soluciones	70
X REFERENCIAS	75

I RESUMEN

El estrés oxidativo resulta de la pérdida del balance entre la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los mecanismos de defensa antioxidante del organismo, y se ha demostrado que está involucrado en diversos procesos fisiopatológicos.

Existen diversas evidencias que relacionan el estrés oxidativo con el desarrollo de cáncer. Por ejemplo, la formación de aductos entre algunos productos de lipoperoxidación y los nucleótidos del DNA, o bien, altas concentraciones de peróxido de hidrógeno que pueden estar a su vez involucradas en procesos celulares que llevan a la carcinogénesis, como la activación del factor de transcripción NF- κ B. Por todas estas evidencias, se han utilizado diferentes antioxidantes para prevenir e, incluso, tratar de combatir este padecimiento. Entre los compuestos con mayor capacidad antioxidante se encuentran los polifenoles, que son parte integral de la dieta humana.

El cáncer renal es uno de los tipos de cáncer menos estudiados y da lugar a una alta mortalidad. Para el estudio de este tipo de cáncer el modelo más utilizado es el cáncer de células renales inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).

Tomando en cuenta lo anterior se decidió evaluar la capacidad antioxidante de un extracto de polifenoles de semilla de uva (GSPE) sobre el daño oxidativo y las alteraciones que pueden estar involucradas en la carcinogénesis renal inducida por FeNTA. Para ello se estudiaron 4 grupos de ratas (control, GSPE, FeNTAy GSPE+FeNTA), en los que se determinó en la corteza renal: las proteínas oxidadas, la lipoperoxidación, la producción de peróxido de hidrógeno, la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD), y la activación del factor de transcripción NF- κ B.

Para empezar, se determinó la capacidad del GSPE para atrapar anión superóxido *in vitro* y se encontró una IC₅₀ de 17.5 μ g/mL. Una vez evaluada esta capacidad, se hizo una prueba piloto en la que se administró FeNTA por vía intraperitoneal (ip) a una dosis de 15 mgFe³⁺/Kg y los animales se sacrificaron a diferentes tiempos. Se encontró que 1 hora después de la administración del carcinógeno el daño oxidativo tanto a lípidos, como proteínas, así mismo los niveles de peróxido de hidrógeno se encontraban en su mayor nivel.

Se realizaron cinco protocolos (I-V) buscando la dosis y el tiempo de pretratamiento con el antioxidante que ofrecieran la mayor protección contra el daño oxidativo inducido por el carcinógeno. En estos protocolos las ratas se sacrificaron 1 hora después de la administración de FeNTA, y se realizaron las determinaciones ya mencionadas. Los esquemas de tratamiento con GSPE utilizados en cada uno de los protocolos fueron: En el protocolo I 100 mg/kg peso corporal/día/8 días, en el II 150 mg/Kg peso corporal/día/15 días, en el III 200 mg/Kg peso

corporal/día/25 días En el **IV** 150 mg/Kg peso corporal/día/25 días y en el **V** 175 mg/Kg peso corporal/día/15 días. El esquema con el que se obtuvo mayor protección antioxidante fue aquel del protocolo II, mientras que en el protocolo III el GSPE indujo estrés oxidativo potenciando el daño por FeNTA en algunos de los parámetros determinados.

El GSPE ofreció protección contra la oxidación de proteínas en tres de los protocolos realizados en este estudio. El GSPE también ofreció protección contra la oxidación de lípidos y contra la producción de peróxido de hidrógeno, aunque no en todos los protocolos. Así mismo, se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes y la activación del factor de transcripción NF-kB en el último protocolo. Se observó que el FeNTA disminuyó la actividad de CAT y aumentó la actividad de SOD; el GSPE no pudo revertir estas alteraciones. En cuanto a la actividad de GPX, ésta no se alteró por el carcinógeno; este resultado no concuerda con los resultados reportados en la literatura sobre el comportamiento de esta enzima en el modelo de FeNTA. Por otro lado al estudiar la activación del factor de transcripción NF-kB se encontró que el FeNTA en las condiciones utilizadas en este trabajo no altera la activación de este factor, sin embargo, este no puede descartarse como parte del mecanismo involucrado en la carcinogénesis de FeNTA.

Con estos resultados podemos concluir que el GSPE sí ofrece protección contra el daño oxidativo inducido por FeNTA, pero dentro de un cierto rango de dosis. Sin embargo, si se sobrepasa este rango de dosis se encuentra un efecto oxidante, por lo que se debe evitar el uso de dosis demasiado altas de este extracto.

II INTRODUCCIÓN

1. ESTRÉS OXIDATIVO

Se utiliza el término estrés oxidativo para denotar la pérdida del balance entre la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o de nitrógeno (ERN) y los mecanismos de defensa antioxidante del organismo [Dotan y cols., 2004]. Se ha demostrado que el estrés oxidativo está involucrado en procesos fisiopatológicos como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, artritis reumatoide, diabetes mellitus, envejecimiento y cáncer, entre otros [Khan y cols., 2003].

Las ERO se generan en la mitocondria como subproductos normales de la respiración y en otros lugares dentro de la célula como resultado de reacciones bioquímicas que utilizan oxígeno [Oberley 2002; Matés y cols., 1999]. Las especies reactivas de oxígeno más comunes se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 Especies reactivas de oxígeno más comunes [Evans y Halliwell 2001]:

Radicales	No radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Hidroxilo (OH^{\cdot})	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
Peroxilo (RO_2^{\cdot})	Ozono (O_3)
Alcoxilo (RO^{\cdot})	Singulete de oxígeno (O_2^1)
Hidroperoxilo (HO_2^{\cdot})	Ácido hipobromoso ($HOBBr$)

Las ERO en bajas concentraciones tienen diferentes funciones fisiológicas que incluyen la activación y modulación de señales de transducción, modulación de factores de transcripción sensibles al estado redox, regulación de la actividad de enzimas mitocondriales [Oberley 2002], apoptosis [Ghosh y Myers 1998], inmunidad [Yin y cols., 1995] y defensa contra microorganismos [Bae y cols., 1997, Lee y cols., 1998]. Sin embargo, los niveles de ERO pueden incrementar por metales de transición como el hierro y el cobre o por agentes como la radiación, el ozono y algunos productos carcinógenos [Oberley 2002], y estas altas concentraciones pueden conducir a estrés oxidativo el cual puede causar severas disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas [Matés y cols., 1999].

Para protegerse contra los efectos tóxicos de las ERO y modular sus funciones fisiológicas, la célula ha desarrollado un intrincado sistema de defensa antioxidante. Este sistema está compuesto por moléculas de bajo peso molecular, como las vitaminas E, C, A y el glutatión reducido (GSH), enzimas primarias (superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), superóxido dismutasa de cobre y zinc (Cu-ZnSOD) catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx)) y enzimas secundarias, (glutatión reductasa

(GR) y los sistemas de tiorredoxina) [Meister y Anderson 1983]. Otras proteínas importantes para modular el estado redox de la célula son las que secuestran metales de transición, así como las involucradas en respuesta a diferentes tipos de estrés (por ejemplo el sistema de respuesta al calor). Cada uno de los componentes de estos sistemas antioxidantes está específicamente compartimentalizado en ubicaciones subcelulares como mitocondrias, peroxisomas y citoplasma [Muse y cols., 1994, Oberley y Oberley 1997].

2. CÁNCER Y ESTRÉS OXIDATIVO

2.1 Cáncer

En México el cáncer se convirtió en la segunda causa de muerte a partir de 1989 [www.incan.edu.mx]. Este padecimiento se define como el crecimiento tisular producido por la proliferación descontrolada y continúa de células anormales con capacidad de invasión y colonización de territorios normalmente reservados para otras células [Alberts y col. 2002]. Esta no es una enfermedad única sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen y puede generarse de cualquier tipo de célula en cualquier tejido [Bishop y Weinberg 1996].

El cáncer se considera una enfermedad genética, ya que pueden rastrearse alteraciones en genes específicos; de hecho, se ha visto que células de diferentes tipos de cáncer comparten anomalías en su secuencia de DNA. Sin embargo, en la mayoría de los casos, no es una enfermedad hereditaria, ya que en este tipo de enfermedades el defecto genético está presente en los cromosomas de los padres y es transmitida al cigoto; mientras que las alteraciones genéticas que llevan al surgimiento de la mayoría de los tipos de cáncer surgen en el DNA de una célula somática durante el tiempo de vida del individuo afectado. [Karp 2003].

La carcinogénesis está relacionada con cambios en el DNA que pueden ser provocados por diferentes tipos de agentes: a) carcinógenos que, entre otras lesiones, provocan cambios en la secuencia de nucleótidos del DNA; b) radiaciones, que generalmente causan rupturas en los cromosomas y traslocaciones; y c) virus, que introducen a la célula DNA extraño que contiene genes que controlan el ciclo celular [Alberts y cols., 2002].

Hoy en día se están realizando muchos estudios para poder identificar las mutaciones importantes y descubrir cómo dan lugar al comportamiento de las células cancerosas. Se han logrado descubrir más de 100 genes que se encuentran repetidamente alterados en células cancerosas, y se han denominado “genes críticos del cáncer”, lo que indica que su mutación contribuye a la carcinogénesis. Estos genes se dividen en dos clases: los proto-oncogenes, cuyas formas mutantes sobreexpresadas se llaman oncogenes, y los genes supresores de tumores [Alberts y cols., 2002].

Se ha sugerido que el cáncer surge por la manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que, juntas, dictan el crecimiento celular maligno, y las comparten muchos de los tipos de tumores humanos: 1) autosuficiencia en señales de crecimiento, 2) insensibilidad a señales anticrecimiento, 3) evasión de la muerte programada (apoptosis), 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogénesis sostenida, 6) invasión de tejidos y metástasis [Hannahan 2000]. Tomando esto en cuenta se hace evidente que una sola mutación no basta para convertir una célula normal en una célula cancerosa, por el contrario, se ha visto que se requiere que ocurran varios accidentes en el linaje de una célula para que se dé la carcinogénesis [Alberts y cols., 2002], es decir, el desarrollo de cualquier tumor sigue un proceso análogo a la evolución Darwiniana, donde una sucesión de cambios genéticos, que confieren algún tipo de ventaja en el crecimiento de las células, llevan a la conversión progresiva de células normales a células cancerosas [Hanahan 2000].

2.2 Estrés oxidativo y cáncer

Existen muchas evidencias que relacionan el estrés oxidativo con el cáncer. Se sabe que las modificaciones al DNA que resultan del daño oxidativo representan los primeros pasos en el proceso de carcinogénesis. Por otro lado los productos de oxidación de lípidos pueden atacar al DNA o a otros lípidos provocando su oxidación. Además de causar daño oxidativo a macromoléculas las ERO también pueden tener un papel importante en la señalización intracelular, como en el caso del peróxido de hidrógeno. En cuanto a las defensas antioxidantes del organismo se ha visto que las enzimas antioxidantes se encuentran alteradas en muchos tipos de cáncer.

2.2.1 Daño oxidativo a lípidos y DNA

Está ampliamente demostrado que las ERO, especialmente el OH^\bullet , causan daño directo al DNA, el cual está íntimamente relacionado con mutagénesis y el desarrollo del cáncer [Oberley 2002; Floyd 1990; Wood y cols., 1990; Cheng y cols., 1992; Le Page y cols., 1998; Okamoto y cols., 1996]. Hasta la fecha se han identificado más de 100 productos de oxidación provocados por ERO al DNA, entre los que se encuentran las rupturas de una y dos hebras, modificaciones en el esqueleto del DNA, daño oxidativo a las bases, creación de sitios AP y transversiones G-T [Chipman y cols., 1998; Cadenas y Barja 1999; Valko y cols., 2006]. El daño oxidativo al DNA puede resultar en la interrupción, también conocida como “arresto”, o inducción de la transcripción, inducción de vías de transducción de señales, errores de replicación, e inestabilidad genómica, todos los cuales están asociados con la carcinogénesis [Valko y cols., 2006].

Por otro lado, las ERO producen daño oxidativo a lípidos, generándose por ejemplo malondialdehído, que es uno de los productos principales de este proceso. Este compuesto es mutagénico en bacterias, células de mamífero y es carcinógeno en ratas, ya que puede formar aductos con la adenina, la guanina y la citosina, lo cual puede conducir a mutaciones en protooncogenes y/o genes supresores de tumores e incrementar así la probabilidad de inducir células cancerosas por estrés oxidativo [Umemura y cols., 1996; Burcham 1998; Valko y cols., 2006]. De hecho, 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].

2.2.2 Peróxido de hidrógeno

En muchas células cancerosas se ha encontrado una alta producción de ERO, especialmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo que ha originado el concepto de “estrés oxidativo persistente en cáncer”. Estas concentraciones altas de H_2O_2 pueden explicar algunas de las características anormales de las células cancerosas. Dado que esta molécula actualmente se reconoce como parte importante en la transducción de señales [Khan y Wilson 1995], se piensa que la gran cantidad de peróxido producido por las células cancerosas es necesaria para activar y mediar las señales que llevan a la activación de factores de transcripción sensibles al estado redox y genes que están involucrados en el crecimiento, proliferación y supervivencia de las células cancerosas [Loo G 2003]. Como se puede ver en la figura 1, la gran cantidad de peróxido producido en las células cancerosas puede incrementar la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) dependiente de la cinasa de tirosinas de proteínas (PTK); de hecho, se sabe que el mismo peróxido puede inducir la fosforilación de EGFR [Meves y cols., 2001]. Este receptor inicia la cascada de señalización de Ras, que a su vez activa la cascada de proteín-cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Así, la concentración alta de H_2O_2 en las células cancerosas puede sobre activar MAPK, ya sea directamente o a través de PTK-EGFR-Ras. Por otro lado, la activación de MAPK puede deberse a una disminución en la cantidad de GSH provocada por el mismo peróxido de hidrógeno. Lo anterior se ha propuesto ya que los daños causados por H_2O_2 se previenen con N-acetilcisteína, que puede reforzar los niveles de GSH intracelular [Specht y cols., 2001]. Esta sobre-activación de MAPK induce un incremento en la activación de algunos factores de transcripción, incluyendo el Factor Nuclear kappa B (NF- κ B), el activador de proteínas 1 (AP1) y c-myc, los cuales son sensibles al estado redox. Estos factores de transcripción pueden llevar a la activación de algunos genes como *ciclooxigenasa-2* (COX-2), cuya proteína está involucrada en la formación de prostaglandina E_2 , un eicosanoide que induce la fosforilación del receptor del factor de crecimiento y señalamientos mitogénicos en células de cáncer de colon; *metaloproteínas de matriz* (MMP), que facilitan la metástasis, y la *ciclina B1*, que

codifica una proteína que permite la progresión a través del punto de control de las fases G₂/M para que ocurra la mitosis.

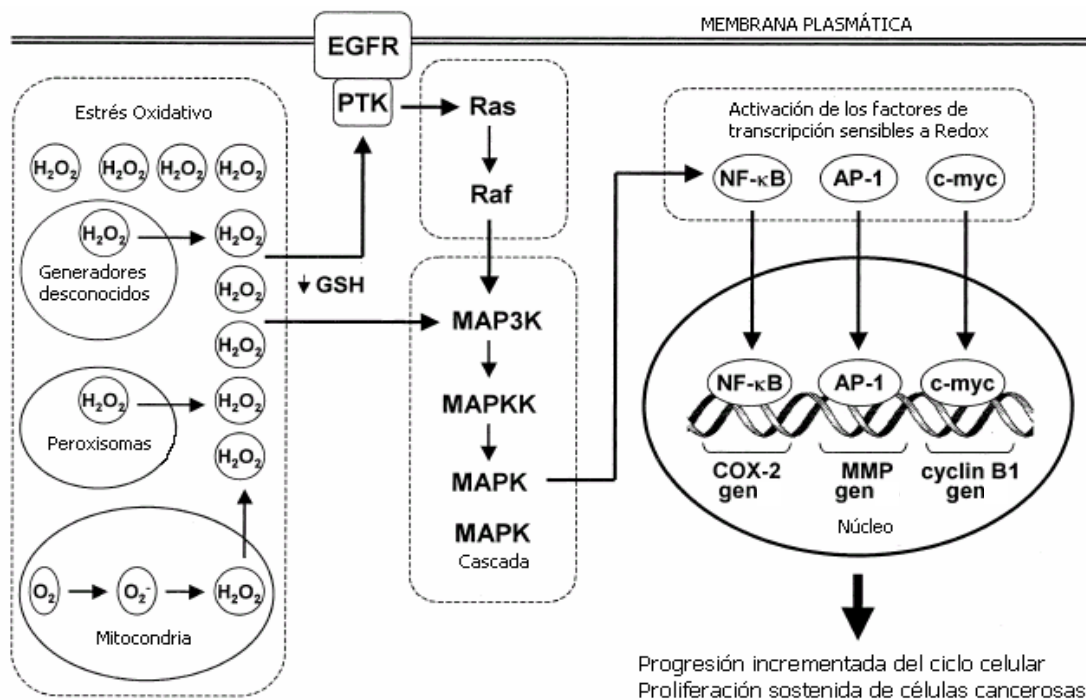


Figura 1.- Posible papel del H₂O₂ en la proliferación de células cancerosas [Loo 2003]. El peróxido de hidrógeno puede conducir a la activación de cascadas de señalización, que puede a su vez, llevar a un incremento en la progresión del ciclo celular y por lo tanto a la proliferación sostenida de las células cancerosas. H₂O₂= peróxido de hidrógeno, GSH= Glutación reducido, PTK= cinasas de tirosinas de proteínas, EGFR= receptor del factor de crecimiento epidermal, MAPK= cinasas de proteínas activadas por mitógenos, NF-κB= Factor nuclear kappa B, AP1= activador de proteínas 1, COX-2= ciclooxigenasa 2, MMP= metaloproteinasas de matriz

2.2.3 Enzimas antioxidantes

Como ya se mencionó anteriormente, las células normales están protegidas contra los efectos tóxicos de las ERO por diferentes enzimas antioxidantes entre otras cosas. Las células cancerosas también generan ERO, pero se ha demostrado bioquímicamente que los niveles de estas enzimas se encuentran disminuidos en muchos tipos de cáncer; aunque también se ha visto que ciertos tipos de tumores como los adenocarcinomas pueden tener elevados los niveles de MnSOD y CAT. En general, se puede afirmar que todos los tipos de cáncer estudiados hasta la fecha tienen alterados los niveles de las enzimas antioxidantes en comparación de la célula de la que se originaron [Oberley y Oberley 1997].

Existen evidencias que relacionan las alteraciones en la actividad de las enzimas antioxidantes con la aparición y desarrollo de cáncer; se sabe, por ejemplo, que la disminución en la cantidad de CAT en las células puede incrementar el riesgo al desarrollo de cáncer de mama [Ahn y cols., 2005].

Hay un estudio donde se evaluó la actividad de GPx, glutathion-S-transferasa (GST), CAT, xantina oxidasa (XO), y SOD en eritrocitos de pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, y se encontró que las actividades de SOD, CAT y XO estaban significativamente elevadas en pacientes con ambos tipos de cáncer [Kaynar y cols., 2005]. También se han observado incrementos en la expresión de Mn-SOD en un modelo animal de cáncer de ovario, así como en tejido primario de pacientes con esta enfermedad [Hu y cols., 2005]. En el mismo estudio se observó que en muestras de sangre los pacientes con cáncer de ovario presentan niveles más elevados de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico y otros productos de oxidación de lípidos, por otro lado los niveles en el plasma de SOD, CAT y vitamina C disminuyen.

Estudiando los diferentes tipos de carcinoma de células renales se encontró que en los carcinomas de células claras bajan los niveles de enzimas antioxidantes, mientras que en los de tipo granular los niveles de SOD y CAT se encontraron elevados. Estas determinaciones se realizaron también en el tejido adyacente a los tumores y encontraron que los niveles de enzimas antioxidantes eran iguales que en el tejido normal, lo que indica que estas alteraciones son propias de las células transformadas [Oberley y Oberley 1997].

2.3 NF- κ B, estrés oxidativo y cáncer

Entre los factores de transcripción sensibles al estado redox y que están íntimamente relacionados con el cáncer se encuentra NF- κ B. Este es un factor de transcripción que 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 que está localizado en el núcleo unido al DNA [Magnani y cols., 2000].

NF- κ B constituye una pequeña familia de proteínas dimericas de unión a DNA que en mamíferos está compuesta por NF- κ B: (RelA o 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 hetero u homodímeros y muestran una región N-terminal de 300 aminoácidos muy conservada, denominada dominio de homología Rel que es responsable de la dimerización, traslocación nuclear, unión al DNA, transcripción de genes e interacción con la familia de proteínas inhibidoras de NF- κ B (I κ B) [Magnani y cols., 2000; Ruland y Mak 2003].

La activación de NF- κ B es regulada por múltiples vías de señalización y la contribución de cada una de ellas en la inducción del factor depende del estímulo que haya recibido la célula [Li ZW y cols., 1999]. Esta activación se controla por la fosforilación, ubiquitinación y posterior degradación

proteosomal de I κ B, lo que libera al dímero y permite su traslocación al núcleo donde se une a su secuencia consenso.

Este factor de transcripción regula numerosos genes y tiene un papel importante en respuestas inmunes, a estrés y de inflamación; asimismo, se ha demostrado que la activación de NF- κ B controla señalización tanto pro como anti apoptótica [Li y Karin 1999]. Como ya se había mencionado en la sección de “cáncer y estrés oxidativo” el NF- κ B también tiene como blanco genes que regulan la capacidad de invasión de tejidos y de hacer metástasis; además, se ha visto involucrado en la proliferación celular, angiogénesis, quimioresistencia e iniciación de tumores [Wu y Kral 2005]. En diferentes estudios se ha encontrado un NF- κ B aberrantemente activado en diferentes líneas celulares tumorales y en tejidos provenientes de diferentes tipos de leucemia y linfomas [Kucharczak y cols., 2003], de cáncer de próstata y de mama [Wu y Kral 2005], cáncer gástrico [Dolcet y cols., 2005] adenocarcinoma de pulmón [Kucharczak y cols., 2003]. Se sabe también que ciertos carcinógenos como el 7, 12 dimetil-benz(a)antraceno (DMBA), el humo del cigarro y algunos promotores de tumores pueden inducir la activación del factor [Aggarwal 2004].

Se ha sugerido que la actividad de NF- κ B se regula por los niveles intracelulares de ROS, pero el mecanismo molecular involucrado aún no está bien esclarecido; sin embargo, numerosos estudios han mostrado que NF- κ B actúa como un sensor de estrés oxidativo en algunos tipos celulares. Por ejemplo, células HeLA (células de adenocarcinoma de cerviz humano) expuestas a H₂O₂ muestran potente activación de NF- κ B [Fan y cols., 2003]. También se ha visto que los productos de la lipoperoxidación pueden inducir la activación de ERK y MAPK p38 como respuesta al estrés oxidativo, lo que da como resultado un incremento en la activación de NF- κ B [Je y cols., 2004]. Así mismo se ha demostrado que la activación de NF- κ B se puede detectar a tiempos cortos (30 minutos), y que al utilizar antioxidantes como pirrolidina ditiocarbamato (PDCT) N-acetil-L-cisteina (NAC), difeniliodonio (DPI) y rotenona ésta disminuye efectivamente [Sheu y cols., 2004]. Además, otros experimentos demostraron que el factor de transcripción se encuentra activado 1, 3, y 6 horas después de la administración del lipolisacarido de *Escherichia coli* tipo O111:B4 que induce inflamación renal [Pocock y cols., 2003].

3. ANTIOXIDANTES Y CÁNCER

Por todas las evidencias que existen de la participación del estrés oxidativo en el desarrollo de cáncer, se han hecho estudios utilizando diversos antioxidantes para prevenirlo e incluso para combatirlo, por ejemplo, se ha reportado que incrementando el consumo de selenio se disminuye el riesgo de desarrollar cáncer de próstata [Li y cols., 2004; Brooks y cols., 2001; Van den Brandt y

cols., 2003; Helzlsouer y cols., 2000; Yoshizawa y cols., 1998; Criqui y cols., 1991], si se aumenta el consumo de folato en la dieta se disminuye el riesgo de desarrollar cáncer de colon [Glynn y cols., 1996; Giovannucci y cols., 1998; Kato y cols., 1999] y de seno [Zhang y cols., 2003]. En estos estudios se ha encontrado que los antioxidantes disminuyen el daño al DNA, la lipoperoxidación, la incidencia de cáncer y el abatimiento de antioxidantes celulares [Cadenas y Barja, 1999].

3.1 Polifenoles

Se ha encontrado que entre los compuestos biológicos con mayor capacidad antioxidante se encuentran los polifenoles, que están presentes en muchas frutas y verduras, siendo por lo tanto parte integral de la dieta humana. En los últimos años su estudio ha tenido gran auge y sus propiedades biológicas, farmacológicas y medicinales se han revisado extensamente. Para entender las diferentes actividades biológicas de estos compuestos se debe conocer su biodisponibilidad, que está determinada por las propiedades químicas de los diferentes polifenoles, la desconjugación y reconjugación en el intestino, absorción intestinal y las enzimas disponibles para su metabolismo.

En la tabla 2 se muestra el contenido de polifenoles totales en diferentes frutas [Bravo 1998]. La uva (*Vitis vinifera*) es de las frutas más consumidas en el mundo [Agarwal y cols., 2000], y en esta tabla podemos ver que el contenido de polifenoles en la uva varía entre 50-490 mg/ 100 g de masa fresca (mf), lo que la ubica entre las frutas con mayor contenido de polifenoles. Entre el 60-70% de este contenido de polifenoles se encuentra en la semilla [Singleton 1992; Bartolome y cols., 1996].

Tabla 2 Contenido de polifenoles en diferentes frutas expresado en mg polifenoles/ 100 g masa fresca (mf) (Bravo 1998)

FRUTA	POLIFENOLES mg/100g mf
Mora azul	135-208
Cereza	60-90
Uva	50-490
Toronja	50
Naranja	50-100
Durazno	10-150
Pera	2-25
Ciruela	4-225
Frambuesa	37-429
Grosella roja	17-20
Fresa	38-218
Tomate	85-130

3.1.1 Estructura

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas, y se biosintetizan a través de dos vías principales: la vía del acetato y la del ácido siquímico, 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 encontramos a los flavonoides, que son los polifenoles más comunes en las plantas (Figura 2). Su estructura general es la de los difenilpropanoides ($C_6C_3C_6$) que consisten de dos anillos aromáticos unidos por tres átomos de carbono que generalmente forman un heterociclo oxigenado.

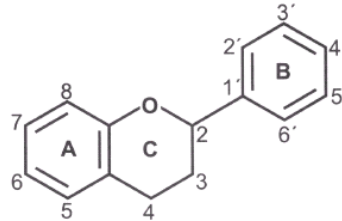


Figura 2.- Estructura básica y sistema de numeración de los flavonoides

Dentro de este grupo tenemos a los taninos que se pueden dividir en hidrolizables y condensados. Dentro de este último grupo se ubican las proantocianidinas (Figura 3), que son polímeros de flavan-3-ol en grados de polimerización de 50 y aún más unidades.

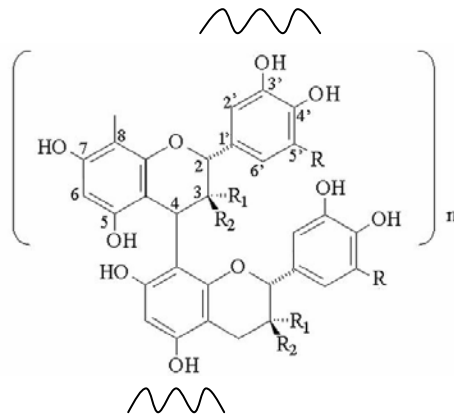


Figura 3.- Estructura básica de las proantocianidinas. R=H procianidina, R1= H y R2= OH catequina, R1= OH y R2= H epicatequina (Garbacki y cols., 2004)

3.1.2 Metabolismo

Uno de los primeros procesos implicados en la biodisponibilidad es su absorción intestinal, que depende de la estructura química del compuesto (grado de glicosilación, acilación, conjugación con otros fenoles, tamaño, grado de polimerización y solubilidad de la molécula) [Bravo 1998], así como del tipo celular [Williams y cols., 2004],

Después de ser ingeridos algunos flavonoides glicosilados son deglicosilados por las enzimas presentes en la mucosa o en la microflora gastrointestinal para poder ser absorbidos. Otros

flavonoides glicosilados pueden ser absorbidos, sin ser modificados, mediante transportadores de membrana como el transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT1), la proteína asociada a resistencia a multidrogas (MRP) o el transportador de monocarboxilato (MCT) [Walle 2004]. Una vez absorbidos, los polifenoles pueden ser conjugados por glucuronidación, sulfatación y metilación y formar aductos con el GSH en el intestino delgado, el hígado y otros órganos; estas modificaciones determinan su destino en el metabolismo. Aquellos flavonoides que no son absorbidos en el tracto gastrointestinal superior llegan al colon, allí la microflora los convierte en metabolitos que pueden ser absorbidos y entrar a la circulación enterohepática [Yang y cols., 2001].

Las modificaciones que sufren los flavonoides alteran su naturaleza antioxidante clásica, ya que la estructura básica sufre modificaciones, se ha visto que los metabolitos de glucuronidación, O-metilación y los aductos con GSH de los polifenoles tienen menor habilidad para donar protones y son menos efectivos para atrapar radicales que la molécula original [Walle 2004; Williams y cols., 2004]. Sin embargo la actividad antioxidante no se pierde por completo y muchos otros flavonoides no sufren estas modificaciones.

3.1.3 Actividad antioxidante

Los flavonoides (incluyendo a las proantocianidinas) poseen propiedades anticarcinogénicas, antivirales, antibacteriales, anti-inflamatorias, anti-alérgicas y vasodilatadoras gracias a su actividad antioxidante. Se ha visto que las proantocianidinas inhiben la peroxidación de lípidos, la agregación de plaquetas, la fragilidad y permeabilidad capilar y que afectan sistemas de enzimas que incluyen la fosfolipasa A2, la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa [Fine 2000]. Bagchi y colaboradores demostraron que el extracto de proantocianidinas (un tipo de flavonoide) de la uva (*Vitis vinifera*) (GSPE) presenta una biodisponibilidad muy alta y proporciona mayor protección contra radicales libres, lipoperoxidación y daño al DNA que las vitaminas E, C y β - caroteno [Bagchi y cols., 2002]. El GSPE también demostró una excelente protección contra el daño por sobredosis de acetoaminofén tanto en hígado como en riñón de ratón; contra el daño al miocardio por isquemia y reperfusión; induce al gen *bcl2* e inhibe al oncogen *c-myc* [Bagchi y cols., 2002]. Otros autores demostraron que en humanos voluntarios que recibieron 110 mg de proantocianidinas (Dímeros de flavonoides) por 30 días disminuye el daño oxidativo al DNA de linfocitos y aumentan los niveles de α -tocoferol [Simonetti y cols., 2002].

Las principales características que tienen los flavonoides para llevar a cabo su actividad antioxidante son 1) un grupo o-difenólico en el anillo B, 2) la conjunción de la doble ligadura 2,3 y la función 4-oxo en el anillo C, y 3) los grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 en el anillo A (Figura 6)[Bravo 1998; Yang y cols., 2001].

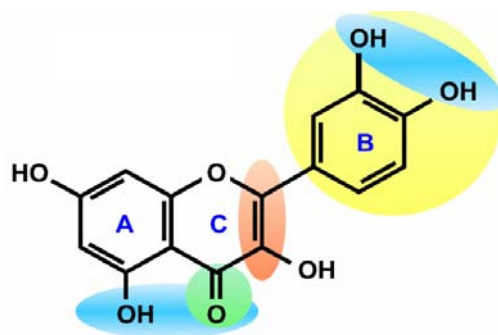


Figura 4.- Las características moleculares contenidas en los óvalos son las responsables de la capacidad antioxidante de los flavonoides

Se ha sugerido que los flavonoides pueden atrapar las elevadas cantidades de H_2O_2 que se producen constitutivamente en las células cancerosas, bloqueando, por lo tanto, el señalamiento por MAPK, la activación de factores de transcripción NF- κ B y AP1 y por último la expresión de genes de respuesta que estimulan la proliferación de células cancerosas [Katiyar y cols., 2001; Manna y cols., 2000; Yu y cols., 2001].

Las principales características de los flavonoides que se han demostrado experimentalmente son:

- Quelan moléculas de hierro libres.
- Interfieren con la oxidación de lípidos y otras moléculas gracias a la rápida donción de un átomo de hidrógeno a los radicales.
- Inhiben no-competitivamente a la xantina oxidasa, que es un generador importante de radicales libres.
- Inhiben a la hialuronidasa, elastasa y colagenasa, que pueden degradar estructuras del tejido conectivo [Murray y cols., 1999].

3.1.4 Actividad anticancerígena

Además de actuar como antioxidantes, los polifenoles pueden ejercer efectos modulatorios en algunos componentes de cascadas de señalización celular como la de PI3K, y las de las MAPK entre otras [Williams y cols., 2004]. Los flavonoides tienen también la capacidad de unirse a los sitios de unión de ATP de ciertas proteínas como la ATPasa mitocondrial, proteína cinasa A y C y la topoisomerasa, lo que provoca un cambio en la estructura tridimensional de las proteínas y por lo tanto la pérdida de su actividad [Williams y cols., 2004]. Además se ha visto que pueden actuar directamente en la mitocondria modulando el poro de transición mitocondrial que controla la liberación del citocromo C durante la apoptosis o bien modulando factores pro-apoptóticos como DIABLO/smac. Por ejemplo, se ha visto que la quercetina, un flavonoide ubicuo en la naturaleza, en pequeñas cantidades puede activar las MAPK llevando a la expresión de genes de supervivencia y defensa; sin embargo si se incrementa la cantidad del compuesto se puede activar la vía de las caspasas,

llevando así a la apoptosis [Williams RJ y cols., 2004]. Por otro lado el resveratrol, un polifenol presente en la uva, induce la interrupción

del ciclo celular en la fase G1 en células A431 de carcinoma epidermoide [Ahmad y cols., 2001], y se ha sugerido que este compuesto induce apoptosis vía la activación de JNK que lleva a la fosforilación y, por lo tanto, a la activación de p53, factor que activa genes que promueven la apoptosis como Waf-1 o BAX [Shih y cols., 2002]. Existen diferentes estudios donde se ha visto que el consumo de polifenoles del te verde puede reducir el riesgo a desarrollar diferentes tipos de cáncer como el de colon o el de mama en poblaciones negra o asiática-americana respectivamente en los Estados Unidos [Wu y cols., 2003; Il'yasova y cols., 2003].

Algunos polifenoles pueden tener diferente tipo de aplicación en la prevención de cáncer y esto depende de las siguientes consideraciones mecanísticas [Yang y cols., 2001]:

- 1) Algunos polifenoles pueden inhibir la activación de carcinógenos catalizada por el citocromo p450.
- 2) Muchos polifenoles inducen enzimas de fase II que pueden facilitar la eliminación de algunos carcinógenos o sus intermediarios reactivos. En este punto se debe ser cauteloso, ya que estas enzimas pueden tener efectos pro-oxidantes en cantidades elevadas o pueden activar algunos carcinógenos.
- 3) Ciertos polifenoles inhiben el metabolismo del ácido araquidónico, inhibiendo la fosfolipasa A₂, la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa.
- 4) Las isoflavonas y los lignanos modulan la carcinogénesis dependiente de hormonas en animales.
- 5) Se ha propuesto que los polifenoles modulan diferentes oncogenes, genes supresores de tumores, y vías de transducción de señales, lo que provoca inhibición de la proliferación celular, transformación, y la inducción de apoptosis

Por otro lado, se ha visto que cuando los flavonoides se encuentran en altas concentraciones en el organismo o si por causa de una herida en el tejido se liberan hierro o cobre, estos compuestos pueden tener efectos pro-oxidantes [Bravo 1998; Yang y cols., 2001; Galati y cols., 2004]. Esta inducción de altas cantidades de ERO se ha visto que puede iniciar el proceso de apoptosis mediante la activación de la cascada de MAPK o daño irreparable al DNA. Más aún, se ha llegado a proponer que las propiedades anticancerígenas de los polifenoles se dan por esta capacidad de inducir la formación de especies reactivas de oxígeno que son responsables de la fragmentación apoptótica del DNA, ya que estas dos propiedades son similares a las de algunas drogas anticancerígenas [Loo 2003; Galati y cols., 2004].

4. CÁNCER RENAL

El cáncer renal es uno de los tipos de cáncer menos estudiados en el mundo, a pesar de que en 2002 se registraron mundialmente más de 100 000 defunciones a causa de este tipo de cáncer [Atkins y cols., 2002] y su incidencia está aumentando. Ese mismo año se presentaron 208, 480 casos nuevos [Staeher y cols., 20005], ubicándolo en el tercer lugar entre todos los tumores del tracto urinario.

De acuerdo a los datos obtenidos del Registro Histopatológico de Neoplasias de 2001 en México, se presentaron 872 casos en hombres y 705 casos en mujeres (total 1,577 casos) falleciendo 1,289 pacientes como consecuencia del tumor, lo que representa una mortalidad del 81.7% . Esta alta mortalidad se debe a que este tipo de cáncer no presenta síntomas en etapas tempranas, por lo que su diagnóstico generalmente se da en etapas avanzadas, incluso cuando ya se ha presentado metástasis.

Existen diferentes tipos de neoplasias renales: Los carcinomas de células renales surgen en la corteza renal y comprenden entre el 80-85% de todas las neoplasias renales primarias. Los carcinomas transicionales que surgen en la pelvis del riñón son los segundos más comunes y representan el 7-8% de las neoplasias renales. Otros tumores como los oncocitomas, tumores de ducto colector y sarcomas renales son poco comunes. El nefroblastoma (tumor de Wilms) es común en niños y representa entre el 5-6% de todos los tumores renales primarios [Atkins y cols., 2001].

El carcinoma de células renales se puede dividir a su vez de acuerdo a la morfología, histología y bases moleculares como se muestra en la tabla 3

Tabla 3 clasificación patológica de los diferentes carcinomas renales [Atkins y cols., 2001]

Tipo de carcinoma	Célula de origen	Incidencia (%)
Células claras	Túbulo proximal	75–85
Cromofílico	Túbulo proximal	12–14
Cromofóbico	Células intercaladas del túbulo colector cortical	4–6
Oncocítico	Células intercaladas del túbulo colector cortical	2–4
Ducto colector	Ducto colector medular	1

Para el estudio del cáncer renal, el modelo más utilizado es el cáncer inducido por el nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) [Bahneman y cols., 1998; Cadenas y Barja 1999; Chipman y cols., 1998; Khan y cols., 2003; Kurokawa y cols., 1990; Leibold y cols., 2002; Li y cols., 1987; Nishiyama y cols., 1995; Preece y cols., 1988; 1989].

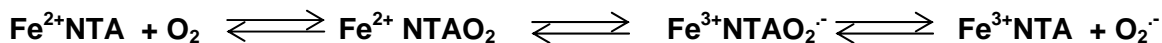
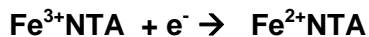
4.1 Nitritotriacetato de hierro

El nitritotriacetato es un ácido aminocarboxílico tribásico que se utilizaba hace más de 20 años como sustituto de polifosfatos en detergentes [Leibold y cols., 2002] y que funciona como agente quelante que compleja calcio, magnesio, zinc y hierro para formar con este último nitritotriacetato de hierro (FeNTA), que es una molécula de muy fácil absorción [Preece y cols., 1989]. El daño oxidativo provocado por esta molécula se ha demostrado por la presencia de productos de oxidación de proteínas, de peroxidación de lípidos como el etano exhalado y malondialdehído (MDA), y de productos de daño al DNA como 8-hidroxi-2-desoxiguanosina [Oberley T 2002; Bahnemann 1998] que, como ya se mencionó anteriormente, están ligados al proceso de carcinogénesis.

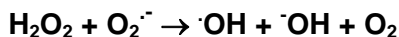
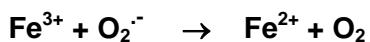
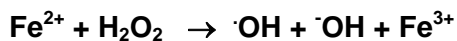
El órgano blanco del FeNTA es el riñón [Mizote y cols., 2002]. Se ha comprobado que una sola inyección intraperitoneal (ip) de este compuesto en ratas y ratones induce daño del túbulo proximal renal, puesto que es absorbido en la vena porta a través del mesotelio y pasa hacia la circulación gracias al hígado. Debido a su bajo peso molecular este compuesto es fácilmente filtrado a través del glomérulo hacia el lumen de los túbulos proximales donde el Fe^{3+} -NTA es reducido a Fe^{2+} -NTA por la cisteína o la cisteinglicina que surgen de la degradación del glutati6n en la superficie del borde en cepillo de los túbulos contorneados proximales, donde una gamma glutamil-transpeptidasa hidroliza el glutati6n convirtiéndolo en cisteinilglicina, la cual es rápidamente degradada a cisteína y glicina por una dipeptidasa, [Singh y cols., 2003]. Esta oxidación genera radicales super6xido (Esquema 1A) que gracias a la reacción de Haber-Weiss produce radical hidroxilo (Esquema 1B), el cual puede desencadenar la cascada de lipoperoxidaci6n (Esquema 1C) [Preece y cols., 1989].

El daño renal inducido por este compuesto se ha demostrado en estudios donde después de administrar FeNTA se observan nefronas irregularmente esparcidas con numerosas secciones de células hiperplásicas en los túbulos proximales, grupos de células eosinófilas arrastradas al lumen [Bahnemann 1998], necrosis en el túbulo contorneado proximal, pérdida del epitelio tubular, condensaci6n de la cromatina nuclear (picnosis), y parte del borde en cepillo se vuelve bas6filo. También se ha visto que este compuesto incrementa 2.5 veces la producci6n de per6xido de hidrógeno en el riñón [Preece y cols., 1988; 1989; Ansar y cols., 1999; Mazzon y cols., 2001]. El incremento en la oxidaci6n de proteínas se puede deber también a que el FeNTA inhibe la acci6n de la NADPH quinona reductasa renal, lo que lleva a un incremento en el contenido de grupos carbonilo en las proteínas gracias a la producci6n de semiquinonas [Iqbal y cols., 2003].

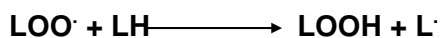
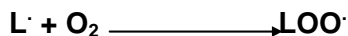
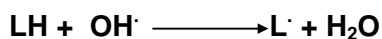
A



B



C



Esquema 1.- Reacciones del metabolismo de FeNTA

Si el compuesto se inyecta de manera crónica se produce carcinoma de células renales [Okada y Midorikawa 1982; Atar e Iqbal 1998; Khan y Sultana 2005], con una alta incidencia de tumores (30-90%), generalmente con metástasis pulmonar e invasión peritoneal en roedores. Los tumores renales inducidos parecen ser la contraparte del carcinoma humano de células renales [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 y los datos histopatológicos están marcados por células claras o de tipo granular [Li y cols., 1987; Deguchi y cols., 1995]. Algunos autores han demostrado que la administración de FeNTA induce la ornitina descarboxilasa (ODC renal y hepática [Rahman y cols., 2003], una enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis de poliaminas, que está involucrada en la proliferación de tumores, que induce la síntesis de la quinona reductasa, que es capaz de inactivar ciertos carcinógenos [Kandil y cols., 2002], y que es drásticamente inducida en respuesta a promotores de tumores [Khan y cols., 2004]. Además, existe evidencia de que las ERO están involucradas en el proceso de carcinogénesis [Mizote y cols., 2002], por ejemplo se ha demostrado en sistemas in vitro que el FeNTA en presencia de H_2O_2 causa rompimientos en casi cada nucleótido del DNA aislado de células humanas [Inoue y Kawanishi 1987], lo cual sugiere que este compuesto cataliza la descomposición del H_2O_2 en $\text{OH}\cdot$ [Kawanishi y cols., 2002]. Asimismo, se ha demostrado la formación de lesiones oxidativas al DNA como rompimientos de una y dos hebras [Toyokuni y Sagripantini 1993], entrecruzamientos DNA-proteínas [Toyokuni y cols., 1995] y aumento

en la formación de 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OHdGuo) [Umemura y cols., 1990]. De hecho se ha encontrado que la 8-oxodesoxiguanosina (8-oxodG) se excreta en la orina de ratas tratadas con este compuesto [Hermanns y cols., 1998]. Por otro lado se ha demostrado un papel importante de la formación de aldehídos carcinogénicos como producto de la lipoperoxidación en los efectos del FeNTA, tanto *in vivo* como *in vitro* [Ichihashi y cols., 2001; Toyokuni y cols., 1994; Fukuda y cols., 1996].

5. ANTECEDENTES DIRECTOS

En un estudio donde se administró FeNTA a una dosis de 9 mg/Kg peso corporal a ratas macho Wistar se observó que el nivel de glutatión reducido disminuye, al igual que las actividades de la GST, GR, CAT, GPx y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en el riñón. Así mismo, se incrementan los niveles de oxidación de lípidos, nitrógeno de urea en sangre (BUN), creatinina y peróxido de hidrógeno, al igual que la actividad de la xantina oxidasa y la ornitina descarboxilasa y la incorporación de timidina tritiada, efectos que fueron revertidos por un extracto de *Nymphaea alba*, la rosa acuática, utilizada como planta medicinal en la India [Khan y Sultana 2005]. Otro experimento con roedores tratados con FeNTA, mostró que la vitamina E, un importante antioxidante endógeno, inhibe la lipoperoxidación, la formación de aductos oxidativos de DNA con productos de lipoperoxidación y el desarrollo de cáncer en riñones [Zhang y cols., 1997]. En el daño con FeNTA, también se han probado diferentes compuestos antioxidantes como la melatonina, resveratrol y el aceite de ajo, entre otros, tanto *in vivo* [Okada 2003] como *in vitro* [Matos y cols., 2000].

A pesar de estas evidencias el modelo de FeNTA aún no está completamente caracterizado, por ejemplo no se sabe si el tratamiento *in vivo* lleva a la activación del factor de transcripción NF-kB, además, hasta la fecha no se han hecho estudios para determinar si hay relación entre la activación del factor de transcripción, el estrés oxidativo y los niveles de las defensas antioxidantes. Es por ello que en este estudio se pretende evaluar la alteración de los niveles de ciertas defensas antioxidantes, así como la activación del factor de transcripción NF-kB .

III JUSTIFICACIÓN

Existen muchas evidencias que relacionan el estrés oxidativo con el proceso de carcinogénesis y se ha visto que algunos antioxidantes pueden proteger contra el desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Entre los compuestos con mayor capacidad antioxidante se encuentran los polifenoles.

El cáncer renal es uno de los tipos de cáncer menos estudiados y el FeNTA es el carcinógeno renal más utilizado con este fin. La carcinogenicidad de este compuesto se ha relacionado con su capacidad de generar estrés oxidativo; sin embargo no se conocen los mecanismos moleculares involucrados.

Por lo tanto, se consideró importante evaluar si, por su capacidad antioxidante, un extracto de polifenoles de semilla de uva (GSPE) previene el daño oxidativo a macromoléculas como lípidos y proteínas renales inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) y si disminuye la producción de peróxido de hidrógeno. Por otro lado, se consideró importante determinar si el FeNTA altera la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) y si el GSPE es capaz de prevenir esta alteración. También se consideró importante determinar si la exposición a este carcinógeno modifica la activación de el factor de transcripción NF- κ B y si esto es prevenido por el GSPE en un estudio *in vivo*.

IV HIPÓTESIS

El extracto de polifenoles de semilla de uva es capaz de proteger contra el daño oxidativo que puede iniciar el proceso de carcinogénesis renal inducido por nitrilotriacetato de hierro en estudios *in vivo*.

V OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la capacidad antioxidante de un extracto comercial de polifenoles de la uva (GSPE) sobre el daño oxidativo y las alteraciones que pueden iniciar la carcinogénesis renal inducidos por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).

PARTICULARES

- Evaluar la capacidad antioxidante del GSPE para proteger contra el daño oxidativo a proteínas como marcador de estrés oxidativo inducido por FeNTA *in vivo* en riñón de ratas Wistar.
- Probar el incremento en el daño oxidativo a lípidos y en los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) inducidos por FeNTA como factores de riesgo para la carcinogénesis y si el GSPE es capaz de prevenirlo.
- Analizar el comportamiento de defensas celulares antioxidantes enzimáticas como CAT, SOD y GPx como resultado del tratamiento con FeNTA y el efecto del GSPE sobre este comportamiento.
- Determinar si la actividad del factor de transcripción NF- κ B se modifica por la exposición al carcinógeno renal y si el antioxidante revierte esta modificación.

VI METODOLOGÍA

1 DISEÑO EXPERIMENTAL

1.1 Pruebas piloto

Se realizaron pruebas piloto para determinar el tiempo ideal de tratamiento con el carcinógeno (FeNTA). Se utilizaron 4 ratas macho Wistar de aproximadamente 250 g de peso para cada grupo (Control, 1 hora, 3 horas, 6 horas y 9 horas).

El FeNTA se administró intraperitonealmente (ip) a una dosis de 15 mg Fe³⁺/Kg de peso corporal, ya que a esta dosis Toyokuni y cols., [1994] encontraron el mayor daño oxidativo a macromoléculas. Se sacrificaron a los animales por decapitación 1, 3, 6 y 9 horas después [Fukuda y cols., 1996, Qi y cols., 1999, Ichihashi y cols., 2001]. Se extrajeron los riñones, se separó la corteza y con esta se realizaron las determinaciones de proteínas y lípidos oxidados y los niveles de H₂O₂ con el fin de evaluar el daño oxidativo en cada tiempo de sacrificio.

1.2 Protocolos experimentales.

Una vez determinado el tiempo de estudio para el carcinógeno se llevaron a cabo protocolos con los siguientes grupos: 1) control, 2) GSPE 3) FeNTA y 4) GSPE + FeNTA. Al grupo control se le administró el vehículo del antioxidante (agua) vía intragástrica (ig) y del carcinógeno (bicarbonato de sodio 0.12M pH 7.4) ip; el grupo GSPE recibió el antioxidante ig 8,15 ó 25 días antes de la administración de FeNTA, el grupo FeNTA recibió el carcinógeno ip a la dosis utilizada en la prueba piloto; finalmente, el grupo GSPE+FeNTA recibió ambos compuestos. En todos los grupos se utilizaron 5-7 ratas macho Wistar de aproximadamente 250 g por cada grupo. El GSPE utilizado en los protocolos fue una donación de San Joaquin Valey Concentrates, Fresno CA, EEUU.

Los animales se sacrificaron por decapitación 1 hora después de la administración de FeNTA. Se extrajeron ambos riñones, se separó la corteza y con esta se realizaron las determinaciones de: 1) Daño oxidativo a lípidos 2) Daño oxidativo a proteínas, 3) Niveles de H₂O₂, 4) Activación del factor de transcripción NF-κB y 5) Actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa.

2. DETERMINACIONES

Las técnicas detalladas se encuentran en el Anexo II

2.1 Atrapamiento de anión superóxido

La capacidad del GSPE de atrapar el anión superóxido *in vitro* se determinó mediante una modificación al método de Oberlye y Spitz [1984], cuyo fundamento radica en que un compuesto con actividad antioxidante inhibe la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por el atrapamiento de los radicales superóxido generados por el sistema xantina-xantina oxidasa.

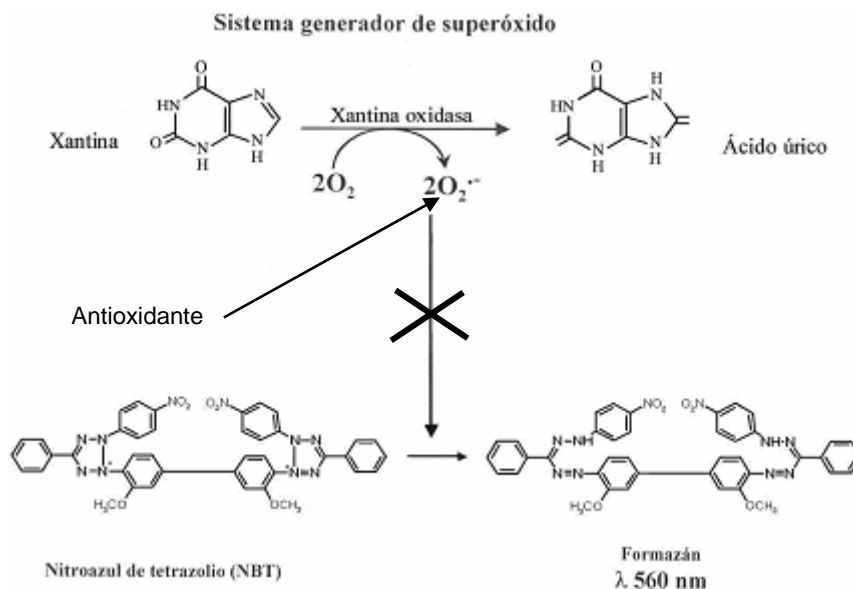


Figura 5.- Reacción para determinar el atrapamiento del anión superóxido. Mientras mayor capacidad antioxidante tenga el compuesto menor será la absorbancia detectada.

2.2 Oxidación de proteínas

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-hidroxi nonenal o el MDA [Nyström 2005]. Esta determinación se llevó a cabo basándose en la reactividad de los grupos carbonilo con dinitrofenilhidrazina (DNPH) (figura 6) 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 280nm para expresar el contenido de grupos carbonilo en nmol/mg proteína [Reznick y Packer 1994, Levine y cols., 1994, Sohal y cols., 1993].

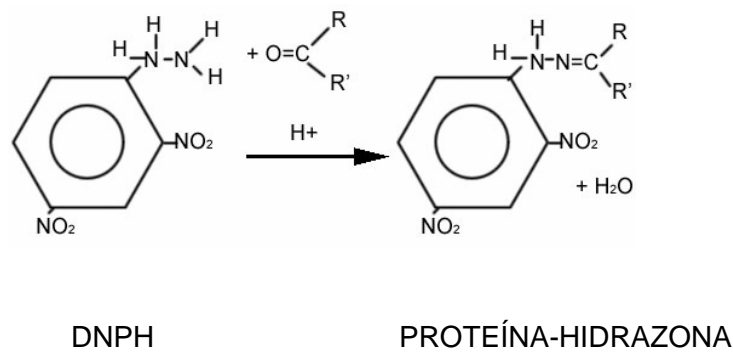


Figura 6.- Reacción de DNPH con un grupo carbonilo

2.3 Oxidación de lípidos

Uno de los marcadores clásicos de estrés oxidativo es la determinación de productos de la peroxidación de lípidos que finalmente llevan a la pérdida de la función e integridad de las membranas biológicas. El malondialdehído (MDA) es uno de los productos derivados de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, hay evidencia de su relación con el proceso de carcinogénesis [Burcham 1998]. Esta determinación se llevó a cabo con un método espectrofotocolorimétrico 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 [Erdelmeier y cols., 1998, Gerard-Monier y cols., 1998].

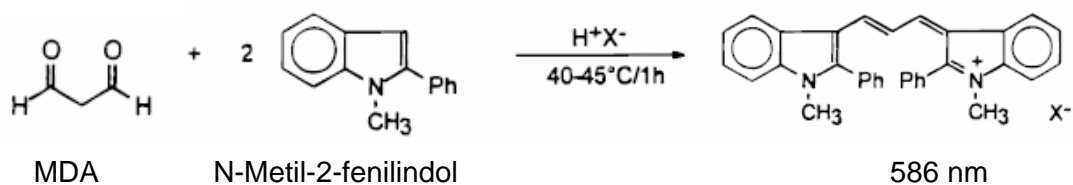
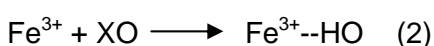
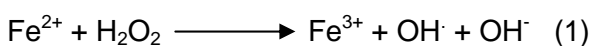


Figura 7.-Reacción de MDA con N-metil-2fenilindol

2.4 Niveles de H₂O₂

Actualmente se reconoce al H₂O₂ como una molécula involucrada en la transducción de señales intracelulares, incluyendo en los procesos cancerosos [Loo 2003]. Esta determinación se llevó a cabo por el método de FOX, que está basado en la oxidación de Fe²⁺ a Fe³⁺ por el peróxido de hidrógeno en condiciones ácidas (Reacción 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 (Reacción 2), en estas muestras se determinó también el contenido de proteínas por el método de Lowry para expresar el resultado en nmol de H₂O₂ / mg proteína [Long y cols., 1999].



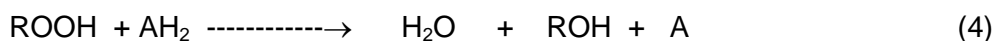
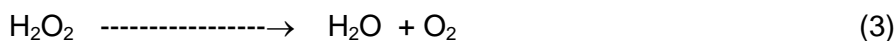
2.5 Activación del factor de transcripción NF-κB

Western Blot.- IκB-α, el inhibidor de NFκB, se encuentra en el citoplasma de las células cuando el factor de transcripción se encuentra inactivo. La técnica de Western Blot comprende una electroforesis que separa las proteínas desnaturalizadas por su peso molecular, estas proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa y esta se incuba con anticuerpos que permiten determinar la cantidad de la proteína deseada en el tejido o en el extracto. En este trabajo se utilizarán los anticuerpos primario contra IκB-α de Santa Cruz Biotechnology (CAT# sc-371-G), contra actina (CAT# sc 1616) y como control positivo de IκB-α se utilizará una proteína fusionada de IκB expresada en E coli (CAT# sc-4094). Esta técnica proporcionará una medida indirecta de la activación del factor de transcripción ya que se medirán los niveles de IκB-α en los diferentes grupos de tratamiento, si el factor de transcripción se encuentra activo la cantidad de IκB debe disminuir.

2.6 Enzimas antioxidantes

2.6.1 Catalasa

La catalasa es una hemoproteína tetramérica que posee dos actividades: A) actividad catalítica: descompone el H₂O₂ a oxígeno y agua (reacción 3), y B) actividad de peroxidasa: oxida donadores de protones como el metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles, con el consumo de 1 mol de peróxido (reacción 4) [Aebi H 1984]

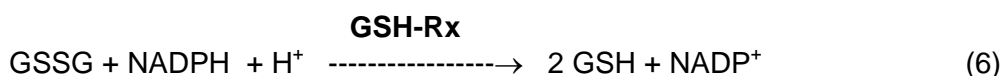
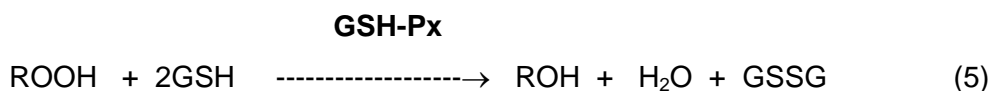


En tejidos de mamíferos, está presente en altas concentraciones en hígado y riñón, y en bajos niveles en tejido conectivo [Nakashima y cols., 1989]. En casi todas las células, se encuentra principalmente en los peroxisomas (80%) y la mitocondria, mientras que en los eritrocitos existe en forma soluble [Aebi 1983].

La determinación de su actividad de acuerdo al método de Aebi se basa en la disminución de la absorbancia del H₂O₂ debido a su degradación por la catalasa presente en la muestra [1983]. Se lee la absorbancia a 240 nm cada 15 seg durante 30 seg (que es el período en el que la descomposición de H₂O₂ sigue una cinética de primer orden) De acuerdo a Aebi, se usó la constante de reacción de primer orden (*k*) como la unidad de actividad de la catalasa, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula: $k=(1/t) (2.3X\log A_1/A_2)$ donde t= intervalo de tiempo medido, A₁ y A₂ son las absorbancias del H₂O₂ en los tiempos t₁ y t₂. Los resultados se expresan como *k*/mg proteína.

2.6.2 Glutathion peroxidasa

La glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la descomposición del H_2O_2 y de otros peróxidos orgánicos a H_2O con la concomitante oxidación del glutatión reducido (GSH), que se transforma en glutatión oxidado (GSSG) (reacción 5). El GSSG es, a su vez, reducido a GSH por la glutatión reductasa (GSH-Rx) en presencia de NADPH (reacción 6) formando un ciclo redox que impide que se agoten las reservas de GSH [Harris 1992, Ichikawa y cols., 1994]-



Se conocen diferentes isoformas de esta enzima la cual contiene en su sitio activo un átomo de selenio (Tabla 4).

Tabla 4. Localización de las isoformas de glutatión peroxidasa

Isoforma	Localización
cGSH-Px	citosol
pIGSH-Px	extracelular
giGSH-Px	gastrointestinal
PIGSH-Px	membranas

La actividad de la GPx se mide de manera indirecta por una reacción acoplada con la glutatión reductasa [Lawrence 1976] y se basa en la disminución de la absorbencia a 340 nm debido a la desaparición de NADPH. La GPx al reducir los hidroperóxidos consume glutatión reducido, el cual es regenerado por la glutatión reductasa a partir de glutatión oxidado, proceso que consume NADPH (Fig. 8). Los datos se expresan como U/mg proteína. Una unidad de GPx (U) se define como la cantidad de enzima que oxida un μmol de NADPH por minuto.

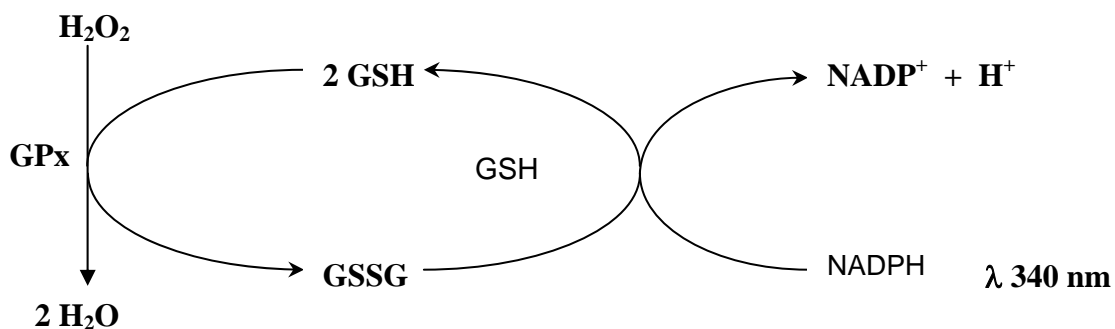
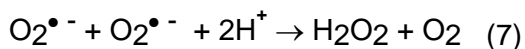


Fig. 8. Mecanismo indirecto para la medición de actividad de GPx

2.6.3 Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa es una metaloenzima que cataliza la conversión del anión superóxido en oxígeno molecular y H₂O₂: (Reacción 7)



En las células eucarióticas existen tres isoformas de SOD [Ho y cols., 1991], dos de estas isoformas contienen en su sitio activo cobre y zinc (Cu,Zn-SOD), y la tercera contiene manganeso (Mn-SOD). Una de las isoformas de CuZn-SOD se localiza principalmene en el citosol, [Weisiger R y Fridovich I 1973], la otra es extracelular (EC-SOD) [Oury y cols., 1996] y se localiza en flúidos como plasma, líquido sinovial y linfa [Carlsson y cols., 1996]. La Mn-SOD se localiza en la matriz mitocondrial [Weisiger R y Fridovich I 1973].

La actividad de la SOD se mide por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa [Oberley y Spitz1984] (figura 9). Los resultados se expresan en U/mg proteína. Una unidad de SOD (U) se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT.

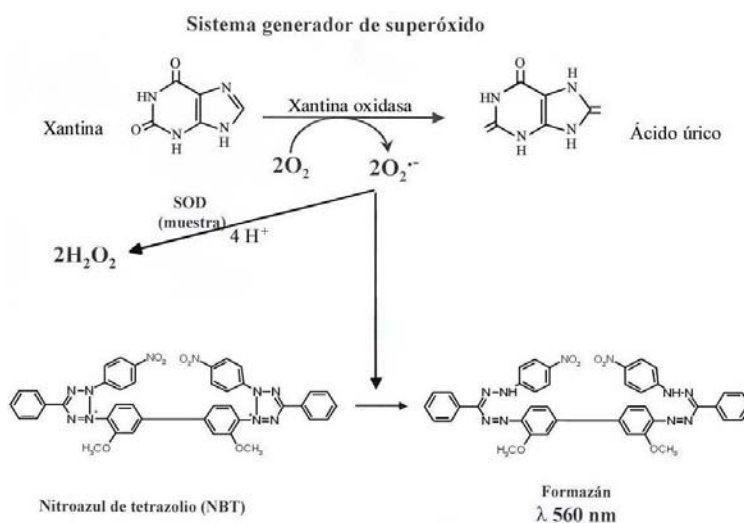


Figura 9.- Mecanismo para la medición de la actividad de SOD

3 PREPARACIÓN DE FeNTA y GSPE

3.1 Preparación de FeNTA

Se realizó una modificación de la técnica de Away [Away y cols., 1979]. Se prepara una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 120mM con la que se preparan una solución de nitrato de hierro (FeNO₃) 160mM y una solución de ácido nitrilotriacético, sal disódica 320mM. Se mezclan en proporción 1 parte de FeNO₃ con 2 partes de ácido nitrilotriacético. Se ajusta el pH a 7.4 con NaHCO₃ en polvo. Una vez mezcladas ambas soluciones se deben mantener protegidas de la luz, ya que el FeNTA es un compuesto fotolábil.

3.2 Preparación y administración de GSPE

Esta solución se prepara en base a la dosis y al peso de los animales. Por ejemplo, para el primer protocolo la dosis era de 100mg GSPE/Kg peso, para saber la cantidad de polvo que se debía pesar se sigue la relación:

100mg GSPE-----1000g rata

X-----200g rata X=20 mg GSPE para una rata de 200g,

La cantidad obtenida se multiplica por el número de animales que se deben administrar. A cada animal se le administra alrededor de 1.5-2 mL de extracto dependiendo de su peso. Por ejemplo si se tienen 10 ratas a las que se va a administrar el extracto se disuelven 200 mg de GSPE en 15 ml de agua. Se debe calentar un poco para disolver completamente el extracto.

El extracto se administró por vía intragástrica (ig) a diferentes dosis (100, 150, 175 y 200 mg/Kg peso corporal) durante 8,15,ó 25 días previo a la administración de FeNTA.

4 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.

VII RESULTADOS

1. ATRAPAMIENTO DE RADICAL SUPERÓXIDO

Para comprobar la capacidad antioxidante del GSPE, se probó su capacidad de atrapar radical superóxido mediante una modificación de la técnica de Oberley y Spitz [1984]. Se hicieron diluciones con diferentes concentraciones de GSPE (0-120 µg GSPE/mL) y se obtuvo una CI_{50} de 17.5 µg/mL (figura 10). Esto indica una buena capacidad antioxidante, ya que al evaluar la capacidad de atrapamiento de radical superóxido de la vitamina C, un antioxidante clásico, se encontró una CI_{50} de 120 µg/mL. Una vez evaluada la capacidad antioxidante del extracto se realizaron los protocolos experimentales.

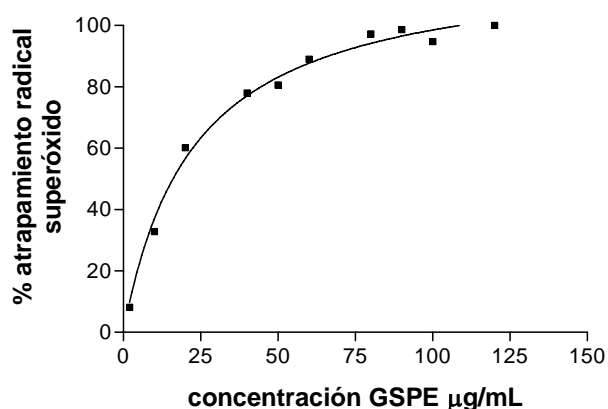


Figura 10.- Atrapamiento de radical superóxido con diferentes concentraciones GSPE.

2. PRUEBA PILOTO

En esta prueba se administró el carcinógeno ip a una dosis de 15 mg Fe^{3+} /Kg peso corporal y los animales se sacrificaron 1, 3, 6 y 9 horas después de la administración.

En la figura 11A se observa que una hora después de la inyección del carcinógeno, el daño oxidativo a proteínas aumenta más de tres veces respecto al control, siendo este el valor más alto de todos. Después de tres horas el valor disminuye hasta alcanzar el nivel control.

En la figura 11B es evidente el incremento del daño oxidativo a lípidos 1h después del tratamiento, mientras que a ninguno de los otros tiempos estudiados (3, 6 y 9 h) se encontraron diferencias con respecto al control. El H_2O_2 únicamente se detectó en el grupo de 1h (figura 11C) y este resultado apoya los resultados obtenidos en los otros marcadores.

Entonces, los resultados obtenidos con las determinaciones realizadas indican que el mayor estrés oxidativo se presenta una hora después de tratar a las ratas con el carcinógeno a una dosis de 15 mg de Fe^{3+} /Kg de peso corporal. Con base en esto, se decidió que para los protocolos experimentales se utilizará esta dosis y se sacrificarán a los animales una hora después de la administración del carcinógeno.

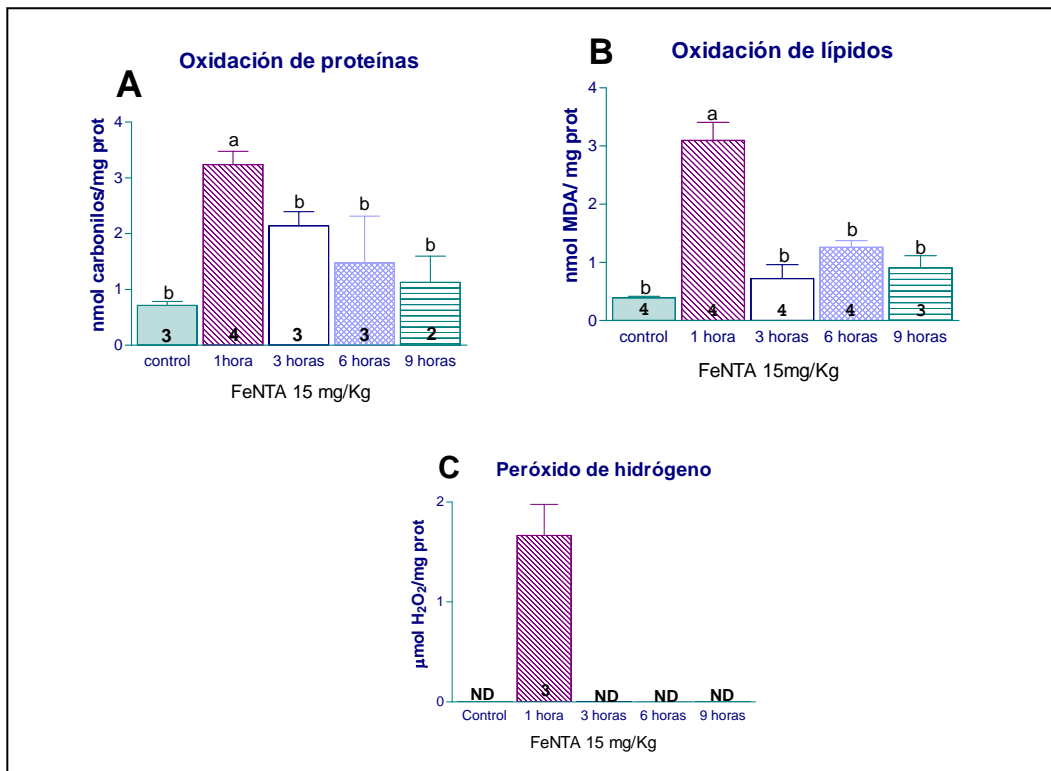


Figura 11.- Efecto de la administración de FeNTA (15mg Fe³⁺/Kg peso corporal) a diferentes tiempos en: oxidación de proteínas (A), oxidación de lípidos (B) y peróxido de hidrógeno (C) en corteza renal. Cada barra representa la media \pm EE. El valor de *n* está en la base de cada columna. Los grupos con letra diferente presentan diferencia estadística $p < 0.05$. ND= no detectado.

3. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

3.1 Protocolo I

En este protocolo la dosis del pretratamiento con GSPE fue de 100mg/Kg peso corporal administrada cada 24 horas durante 8 días por vía intragástrica. En la figura 12 está representado el peso de las ratas a lo largo del experimento. Los pesos de los grupos estudiados no fueron significativamente diferentes el día del sacrificio.

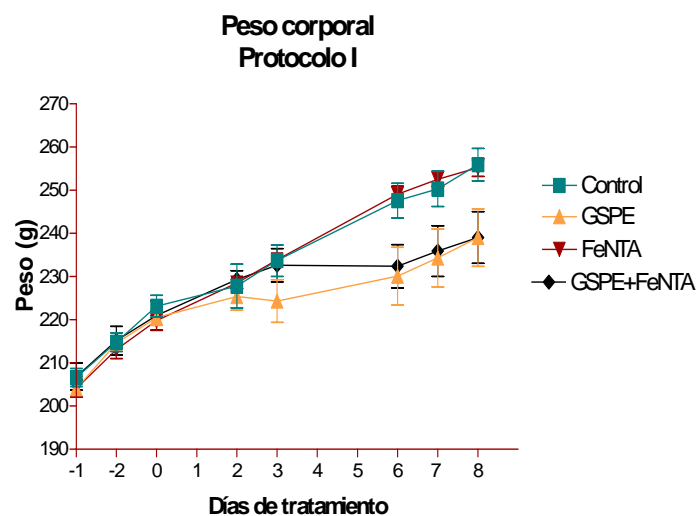


Figura 12.- Peso corporal de los diferentes grupos estudiados durante la administración del GSPE 100mg/Kg peso corporal/día (grupos GSPE y GSPE+FeNTA) o agua (grupos control y FeNTA). Cada punto representa la media de 5-7 datos \pm EE.

En la figura 13A se puede ver que la cantidad de proteínas oxidadas en los grupos GSPE y control es muy similar, y que en los grupos tratados con FeNTA y GSPE + FeNTA se presenta un aumento estadísticamente significativo, no habiendo diferencia entre ellos, lo que indica que el GSPE no ofrece protección contra el daño oxidativo a proteínas en este experimento. En los resultados de lipoperoxidación obtenidos (figura 13B), se observa que el tratamiento con GSPE no afecta los valores de MDA respecto al control, que en el grupo con FeNTA hay un incremento estadísticamente significativo en la oxidación de lípidos y que el GSPE ofrece protección parcial contra el daño oxidativo generado por el carcinógeno, ya que el grupo GSPE+FeNTA presenta una disminución estadísticamente significativa respecto al grupo FeNTA, pero sigue siendo diferente de los grupos control y GSPE. En la figura 13C están los resultados de la determinación de peróxido de hidrógeno, donde se ve que los grupos GSPE y control tienen valores similares entre ellos, mientras que los grupos FeNTA y GSPE + FeNTA presentan valores más altos, sin diferencia estadística entre ellos, en este caso el GSPE a la dosis utilizada no ofreció protección contra la producción de peróxido de hidrógeno. En resumen, podemos decir que la administración de 100mg GSPE/Kg peso corporal/día durante 8 días ofrece solo protección parcial contra la oxidación de lípidos y no ofrece protección contra la oxidación de proteínas o los niveles de peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, se realizó otro protocolo aumentando tanto la dosis del GSPE como el tiempo de administración.

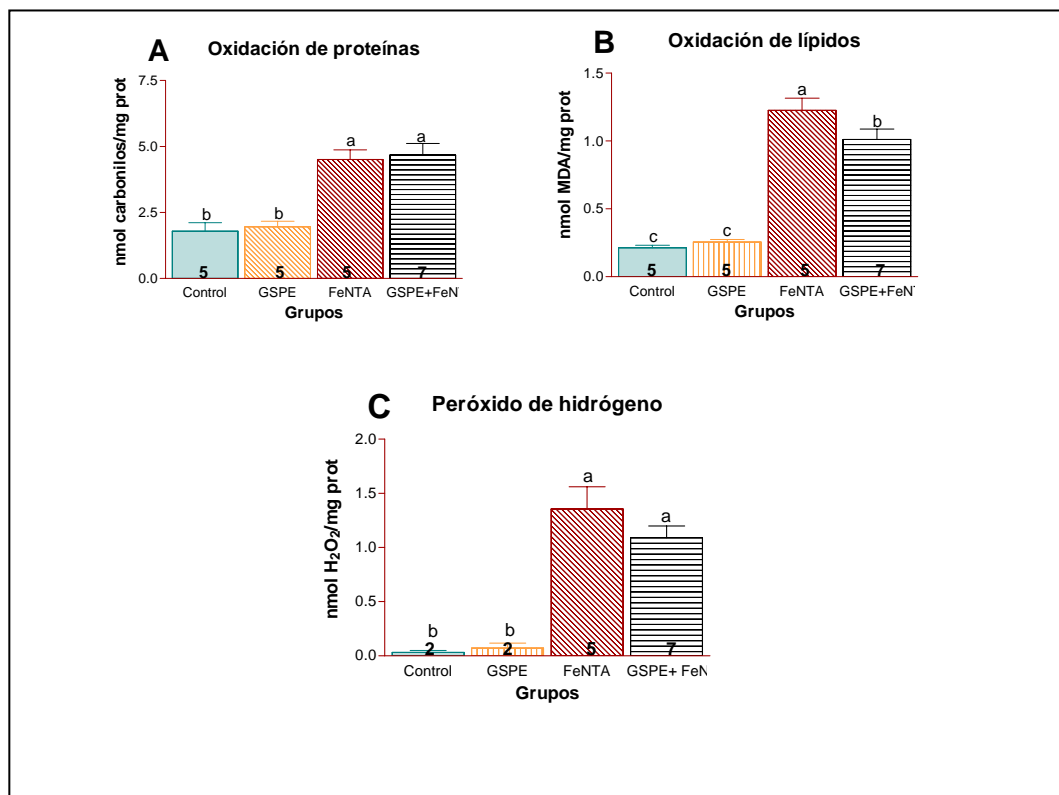


Figura 13.- Efecto del pre-tratamiento intragástrica (ig) con GSPE (100mg/Kg peso corporal/día) durante 8 días y la administración intraperitoneal (ip) de FeNTA (15 mg Fe³⁺/Kg peso corporal) en: oxidación de

proteínas (A), oxidación de lípidos (B) y peróxido de hidrógeno (C) en corteza renal. Cada barra representa la media \pm EE. El valor de n está en la base de cada columna. Los grupos con letra diferente presentan diferencia estadística $p < 0.05$

3.2 Protocolo II

En este protocolo se utilizó una dosis mayor de GSPE (150 mg/Kg peso corporal/día) y se administró por un período de 15 días antes de la administración del carcinógeno. En la figura 14 podemos ver el peso de los grupos estudiados a lo largo del protocolo, y vemos que no hubo diferencia entre los grupos el día del sacrificio. En la figura 15A se presentan los resultados de la determinación de proteínas oxidadas, donde podemos ver que el valor del grupo con GSPE es similar al del grupo control, el valor del grupo con FeNTA presenta diferencia estadística con respecto a los dos primeros grupos y el grupo con GSPE+FeNTA es estadísticamente diferente del grupo con FeNTA; no existe diferencia estadística con el grupo control, por lo que se puede decir que en este caso existe protección total del GSPE contra el daño por FeNTA. Los resultados de lipoperoxidación (figura 15B) muestran que el grupo con GSPE tampoco muestra diferencia estadística contra el grupo control en esta determinación. El FeNTA provoca un aumento estadísticamente significativo de la lipoperoxidación y el GSPE ofreció protección parcial contra este efecto ya que la disminución en el valor de lipoperoxidación es estadísticamente diferente del valor del grupo tratado con FeNTA, y es diferente de aquél del grupo con GSPE. En el caso del peróxido de hidrógeno, el grupo tratado con GSPE y el control tienen valores similares, el FeNTA incrementa la producción de peróxido con diferencia estadística y el GSPE evita ese aumento de manera parcial (figura 15C).

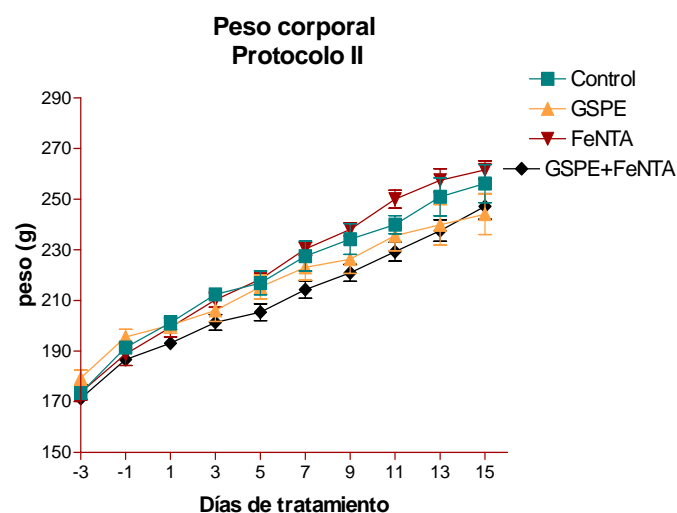


Figura 14.- Peso corporal de los diferentes grupos estudiados durante la administración del GSPE 150mg/Kg peso corporal/día (grupos GSPE y GSPE+FeNTA) o agua (grupos control y FeNTA). Cada punto representa la media de 5-7 datos \pm EE.

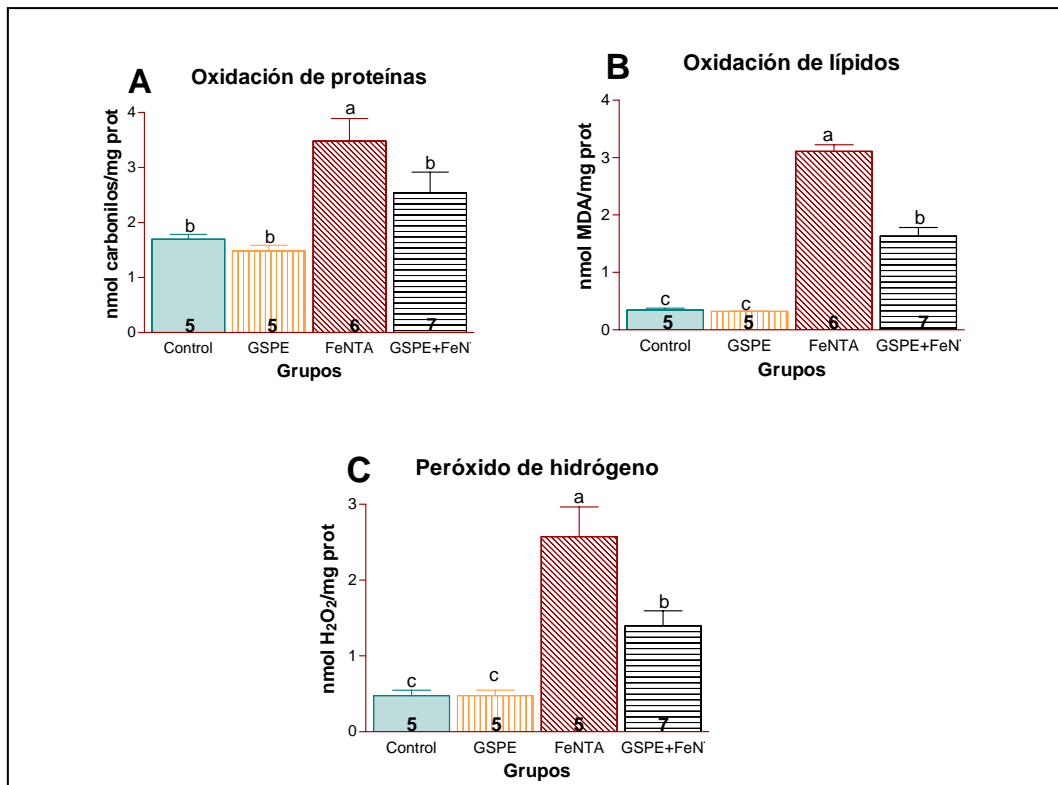


Figura 15.- Efecto del pretratamiento ig con GSPE (150mg/Kg peso corporal/día) durante 15 días y la administración ip de FeNTA (15mg Fe³⁺/Kg peso corporal) en: oxidación de proteínas (A), oxidación de lípidos (B) y peróxido de hidrógeno (C) en corteza renal. Cada barra representa la media \pm EE. El valor de *n* está en la base de cada columna. Los grupos con letra diferente presentan diferencia estadística $p < 0.05$

3.3 Protocolo III

Al haber encontrado protección total en uno de los parámetros en el protocolo anterior se pensó que si se aumentaba tanto la dosis como el tiempo de administración del GSPE se obtendría protección total en todos los marcadores, por lo que se utilizó la dosis de 200 mg/Kg peso corporal/día, administrando el antioxidante durante 25 días. En la figura 16 se observa el peso de los diferentes grupos durante el estudio, y al igual que en los otros protocolos no se observa diferencia significativa entre los grupos el día día sacrificio. En la figura 17A podemos ver los resultados de la determinación de proteínas oxidadas, donde todos los grupos presentan diferencia estadística entre si, es decir que el GSPE por sí solo aumentó la oxidación de proteínas; aunque en menor proporción que el FeNTA, y el GSPE ofreció protección parcial contra la oxidación producida por el carcinógeno en el grupo tratado con ambos compuestos. En cuanto a la lipoperoxidación (figura 17B) observamos que el grupo GSPE no es diferente del grupo control, el FeNTA provoca un aumento estadísticamente significativo de los valores de MDA, sin embargo, a diferencia de los protocolos anteriores, el pretratamiento con GSPE potenció la lipoperoxidación en el grupo GSPE + FeNTA. Este comportamiento se repite en la figura 17C donde se observa el contenido renal de peróxido de hidrógeno.

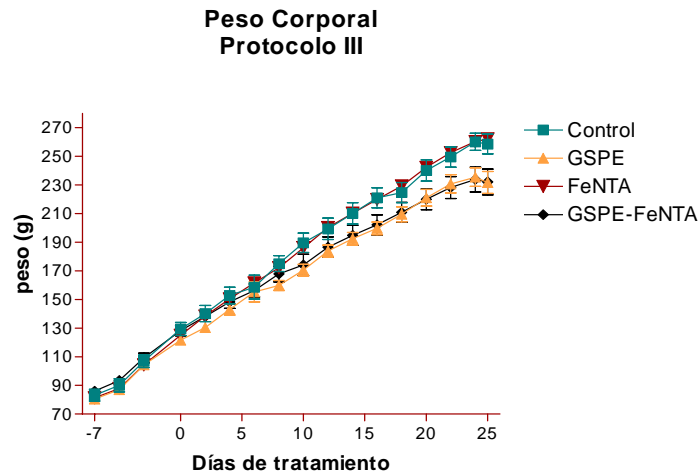


Figura 16.- Peso corporal de los diferentes grupos estudiados durante la administración del GSPE 200mg/Kg peso corporal/día (grupos GSPE y GSPE+FeNTA) o agua (grupos control y FeNTA). Cada punto representa la media de 5-7 datos \pm ES.

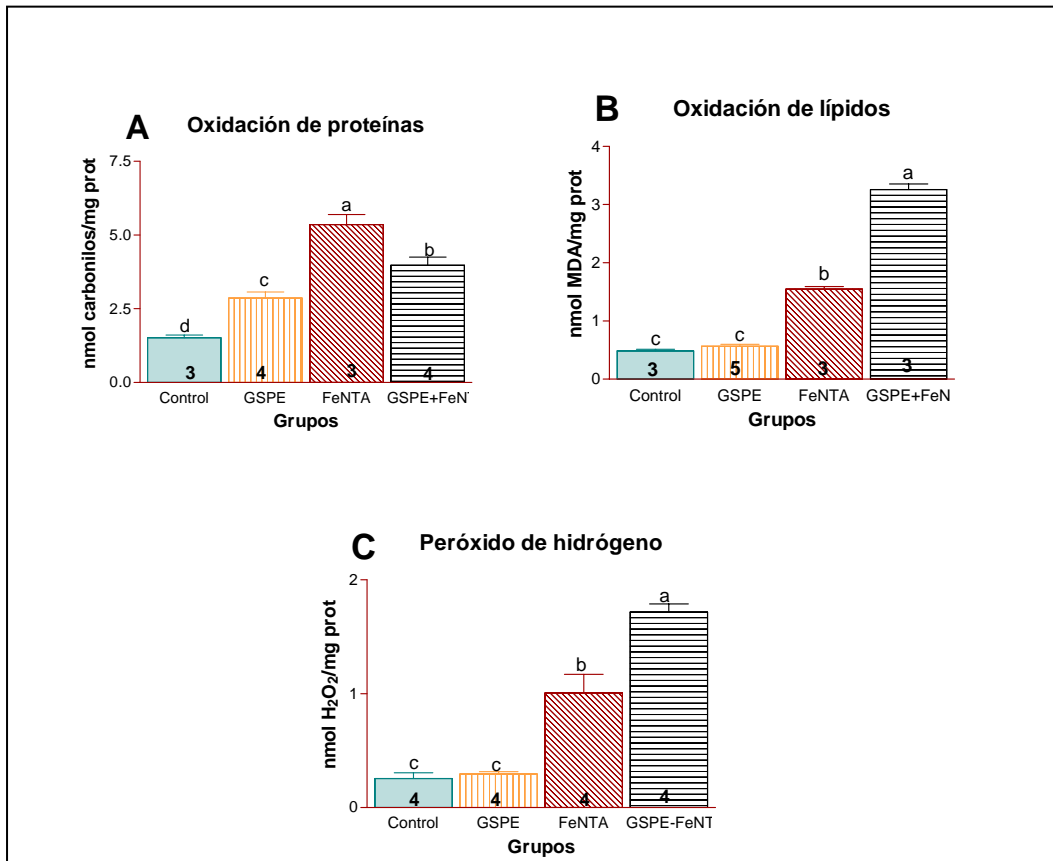


Figura 17.- Efecto del pretratamiento ig con GSPE (200 mg/Kg peso corporal/día) durante 25 días y la administración ip de FeNTA (15mg Fe³⁺/Kg peso corporal) en: oxidación de proteínas (A), oxidación de lípidos (B) y peróxido de hidrógeno (C) en corteza renal. Cada barra representa la media \pm ES. El valor de *n* está en la base de cada columna. Los grupos con letra diferente presentan diferencia estadística $p < 0.05$

3.4 Protocolo IV

Ya que con las condiciones del protocolo anterior se encontró un efecto prooxidante se decidió utilizar la dosis del protocolo II, que había dado los mejores resultados hasta el momento (150mg/Kg peso corporal/día), y dado que ya se había probado esta dosis a un tiempo corto, se

decidió aumentar el tiempo de administración a 25 días con el fin de mejorar los resultados obtenidos en dicho protocolo.

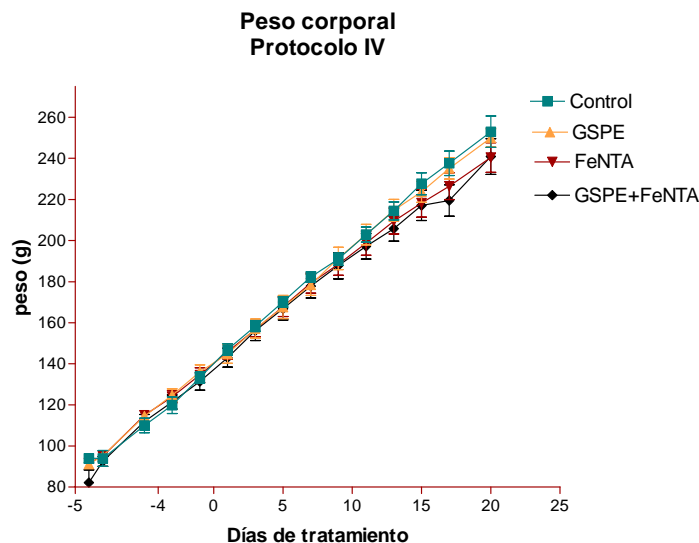


Figura 18.- Peso corporal de los diferentes grupos estudiados durante la administración del GSPE 150mg/Kg peso corporal/día (grupos GSPE y GSPE+FeNTA) o agua (grupos control y FeNTA). Cada punto representa la media de 5-7 datos \pm EE.

En la figura 18 podemos ver el peso de los grupos estudiados a lo largo del protocolo, y se aprecia que en este protocolo tampoco hubo diferencia significativa entre los grupos el día del sacrificio. En la figura 19A se presentan los resultados de la determinación de proteínas oxidadas, donde podemos ver que no hay diferencia estadística entre los valores de los grupos GSPE y control, que el valor del grupo con FeNTA presenta diferencia estadística respecto a los dos primeros grupos y que se obtiene protección parcial con el GSPE contra el daño oxidativo inducido por el FeNTA. Los resultados de lipoperoxidación (figura 19B) muestran que el grupo tratado con GSPE no es estadísticamente diferente del grupo control, que el FeNTA provoca un aumento estadísticamente significativo de la lipoperoxidación y que el GSPE ofreció protección parcial contra este efecto, ya que el valor de lipoperoxidación es estadísticamente menor que el del grupo tratado con FeNTA, pero aún diferente del control. En el caso del peróxido de hidrógeno (figura 19C), no se detectó este compuesto en los grupos GSPE y control; por otro lado, los grupos FeNTA y GSPE+FeNTA presentaron valores similares y mayores que los de los otros dos grupos, por lo que se concluye que en este caso el GSPE no ofreció protección contra la elevación del peróxido de hidrógeno tisular inducido por FeNTA.

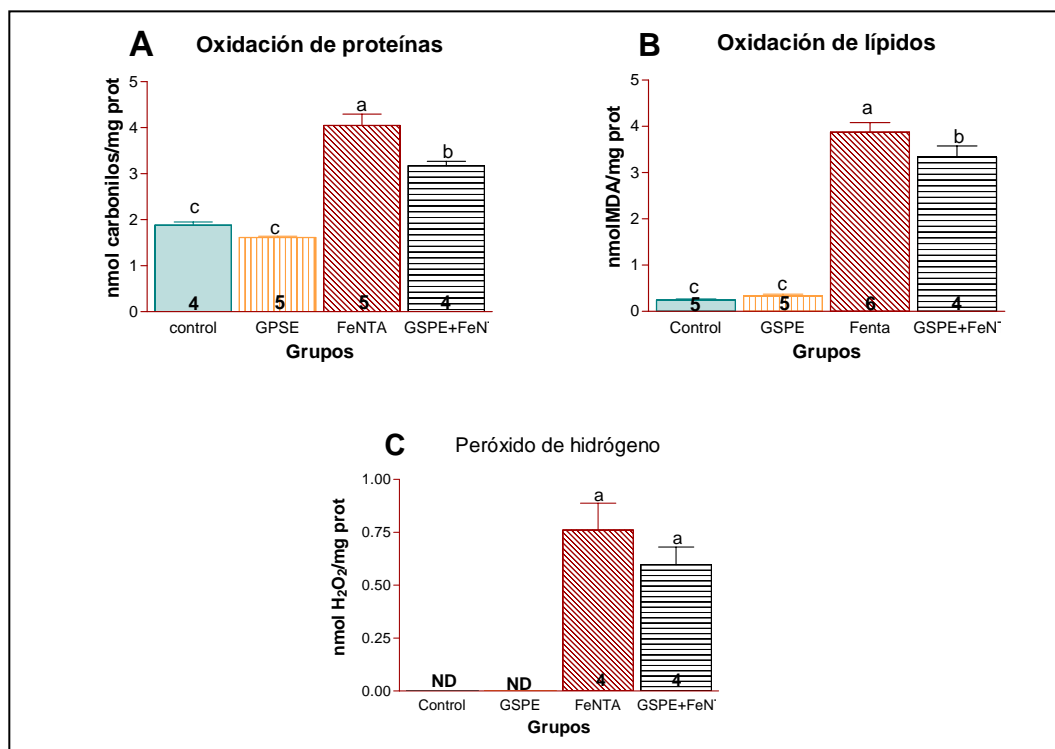


Figura 19.- Efecto del pretratamiento ig con GSPE (150mg/Kg peso corporal/día) durante 25 días y la administración ip de FeNTA (15mg Fe³⁺/Kg peso corporal) en: oxidación de proteínas (A), oxidación de lípidos (B) y peróxido de hidrógeno (C) en corteza renal. Cada barra representa la media \pm ES. El valor de n está en la base de cada columna. Los grupos con letra diferente presentan diferencia estadística $p < 0.05$. ND= no detectado

3.5 Protocolo V

Como no se obtuvo una mejoría en la protección antioxidante en el protocolo anterior con respecto al protocolo II, se decidió aumentar la dosis de GSPE a 175 mg/Kg peso corporal/día y utilizar el tiempo de administración que había funcionado mejor (15 días). En la figura 20 podemos ver el peso de los grupos estudiados a lo largo del protocolo y, al igual que en los protocolos anteriores, no hay diferencia significativa entre los grupos el día del sacrificio. En la figura 21A se puede observar que en la determinación del daño oxidativo a proteínas el grupo con GSPE no es diferente del grupo control, el grupo con FeNTA tiene un valor estadísticamente mayor contra el grupo control y se observa protección parcial contra el carcinógeno con GSPE. Los resultados de lipoperoxidación (Figura 21B) muestran que el grupo de GSPE no tiene diferencia estadística respecto al control, mientras que en el grupo tratado con FeNTA se incrementa el valor de lipoperoxidación, presentando diferencia estadística; el GSPE también ofreció protección parcial contra este daño. En la figura 21C se presentan los resultados de la determinación de peróxido de hidrógeno y se observa que los grupos GSPE y control no presentan diferencia entre ellos, y que el GSPE no ofreció protección contra el FeNTA, ya que los valores de ambos grupos no son estadísticamente diferentes.

En ningún esquema de tratamiento evaluado se encontró protección total en todos los parámetros como se deseaba, entonces se procedió a realizar la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes y de la activación del factor de transcripción NF- κ B en el último protocolo.

Los resultados de la actividad de las enzimas antioxidantes se muestran en la figura 22. Aquí se observa que la actividad de la catalasa no cambia en el grupo de GSPE respecto al grupo control (figura 22A), pero es estadísticamente menor en el grupo de FeNTA, mientras que con el GSPE no se observó ningún efecto sobre esta alteración. Los resultados de la determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa están en la figura 22B, donde se observa que el GSPE provoca un aumento estadísticamente significativo en la actividad de esta enzima respecto al grupo control, y que los grupos con FeNTA y GSPE + FeNTA no presentan diferencia estadística respecto al control (figura 22B). Por último, los resultados de la determinación de la actividad de la superóxido dismutasa total (figura 21C) muestran que en el grupo GSPE la actividad de esta enzima es estadísticamente menor respecto al control, en el grupo con FeNTA la actividad de la enzima presenta un incremento estadísticamente significativo respecto al control y el GSPE no tiene efecto alguno sobre esta alteración.

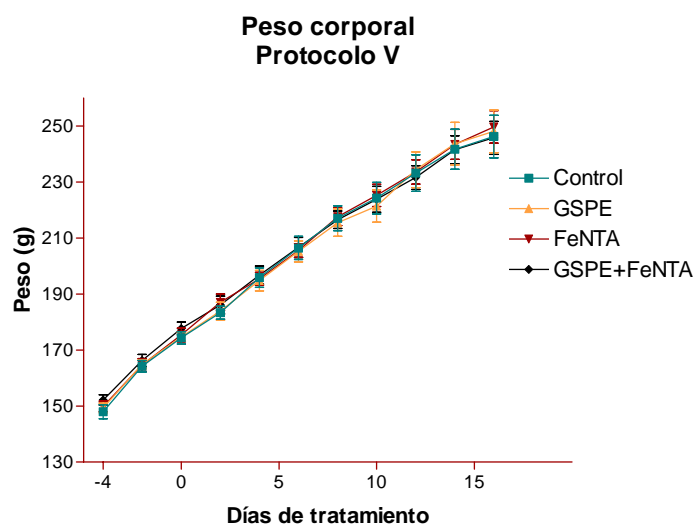


Figura 20.- Peso corporal de los diferentes grupos estudiados durante la administración del GSPE 175 mg/Kg peso corporal/día (grupos GSPE y GSPE+FeNTA) o agua (grupos control y FeNTA). Cada punto representa la media de 5-7 datos \pm EE.

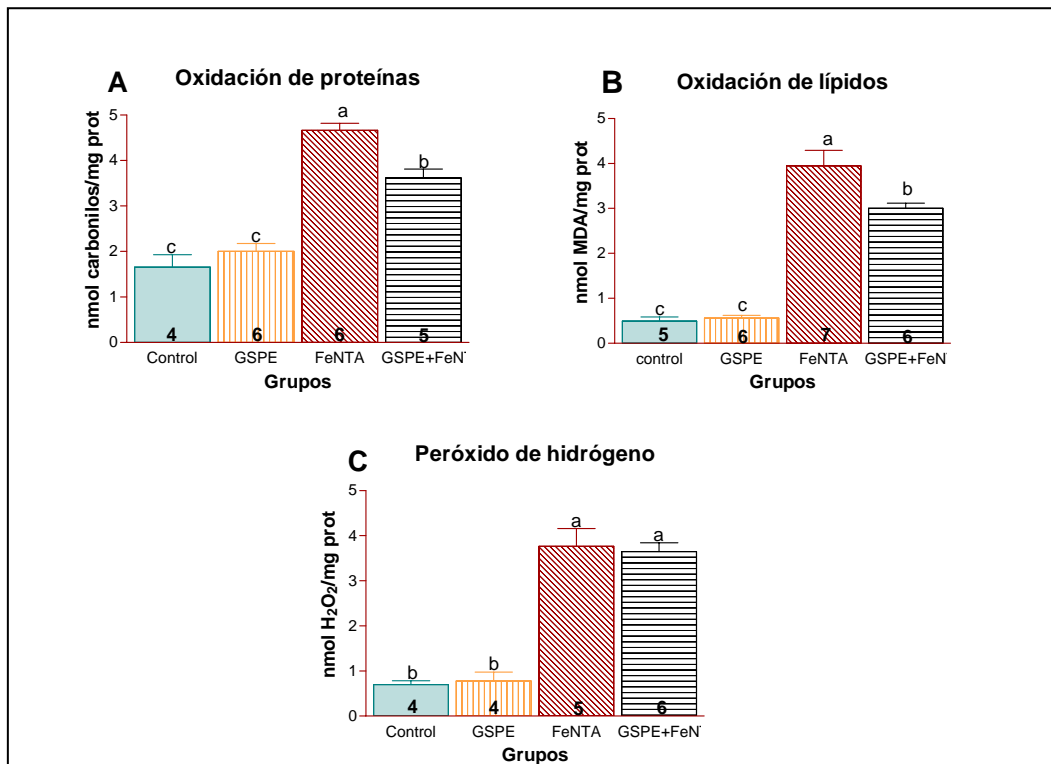


Figura 21.- Efecto del pretratamiento ig con GSPE (175mg/Kg peso corporal/día) durante 15 días y la administración ip de FeNTA (15mg Fe³⁺/Kg peso corporal) en: oxidación de proteínas (A), oxidación de lípidos (B) y peróxido de hidrógeno (C) en corteza renal. Cada barra representa la media \pm EE. El valor de *n* está en la base de cada columna. Los grupos con letra diferente presentan diferencia estadística $p < 0.05$

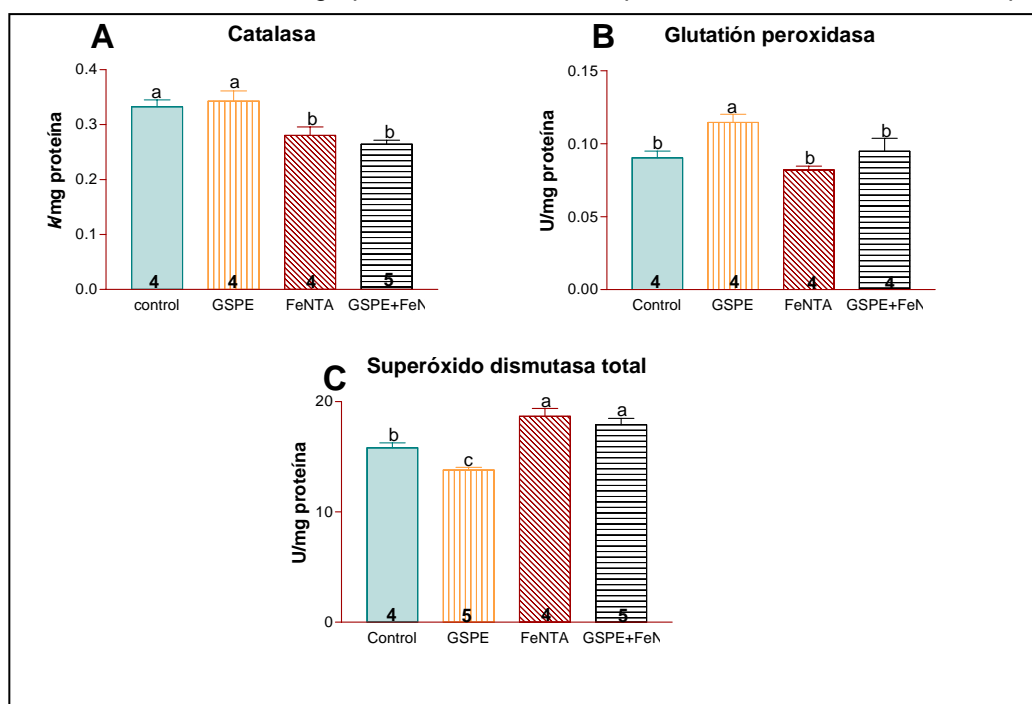


Figura 22.- Efecto del pretratamiento con GSPE (175mg/Kg peso corporal/día) durante 15 días y la administración ip de FeNTA (15mg Fe³⁺/Kg peso corporal) en la actividad renal de las enzimas antioxidantes catalasa (A), glutatión peroxidasa (B) y superóxido dismutasa (C). Cada barra representa la media \pm ES. El valor de *n* está en la base de cada columna. Los grupos con letra diferente presentan diferencia estadística $p < 0.05$

La determinación de la activación del factor de transcripción NF- κ B se llevó a cabo de manera indirecta midiendo mediante la técnica de Western Blot la cantidad de I κ B- α , inhibidor del factor de transcripción, el cuál cuando se degrada libera a NF- κ B; también se determinó la cantidad de actina como control de expresión interna y como control positivo se utilizó I κ B expresado en *E coli*

como una proteína de fusión de 62 KDa (Santa Cruz #cat sc-4094). Se encontró que no hay diferencia significativa en la cantidad de I κ B- α entre los cuatro grupos analizados (figura 23), por lo que se puede sugerir que el FeNTA en las condiciones del presente estudio no modifica la degradación de I κ B- α

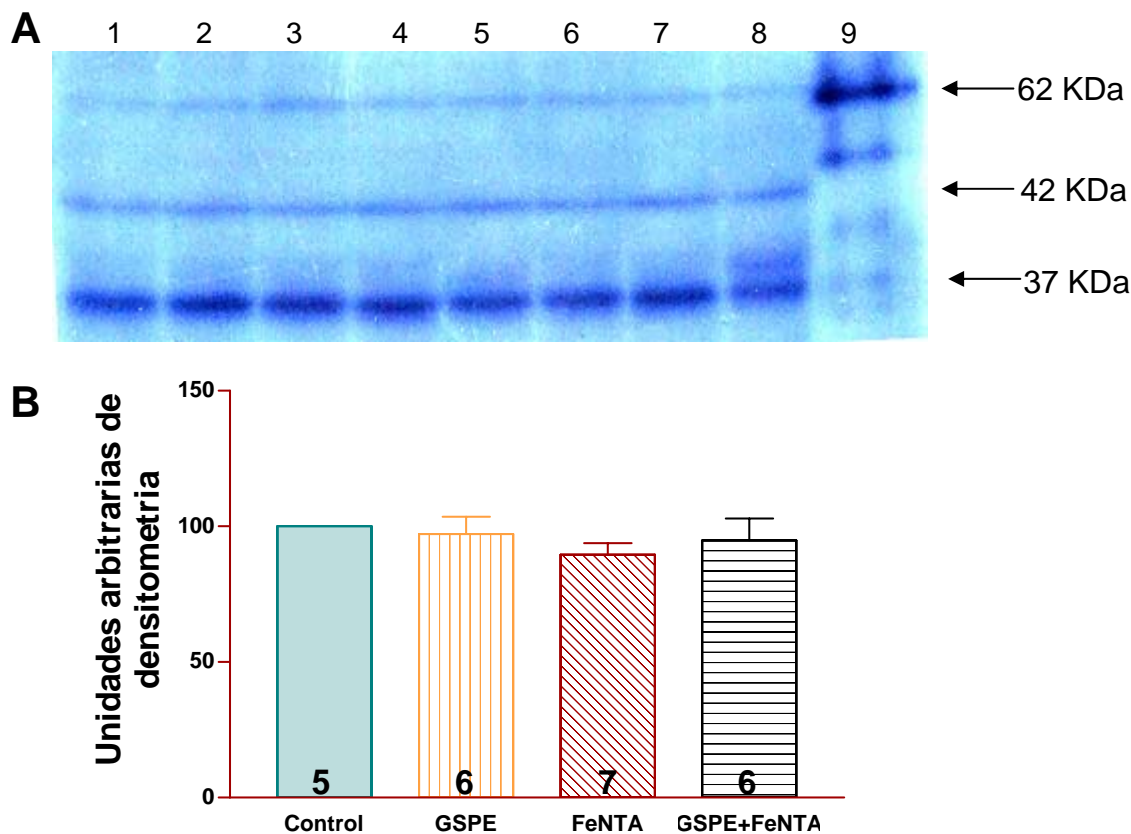


Figura 23.- Determinación de los niveles de expresión de I κ B (37KDa) y actina (42KDa) mediante la técnica de Western blot. Carriles 1 y 2 control, 3 y 4 GSPE, 5 y 6 FeNTA 7 y 8 GSPE+FeNTA. Carril 9 control positivo de I κ B, (proteína de fusión 62KDa) El panel A muestra una imagen representativa de los experimentos realizados. Analisis densitométrico de la determinación de la cantidad de I κ B por la técnica de Western Blot (B) Cada barra representa la media \pm ES. El valor de *n* está en la base de cada columna. Los grupos con letra diferente presentan diferencia estadística $p < 0.05$

VIII DISCUSIÓN

El cáncer renal da lugar a una alta mortalidad debido, en gran parte, a que no se puede detectar en etapas tempranas. El modelo experimental más utilizado para su estudio es el de cáncer de células renales inducido por FeNTA, en cuyo mecanismo de acción parece jugar un papel importante el estrés oxidativo, sin embargo, no ha sido completamente caracterizado. Se ha demostrado que los polifenoles tienen mayor capacidad antioxidante que muchos de los antioxidantes más estudiados, por lo que se consideró atractivo estudiarlos en el presente trabajo.

Estos compuestos se encuentran en muchas frutas y verduras de consumo humano, como la uva. No existen datos en la literatura donde, utilizando un extracto de semillas de uva contra el daño oxidativo por FeNTA, se evalúe la disminución de marcadores clásicos de estrés oxidativo como el daño oxidativo a proteínas, o factores de riesgo al desarrollo de cáncer como el daño oxidativo a lípidos y la producción de peróxido de hidrógeno. Tampoco se han evaluado los mecanismos moleculares posiblemente involucrados en el desarrollo del cáncer renal en este modelo, por lo que el presente trabajo contribuye a la caracterización del modelo de FeNTA y a la búsqueda de una posible ruta de prevención del daño oxidativo que puede llevar al desarrollo de cáncer de células renales.

Para comprobar la efectividad del GSPE como antioxidante se determinó su capacidad de atrapar radical superóxido *in vitro* (figura 11), encontrándose una CI_{50} de 17.5 $\mu\text{g/mL}$. Esto indica que el GSPE tiene una buena capacidad antioxidante, ya que se evaluó la capacidad de atrapar radical superóxido de la vitamina C y se encontró una CI_{50} de 120 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados coinciden con los reportados por Bagchi y cols. [2002b], quienes han informado que el GSPE tiene mejor capacidad antioxidante que las vitaminas C, E y el β -caroteno *in vitro*. Una vez evaluada esta capacidad atrapadora del GSPE se procedió a realizar los estudios *in vivo*.

En la prueba piloto se observó que 1 hora después de administrar el carcinógeno, los valores de la oxidación de lípidos, proteínas y producción de peróxido se incrementan; esto coincide con los estudios realizados por Umemura y cols. [1990b] y Qi y cols. [1999], quienes, utilizando la misma dosis de FeNTA que se usó en el presente estudio, observaron un incremento en la oxidación de lípidos. Entre las teorías que explican este efecto oxidativo del FeNTA sobre las biomoléculas, se ha propuesto que el Fe^{3+} es reducido a Fe^{2+} por productos de degradación del glutatión. Esto puede inducir la reacción de Fenton-Haber Weiss para producir radical hidroxilo que induce, a su vez, la oxidación de lípidos [Umemura y cols., 1990b]. También se ha propuesto que el FeNTA inhibe la acción de la NADPH quinona reductasa, por lo que se pueden oxidar las proteínas [Iqbal y cols., 1999].

Por otro lado, se observó que, conforme pasa el tiempo, disminuye el daño oxidativo a las biomoléculas y la cantidad de peróxido de hidrógeno. Toyokuni y cols. [1994] encontraron un comportamiento similar al determinar productos de oxidación de lípidos a diferentes tiempos después de administrar FeNTA a la misma dosis utilizada en este trabajo. Uchida y cols. [1995], por su parte, también encontraron un comportamiento similar en la oxidación de lípidos y de proteínas. La disminución en los marcadores de estrés oxidativo entre una y tres horas indica que paulatinamente los productos de lipoperoxidación, como el MDA, o las proteínas que fueron dañadas, son eliminados del organismo, y que los niveles de peróxido de hidrógeno son abatidos por los mecanismos de detoxificación de este compuesto. Con base en todos estos resultados, en

todos los protocolos experimentales ensayados los animales se sacrificaron una hora después de la administración de FeNTA.

En el protocolo I se administró la dosis de GSPE más frecuentemente utilizada en la literatura en otros modelos (100 mg GSPE/Kg peso corporal/ día durante 7 días) [Ray y cols., 1999; 2000; 2000b; Bagchi y cols., 2001, Vinson y cols., 2002] y pudimos ver que bajo estas condiciones de tratamiento el GSPE solo previno el daño oxidativo a lípidos provocado por FeNTA, pero no protegió contra la oxidación de proteínas ni contra la producción de peróxido de hidrógeno. Esto podría deberse a que la oxidación de lípidos dispara reacciones en cadena que amplifican el daño final a estas biomoléculas [Halliwell y Chirico 1993], lo que resulta en una mayor sensibilidad en la detección de cambios en la oxidación de los lípidos que en los otros parámetros. Es decir, la cantidad de flavonoides administrada en esta dosis provocó la disminución de la cascada de lipoperoxidación [Bravo 1998]; sin embargo, no fue suficiente para disminuir el daño a proteínas. Por lo tanto, para obtener una mayor protección contra el daño oxidativo por FeNTA se decidió incrementar tanto la dosis como el tiempo de administración del antioxidante.

En el protocolo II, con una dosis de 150 mg GSPE/ Kg peso corporal/ día durante 15 días, vemos que el GSPE previno el daño oxidativo en todos los parámetros, otorgando incluso protección total contra el daño oxidativo a proteínas, y una protección notable en lipoperoxidación (47%) y en los niveles de peróxido de hidrógeno (46%). Aún así, la protección siguió siendo parcial en estos dos últimos parámetros. En el caso de los lípidos, se puede especular que obtener una protección total en su oxidación resulta difícil, ya que los radicales generados en el mismo proceso de lipoperoxidación pueden oxidar otros lípidos. Las proteínas por su parte, al no seguir un mecanismo en cascada pueden presentar una protección total más fácilmente. En el peróxido de hidrógeno la dosis de FeNTA produce tal cantidad de esta ERO que las condiciones de tratamiento con el GSPE en este protocolo no son aún suficientes para disminuirlo a nivel basal.

El hecho de encontrar protección total en uno de los parámetros nos llevó a pensar que, si se incrementaba una vez más la dosis y el tiempo de administración del antioxidante se obtendría protección total en los tres parámetros determinados. Por lo tanto, en el protocolo III se utilizó una dosis de 200mg GSPE/Kg peso corporal/día durante 25 días. Los resultados no fueron los esperados, ya que el GSPE potenció la oxidación de lípidos provocada por FeNTA, así como la producción de peróxido de hidrógeno. Estos resultados indican que la dosis utilizada en este protocolo fue demasiado alta, resultando en un efecto pro-oxidante sobre los lípidos y la producción de peróxido de hidrógeno. Diferentes autores han reportado que los polifenoles en altas concentraciones pueden actuar como prooxidantes [Bravo 1998; Yang y cols., 2001; Galati y cols., 2004], esto puede deberse a que los polifenoles quelan moléculas de hierro [Murray 1999], y si bien esto puede ayudar a su capacidad antioxidante, también puede contribuir a que tengan

un efecto pro-oxidante [Yang 2001]. Esto se debe a que el GSPE puede interactuar con el Fe^{3+} del FeNTA reduciéndolo a Fe^{2+} , este a su vez puede reaccionar con el oxígeno. Los productos de esta reacción son anión superóxido y Fe^{3+} , formándose así un ciclo redox [Lee y Lee 2006]. El anión superóxido puede incrementar la lipoperoxidación, y producir peróxido de hidrógeno gracias a la acción de la SOD [Lee y Lee 2006]. Se ha demostrado también que la auto-oxidación de algunos polifenoles genera radicales semiquinonas, lo que puede resultar en el incremento de la producción de ERO, entre ellas peróxido de hidrógeno [Akagawa y cols., 2003; Lee y Lee 2006; Maeta y cols., 2007]. De hecho, en el caso de la oxidación de proteínas se observó que el GSPE por sí solo induce este daño oxidativo; por otro lado en esa misma determinación vemos que el GSPE disminuye el daño provocado por FeNTA, por lo que se puede especular que al encontrarse en exceso una parte del GSPE bloquea efectivamente el daño a proteínas inducido por FeNTA.

Al haber encontrado ya un efecto prooxidante, se decidió disminuir la dosis del GSPE en el protocolo IV, por lo que se utilizó la dosis del protocolo II (150 mg GSPE/Kg peso corporal), ya que era la que hasta el momento había dado mejores resultados, y se pensó que al aumentar el tiempo de administración a 25 días se podrían superar los resultados obtenidos en ese protocolo. Con estas condiciones de tratamiento solo se obtuvo protección parcial en la oxidación de lípidos y de proteínas, pero no hubo protección en contra la producción de peróxido de hidrógeno.

Como no se obtuvo la protección deseada con las condiciones anteriores, se decidió realizar un quinto protocolo aumentando un poco la dosis, pero sin llegar a los 200 mg/Kg peso para evitar el daño oxidativo por GSPE, por lo que se utilizó una dosis de 175 mg GSPE/Kg peso corporal/día. Además, en vista de que el tiempo de administración largo no proporcionó buenos resultados, se decidió administrar el antioxidante durante 15 días, que fue el tiempo de administración que había dado mejores resultados (protocolo II). En este protocolo V se encontraron resultados similares a los obtenidos en el protocolo IV, es decir, protección parcial contra la oxidación de lípidos y proteínas, pero ninguna protección contra la producción de peróxido de hidrógeno.

El GSPE fue capaz de disminuir el daño oxidativo a las proteínas en tres de los cinco protocolos realizados, por lo que se puede decir que su capacidad de prevenir este daño oxidativo se da dentro de un cierto rango de dosis. Por otro lado, bajo todas las condiciones estudiadas, excepto en aquellas del protocolo III (200 mg/Kg peso corporal/ 25 días), se encontró protección parcial contra la oxidación de lípidos, por lo que podemos concluir que, el GSPE puede proteger contra el riesgo al desarrollo de cáncer, ya que se ha demostrado que existe una relación entre este y la oxidación de lípidos [Umemura y cols., 1996; Burcham 1998; Valko y cols., 2006; Gago-Dominguez y cols., 2002], el GSPE puede proteger contra este riesgo. En cuanto al peróxido de hidrógeno, otro factor de riesgo para el desarrollo de cáncer [Khan y Wilson 1995; Meves y cols., 2001; Loo G 2003], solo bajo una de las condiciones estudiadas (150 mg GSPE/Kg peso

corporal/día durante 15 días) se encontró protección parcial. Esto nos lleva a decir que el GSPE sí ofrece protección contra este factor de riesgo a la carcinogénesis, pero solo en un estrecho rango de dosis. El hecho de que los niveles de peróxido de hidrógeno no hayan disminuido significativamente en los grupos de GSPE+FeNTA en las otras condiciones estudiadas, pero sí el daño oxidativo a lípidos y proteínas, se puede deber a que el GSPE probablemente atrapa ERO como el anión superóxido o el radical hidroxilo más eficientemente que al peróxido de hidrógeno. Esta es la primera vez que se reporta el efecto del GSPE en los niveles de peróxido de hidrógeno en un modelo *in vivo*. Otro aspecto importante del presente trabajo es que es la primera vez que se reporta el efecto de un antioxidante en el daño oxidativo a proteínas provocado por FeNTA. Este parámetro se utiliza en la literatura para mostrar el daño oxidativo que provoca el carcinógeno [Iqbal y cols., 1999, Nagasawa y cols., 1997], pero en los trabajos publicados donde se utilizan antioxidantes no se reporta el efecto de estos antioxidantes sobre el daño oxidativo a proteínas, y fue precisamente en este parámetro donde en el presente trabajo se encontró la protección total del antioxidante.

Al no haber encontrado una protección total en todos los parámetros estudiados bajo ninguna de las condiciones de tratamiento con el antioxidante como se buscaba, en el último protocolo, donde se encontró una buena protección, se decidió medir las actividades de las enzimas CAT, GPx y SOD, con el fin de conocer el estado de algunas defensas antioxidantes, así como la activación del factor de transcripción NF- κ B como posible mecanismo molecular involucrado en la carcinogénesis por FeNTA.

En cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes se encontró que la actividad de CAT no cambia con el antioxidante, el FeNTA la disminuye y el antioxidante no fue capaz de recuperarla. Esta observación es muy interesante, ya que se ha visto que los niveles de la enzima se encuentran disminuidos en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer renal de células claras [Oberley y Oberley 1997]; más aún, se ha visto que esta disminución incrementa el riesgo al desarrollo de cáncer de mama [Ahn y cols., 2005; Valko y cols., 2006]. Lo más interesante de esta observación es que en el presente estudio se trabajó con un carcinógeno renal administrado de manera aguda y, al igual que en los reportes de la literatura antes mencionados, se encontró una disminución en la actividad de CAT, lo que puede indicar que esta alteración es un factor de riesgo al desarrollo de cáncer desde etapas tempranas. En el caso de la actividad de GPx, se encontró un aumento en el grupo tratado solo con GSPE, pero el carcinógeno no altera su actividad. Se ha propuesto que la GPX es una defensa antioxidante importante a bajos niveles de estrés oxidativo [Valko y cols., 2006], por lo que se puede pensar que el GSPE en las condiciones de este protocolo puede estar incrementando ligeramente los niveles de estrés lo que llevó a la activación de la enzima. Sin embargo, en diferentes modelos de estrés oxidativo el comportamiento de la actividad de esta enzima es controversial. Por ejemplo, se ha visto que la

actividad de GPx baja en el cerebro de ratones tratados con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), un compuesto que induce estrés oxidativo [Chen y cols., 2007]. Por otro lado, Iqbal y cols. [1998] e Iqbal y Athar [1999] encontraron que el FeNTA disminuye la actividad de GPX, pero estos resultados no concuerdan con los resultados del presente trabajo, ya que nosotros no encontramos alteración en la actividad de la enzima por FeNTA. Sin embargo, en ambos sacrificaron a los animales a tiempos más largos del utilizado en el presente estudio, lo que podría indicar que el cambio en la actividad de esta enzima no se aprecia a tiempos cortos. En un estudio donde se utilizó un extracto de un hongo de la familia de los basidiomicetos contra el daño por FeNTA, se encontró que la actividad de GPx se incrementa 12 horas después de la administración del compuesto [Ye y cols., 2003]. En estas inconsistencias pueden estar involucrados el tipo de estrés oxidativo y el tiempo al que se realizaron los estudios. Estos resultados, aunados a los del presente trabajo parecen indicar que el comportamiento de GPx no es muy constante en este modelo. Por último, la actividad de SOD disminuyó en el grupo con GSPE, y el FeNTA la incrementó. En un estudio donde se vio el efecto del ejercicio continuo en músculo esquelético de rata, se encontró que la actividad de esta enzima se incrementa como resultado del estrés oxidativo inducido por el ejercicio [Pinho y cols., 2006]. Se sabe que el FeNTA es capaz de generar anión superóxido [Preece y cols., 1989], por lo que también podría inducir el aumento de la actividad de esta enzima. Interesantemente, en otro estudio en pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, Kaynar y cols., [2005] encontraron que el nivel de SOD se incrementa con respecto al control, lo cual podría indicar que el incremento de la actividad de esta enzima es un factor que está relacionado con el riesgo al desarrollo de cáncer. El GSPE no es capaz de recuperar las alteraciones en la actividad de CAT ni de SOD. No se puede descartar un posible efecto del GSPE en la alteración de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD, ya que este se puede dar a un tiempo más largo [Iqbal y cols., 1998, Iqbal y Athar 1999].

En cuanto a la activación del factor de transcripción NF- κ B, se encontró que ninguno de los dos compuestos altera la cantidad de I κ B, que es una medida indirecta de la activación de NF- κ B. Por otro lado, en este estudio se evaluó la expresión de I κ B- α , sin embargo I κ B es toda una familia de proteínas entre las que se encuentran I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ e I κ B- γ . Cada una de estas proteínas inhibe un dímero diferente de proteínas que componen a NF- κ B, I κ B- α inhibe el dímero compuesto por Rel A y c-Rel [Magnani y cols., 2000], por lo que se puede sugerir que en este caso no se está activando este dímero en particular y es por ello que no vemos un cambio en la cantidad de I κ B- α , aunque no se puede descartar la posibilidad de que otro(s) dímero(s) se activen, por lo que sería interesante medir otros componentes de la familia de I κ B. Se esperaba ver cambios a tiempos cortos ya que Pocock y cols. [2003] realizaron un estudio donde determinaron la activación de NF- κ B en glomérulos de ratas Wistar tratadas con LPS, lo que provocó el incremento de la activación del factor desde una hasta 6 horas después de la inyección del compuesto. Oya y cols. [2001] determinaron la activación de NF- κ B en diferentes líneas

celulares de cáncer de células renales expuestas al ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) y encontraron que NF- κ B se activa a partir de los 30 minutos posteriores a la incubación con TRAIL. No existen trabajos publicados en los que se estudie el comportamiento a diferentes tiempos activación de NF- κ B en el modelo de carcinogénesis por FeNTA, con los resultados del presente estudio se puede decir que una hora después de la administración de FeNTA no se detecta ningún cambio en la cantidad de esta proteína, sin embargo, no se puede descartar como mecanismo, ya que este puede activarse a tiempos más largos o bien podrían estar involucrados otros dímeros. Otra estrategia que sería útil para evaluar efectivamente la activación de este factor de transcripción es la técnica de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), en la que el factor de transcripción activado presenta un reterdo en el corrimiento electroforético respecto al factor no activado.

Ya se han utilizado algunos antioxidantes como vitamina E, melatonina, resveratrol y aceite de ajo para disminuir el daño causado por FeNTA, y se ha encontrado que estos antioxidantes inhiben la lipoperoxidación, la formación de aductos oxidativos de DNA con productos de lipoperoxidación y el desarrollo de cáncer en riñones [Zhang y cols., 1997; Okada 2003; Matos y cols., 2000]. Qi y cols. [1999] utilizaron diferentes concentraciones de melatonina para prevenir el daño producido por FeNTA, y encontraron una disminución total de la oxidación de lípidos cuando se administró la melatonina en una dosis de 50 mg/Kg peso 30 min antes de la inyección de FeNTA. Estos autores encontraron un aumento de lipoperoxidación por FeNTA de 1.5 veces respecto al control y una disminución por el antioxidante es de 1.7 veces respecto al grupo con FeNTA. Iqbal y cols. [1998] por su parte, encontraron que el FeNTA incrementa la lipoperoxidación 1.9 veces respecto al control y la vitamina E disminuye este daño 0.78 veces respecto al grupo con FeNTA, esto representa una protección parcial. Por otro lado, en 1999 Iqbal y Athar utilizaron aceite de ajo para disminuir el daño oxidativo por FeNTA y encontraron que el valor de lipoperoxidación se incrementa 1.6 veces con el FeNTA y que el aceite de ajo ofrece disminuye este daño 0.48 veces, lo que representa una protección parcial. En otro estudio [Singh y cols., 2003] utilizaron carvediol (un antagonista de adrenoreceptores utilizado en el tratamiento de hipertensión) y trimetazidina (una droga anti-isquémica) par disminuir el daño por FeNTA, determinaron el daño oxidativo a lípidos. Y encontraron que el FeNTA incrementa este daño 2.9 veces y que ambos compuestos reducen el daño 1.63 veces, lo que representa una protección parcial. En el presente trabajo también se encontró protección parcial, pero el aumento de la lipoperoxidación por FeNTA fue de 9 veces y la disminución por el GSPE es de 4.28 veces respecto al grupo de FeNTA. En cuanto a la producción de peróxido de hidrógeno producidos por FeNTA, Iqbal y cols., [1998] encontraron que el FeNTA incrementa 2.21 veces la producción de peróxido respecto al control, mientras que la vitamina E disminuye esta producción 0.64 veces, Iqbal y Athar [1999] por su parte encontraron que el FeNTA incrementa 2.04 veces la producción de peróxido de hidrógeno y el aceite de ajo disminuye 0.39 veces esta producción. Cuando en el presente estudio el incremento en la

producción de peróxido de hidrógeno por FeNTA es de 5.4 veces y la disminución por el GSPE es de 2.46 veces. Este es el primer trabajo que reporta el efecto de un compuesto antioxidante en la oxidación de proteínas inducida por FeNTA, y cabe resaltar que se encontró protección total contra este parámetro con las condiciones de tratamiento del protocolo II.

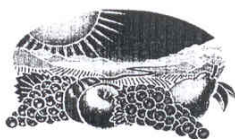
Como se puede ver en el presente trabajo el FeNTA provoca un incremento mucho mayor tanto la lipoperoxidación como la producción de peróxido de hidrógeno que en otros trabajos reportados en la literatura y el GSPE disminuye de manera más importante la oxidación de lípidos y la producción de peróxido de hidrógeno provocados por el carcinógeno, por lo que, por lo menos en estos marcadores de estrés oxidativo, el GSPE parece tener una mejor capacidad antioxidante que los otros compuestos.

A pesar de los esfuerzos para obtener una protección antioxidante total ésta nunca se logró, y parece que el GSPE no presenta un comportamiento claro dependiente de dosis o tiempo, por lo que se considera difícil poder encontrar las condiciones adecuadas para trabajar con este extracto en el presente modelo. Todos estos resultados contribuyen a la caracterización del GSPE como antioxidante.

IX CONCLUSIONES

- ❖ El GSPE tiene propiedades antioxidantes notorias tanto *in vivo* como *in vitro*.
- ❖ El esquema de tratamiento con GSPE que ofrece la mejor protección antioxidante fue el utilizado en el protocolo II (150 mg GSPE/Kg peso corporal/día durante 15 días).
- ❖ Un esquema de tratamiento con 200mg GSPE/Kg peso corporal/día durante 25 días provoca un efecto prooxidante.
- ❖ El GSPE es capaz de proteger contra factores de riesgo al desarrollo de cáncer como la oxidación de lípidos y la producción de peróxido de hidrógeno, pero es muy importante tomar en cuenta el esquema de tratamiento.
- ❖ El GSPE puede disminuir la oxidación de proteínas dentro de un cierto rango de dosis.
- ❖ El FeNTA altera la actividad de las enzimas CAT y SOD, pero no la de GPx, las dos primeras pueden ser alteraciones que incrementan el riesgo al desarrollo de cáncer.
- ❖ El GSPE en este modelo funciona mejor como antioxidante comparado con los otros compuestos utilizados en la literatura contra el daño oxidativo inducido por FeNTA, ya que disminuye en mayor proporción el daño oxidativo inducido por el carcinógeno.
- ❖ Los niveles de I κ B- α no se ven alterados una hora después de la administración del carcinógeno.

ANEXO I CERTIFICADO DE ANÁLISIS GSPE



SAN JOAQUIN VALLEY CONCENTRATES
Providing World-Class, Natural Products To Improve People's Lives

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Name of the Product	ActiVin GSE 2000-RD
Lot Number	2002060109F
Type of Material	Grape Seed Extract
Chemical Classification	Organic, Nutritive
Physical Classification	Powder, Non-Fibrous
Plant Part	Grape Seed (<i>Vitis vinifera</i>)
Extraction Solvent	Water
Date of Manufacture	June 1, 2002

Analytical Results

Identification

Total Phenolic Content*

Monomer Content*

Oligomeric Polyphenol Content*

Loss on Drying

Solubility

pH (1% Solution)

Bulk Density

Tap Density

Metals Analysis

Arsenic (As)

Cadmium (Cd)

Lead (Pb)

Mercury (Hg)

Particle Size Distribution

Wt. % Retained on 100 Mesh

Microbiological Assays

Total Plate Count (Cfu/gm)

Yeast (Cfu/gm)

Mold (Cfu/gm)

E. Coli (Cfu/gm)

Staph. Aureus

Salmonella (Cfu/gm)

Analytical Results

Passes

83.6%

2.7%

81.0%

5.9%

99.1%

4.3

0.33 g/cc

0.50 g/cc

<1 ppm

<1 ppm

<1 ppm

<0.2 ppm

0.2%

300

<10

<10

Not Detected

Not Detected

Not Detected

Specifications

To Pass Test

>80% (as GAE)

< or = 5.5%

>75% (GAE)

<8%

>98% (GSE Method)

>3.0 and <5.0

0.20 to 0.35 g/cc

0.30 to 0.50 g/cc

<5 ppm

<1 ppm

<1 ppm

<0.2 ppm

<2%

<1000

<100

<100

<3

<3

Not Detected (25 grams)

*Results reported on a dry weight basis

Shelf Life: 2 years when stored in original containers in a cool, dry location with all liners sealed.

Confirmation that specification data from independent laboratory is accurately disclosed on this Certificate of Analysis:

San Joaquin Valley Concentrates

By: Thomas Battner

Date: October 10, 2002

ANEXO II TÉCNICAS Y SOLUCIONES

1 ATRAPAMIENTO DE RADICAL SUPERÓXIDO [Oberley y Spitz1984]

Se utilizó la misma técnica de actividad de SOD para realizar esta determinación (ver más adelante en este anexo). En este caso solo se obtiene el % de atrapamiento, ya que no se puede calcular la cinética del proceso:

Ejemplo de cálculo:

Tubo 100% reducción NBT absorbancia promedio= 0.2158

Muestra absorbancia= 0.154

$0.2158 - 100\%$

$0.154 - X$ $X = 71.36\%$ reducción de NBT por lo tanto se atrapó $100 - 71.36 = 28.6\%$ radical superóxido

Para obtener la Cl_{50} se obtiene la ecuación de la curva:

$$y = 24.177 \ln(x) - 12.963$$

y se calcula el valor deseado.

2 OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS [Reznick y Packer 1994, Levine y cols., 1994, Sohal y cols. , 1993]

2.1 Preparación del homogenizado y técnica

1. Pesar 100mg de tejido y homogenizar en 900 μ L de buffer de fosfatos 50 mM EDTA 1mM, tritón 0.1% c/inhibidores de proteasas.
2. Centrifugar las muestras 20 min a 32000 xg a 4°C en tubos eppendorff, tomar el sobrenadante (muestra).
3. Tratar las muestras con sulfato de estreptomicina 10% durante 12 hrs a 4°C colocando 200 μ L de sulfato de estreptomicina a 600 μ L de homogenado.
4. Centrifugar 10 min a 3500 xg a 4°C
5. Hacer 2 tubos por muestra
6. Blanco: 150 μ L homogenado + 600 μ L HCl 2.5 M
7. Problema: 150 μ L homogenado + 600 μ L DNPH 10 mM
8. Agitar los tubos e incubar 1h a temperatura ambiente en obscuridad. Agitar cada 15 minutos.
9. Adicionar 750 μ L de TCA 20%.
10. Agitar en vórtex
11. Incubar los tubos a 4°C por 10 min.
12. Centrifugar por 10 min a 4°C a 5000 xg.
13. Descartar el sobrenadante.
14. Resuspender el botón con 600 μ L de TCA 10% a temperatura ambiente
15. Centrifugar los tubos 10 min a 5000 xg a 4°C

16. Decantar el sobrenadante.
17. Realizar 3 lavados con 600 μL etanol-acetato de etilo (1:1). Ayudarse con pipeta
18. Para el último lavado centrifugar los tubos 15 min a 6850 xg a 4°C.
19. Dejar que se evapore bien el etanol-acetato de etilo en el último lavado (campana)
20. Resuspender el botón en 1mL de guanidina 6 M en solución de fosfatos 20mM pH 2.3
21. Leer todos los tubos a 370 nm (visible)
22. Calibrar con guanidina 6M

PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN

1. Preparar una curva de albúmina en guanidina.

	[ABS] mg/mL	μL ABS 4 mg/mL en Guanidina	Guanidina μL
1	0.26	65	935
2	0.5	125	875
3	1	250	750
4	2	500	500

2. Leer solo los tubos blanco (con HCl) en esta curva. Para obtener el contenido de proteínas en el ensayo a 280 nm (UV)
3. Calibrar con guanidina 6 M.

2.2 Cálculos:

EJEMPLO: Se usa el coeficiente de absorción de la DNPH ($22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para calcular el contenido de carbonilos. Los resultados se expresan como nmoles de carbonilos/mg de proteína.

Muestra

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

*El factor de 45.45 se obtiene:

El coeficiente de extinción mola de DNPH usado para calcular la [] de carbonilos, donde C es la [] de DNPH/mL

$$\epsilon = 22000 \text{ M} = 22000 / (10^6 \text{ nmol/mL})$$

$$C = \frac{Abs}{\epsilon} = \frac{Abs}{2.2 \times 10^4 / 16^6} = \Delta Abs * 45.45$$

2.3 Soluciones

Buffer de homogenización: buffer de fosfatos 50 mM pH=7.4 con leupeptina (5 µg/mL), pepstatina A (7 µg/mL) y aprotonina (5 µg/mL) y EDTA 1 mM.

Pesar

	100mL
NaH ₂ PO ₄	0.4194g
Na ₂ HPO ₄	0.278g
EDTA-Na ₂	0.0372g
Leupeptina	0.0005g
Pepstatina A	0.0005g
Aprotonina	0.0007g
Tritón	0.1mL

Disolver todos los componentes en agua destilada, ajustar el pH y aforar

Almacenar a 4°C

NOTA: Los inhibidores se añaden al momento que se va a utilizar el buffer

Sulfato de estreptomina 10% en Amortiguador de fosfatos 50 mM c/inhibidores de proteasas, EDTA, tritón.

Para preparar 10 mL

Pesar 1 g. de sulfato de estreptomina, disolver en amortiguador de fosfatos 50 mM c/inhibidores, EDTA y Tritón. y aforar

Solución de HCl 2.5 M (0.05 L):

Tomar 10 mL de ácido clorhídrico 37% y aforarlo a 50 mL

DNPH 10mM

Pesar

	25 mL
DNPH 10 mM	49.5 mg

Disolver en HCl 2.5 M y aforar

Ácido Tricloroacético TCA 20%(w/v)

Pesar 20g TCA y disolver en 100 mL H₂O.

Almacenar a temperatura ambiente.

NOTA: Pesarlo en vidrio

TCA 10% (ácido tricloroacético)

Pesar 10 g TCA y disolver en 100 mL H₂O

Almacenar a temperatura ambiente.

NOTA: Pesarlo en vidrio

EtOH: Acetato de etilo 1:1 (v/v)

Mezclar cantidades iguales de EtOH absoluto y de acetato de etilo.

Almacenar a 4°C.

Solución de fosfatos 20 mM pH=2.3

Pesar

	200 mL
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.7584 g
KH ₂ PO ₄	0.092 g

Disolver en agua destilada, ajustar pH y llevar al volumen deseado.
Almacenar a temperatura ambiente

Guanidina-HCl 6.0M:

Pesar

	20 mL
Guanidina-HCl	11.4636 g

Disolver en solución de fosfatos 20 mM pH 2.3 y llevar al volumen deseado.

Albúmina sérica bovina 4mg/mL en guanidina 6M

Pesar 0.04g de ABS, disolver y aforar a 10 mL con guanidina 6M
Almacenar a 4°C

3 OXIDACIÓN DE LÍPIDOS [Erdelmeier y cols. 1998, Gerard-Monier y cols. 1998].

3.1 Preparación del homogenizado

1. Lavar el riñón en solución salina isotónica fría (NaCl 0.9%)
2. Pesar 0.1 g de tejido
3. Preparar homogenizado en 1 mL de buffer de fosfatos 20 mM a pH 7.4
4. Centrifugar el homogenizado a 3000 xg a 4°C por 10 min para remover las partículas grandes
5. Tomar el sobrenadante
6. Mantener las muestras en hielo previo al ensayo. Si no se van a utilizar inmediatamente congelarlas a -70°C, una vez descongelada la muestra no puede ser recongelada.

3.2 Técnica

1. Añadir un volumen (6mL) de metanol 100% a tres volúmenes (18mL) del estándar 10 mM de 1metil-2fenilindol en acetinitrilo (reactivo A).
2. Poner en tubos de ensayo 200µL de muestra.
3. Añadir 650 µL del reactivo A.
4. Agitar suavemente en el vortex.
5. Añadir 150 µL de HCl 37% (12N).
6. Mezclar bien y tapar los tubos.
7. Incubar a 45° C ± 1 °C por 60 min.
8. Centrifugar los tubos a 15 000 xg por 10 min
9. Transferir el sobrenadante a una celda.
10. Leer la absorbancia a 586 nm.

Blanco de muestra

Se sugiere medir un blanco de muestra para corregir la contribución de la muestra a 586 nm. Este blanco se hace añadiendo 650 µL de acetinitrilo/metanol (75/25%) en lugar del reactivo A. La adición del ácido y la incubación de la muestra se llevan a cabo como se describió previamente.

PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN

1. Diluir 1/500 (v/v) en agua el estandar 10 mM de 1,1,3,3 tetrametoxipropano en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7.4 para obtener un stock 20 μ M
2. Pipetear las siguientes cantidades de reactivos:

Tubo	Stock (μ L)	Agua o buffer (μ L)	Concentración TMOP (μ M)
Blanco	0	200	0
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

3.3 Cálculos

1. Usando los datos obtenidos calcule la absorbancia neta de las muestras a 586 nm restando el valor obtenido del blanco de muestra
2. Dividir el valor obtenido de MDA entre la cantidad de proteínas determinadas por el método de Lowry para reportar [MDA]/mg de proteína

3.4 soluciones

Buffer de homogenización: Buffer de fosfatos 20mM a pH 7.4.

Pesar

	500 mL
Na ₂ PO ₄	0.8626 g
KH ₂ PO ₄	0.5340 g

Disolver los componentes en agua destilada, ajustar el pH y aforar
Almacenar a 4°C

Tris – HCl 20 mM pH=7.4

Para preparar 100mL

Pesar 0.3152g de Tris-HCl y disolver en agua destilada, ajustar el pH a 7.4 y aforar.
Almacenar a 4°C

1,1,3,3-tetrametoxipropano 10mM (TMOP)

Para preparar 10mL

Tomar 16.47 μ L de TMOP, Disolver Tris-HCl 20 mM pH 7.4 y aforar.
Almacenar a 4°C

1-metil-2-fenilindol 10mM

Para preparar 25mL

Pesar 0.05182 g de 1-metil 2-fenil indol y disolver en 25mL de acetonitrilo.

NOTA: La solución es estable 4 días a 4°C, pero se recomienda prepararla el mismo día del ensayo

acetonitrilo-metanol 75/25%

Para preparar 100 mL
Mezclar 75 mL de acetonitrilo con 25 mL de metanol.
Preparar en el momento del ensayo

4 NIVELES DE H₂O₂ [Long y cols., 1999; Banerjee y cols., 2002].

4.1 Preparación del homogenizado

1. Hacer los homogenados inmediatamente después del sacrificio.
2. Homogenizar 100mg de tejido en 900 µL en buffer de fosfatos 100mM pH=7.4.
3. Centrifugar a 15 000 xg durante 20 min, tomar el sobrenadante.

4.2 Técnica

1. Mezclar en tubos eppendorf nuevos de 1.5 ml:

Reactivos	Estándares	Muestra
Sol. FOX	900 µL	900 µL
St H ₂ O ₂	90 µL	-
Muestra	-	90 µL
Metanol (HPLC)	10 µL	10 µL

2. Agitar en vortex 5"
3. Incubar 30 min a temperatura ambiente
4. Centrifugar a 15,000xg durante 10 min/temp. amb.
5. Incubar 30 min a temperatura ambiente
6. Medir absorbancia a 560 nm vs. curva estándar
 - Blanco: Metanol + muestra para corregir la abs de la muestra

PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN

1. Diluir 285 µL de H₂O₂ 30% con H₂O desionizada hasta 100 mL. (hacerlo en matraz aforado) para obtener la solución "stock" de H₂O₂ 25 µM
2. Hacer una dilución 1:250 para obtener un estándar de H₂O₂. 100 µM
3. Hacer diluciones como sigue para obtener cada uno de los estándares de la curva

[H ₂ O ₂] μM	μL de H ₂ O ₂ 100 μM	μL de H ₂ O
0	-	1000
2.5	25	975
5.0	50	950
10	100	900
25	250	750
50	500	500
75	750	250

4. De cada estándar se tomarán 90 μl para usarlos en el ensayo, de manera que la concentración final de cada estándar será la siguiente:

Estándar de [H ₂ O ₂] μM	[H ₂ O ₂] en ensayo
0	0
2.5	0.225 μM
5.0	0.45 μM
10	0.90 μM
25	2.25 μM
50	4.50 μM
75	6.75 μM

4.3 Cálculos

1. Para expresar la cantidad de H₂O₂ por cada mg de proteína, primero se tiene que determinar el contenido total de proteína por el método de Lowry. El valor obtenido de H₂O₂ se divide entre el valor de Lowry (mg/mL) para que las unidades sean nmol/mg proteína

4.4 Soluciones

Buffer de homogenización: buffer de fosfatos 100 mM pH 7.4

Pesar:

	250 mL
KH ₂ PO ₄	1.33 g
Na ₂ HPO ₄	2.16 g

Disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar
Almacenar a 4°C

H₂SO₄ 250mM

Para preparar 200 mL
Tomar 2.7 mL de H₂SO₄ y llevar a 200 mL con agua destilada

Almacenar a temperatura ambiente

Hidroxitolueno butilado 4 mM en metanol grado HPLC (Reactivo 1):

Para prepara 18 mL

Pesar 0.015686g y disolver en 18 mL de MeOH.

Preparar en el momento del ensayo

Naranja de xilenol 1 mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56 mM (Reactivo 2)

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

NOTA: Estos dos reactivos son estables por una semana a 4°C

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 grado HPLC:

Reactivo 2= Xylenol orange 1 mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56 mM

Preparar en el momento del ensayo

Stock H₂O₂ 25 μM

Para preparar 100mL

Diluir 285 μL de H₂O₂ 30% con H₂O desionizada y aforar a 100 mL.

Preparar en el momento del ensayo

5 MEDICIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES [Lowry y cols., 1951]

5.1 Preparación de las muestras:

1. Diluir con agua 1:150 el sobrenadante del homogenado de la técnicas de Fox y lipoperoxidación
2. Diluir con agua 1:50 el sobrenadante de la extracción de proteínas para Western blot.

5.2 Técnica

PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN

1. Preparar una curva estándar con albúmina sérica bovina al 0.05%.

	[ASB] $\mu\text{g}/0.2\text{ ml}$	ASB (μL)	H ₂ O (μL)
B	Blanco	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

2. Numerar tubos de vidrio de 12 x 75 mm o de 13 x 100 mm
3. Colocar en cada tubo 0.2 ml de la muestra diluída
4. A todos los tubos añadir 1 mL de sol. C (incluyendo los tubos del blanco y de la curva estándar).
5. Agitar y esperar 10'.
6. A todos los tubos añadir 100 μL de sol. D con agitación simultánea
7. Esperar 30'.
8. Leer a 660 nm.
9. Calibrar con el blanco de la curva.

5.3 Cálculos

El factor de corrección se obtiene de la siguiente manera:

1. Multiplicar la concentración obtenida en el espectro x 5 para pasar de $\mu\text{g}/200\ \mu\text{l}$ a $\mu\text{g}/\text{ml}$ (en el ensayo de Lowry se usan 200 μL de muestra).
2. Multiplicar por la dilución de la muestra (lo que permite conocer la concentración real de la proteína en $\mu\text{g}/\text{mL}$)
3. Dividir entre 1000 (para pasar de $\mu\text{g}/\text{mL}$ a mg/mL).

Pasar de 0.2 mL a ml		dilución		Pasar de μg a mg		FACTOR DE CORRECCIÓN
5	x	50	÷	1000	=	0.25
5	x	150	÷	1000	=	0.75

5.4 Soluciones

Na₂CO₃ al 2%, NaOH al 0.4%, Tartrato de sodio al 0.02%. (Solución A.)

pesar

	1 L
Na ₂ CO ₃	20 g
NaOH	4 g
Tartrato de sodio y potasio	0.2 g

Almacenar a temperatura ambiente

CuSO₄ al 0.5% (Solución B)

Pesar 0.5g en 100 mL de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

Solución C.

Mezclar

	25 tubos	50 tubos
Solución A	25 mL	50 mL
Solución B	0.5 mL	1 mL

Preparar en el momento del ensayo

Folín 1N (Solución D)

Mezclar volúmenes iguales de Folín 2N y agua destilada.

Preparar en el momento del ensayo

6 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

HOMOGENIZADO

1. Homogenizar 100 mg de tejido en 900 μ L de buffer de fosfatos 50 mM pH 7 tritón 1%
2. Centrifugar a 21000xg durante 1 hora a 4°C
3. Tomar el sobrenadante y hacer alícuotas de 300 μ L

NOTA: Las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa se deben determinar el mismo día que se hace el homogenizado, para determinar la superóxido dismutasa se puede descongelar una sola vez el homogenizado.

Buffer de homogenización: Buffer de fosfatos 50mM pH 7 tritón 1%

Pesar

	250mL
KH ₂ PO ₄	1.0524 g
Na ₂ HPO ₄	0.6745 g
Tritón	2.5 mL

Disolver los componentes en agua destilada, ajustar el pH y aforar

Almacenar a 4°C

6.1 Catalasa [Aebi H 1984]

6.1.1 Técnica

1. Diluir la muestra 1:30 con buffer de fosfatos 10 mM pH 7
2. Colocar en un tubo de 12 X 75 mm 25 μ L de la dilución de la muestra + 725 μ L de H₂O₂ 30 mM
3. Agitar en vortex
4. Vaciar el contenido del tubo por decantación a una celda
5. Leer la absorbancia a 240 nm cada 15 seg durante 30 seg.usando un programa de cinética
6. Calibrar con buffer de fosfatos 10 mM pH7

6.1.2 Cálculos

Se usa la constante de reacción de primer orden (κ) como la unidad de actividad de la catalasa, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\kappa = (1/\Delta t)(2.3 \times \log [A_1]/[A_2])$$

donde t = intervalo de tiempo medido, [A₁] y [A₂] son las absorbancias del H₂O₂ en los tiempos t₁ y t₂.

Para un intervalo de 30 seg se aplica la fórmula:

$$k = 0.033 \times \ln [A_1/A_2]$$

Para un intervalo de 15 segundos se aplica la siguiente fórmula:

$$k = 0.0667 \times \ln [A_1/A_2]$$

Finalmente se calcula la actividad específica al dividir el valor de k entre los mg de proteína adicionados al ensayo*.

*Es necesario medir la concentración de proteínas totales en la muestra.

Para obtener la cantidad de proteína en el ensayo se divide la concentración de proteínas obtenida por el método de Lowry entre 1,200 (valor que se obtiene de multiplicar 30 (dilución de la muestra en el ensayo) por 40 (obtenido de 1 mL ÷ 0.025 ml que es el volumen de muestra colocada en el ensayo)).

Ejemplos.

Muestra	Segundos	D.O.	k (0-15) k (15-30) k (0-30)	Proteínas totales (mg/ml)	Proteína en ensayo	k /mg proteína
1	0	1.4060	0.0039	20.55	0.017	0.229
	15	1.3250	0.0038			0.223
	30	1.2520	0.0038			<u>0.227</u>

Se reporta el intervalo de 0-30 seg en k/ mg proteína, este valor debe ser aproximadamente el promedio de los dos valores de los intervalos de 15 segundos.

6.1.3 Soluciones

Amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0

Pesar

	250 mL
KH ₂ PO ₄	0.2105 g
Na ₂ HPO ₄	0.135 g

Disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar
Almacenar a temperatura ambiente

H₂O₂ 30 mM

Para preparar 50 mL

Medir 170 µL de peróxido de hidrógeno al 30%, disolverlos en amortiguador de fosfatos 10 mM y aforar.

Preparar al momento del ensayo

6.2 Glutación peroxidasa [Harris., 1992; Ichikawa y cols., 1994]

6.2.1 Técnica

1. Diluir la muestra 1:10 utilizando buffer de fosfatos 50 mM pH 7
2. En tubos de 12 X 75 mm se colocan los siguientes reactivos:
3. Tubo inespecífico:
800 µL de mezcla de reacción + 100 µL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7
4. Agitar en vortex
5. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente
6. Cuando se cumplan 2 minutos de incubación del tubo inespecífico añadir al siguiente tubo (muestra #1):
800 µL de mezcla de reacción + 100 µL de dilución de la muestra
7. Agitar en vortex

8. Cumplidos los 5 minutos de incubación del tubo inespecífico adicionar a este 100 μL de H_2O_2 0.25 mM
9. Agitar en vortex
10. Vaciar por decantación a una celda
11. Leer la absorbancia de la muestra a 340 nm cada minuto durante 3 minutos usando un programa de cinética
12. Calibrar con buffer de fosfatos 50 mM pH 7
13. En el primer minuto de lectura del inespecífico preparar el tubo de la muestra #2:
800 μL de mezcla de reacción + 100 μL de dilución de la muestra
14. Al terminar de leerse el tubo inespecífico ya se han cumplido los 5 minutos de incubación de la muestra #1 (y se han cumplido 2 minutos de incubación de la muestra #2).
15. Sacar la celda del espectrofotómetro, tirar su contenido a un recipiente de plástico y lavarla con agua destilada usando una piseta.
16. Añadir 100 μL de H_2O_2 0.25 mM al tubo de la muestra #1.
17. Agitar en vórtex.
18. Vaciar por decantación a la celda.
19. Leer muestra #1.
20. En el primer minuto de lectura de la muestra #1 preparar el tubo de la muestra #3 (se repite el procedimiento explicado anteriormente para cada una de las muestras, hasta terminar la lectura de todas ellas).

6.2.2 Cálculos:

La actividad de la glutatión peroxidasa se determina promediando los cambios de absorbancia por minuto, multiplicando este promedio por 0.16 (este factor se obtiene tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar del NADPH a 340 nm es de $6.22 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y dividiendo el resultado entre los mg de proteína adicionados en el ensayo. Así se obtiene la actividad específica expresada en U/mg de proteína, donde $1 \text{ U} = \mu\text{mol}$ de NADPH oxidado/min)

Finalmente se divide este resultado entre los mg de proteína adicionados al ensayo. Los datos se expresan como μmoles de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína.

Es necesario medir la concentración de proteínas totales en la muestra.

Ejemplos.

	D.O.	Δ D.O.	Promedio	Promedio - Inespecífico	X 0.16	Proteína (mg/ml)	Proteína en ensayo	U/mg proteína
Inespecífico	0.819 0.776 0.728 0.681	0.043 0.048 0.047	0.0475					
Problema 1	0.845 0.727 0.601 0.470	0.118 0.123 0.131	0.128	0.0805	0.0129	19.0	0.19	0.0678

La cantidad de proteína en el ensayo se calcula considerando que se agregan 0.1 ml de muestra diluido 1:10. Esto equivale a añadir 10 μ L del homogenado sin diluir. Por lo tanto hay que dividir entre 100 el valor de concentración de proteínas totales (en mg/ml) para obtener el valor de proteínas en esos 10 μ L.

6.2.3 Soluciones

Buffer de fosfatos 50mM pH 7

Pesar

	250mL
KH ₂ PO ₄	1.0524 g
Na ₂ HPO ₄	0.6745 g

Disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar
Almacenar a 4°C

EDTA 1 mM, Azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, Glutación reducido 1 mM, Glutación reductasa 1 U/ml en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0 (Mezcla de reacción)

Pesar

	31 tubos	40 tubos	62 tubos
EDTA	0.0093 g	0.0119 g	0.0186 g
Azida de sodio	0.00165 g	0.0021 g	0.0033 g
NADPH	0.00415 g	0.0065 g	0.0083 g
Glutación reducido	0.0077 g	0.0098 g	0.0154 g
Glutación reductasa	Calcular*	Calcular*	Calcular*
Amort. de fosfatos 50 mM pH 7.0	25 mL	32 mL	50 mL

* La cantidad de glutación reductasa a añadir a la mezcla de reacción depende del número de muestras y del # de lote de esta enzima.
Mantener en hielo durante el ensayo

glutación reductasa 1 U/mL.

Para preparar 25 ml de mezcla de reacción (y que contengan por lo tanto 25 U), se debe calcular la cantidad de enzima que se agregará dependiendo de las especificaciones de cada lote.

Ejemplo:

# de lote de GSH reductasa	Unidades en frasco	Volumen en frasco	mg prot/mL	U/mg prot
79H7470	2500	6.0 ml	3.2	131

2500 unidades – 6.0 ml

25 unidades - x mL

x = 0.06 ml

Así entonces, para este lote en particular, añadir 60µL de glutatión reductasa a la mezcla de reacción.

H₂O₂ 2.5 mM

Para preparar 10 mL

Tomar 2 µl de H₂O₂ al 30%.y añadirlos a 10 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0

Preparar al momento del ensayo

6.3 Superoxido dismutasa total [Oberley y Spitz1984]

6.3.1 Técnica

1. Diluir la muestra 1:100 con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0
2. Preparar 3 tubos por cada muestra: 1 tubo blanco y 2 tubos problema.
3. Considerar 4 tubos adicionales además de los correspondientes a las muestras: 2 al principio de la serie y 2 al final de la misma. Estos 4 tubos son los tubos del 100% de reducción del NBT.
4. Adicionar a cada tubo 815 µL de mezcla de reacción.
5. Colocar la gradilla con los tubos en el baño María a 27°C

NOTA: La absorbencia de los tubos 100% debe encontrarse entr 0.15 y 0.20. De no ser así es probable que la actividad de la enzima haya disminuido o que la xantina esté descompuesta y por lo tanto se deba preparar nuevamente.

NOTA: El tiempo total de incubación será de 15 minutos, por lo tanto se debe considerar el número máximo de tubos que se procesarán

Intervalo	# máximo de tubos* en 15 minutos
10 seg	90
15 seg	60
20 seg	45

*Considerar siempre los 4 tubos del 100% de reducción.

6. Cualquiera que sea el intervalo de tiempo elegido, el orden de adición es el siguiente (agitar en vórtex después de la adición de cada volumen de xantina oxidasa):

Procedimiento (considerando un intervalo de 15 seg).

(Tiempo cero segundos) Tubo #1 de 100%

165 μ L de amortiguador

20 μ L de xantina oxidasa

(15 segundos después) Tubo #2 de 100%

165 μ L de amortiguador

20 μ L de xantina oxidasa

(15 segundos después) Tubo blanco de muestra n

165 μ L de muestra

20 μ L de amortiguador

(15 segundos después) Tubo problema de muestra n

165 μ L de muestra

20 μ L de xantina oxidasa

(15 segundos después) Tubo problema de muestra n

165 μ L de muestra

20 μ L de xantina oxidasa

(15 segundos después) Tubo #3 de 100%

165 μ L de amortiguador

20 μ L de xantina oxidasa

(15 segundos después) Tubo #4 de 100%

165 μ L de amortiguador

20 μ L de xantina oxidasa

7. 15 minutos después de la adición de los 165 μ L de amortiguador al tubo #1 del 100% adicionar a cada tubo 330 μ L de cloruro de cobre (CuCl_2) 0.8 mM para detener la reacción respetando el intervalo de tiempo utilizado para la adición de los reactivos anteriores.

8. Agitar en vórtex.

9. Leer la absorbencia de cada tubo a 560 nm

10. Calibrar con la mezcla de reacción.

6.3.2 Cálculos

Ejemplos.

	D.O.	Promedio de los problemas (M)	X= M - blanco de muestra	U= (100%-X)/(0.5)100%	Proteína (mg/ml)	mg de proteína en ensayo *	U/mg proteína
100% de reducción	0.4700	0.4700					
100% de reducción	0.4700						
Blanco de muestra 1	0.0180						
Problema de muestra 1	0.2360	0.2450	0.2270	1.0340	20.55	0.0678	15.25
Problema de muestra 1	0.2540						

100% = Promedio de los 4 tubos del 100% de reducción.

* los mg de proteína en el ensayo se calculan de la siguiente manera:

Proteínas totales x 0.33 ml colocados en el ensayo / dilución de la muestra.

1:100 fue la dilución usada en las muestras de este ejemplo, así que:

Proteínas totales x 0.33 / 100 ó Proteínas totales x 0.0033

6.3.3 Soluciones

Na₂CO₃ 400 mM

Para preparar 500 mL

Pesar 21.2 g, disolver en agua destilada y aforar.

Almacenar a 4°C

Xantina 0.3 mM.

Para preparar 1L

Disolver 0.0456 g de xantina en 5 mL de Na₂CO₃ 400 mM, poner en agitación y esperar que se disuelva completamente. Se añade esta solución a 980 mL de agua destilada y se afora

Almacenar en frasco ambar a temperatura ambiente

NOTA: Se debe probar el reactivo cada vez que se vaya a utilizar.

EDTA 0.6 mM.

Para preparar 500 mL

Pesar 0.1118 g, disolver en agua destilada..

Almacenar a 4°C

Nitroazul de tetrazolio (NBT) 150 M.

Para preparar 300 mL
 Pesar 0.0368 g disolver en de agua destilada.
 Almacenar a 4°C en frasco ámbar.

Albúmina 0.1 %.

Para preparar 250 mL
 Pesar 0.25 g disolver en agua destilada y aforar.
 Almacenar a 4°C

Mezcla de reacción

Xantina 0.3mM (mL)	2.5	5	10	15	20	25	30	40
EDTA 0.6mM (mL)	1.25	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20
NBT 150 µM (mL)	1.25	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20
Na ₂ CO ₃ 400mM (mL)	0.75	1.5	3	3.75	6	7.5	9	12
ABS 0.1% (mL)	0.33	0.75	1.5	2.25	3	3.8	4.5	6
Total (mL)	6	12	24	36	49	61	73	98

CuCl₂·2H₂O 0.8 mM.

Para preparar 500 mL
 Pesar 0.070 g, disolver en agua destilada y aforar.
 Almacenar a 4°C

Sulfato de amonio 2M.

Para preparar 250 mL
 Pesar 66 g, disolver en agua destilada y aforar..
 Almacenar a 4°C

Xantina oxidasa (168 U/L).

Para preparar 2 mL (que contengan 168 U/L) se debe calcular la cantidad de enzima que se debe pesar dependiendo de las especificaciones de cada lote.

Ejemplo

Lote con 0.16U/mg sólido:

$$\begin{array}{ll}
 0.16 \text{ U} - 1 \text{ mg} & 1050 \text{ mg} - 1000 \text{ mL} \\
 168 \text{ U} - x \text{ mg} & x \text{ mg} - 2 \text{ mL} \\
 x = 1050 \text{ mg} & x = \mathbf{2.1 \text{ mg}}
 \end{array}$$

Así entonces, para lote en particular, disolver 2.1 mg de xantina oxidasa en sulfato de amonio.

Preparar al momento del ensayo
 Mantener a 4°C hasta su uso.

NOTA: No se debe abrir el frasco de xantina oxidasa inmediatamente después de sacarlo del refrigerador, sino hasta que esté a temperatura ambiente.

7 WESTERN BLOT [Towbin y cols., 1979; Sambrok y cols., 1989]

7.1 Extracción de proteínas totales

1. Homogenizar 100 mg de tejido en 600 μ L de buffer de DTT 1mM, Tris HCl pH 7.4 10mM, glicerol 30%, EDTA pH 8 1mM, Triton X100 1%, ortovanadato de sodio 1mM, PMSF 1 mM, Azida de sodio 15 mM, Inhibidores de proteasas
2. Centrifugar a 10000xg durante 30 min a 2°C
3. Tomar el sobrenadante
4. Determinar la cantidad de proteínas por la técnica de Lowry

7.2 Western blot

1. Preparar el "resolving gel" de acrilamida al 12 % a partir de acrilamida al 30%
2. Agitar suavemente.
3. Vaciar la mezcla del "resolving gel" al molde (sin llenarlo)
4. Añadir cuidadosamente agua (para "aplanar" la superficie del gel).
5. Esperar 20'.
6. Eliminar el agua por decantación.
7. Lavar con agua para eliminar la acrilamida no polimerizada.
8. Secar el exceso de agua con papel (sin tocar el gel).
9. Preparar el "stacking gel" al 5%
10. Colocar la mezcla sobre el "resolving gel" (sin llenar el molde y dejando 4 mm de distancia del borde superior) EVITAR LA PRESENCIA DE BURBUJAS
11. Colocar el peine cuidadosamente (EVITAR LA PRESENCIA DE BURBUJAS).
12. Llenar hasta el borde superior con el "stacking gel" con ayuda de una micropipeta de 200 μ L.
13. Esperar 20'.
14. Sacar el peine cuidadosamente
15. Lavar con agua SIN APUNTAR HACIA EL GEL para eliminar restos del gel y acrilamida no polimerizada.
16. Colocar el molde en posición vertical para que el exceso de agua escurra.
17. Eliminar el agua de cada pozo con tiras de papel absorbente recortadas.
18. Colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis
19. Vaciar A. de electroforesis (Tris 25mM, glicina 250mM y SDS 0.1% pH 8.3) en los depósitos superior e inferior de la cámara.

7.2.1 Preparación de las muestras:

1. En tubos eppendorf de 0.5 ml colocar la cantidad deseada de proteína (de 10 μ g a 100 μ g, depende de la proteína de interés) EVITAR LA PRESENCIA DE BURBUJAS.

2. Colocar buffer desnaturalizante (tris-HCl 50 mM pH 6.8, mercaptoetanol 1%, SDS 1%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%) EVITAR LA PRESENCIA DE BURBUJAS.
3. Mezclar suavemente
4. Colocar los tubos en agua hirviendo durante 1.5 minutos.
5. Colocar las muestras en los pozos con ayuda de una micropipeta

7.2.2 Electroforesis:

1. Llenar el depósito superior de la cámara con A. de electroforesis.
2. Correr a 20 mA/gel.
3. Vigilar la corrida (aproximadamente tarda 1 hora cuando el amortiguador de corrida es fresco).
4. Abrir el molde
5. Separar el stacking y el resolving gel y eliminar el primero
6. Separar el resolving gel del molde

SE DEBE TENER CUIDADO DE NO PERDER LA ORIENTACIÓN DEL GEL.

7.2.3 Transferencia a la membrana de nitrocelulosa

1. Recortar la membrana IMMOBILON-P cat# IPVH00010 (9 x 8 cm; usar guantes).
2. minutos antes de que termine la electroforesis sumergir la membrana en metanol al 100% durante 30".
3. Sumergir la membrana en agua durante 30".
4. Abrir el cassette de transferencia, colocar una esponja delgada.
5. Colocar papel filtro.
6. Colocar el gel. EVITAR LA PRESENCIA DE BURBUJAS
7. Colocar la membrana sobre el gel. EVITAR LA PRESENCIA DE BURBUJAS.
8. Colocar el papel filtro sobre la membrana evitando la presencia de burbujas.
9. Colocar otra esponja delgada
10. Cerrar el cassette.
11. Colocar el cassette en la cámara de transferencia que se ha llenado previamente con amortiguador de transferencia (Tris base 25mM, glicina 190mM, metanol 10% pH 8.3) .
12. Realizar la transferencia a 400 mA durante 1-1.5 horas a 4°C
13. Sacar la membrana, colocarla sobre toallas de papel para que se seque
14. Guardarla en seco hasta su uso.

NOTA: La membrana utilizada funciona mejor si se deja secar completamente antes de incubarla con los anticuerpos y no se lleva a cabo el bloqueo tradicional realizado en el Western blot

7.2.4 Incubación con anticuerpos.

1. Las membranas deben ser manejadas con pinzas sin dientes para no maltratarlas y debe usarse guantes.

2. Colocar la membrana en una bolsa sellable.
3. Añadir la sol. de anticuerpo primario diluído con Na_2HPO_4 80mM, NaH_2PO_4 20 mM NaCl 100m m, tween-20 0.1% (PBS-T 0.1%), eliminar las burbujas.
4. Incubar 1 h a temperatura ambiente con agitación constante, sacar de la bolsa sellable
5. Lavar 3 veces con 10 mL de PBS-T 0.1% por 10 min con agitación constante.
6. Colocar la membrana en otra bolsa sellable.
7. Añadir la sol. de anticuerpo secundario (diluído con PBS-T 0.1%+leche descremada 2%), eliminar las burbujas.
8. Incubar 1 h a temperatura ambiente con agitación constante.
9. Lavar 3 veces con 10 mL PBS-T 0.1% por 10 min con agitación constante.
10. Usar inmediatamente la membrana o guardarla a 4°C (preferentemente usarla inmediatamente).

7.2.5 Detección

Se utilizó el kit de detección de IMMOBILON (millipore #catálogo WBKLS0500)

1. Preparar el sustrato en un frasco de vidrio ámbar o de plástico 10 minutos antes de su uso para que esté a temperatura ambiente
 - mezclar cantidades iguales del bote #1 y del bote #2 (0.125 ml /cm² de membrana).
2. Cubrir las membranas con el sustrato
3. Incubar de 1 a 2 min.
4. Eliminar el sustrato por decantación lo más posible
5. En el cuarto oscuro colocar la membrana sobre una mitad de bolsa de plástico y cubrirla con la otra mitad de la bolsa.
6. Colocar la bolsa con las membranas en el cassette de exposición.
7. Apagar la luz blanca y encender la luz roja.
8. Colocar la placa de autorradiografía sobre la bolsa de plástico
9. Cerrar el cassette.
10. Exponer de 3 a 30 min

revelado:

1. Bajo luz roja vaciar el revelador y el fijador en charolas de plástico.
2. Sacar la placa del cassette de exposición.
3. Sumergir la placa en el revelador (usar guantes).
4. Mover continuamente (agitando la charola o la placa) siempre manteniéndola sumergida.
5. Constantemente, cada 10 seg, sacar la placa del revelador y observar si aparecen bandas en la placa (a contraluz con la luz roja).
6. Cuando se observen las bandas de manera nítida hay que sumergir la placa en el fijador y mover la placa continuamente.

7. Lavar la placa bajo el chorro del agua o en una charola con agua de la llave.
8. Secar la placa a temp. ambiente colgándola con ayuda de unas pinzas para que el agua escurra.

7.3 Soluciones

Buffer de lisis DTT 1mM, Tris HCl pH 7.4 10mM, glicerol 30%, EDTA pH 8 1mM, Triton X100 1%, ortovanadato de sodio 1mM, PMSF 1 mM, Azida de sodio 15 mM, Inhibidores de proteasas

1. preparar stocks de los componentes del buffer

compuesto	[] stock	Vol stock (mL)	Pesar (g)	Diluir en
DTT	100mM	5	0.0772	Agua dest esteril
Tris HCL pH 7.4	100mM	100	1.576	Agua dest esteril
EDTA pH 8	100mM	10	0.3722	Agua dest esteril
Ortovanadato	100mM	10	0.1839	Agua dest esteril
PMSF	100mM	5	0.0871	isopropanol
Azida de sodio	1.5M	10	0.9152	Agua dest esteril

2. Mezclar los componentes como indica la siguiente tabla

compuesto	[] stock	mL agregar	[] final
DTT	100mM	0.1	1mM
Tris HCl pH 7.4	100mM	1	10mM
glicerol		3	30%
EDTA pH 8	100mM	0.1	1mM
Triton X100		0.1	1%
ortovanadato	10mM	0.1	1mM
PMSF	100mM (en isopropanol)	0.1	1mM
Azida de sodio	1.5M	0.1	15mM
Vol final		4.6	

NOTA: Para preparar el Buffer se diluye 1 tableta de complete mini en 5 mL de PBS pH 7.4 y se agregan uno a uno los componentes, finalmente se agregan 0.4mL de PBS pH 7.4 para obtener el volumen final de 10mL.

Acrilamida al 30%

	50 mL
Acrilamida	14.5 g
Bis-acrilamida	0.5 g

Disolver y aforar con agua destilada
Almacenar protegido de la luz a 4°C

Tris base 1.5 M pH 8.8

Para preparar 25 mL
Pesar 4.5427g, disolver en agua destilada y aforar

Almacenar a temperatura ambiente

Tris base 1.0 M pH 6.8

Para preparar 25 mL

Pesar 3.028 g disolver en agua destilada y aforar

Almacenar a temperatura ambiente

Duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

Para preparar 10 mL

Pesar 1 g de SDS, disolver en 10 ml de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

Persulfato de amonio al 10%

Pesar 0.1g de persulfato y disolver en 1 mL

Preparar al momento del ensayo

Preparación del "resolving gel"

Mezclar

	al 12% (mL)
H ₂ O	2.5
Acrilamida 30%	3.04
Tris 1.5 M pH 8.8	1.9
SDS 10%	0.076
Persulfato de amonio al 10%	0.076
TEMED	0.003

NOTA: Mezclar los componentes en el orden indicado en la tabla

Preparación del "stacking gel":

Mezclar

	al 5% (mL)
H ₂ O	1.4
Acrilamida 30%	0.33
Tris 0.5 M pH 6.8	0.25
SDS 10%	0.02
Persulfato de amonio 10%	0.02
TEMED	0.002

NOTA: Mezclar los componentes en el orden indicado en la tabla

Tris 25mM, glicina 250mM, SDS 0.1% pH 8.3 (A. de electroforesis)

Pesar

	1 L
Tris base	3.0285 g
Glicina	18.8 g
SDS	0.1 g

Disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar.

Almacenar a 4°C

Tris HCl 50mM pH 6.8

Para preparar 10mL
 Pesar 0.0788g, disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar
 Almacenar temperatura ambiente

Tris-HCl, 50 mM, pH 6.8, mercaptoetanol 1%, SDS 2%, Azul de bromofenol al 0.1%, Glicerol al 10%. (Buffer desnaturalizante).

Pesar

	50 mL
Tris-HCl	6.25 mL
Mercaptoetanol	0.5 mL
SDS	1 g
Glicerol	5 mL
Azul de bromofenol	Una punta de espátula

Disolver todos los componentes, aforar y hacer alícuotas
 Almacenar a -20°C .

Tris base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%, Metanol 10% pH 8.3-8.4 (Buffer de transferencia)

Pesar

	2 L
Tris base	6 g
Glicina	28.8 g
SDS	2 g
Metanol	200 mL

Disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar
 Almacenar a temperatura ambiente

Na_2HPO_4 80 mM, NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 0.1% pH 7.5 (PBS-T 0.1%)

Pesar:

	1 L
Na_2HPO_4	11.5 g
NaH_2PO_4	2.96 g
NaCl	5.84 g
Tween-20	1 mL

Disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar
 Almacenar a temperatura ambiente

Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	# catalogo Santa Cruz biotechnology
IkB α	sc=371=g
Actina	sc=1616
Control positivo IkB	sc= 4094
Anticuerpo secundario	sc=2020

PBS-T0.1%+ Leche descremada 2%

Para preparar 5 mL
 Pesar 0.1g de leche descremada "Svelty", disolver en 5 mL de PBS-T0.1%

Revelador 1:30

Tomar 10 mL de revelador concentrado y llevarlos a 300 mL con agua destilada
Almacenar en botella ambar a temperatura ambiente

Fijador 1:10

Para preparar 200 mL

Tomar 20 mL de fijador comercial y llevarlos a 200 mL con agua destilada
Almacenar en botella ambar a temperatura ambiente

X REFERENCIAS

- Abate** C, Luk D, Curran T. Transcriptional Regulation by Fos and Jun In Vitro: Interaction among Multiple Activator and Regulatory Domains. *Mol Cell Biol.* 1991;11(7): 3624-3632.
- Aebi** HE. Catalase, in *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer J, Grabi M, Eds. Verlag Chemie. Weinheim 1983; 3: 273-286.
- Aebi** H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-126.
- Aggarwal** BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell.* 2004 Sep;6(3):203-8.
- Agarwal** Ch, Sharma Y, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis. *Mol Carcinog* 2000; 21: 129-138.
- Ahmad** N, Adhami VM, Afaq F, Feyes DK, Mukhtar H. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G1-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1466-1473.
- Ahn** J, Gammon MD, Santella RM, Gaudet MM, Britton JA, Teitelbaum SL, Terry MB, Nowell S, Davis W, Garza C, Neugut AI, Ambrosone CB. Associations between Breast Cancer Risk and the Catalase Genotype, Fruit and Vegetable Consumption, and Supplement Use. *Am J Epidemiol.* 2005 Nov 15;162(10):943-52. Epub 2005 Sep 28.
- Akagawa** M, Shigemitsu T, Suyama K. Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003 Dec;67(12):2632-40.
- Alberts** B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition 2002 Garland Science Taylor and Francis Group.1313-1362.
- Ansar** S, Iqbal M, Athar M. Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitritriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. *Carcinogenesis.* 1999 Apr;20(4):599-606.
- Athar** M, Iqbal M. Ferric nitritriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis.* 1998 Jun;19(6):1133-9.
- Atkins** MB, George DJ, Jonasch E. Renal neoplasia en Brenner & Rector's *The kidney*, vol, 2 6th edition WB Saunder's company 2001; 1844-1862.
- Awai** M, Narasaki M, Yamanoi Y, Seno S. Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitritriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Am J Pathol.* 1979 Jun;95(3):663-73.
- Bae** YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide, *J Biol Chem* 1997; 272: 217-21.

Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Prues HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000; 148(2): 187-197.

Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Ray SD, Sen CK, Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 May;957:260-70.

Bagchi D, Ray SD, Bagchi M, Preuss HG, Stohs SJ. Mechanistic pathways of antioxidant cytoprotection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Indian J Exp Biol.* 2002b Jun;40(6):717-26.

Bahnemann R, Leibold E, Kittel B, Mellert W, Jackh R. Different patterns of kidney toxicity after subacute administration of Na-Nitrilotriacetic acid and Fe-Nitrilotriacetic acid to Wistar rats *Toxicol Sci* 1998; 46: 166–175.

Banerjee D, Kumar PA, Kumar B, Madhusoodanan UK, Nayak S, Jacob J. Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. *Curr. Sci* 2002; Nov; 83(10): 1193-1194.

Bartolome B, Hernandez T, Bengoechea ML, Quesada C, Gomez-Cordoves C, Estrella I. Determination of some structural features of procyanidins and related compounds by photodiode-array detection. *J Chromatogr A* 1996; 723: 19-26.

Bishop JM and Weinberg RA. (Eds.) (1996) *Molecular Oncology*, Scientific American, Inc, New York.

Bravo L Polyphenols: Chemistry, Dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr rev* Nov. 1998; 56: 11 317-333.

Brooks JD, Metter EJ, Chan DW, Sokoll LJ, Landis P, Nelson WG, Muller D, Andres R, Carter HB. Plasma selenium level before diagnosis and the risk of prostate cancer development. *J Urol* 2001; 166:2034-2038.

Burcham P. Genotoxic lipid peroxidation products: DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 1998; 13: 287-293.

Cadenas S, Barja G. Resveratrol, melatonin, vitamin e, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃ *Free Radic Biol Med*, 1999; 26: 1531–1537.

Carlsson LM, Marklund SL, Edlund T: The rat extracellular superoxide dismutase dimer is converted to a tetramer by the exchange of a single amino acid. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1996; 93:5219-5222.

Chen CM, Yin MC, Hsu CC, Liu TC. Antioxidative and anti-inflammatory effects of four cysteine-containing agents in striatum of MPTP-treated mice. *Nutrition.* 2007 Jun 15; [Epub ahead of print].

Cheng K, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage causes G-T and A-C substitutions. *J Biol Chem* 1992; 26: 166-172.

Chipman JK, Davies JE, Parsons JL, Nair J, O'Neill G, Fawell JK. Dna oxidation by potassium bromate; a direct mechanism or linked to lipid peroxidation? *Toxicology* 1998; 126: 93-102.

Criqui MH, Bangdiwala S, Goodman DS, Blaner WS, Morris JS, Kritchevsky S, Lippel K, Mebane I, Tyroler HA. Selenium, retinol, retinol-binding protein, and uric acid. Associations with cancer mortality in a population-based prospective case-control study. *Ann Epidemiol* 1991; 1:385-393.

Deguchi J, Miyamoto M, Okada S. Sex hormone-dependent renal cell carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in Wistar rats. *Jpn J Cancer Res.* 1995; 86(11): 1068-71.

Djavaheri-Mergny M, Mergny J, Bertrand F, Santus R, Mazière C, Dubertret L, Mazière J. Ultraviolet-A induces activation of AP-1 in cultured human keratinocytes *FEBS Letters.* 1996; 384: 92-96.

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005; Apr 27; (Epub ahead of print).

Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I, Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress *Prog Lipid Res* 2004; 43: 200–227.

Erdelmeier I, Gerard-Monnier D, Yadan JC, Chaudiere J. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol.* 1998; (10):1184-94.

Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 2001; 85: Suppl. 2, S67-S74.

Fan C, Li Q, Ross D, Engelhardt JF. 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.* 2003; 278(3): 2072-80.

Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Res.* 2003; 63(18):5940-9.

Fine AM, Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications *Altern Med Rev* 2000; 5(2):144-151.

Floyd R. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1447-1450.

Fukuda A, Osawa, T, Oda H, Toyokuni S, Satoh K, Uchida K. Oxidative stress response in iron-induced renal carcinogenesis: acute nephrotoxicity mediates the enhanced expression of glutathion S-transferase Yp isozyme. *Arch. Biochem Biophys.* 1996; 329(1): 39-46.

Gago-Dominguez M Castelao JE, Yuan JM, Ross RK, Yu MC. Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States) *Cancer Causes and Control.* 2002; 13: 287-293.

Garbacki N, Tits M, Angenot L, Damas J. Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats. *BMC Pharmacology* 2004, 4 (1):25.

Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudiere J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol*. 1998; (10):1176-83.

Ghosh J, Myers CE: Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 13182-7.

Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Fuchs C, Rosner BA, Speizer FE, Willett WC. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann Intern Med* 1998; 129:517-524.

Glynn SA, Albanes D, Pietinen P, Brown CC, Rautalahti M, Tangrea JA, Gunter EW, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR. Colorectal cancer and folate status: a nested case-control study among male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5:487-494.

Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993 May;57(5 Suppl):715S-724S; discussion 724S-725S.

Hadži-Đokić J. Epidemiology and factors contributing to the occurrence of renal parenchymal tumors *Medicine and Biology* 1999; 6(1): 48 – 52.

Hanahan D The Hallmarks of cancer *Cell*, 2000; 100: 57-70 .

Harris ED: Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J*. 1992; 6:2675-2683.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004; 18(18): 2195-224.

Helzlsouer KJ, Huang HY, Alberg AJ, Hoffman S, Burke A, Norkus EP, Morris JS, Comstock GW. Association between alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, selenium, and subsequent prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:2018-2023.

Hermanns RC, de Zwart LL, Salemink PJ, Commandeur JN, Vermeulen NP, Meerman JH. Urinary excretion of biomarkers of oxidative kidney damage induced by ferric nitrilotriacetate. *Toxicol Sci*. 1998; (2):241-9.

Ho YS, Howard AJ, Crapo JD: Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol*. 1991; 4:278-286.

Hu Y, Rosen DG, Zhou Y, Feng L, Yang G, Liu J, Huang P. Mitochondrial MnSOD expression in ovarian cancer: Role in cell proliferation and response to oxidative stress. *J Biol Chem*. 2005 Sep 22; [Epub ahead of print].

Ichihashi K, Osawa T, Toyokuni S, Uchida K. Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes: implications for oxidative stress. *J Biol Chem* 2001; 276 (26): 23903-13.

Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T: Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int*. 1994; 45:1-9.

Il'yasova D, Martin C, Sandler RS Tea intake and risk of colon cancer in African-Americans and whites: North Carolina colon cancer study. *Cancer Causes Control*. 2003; 14(8):767-72.

Inoue S, Kawanishi S. Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res*. 1987; 47(24 Pt 1):6522-7.

Iqbal M, Okazaki Y, Sharma SD, Okada S. Nitroglycerin, a nitric oxide generator attenuates ferric nitrilotriacetate-induced renal oxidative stress, hyperproliferative response and necrosis in ddY mice. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Oct 13;1623(2-3):98-108.

Iqbal M, Sharma SD, Rahman A, Trikha P, Athar M. Evidence that ferric nitrilotriacetate mediates oxidative stress by down-regulating DT-diaphorase activity: implications for carcinogenesis. *Cancer Lett*. 1999 Jul 1;141(1-2):151-7.

Je JH, Lee JY, Jung KJ, Sung B, Go EK, Yu BP, Chung HY. NF-kappa B activation mechanism of 4-hydroxyhexenal via NIK/IKK and p38 MAPK pathway. *FEBS Lett*. 2004; 566(1-3): 183-9.

Kandil F, Smith M, Rogers R, Pepin M, Song L, Pezzuto J, Seigler D. composition of a chemopreventive proanthocyanidin-rich fraction from cranberry fruit responsible for the inhibition of 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA)-induced ornithine decarboxylase (ODC) activity. *J Agric Food Chem* 2002; 50(5): 1063-9.

Karbownik M, Tan DX, Reiter RJ. Protective effects of melatonin against oxidation of guanine bases in DNA and decreased microsomal membrane fluidity in rat liver induced by whole body ionizing radiation. *Mol Cell Biochem* 2000; 211: 137-144.

Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 1997; 9: 240-6.

Karp G. Cell and molecular biology, concepts and experiments. John Wiley and sons, inc 3rd edition

Katiyar SK, Afaq F, Azizuddin K, Mukhtar H. Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol Applied Pharm* 2001; 176:110-117.

Kato I, Dnistrian AM, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore RE, Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jacquotte A, Riboli E. Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women: a nested case-control study. *Br J Cancer* 1999; 79:1917-1922.

Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2002; 32(9):822-32.

Kaynar H, Meral M, Turhan H, Keles M, Celik G, Akcay F. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric

oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2005 Sep 28;227(2):133-9. E pub 2005 Jan 8.

Khan AU, Wilson T. Reactive oxygen species as cellular messengers, *Chms Biol* 1995; 2: 437-45.

Khan N, Sharma S, Sultana S *Nigella sativa* (black cumin) ameliorates potassium bromate-induced early events of carcinogenesis: diminution of oxidative stress. *Hum Expl Toxicol* 2003; 22: 193-203.

Khan N, Sharma S, Sultana S. Attenuation of potassium bromate-induced nephrotoxicity by coumarin (1,2 benzopyrene) in Wistar rats: chemoprevention against free radical-mediated oxidative stress and tumor promotion response. *Redox Rep* 2004; 9(1): 19-28.

Khan N, Sultana S. Anticarcinogenic effect of *Nymphaea alba* against oxidative damage, hyperproliferative response and renal carcinogenesis in Wistar rats. *Mol Cell Biochem.* 2005 Mar;271(1-2):1-11.

Khan N, Sultana S. Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sci.* 2005 Jul 29;77(11):1194-210.

Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gelin C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 2003;22(56):8961-82.

Kurokawa Y, Maekawa A, Takahashi M, Hayashi Y. Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate – a / new renal carcinogen. *Environ Health Perspect* 1990; 87: 309-35.

Lawrence RA, Burk RF: Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1976; 71:952-958.

Le Page F, Guy A, Cadet J, Sarasin A, Gentil A. Repair and mutagenic potency of 8-oxo-G:C base pairs in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 1998; 26: 1276-1281.

Lee KW, Lee HJ. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors.* 2006;26(2):105-21.

Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, et al. Glucose deprivation- induced cytotoxicity and alterations in mitogen –activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998; 323: 5294-9.

Leibold E, Deckardt K, Mellert W, Potthoff-Karl B, Grundler O, Jackh R. NTA and Fe(III)NTA: differential patterns of renal toxicity in subchronic studies *Hum Expl Toxicol* 2002; 21: 445 – 452.

Levine RL, William JA, Stadman ER, Shacter E. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 1994; 223: 343-357.

Li H, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Morris JS, Willett WC, Gaziano JM, Ma J: A prospective study of plasma selenium levels and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:696-703.

Li JL, Okada S, Hamazaki S, Ebina Y, Midorikawa O. Subacute nephrotoxicity and induction of renal cell carcinoma in mice treated with ferric nitrilotriacetate. *Cancer Res.* 1987; 47: 1867–1869.

Li N, Karin M. Is NF-kappa B the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* 1999; 13(10): 1137-43.

Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M. The IKK beta subunit of IkkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med.* 1999(b) 189(11): 1839-45.

Loo, G Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review) *J of Nutr. Biochem.* 2003; 14: 64-73.

Long LH, Evans PJ, Halliwell B. Hydrogen peroxide in human urine: Implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:605-609.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 193:265.

Maeta K, Nomura W, Takatsume Y, Izawa S, Inoue Y. Green tea polyphenols function as prooxidants to activate oxidative-stress-responsive transcription factors in yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Jan;73(2):572-80. Epub 2006 Nov 22.

Magnani M, Crinelli R, Bianchi M, Antonelli A. The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-κB). *Curr Drug Targets.* 2000; 1(4): 387-99.

Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kB, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 2000; 164:6509-6519.

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32(8):595-603.

Matos H, Di Mascio P, Medeiros MH. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch Biochem Biophys* 2000; 383(1):56-59.

Mazzon E, Britti D, DeSarro A, Caputi A, Cuzzocrea S. Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 424: 75-83 .

Meister A, Anderson ME: Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:711–760.

Meves A, Stock SN, Beyerle A, Pittelkow MR, Peus D. H₂O₂ mediates oxidative stress-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation. *Toxicol Lett* 2001;122:205–214.

Mizote A, Hida A, Hosako M, Fujisawa M, Kamekawa M, Okada S Effects of phlebotomy on the growth of ferric nitrilotriacetate-induced renal cell carcinoma. *Acta Med. Okayama* 2002; 56(4): 199-204.

Monje P, Marinissen MJ, Gutkind JS. Phosphorylation of the Carboxyl-Terminal Transactivation Domain of c-Fos by Extracellular Signal-Regulated Kinase Mediates the Transcriptional Activation of

AP-1 and Cellular Transformation Induced by Platelet-Derived Growth Factor. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(19): 7030–7043.

Murray M, Pizzorno J. Procyanidolic oligomers. In: Murray M, Pizzorno J, eds. *The Textbook of Natural Medicine*. 2nd ed. London:Churchill Livingstone; 1999:899-902.

Muse KE, Oberley TD, Sempf JM, Oberley LW: Immunolocalization of antioxidant enzymes in adult hamster kidney. *Histochem J* 1994; 26:734–753.

Nagasawa T, Hatayama T, Watanabe Y, Tanaka M, Niisato Y, Kitts DD. Free radical-mediated effects on skeletal muscle protein in rats treated with Fe-nitritotriacetate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Feb 3;231(1):37-41.

Nakamura Y and Tonogai Y Metabolism of grape seed polyphenol in the rat *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 7215-7225.

Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene* 1989; 79:279-288.

Nishiyama Y, Suwa H, Okamoto K, Fukumoto M, Hiai H, Toyokuni S: Low incidence of point mutations in H-, K-, and N-ras oncogenes and p53 tumor suppressor gene in renal cell carcinoma and peritoneal mesothelioma of Wistar rats induced by ferric nitritotriacetate. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86:1150–1158.

Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* 2005; 24(7):1311-7.

Oberley LW, Spitz DR: Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth.Enzymol.* 1984; 105:457-464.

Oberley TD, Oberley LW, Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol.* 1997; 12; 525-35.

Oberley T. Oxidative Damage and Cancer. *Am Journal of Pathol*, 2002; 160(2): 403-408.

Okada S., and Midorikawa, O. Induction of the renal adenocarcinoma by Fe-nitritotriacetate (Fe-NTA). *Jpn. Arch. Int. Med.* 1982; 20: 485–493.

Okada S. Prevention of free-radical mediated tissue damage and carcinogenesis induced by low-molecular-weight iron. *Biometals* 2003;16:99-101.

Okamoto K, Toyokuni S, Kim WJ, Ogawa O, Kakehi Y, Arao S, Hiai H, Yoshida O. Overexpression of human MutT homologue gene messenger RNA in renal-cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. *Int J Cancer* 1996; 65(4): 437-41.

Oury TD, Day BJ, Crapo JD: Extracellular superoxide dismutase: A regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab.Invest.* 1996; 75:617-636.

Oya M, Ohtsubo M, Takayanagi A, Tachibana M, Shimizu N, Murai M. Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene*. 2001 Jun 28;20(29):3888-96.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, Dal-Pizzol F, Moreira JC. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int*. 2006 Oct;30(10):848-53. Epub 2006 Aug 24.

Pocock J, Gomez-Guerrero C, Harendza S, Ayoub M, Hernandez-Vargas P, Zahner G, Stahl RA, Thaiss F. 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*. 2003; 170(12):6280-91.

Preece, N.E. Evans PF, Howarth JA, King LJ, Parke DV. The induction of autoxidative tissue damage by iron nitrilotriacetate in rats and mice. *Toxicology and applied pharmacology* 1988; 93: 89-100.

Preece, N.E. Hall DE, Howarth JA, King LJ, Parke DV. Effects of acute and sub-chronic administration of iron nitrilotriacetate in the rat. *Toxicology* 1989; 59: 37-58.

Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Kim SJ, García JJ. Inhibitory effects of melatonin on ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation and oxidative damage in the rat kidney. *Toxicology* 1999; 139: 81-91.

Rahman A, Ahmed S, Vasenwala SM, Athar M. Glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor, abrogates ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress and renal damage. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 418(1): 71-9.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol* 1994; 223: 357-363.

Ruland J, Mak TW. From antigen to activation: specific signal transduction pathways linking antigen receptors to NF-kappaB. *Semin Immunol*. 2003; 15(3): 177-83.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd. Ed. Vol. 3, Chapter 18, Chris Nolan (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

Seghatoleslami M, Tuan R. Cell Density Dependent Regulation of AP-1 Activity is Important for Chondrogenic Differentiation of C3H10T1/2 Mesenchymal Cells. *J Cell Biochem*. 2002; 84: 237-248.

Shao ZH, Becker LB, Vanden Hoek TL, Schumacker PT, Li CQ, Zhao D, Wojcik K, Anderson T, Qin Y, Dey L, Yuan CS. Grape seed proanthocyanidin extract attenuates oxidant injury in cardiomyocytes. *Pharmacol Res*. 2003 Jun;47(6):463-9.

Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 2002; 4: E131-6.

Sheu ML, Ho FM, Chao KF, Kuo ML, Liu SH. 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.* 2004; 66(1):187-96.

Shih A, Davis FB, Lin HY, Davis PJ: Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK- and p53-dependent mechanism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1223-1232.

Simonetti P, Ciappellano S, Gardana C, Bramati L, Pietta P. Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds: in vivo effects on oxidative stress. *J agric Food Chem* 2002; 50:6217-6221.

Singh D, Chander V, Chopra K. Carvedilol, an antihypertensive drug with antioxidant properties, protects against glycerol-induced acute renal failure. *Am J Nephrol.* 2003; 23(6): 415-21.

Singleton VL. Tannins and the qualities of wines. In: Laks PE, Hemingway RW, editors. *Plant polyphenols*. New York: Plenum Press; 1992 p 859-880.

Sohal RS, Agarwal S, Dubey A, Orr WC. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7255-7259.

Specht MC, Barden CB, Fahey TJ. p44/p42-MAP kinase expression in papillary thyroid carcinomas. *Surgery* 2001;130:936–940.

Stahler M, Rohrmann K, Bachmann A, Zaak D, Stief CG, Siebels M. Therapeutic approaches in metastatic renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2005 Jun;95(8):1153-61.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979;76:4350-4353.

Toyokuni S, Sagripanti JL. DNA single- and double-strand breaks produced by ferric nitrilotriacetate in relation to renal tubular carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1993; 14(2):223-7.

Toyokuni S, Uchida K, Okamoto K, Hattori-Nakakuki Y, Hiai H, Stadtman ER. 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 U S A.* 1994; 91(7):2616-20.

Toyokuni S, Mori T, Hiai H, Dizdaroglu M. 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.* 1995; 62(3):309-13.

Uchida K, Fukuda A, Kawakishi S, Hiai H, Toyokuni S. A renal carcinogen ferric nitrilotriacetate mediates a temporary accumulation of aldehyde-modified proteins within cytosolic compartment of rat kidney. *Arch Biochem Biophys.* 1995 Mar 10;317(2):405-11.

Umemura T, Sai K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA). *Carcinogenesis.* 1990; 11(2):345-7.

Umemura T, Sai K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y. Oxidative DNA damage, lipid peroxidation and nephrotoxicity induced in the rat kidney after ferric nitrilotriacetate administration. *Cancer Lett.* 1990b Oct 8;54(1-2):95-100.

Umemura T, Hasegawa R, Sai-Kato K, Nishikawa A, Furukawa F, Toyokuni S, Uchida K, Inoue T, Kurokawa Y. Prevention by 2-mercaptoethane sulfonate and N-acetylcysteine of renal oxidative damage in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Jpn J Cancer Res.* 1996; 87(9): 882-6.

Urakami S, Tsuchiya H, Orimoto K, Kobayashi T, Igawa M, Hino O. Overexpression of members of the AP-1 transcriptional factor family from an early stage of renal carcinogenesis and inhibition of cell growth by AP-1 gene antisense oligonucleotides in the Tsc2 gene mutant (Eker) rat model. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;241(1):24-30.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160 (1):1-40.

van den Brandt PA, Zeegers MP, Bode P, Goldbohm RA. Toenail selenium levels and the subsequent risk of prostate cancer: a prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(9):866-71.

Walle T. Absorption and metabolism of polyphenols. *Free Radic Biol Med*; 2004 Apr 1; 36 (7)829-837.

Weisiger RA, Fridovich I: Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J.Biol.Chem.* 1973; 248:4793-4796.

Weizman N, Shiloh J, Barzilai A. Contribution of the Atm Protein to Maintaining Cellular Homeostasis Evidenced by Continuous Activation of the AP-1 Pathway in Atm-deficient Brains. *J Biol Chem.* 2003; 278(9): 6741–6747.

Wood ML, Dizdaroglu M, Gajewski E, Essigmann JM. Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry* 1990; 29: 7024-7032.

Wu AH, Yu MC, Tseng CC, Hankin J, Pike MC Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans *Int J Cancer.* 2003; 106(4):574-9

Wu JT, Kral JG. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy. *J Surg Res.* 2005; 123(1):158-69.

Xu Y, Bradham C, Brenner DA, Czaja MJ. Hydrogen peroxide-induced liver cell necrosis is dependent on AP-1 activation. *Am J Physiol.* 1997; 273: G795-803.

Yamanaka N, Oda O, Nagao S. Green tea catechins such as (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin accelerate Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. *FEBS Lett.* 1997 Jan 20;401(2-3):230-4

Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr.* 2001; 21:381-406.

Ye SF, Ichimura K, Wakame K, Ohe M. Suppressive effects of Active Hexose Correlated Compound on the increased activity of hepatic and renal ornithine decarboxylase induced by oxidative stress. *Life Sci.* 2003 Dec 19;74(5):593-602.

Yin GY, Yin YF, He XF. Effect of zhuchun pill on immunity and endocrine function of elderly with kidney-yang deficiency *Chung Kuo Chung His I Chieh Ho Tsa Chih* 1995; 15: 601-3.

Yoshizawa K, Willett WC, Morris SJ, Stampfer MJ, Spiegelman D, Rimm EB, Giovannucci E. Study of prediagnostic selenium level in toenails and the risk of advanced prostate cancer. *J Natl Cancer Inst,* 1998; 90:1219-1224.

Yu R, Hebbar V, Kim DW, Mandlekar S, Pezzuto JM, Kong AN. Resveratrol inhibits phorbol ester and UV-induced activator protein 1 activation by interfering with mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol Pharmacol* 2001; 60:217-224.

Zhang D, Okada S, Yu Y, Zheng P, Yamaguchi R, Kasai H. Vitamin E inhibits apoptosis, DNA modification, and cancer incidence induced by iron-mediated peroxidation in Wistar rat kidney. *Cancer Res.* 1997; 57(12):2410-4.

Zhang SM, Willett WC, Selhub J, Hunter DJ, Giovannucci EL, Holmes MD, Colditz GA, Hankinson SE. Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:373-380.

Zhang Y, Chen F. Reactive oxygen species (ROS), troublemakers between nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK). *Cancer Res.* 2004; 64(6):1902-5.