



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio del papel de la proteína p53 y del efecto de un extracto de tamarindo en la respuesta a un carcinógeno renal *in vivo*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:
Fernando Montalvo Muñoz

MÉXICO, D.F.

2008





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.

Jurado asignado:

Presidente: Dr. José Pedraza Chaverri

Vocal: Dr. Oscar Armando Pérez Méndez

Secretario: Dra. María Elena Ibarra Rubio

Suplente 1: Q.F.B. María Elena Bravo Gómez

Suplente 2: Dr. Guillermo Celestino Cardoso Saldaña

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Universidad Nacional Autónoma de México, Laboratorio 120 del Departamento de Biología, Edificio F, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, México D.F., México.

Reconocimientos:

El proyecto se realizó con el apoyo de CONACYT No. 59893 y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico bajo el PAPIIT No. IN214307.

En el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo otorgado por el Colegio de Profesores de la Facultad de Química y la Sección 024 de las AAPAUNAM por haber ganado la Cátedra "Raúl Cetina Rosado".

Dra. María Elena Ibarra Rubio
Asesor

Fernando Montalvo Muñoz
Sustentante

Dedicatoria:

A mi Madre, por su esfuerzo por darme las alas para conocer el mundo, esto va por ti.

A mi Abuelita, mi Hermana y mi Abuelo, por todo su amor y apoyo, sin ustedes no sería nadie.

A mi Doc, por ser mi Guía, mi Maestra y un ejemplo a seguir.

A Nelly, por su amor, por ser mi compañera, mi inspiración y mi meta.

A mi equipo, Chabetty, Francisco y José, por creer en mí y por su apoyo y amistad.

A mi otra familia, Maggie, Fabiola y Sergio, por su cariño y respaldo.

A mis amigos, Keke, Fabiola, Francisco e Ignacio, por estar siempre que los necesité.

A mis compañeros, Mercedes, Montserrat, Adriana y Omar, por sus consejos y ayuda.

A la UNAM, por todo lo que me ha dado.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
2.1	Estrés oxidante y cáncer	3
2.2	Polifenoles, cáncer y mecanismos celulares	4
2.3	p53	5
2.4	Carcinoma de células renales	7
2.5	Alteraciones bioquímicas y moleculares en CCR humano	8
2.6	Nitilotriacetato de hierro (FeNTA)	9
2.7	Tamarindo	10
III.	JUSTIFICACIÓN	13
IV.	HIPÓTESIS	13
V.	OBJETIVOS	14
VI.	METODOLOGÍA	14
6.1.	Preparación del extracto de tamarindo	14
6.2.	Caracterización del extracto	16
6.3.	Implementación de un modelo subcrónico de tratamiento con el carcinógeno renal nitilotriacetato de hierro (FeNTA) en ratas Wistar macho.	17
6.4.	Evaluación de la función renal	18
6.5.	Lipoperoxidación	19
6.6.	Daño oxidante a proteínas	19
6.7.	Peróxido de hidrógeno	20
6.8.	Determinación de los niveles de diferentes proteínas por Western blot	20
6.9.	Análisis estadístico	21
VII.	RESULTADOS	22
7.1.	Caracterización del EST	22
7.2.	Protocolo de tratamiento subcrónico con el carcinógeno renal nitilotriacetato (FeNTA) en ratas Wistar macho	23
7.3.	Evaluación de la función renal	24
7.4.	Lipoperoxidación	24
7.5.	Daño oxidante a proteínas	25

7.6.	Peróxido de hidrógeno	25
7.7.	Determinación de los niveles de diferentes proteínas por Western blot	26
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	30
IX.	CONCLUSIONES	33
X.	BIBLIOGRAFÍA	34

I. RESUMEN.

Estudio del papel de la proteína p53 y del efecto de un extracto de tamarindo en la respuesta a un carcinógeno renal *in vivo*.

La proteína supresora de tumores p53 es un potente factor de transcripción que promueve la reparación del ADN, la detención del ciclo celular y es capaz de inducir apoptosis. En aproximadamente 50% del total de cánceres humanos se presentan mutaciones somáticas de pérdida de significado de p53. Además, la síntesis de esta proteína es inducida por estímulos tales como el estrés oxidante, que es un factor relacionado a la aparición de cáncer.

El carcinoma de células renales (CCR) es uno de los tipos de cáncer menos estudiados, su diagnóstico temprano es difícil y por tanto presenta un alto índice de mortalidad. Existe una gran controversia sobre si p53 se encuentra mutado o no en CCR, sin embargo, más allá de la presencia de mutaciones, es importante determinar su funcionalidad, pues también en este sentido se han publicado hallazgos contradictorios en CCR. El modelo experimental de carcinogénesis renal más aceptado es aquél en el que se utiliza nitrilotriacetato de hierro (FeNTA), compuesto que induce estrés oxidante y desarrollo de CCR. Los mecanismos moleculares involucrados en este modelo se desconocen, y entre las pocas caracterizaciones que se han hecho, se ha descrito una tasa de mutación muy baja del gen p53, pero no se han determinado los niveles de la proteína ni su funcionalidad.

Por otro lado, en las semillas de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) hay gran cantidad de sustancias fenólicas, las cuales presentan capacidades antioxidantes notables. Recientemente se han identificado algunos de estos componentes de las semillas y del pericarpio de este fruto, cuyas propiedades anticancerígenas se han probado en diferentes tipos de cáncer, por lo que las semillas de tamarindo podrían ser una fuente importante de productos quimiopreventivos naturales.

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se planteó analizar la probable participación de la proteína p53 como mecanismo molecular de carcinogenicidad del FeNTA y si un extracto de la testa de semilla de tamarindo (EST) modula estas alteraciones.

Para ese fin se preparó un EST, en el cual se determinó una cantidad de aproximadamente 1.26 mg de fenoles totales (FT) por miligramo de extracto. Además, se determinó que su capacidad de inactivación del radical superóxido corresponde a una

concentración media inhibitoria (IC_{50}) de 2.7 μ g FT/mL. Esta capacidad es casi 8 veces mayor a la de la vitamina C.

Se implementó un protocolo subcrónico *in vivo* en el cual se probó el efecto de dicho extracto en ratas Wistar macho que se organizaron en 5 grupos: **Control:** Vehículos; **DEN:** administración única de N-dietilnitrosamina (DEN) i.p. (200 mg/kg, iniciador de carcinogénesis); **EST:** extracto de semillas de tamarindo p.o. (100 mg FT/kg/día); **D+F:** administración única de DEN i.p. (200 mg/Kg) 10 días antes de la administración del carcinógeno e inyecciones i.p. de FeNTA con aumento gradual semanal en la dosis (3, 5, 7 y 9 mg/Kg) 2 veces a la semana durante 4 semanas; **E+D+F:** administración de EST, DEN y FeNTA bajo las condiciones ya descritas. Se sacrificaron los animales por decapitación 48 horas después de la última inyección de FeNTA y se obtuvieron muestras de sangre y corteza renal para determinar el daño oxidante, y los niveles de p53 así como de las proteínas responsivas mdm2, BAX y Bcl-2.

No se observaron cambios en la oxidación de lípidos y proteínas, ni en los niveles de peróxido de hidrógeno en ninguno de los grupos bajo las condiciones del presente trabajo. El análisis por inmuno-detección reveló un aumento estadísticamente significativo en los niveles de la proteína p53 en el grupo tratado con DEN y FeNTA así como en el grupo tratado con DEN, FeNTA y EST. Sin embargo, las proteínas responsivas mdm2, BAX, y Bcl-2 parecen no responder a este aumento.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de las proteínas mdm2, BAX y Bcl-2 en ninguno de los grupos estudiados.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que en este modelo de inducción de carcinogénesis renal, p53 está regulado a la alza ó mdm2 no lo está ubiquitinando. Los niveles inalterados de Bcl-2 y de BAX indican que p53 no está realizando su función pro-apoptótica por estas vías moleculares, pudiendo esto participar en la carcinogenicidad del FeNTA.

II . INTRODUCCIÓN

2.1 Estrés oxidante y cáncer

Se ha demostrado ampliamente la participación del estrés oxidante en muchas patologías como hipertensión, diabetes y cáncer, por mencionar algunas [Matés y cols. 1999]. En el caso del cáncer, por ejemplo, se ha encontrado que las células transformadas producen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (EROs), particularmente de H_2O_2 [Benhar y cols. 2001; Szatrowski y cols. 1991]. De alguna manera, estas células toleran los altos niveles de EROs, y crecen y proliferan bajo estas condiciones en vez de entrar en un arresto del ciclo celular y/o a procesos de apoptosis como ocurre en las células normales [Elledge y cols. 1995]. Aunque se creía originalmente que las EROs eran únicamente moléculas destructivas, ahora se reconoce ampliamente su participación en la transducción de señales [Genestra, 2007; Hansen, 2006; Khan y cols. 1995; Manna y cols. 1998; Valko y cols. 2006; Veal y cols. 2007]. Las EROs, particularmente el H_2O_2 , inhiben diferentes tipos de fosfatasa (de fosfoserina/treonina, de fosfotirosina y de fosfolípidos) [Genestra, 2007; Lu y cols. 2007; Valko y cols. 2006]; en cambio, activan diferentes cinasas, entre las cuales se encuentran las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), particularmente JNK y p38, o cinasa de fosfadilinositol-3 (PI3K) [Genestra, 2007; Valko y cols. 2006]. Las grandes cantidades de H_2O_2 producidas en células cancerosas pueden estar mediando eventos de señalización que lleven a la activación de factores de transcripción sensibles al estado redox y de genes involucrados en el crecimiento, proliferación, supervivencia e invasividad de las células cancerosas [Loo, 2003].

Otro hecho que vincula el estrés oxidante con la carcinogénesis es que está ampliamente demostrado que las EROs, en especial el radical hidroxilo, causan daño directo al DNA lo que está íntimamente relacionado con mutagénesis y desarrollo de cáncer [Cheng y cols.1992; Floyd, 1990; Oberley, 2002; Okamoto y cols.1996; Valko y cols. 2006]. Uno de los productos más abundantes de este daño oxidante al ADN es la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), la cual, de hecho, se ha usado como marcador relacionado con la carcinogénesis [Floyd, 1990; Okamoto y cols. 1996]. Además, se ha visto que durante la lipoperoxidación, generada por el exceso de EROs, se forman aldehídos carcinogénicos, lo que incrementa la probabilidad de inducir células cancerosas por estrés oxidante [Burcham, 1998].

2.2 Polifenoles, cáncer y mecanismos celulares

Las múltiples evidencias de la participación del estrés oxidante en el desarrollo del cáncer han llevado a promover desde hace tiempo el uso de compuestos antioxidantes como una posible terapia preventiva y/o curativa [Ito y cols. 1987; Halliwell y cols. 1992; Valko y cols. 2006; Wattenberg y cols. 1985]. El consumo de frutas y verduras frescas siempre se ha asociado a una buena salud. Esto se ha atribuido, en gran parte, a la presencia en estos alimentos de diversos compuestos fenólicos, a los que se les ha demostrado una excelente capacidad antioxidante [Bravo, 1998; Rice-Evans, 2001; Shahidi y cols. 1992]. En la última década y media se ha probado el efecto de diferentes polifenoles y diversos extractos vegetales en muchos tipos de cáncer, tanto *in vivo* como *in vitro*, mostrando resultados muy positivos. Algunos ejemplos de los fitoquímicos fenólicos y extractos probados son los isotiocianatos [Hecht, 2000], polifenoles de té verde y negro [Halder, 2007; Shankar, 2007; Stoner y cols. 1995], la curcumina [Okazaki y cols. 2005], el resveratrol y la epicatequina-3-galato [Rice-Evans y cols. 1996], el provinol [Buffoli y cols. 2005], el ácido clorogénico [Feng y cols. 2005], la quercetina [Salah y cols. 1995], la emodina [Olsen y cols. 2007], los polifenoles de semillas de uva [Agarwal y cols. 2004; Bagchi y cols. 2003; Kaur y cols. 2006; Zhang y cols. 2005]. Estos compuestos y extractos se han probado en diferentes modelos de cáncer de piel, seno, esófago, estómago, duodeno, colon e hígado, así como para la protección contra diferentes carcinógenos. Entre los mecanismos celulares involucrados en el efecto benéfico de los fitoquímicos fenólicos se han reportado inhibición de la lipoperoxidación, inducción de enzimas antioxidantes y de fase I, efectos antiinflamatorios, inducción de apoptosis y de arresto del ciclo celular e inhibición de metástasis y angiogénesis. Sobre todo en los últimos años, se ha demostrado que algunos de estos efectos se dan por la inhibición de vías de señalización como PI3K/Akt, ERK y Ras/Raf/MAPK y/o la activación de vías como JNK, p53 y caspasas, mediante la regulación de la expresión de genes como Waf-1, BAX, Bcl-2 y metaloproteinasas de matriz, y la supresión de la activación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1.

Hoy en día se han encontrado evidencias de que no necesariamente se obtienen efectos positivos a cualquier tiempo y/o dosis de exposición a estos compuestos o en cualquier especie, y se ha reconocido que es necesario estudiar mucho más a fondo los efectos del consumo de frutas y vegetales y de la combinación de diferentes polifenoles para identificar los esquemas de tratamiento y combinaciones de polifenoles específicas

ideales para disminuir el desarrollo y/o prevenir el cáncer y otras patologías [Lee y Lee, 2006; Nichenametla, 2006].

2.3 p53

El gen p53 fue descubierto y es conocido principalmente como un gen supresor de tumores con capacidades para inducir arresto del ciclo celular y apoptosis. En el ser humano dicho gen se encuentra en el cromosoma 17 (17p13.1) mientras que en la rata se ubica en el cromosoma 10. En la mayoría de los tumores humanos se presentan mutaciones de pérdida de significado del gen p53 o se encuentra funcionalmente inactivo y el restablecimiento de su función tiene como consecuencia la muerte de células tumorales [May y May, 1999].

La proteína p53 tiene un peso aparente de 53kDa, contiene 393 aminoácidos y puede dividirse en 5 dominios como se observa en la Figura 1:

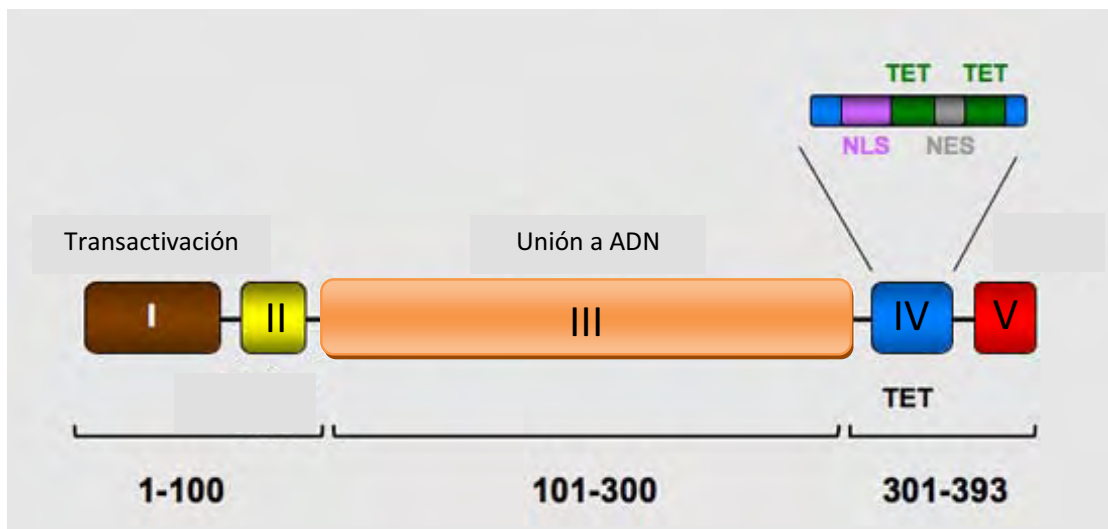


Figura 1. Esquema de los dominios presentes en la proteína supresora de tumores p53. TET: Dominio de oligomerización. NES: Señal de exportación nuclear. NLS: Señal de localización nuclear.

I) La región amino terminal 1 – 42 contiene el dominio de transactivación y el sitio de unión a su proteína reguladora, mdm2. También contiene el dominio altamente conservado I (HCD I). II) La región 40 – 92 contiene series repetitivas de residuos de prolina que están conservados en la mayoría de p53. También tiene un segundo dominio de transactivación. III) La región central (101 – 306) contiene el dominio de unión al DNA. Es en éste sitio donde se encuentran aproximadamente 90% de las mutaciones encontradas en cánceres humanos y contiene el HCD II. IV) El dominio de oligomerización (307 – 355, TET) consiste en una hoja beta plegada, seguida de una alfa

hélice necesaria para la dimerización. La proteína p53 está compuesta de 2 dímeros, por lo tanto es un tetrámero. Una señal de exportación nuclear (NES) se localiza ahí. V) La región carboxilo terminal (356 – 393) contiene 3 señales de localización nuclear (NLS) y un dominio no específico de unión a DNA que se une a DNA dañado. Esta región está involucrada en la regulación a la baja de la unión al dominio central. La actividad de p53 se determina principalmente a nivel de proteína. Bajo condiciones normales, la proteína p53 tiene una vida media corta y apenas es detectable en la célula [Lodish y cols. 2002].

La degradación de p53 está mediada de forma predominante por su interacción con la ligasa de ubiquitina mdm2 [Haupt Y y cols. 1997]. La transcripción del gen mdm2 es activada por p53, lo que crea un ciclo de retroalimentación negativo que limita la duración de la actividad de p53 [Kubbutat y cols. 1997; Michael y Oren, 2003]. Bajo condiciones críticas estrés (e.g. radiación y o UV, alquilación de bases, depuración de ADN o reacción con radicales libres oxidantes, hipoxia, expresión anormal de oncogenes, etc.) la interacción de p53 con mdm2 disminuye [Harris y Levine, 2005]. Esto puede deberse tanto a cambios conformacionales en p53 resultado de su fosforilación por cinasas inducidas por estrés o por la unión de mdm2 a Arf, que es otra proteína supresora de tumores [Gallagher y cols. 2006; Gudkov y Komarova, 2007].

Cuando p53 es activada por los estímulos arriba mencionados, puede inducir varios tipos de respuestas, incluyendo arresto del ciclo celular, senescencia, diferenciación o apoptosis. Bajo ciertas circunstancias, p53 también contribuye a la reparación del daño genotóxico, permitiendo la probabilidad que la célula rehabilitada regrese a la proliferación; sin embargo en la mayoría de los casos, la inducción de p53 lleva a la inhibición irreversible del crecimiento celular, activando incluso la apoptosis. Por esto, la regulación de la actividad de p53 es crítica ya que su función debe estar modulada lo suficiente para permitir el crecimiento y desarrollo normal, conservando la capacidad de ofrecer una rápida respuesta al estrés asociado a la tumorigénesis. Se ha demostrado que la pérdida de mdm2 induce letalidad embrionaria temprana, la cual se debe a la función de p53 [Vousden, 2002].

En años recientes, aún las “verdades” más indiscutibles sobre p53, han sido cuestionadas. De todas las actividades de p53, la más firmemente aceptada es su función como factor de transcripción. Al ensamblarse como tetrámero, p53 tiene afinidad de unión al ADN de forma específica a una secuencia a través de su dominio central, lo que activa la expresión de genes que presentan esta secuencia en su región promotora, por interacción del dominio N-terminal con la maquinaria transcripcional.

De esta forma, p53 puede inducir la expresión de diferentes productos génicos pro-apoptóticos, incluyendo inhibidores del avance del ciclo celular, mediadores de estrés oxidante, activadores de caspasas y proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2. Se cree que éstas últimas catalizan la permeabilización de la membrana exterior mitocondrial (MOMP).

La proteína Bcl-2 es el prototipo de una familia de proteínas que contienen al menos una región de homología de Bcl-2 (BH). Esta familia está dividida en proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-X_L) que contienen 4 dominios BH, proteínas pro-apoptóticas (BAX y BAK), que contienen 3 dominios BH y la familia de proteínas con dominio único BH3 (BIM, BID, NOXA, PUMA). La proteína p53 funciona como factor transcripcional de estas últimas, así como de BAX e inhibe indirectamente la expresión de Bcl-2 por medio de la regulación positiva de BID [Zamzami y Kroemer, 2005; Danial y Korsmeyer, 2004].

En general, las células con mutaciones en p53, pierden la habilidad de activar la expresión de los genes responsivos a la proteína tipo silvestre, lo que sugiere que la función transcripcional de p53 sea muy importante para la supresión de tumores.

Adicionalmente, existe evidencia de que p53 puede proteger del daño genómico de forma más positiva ayudando a reparar y prevenir el daño genómico al disminuir los niveles de EROs intracelulares. Los niveles bajos de la proteína p53 presentes en tejidos normales son suficientes para conducir a la expresión de muchos genes. Por lo tanto, la pérdida de expresión de p53 eleva las EROs, promoviendo la oxidación del ADN y el aumento en la tasa de mutaciones. Por otro lado, condiciones de estrés severo causan la estabilización y activación de p53, lo que lleva a la inducción de genes pro-oxidantes y de los genes pro-apoptóticos ya descritos. El trabajo de Sablina y cols. (2005) sugiere que p53 puede cambiar de estar proveyendo señales de supervivencia en condiciones de poco o ningún estrés a activar apoptosis en respuesta a estrés severo.

2.4 Carcinoma de células renales (CCR)

Entre los tipos de cáncer menos estudiados y comprendidos está el CCR, el cual es el más común de todas las neoplasias renales, representando del 80 al 85% [Atkins y cols. 2000]. Existen varios tipos histológicos de CCR: de células claras (80%), papilar tipo 1 y tipo 2 (10-15%), cromóforo (5%), oncocitoma (4%) y carcinoma de ducto colector (menos del 1%) [Linehan, 2005; Nelson y cols. 2007]. A nivel mundial son más de 100,000 personas las que mueren anualmente por este tipo de cáncer [Atkins y cols. 2000] y su

incidencia está aumentando (en 2002 se presentaron 208,480 casos nuevos en el mundo) [Stahler, 2005]. La estadística existente en México no está actualizada. De acuerdo con los datos obtenidos del Compendio de Cáncer de 2001 de la Dirección General de Epidemiología de México, el CCR representa aproximadamente el 1.1-2.2% de todos los tumores malignos en adultos. En ese año se presentaron un total de 1,577 casos, de los cuales 1,289 pacientes fallecieron como consecuencia del tumor representando la causa número 12-15 de muertes por cáncer. No hay datos estadísticos a nivel nacional más recientes. Un problema serio con el cáncer renal es que el 40-45% de los pacientes se diagnostican en etapas avanzadas o cuando ya presentan metástasis, y es factible que un 60-70% de los casos restantes la desarrollen, lo que disminuye la tasa de sobrevivencia a un 5% [Nelson y cols. 2007]. Esto se debe a que en etapas iniciales el CCR es prácticamente asintomático y en más del 50% de los casos se descubre por hallazgos radiológicos incidentales realizados por condiciones no relacionadas [Nelson y cols. 2007]. Esto justifica ampliamente la búsqueda de alternativas preventivas.

2.5 Alteraciones bioquímicas y moleculares en CCR humano

Una de las alteraciones genéticas más estudiadas y mejor comprendidas del CCR es la presencia de mutaciones que inactivan al gen supresor de tumores von Hippel-Lindau (VHL) en el 60% del subtipo histológico de células claras. Esto lleva a la pérdida de la actividad de ligasa de VHL E3 estabilizando al factor inducible por hipoxia (HIF), y dando como resultado la expresión de genes inducibles por hipoxia como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [Illiopolus, 2005; Linehan, 2007; Nelson y cols. 2007; Walker, 2005]. An y Reting [2005] encontraron que en una línea celular de CCR de células claras (786-0), la inactividad de VHL activa las vías de señalización de AKT y NF- κ B, lo que puede promover el crecimiento de las células tumorales. Sin embargo, Oya y cols. en 2001 ya habían informado que en ciertas líneas celulares de carcinoma celular renal, el NF- κ B se activa constitutivamente, mientras que en otras su actividad es baja. Estos mismos autores encontraron que el aumento en la actividad de NF- κ B está relacionado con el desarrollo del tumor del CCR en pacientes y que no hay mutaciones funcionales en el gen de I κ B alfa [Oya y cols. 2003]. Por otro lado, se ha encontrado que la proteína proapoptótica p53 comúnmente está inactiva en células de CCR, y que esto puede deberse a la activación constitutiva de NF- κ B, lo que sugiere una terapia anticancerígena mediante la inhibición simultánea de NF- κ B y activación de p53 [Gurova y cols. 2005]. Además, se ha relacionado la cantidad de p53 con el grado del tumor [Kramer

y cols. 2005], con metástasis y diagnóstico más precario [Cho y cols. 2005; Yoshioka y Nakamura 2001], y con recurrencia del cáncer renal [Schvarts y cols. 2005]. Morais y cols. [2006] demostraron que inhibiendo NF- κ B con pirrolidina ditiocarbamato disminuye la viabilidad y proliferación de las líneas celulares metastásicas de CCR, ACHN y SN12K1 (presentándose diferencias entre ellas), y aumenta la apoptosis por la disminución de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL. En 1998, Pammer y cols. ya habían encontrado que Bcl-2, Bclx, Bax y Bak se expresan de manera diferencial en carcinomas celulares renales dependiendo del tipo de tumor. Así mismo, se ha encontrado un aumento en la expresión de EGFR en carcinomas celulares renales humanos, sugiriendo también un papel importante en el desarrollo y progresión del tumor [Kallio y cols. 2003; Merseburger y cols. 2005; Moch y cols. 1997; Langner y cols. 2004;]. En cuanto a Akt, parte de la cascada de señalización de PI3K/Akt/mTOR, se han encontrado comportamientos opuestos al analizar los niveles de la proteína activa [Gemmill y cols. 2005; Hara y cols. 2005; Horiguchi y cols. 2003]. Como se puede apreciar, las alteraciones en el CCR varían dependiendo del tipo de tumor e, incluso, dentro de un mismo subtipo histológico.

En cuanto a daño oxidante, se ha visto que muestras de CCR presentan niveles más elevados de oxidación al ADN comparándolas con muestras de tejido normal [Okamoto y cols. 1994], y que hay una elevada lipoperoxidación en CCR de células claras pero menor en otros tipos de cáncer renal como carcinoma papilar o tumor de Wilms [Oberley y cols. 1999]. Más aún, existen evidencias de 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 CCR [Gago-Dominguez y cols. 2002,2006]. De hecho, en un estudio reciente en población italiana se encontró una relación inversa entre el consumo de vegetales, particularmente aquellos ricos en flavonoides, y el riesgo al desarrollo de CCR [Bosetti, 2007].

2.6 Nitritotriacetato de hierro (FeNTA)

El modelo experimental más utilizado de carcinogénesis renal es el de carcinoma de túbulo proximal inducido por nitritotriacetato de hierro (FeNTA). En este modelo se ha encontrado la participación del estrés oxidante. Administraciones intraperitoneales producen necrosis tubular aguda, lo cual subsecuentemente se asocia con una alta incidencia de adenocarcinoma celular renal en ratas y ratones macho [Okada y cols.

1982]. Se ha demostrado en sistemas tanto *in vitro* [Inoue y cols. 1987; Kawanishi y cols. 2002] como *in vivo* la formación de lesiones oxidativas al DNA por este compuesto [Toyokuni y cols. 1993; Toyokuni y cols. 1995; Umemura y cols. 1990]. De hecho, se encontró que la 8-oxodesoxiguanosina (8-oxodG) se excreta en la orina de ratas tratadas con FeNTA [Hermanns y cols. 1998]. Además, 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* [Fukuda y cols. 1996; Ichihashi y cols. 2001; Toyokuni y cols. 1994]. Con base en observaciones como éstas, está ampliamente aceptado que la generación de EROs y el abatimiento de defensas antioxidantes mediados por el FeNTA juegan un papel clave en su carcinogenicidad. Así mismo, en células de túbulo proximal en cultivo expuestas a FeNTA, se ha encontrado aumentada la actividad del factor de transcripción NF-κB [Chen y cols. 2001; Dávalos-Salas, 2006]. Recientemente se informó que el tratamiento de células hepáticas con FeNTA induce proliferación y activación de la proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) [Bendia, 2005]. En los dos últimos estudios, las alteraciones se revirtieron por el tratamiento con antioxidantes (pirrolidina ditiocarbamato y cianidina-3-O-beta-glucopiranosido respectivamente). También en hepatocitos en cultivo, Omoya y cols. [2001] encontraron que el FeNTA aumenta la actividad de NF-κB y la degradación de su inhibidor IκB.

Por otro lado, en esquemas crónicos de exposición de roedores al FeNTA se desarrolla CCR [Ebina y cols. 1986; Li y cols. 1987]. La incidencia de cáncer en ratas macho es dos veces mayor que en hembras, al igual que en los humanos, y los datos histopatológicos indican que los tumores son del subtipo de células claras o de tipo granular [Deguchi y cols. 1995; Li y cols. 1987]. Así mismo, se ha demostrado que una administración única de N-dietilnitrosamina (DEN) como iniciador 10 días antes del tratamiento crónico con FeNTA (como promotor) aumenta sensiblemente la proporción de animales que desarrollan el carcinoma celular renal y reduce el tiempo necesario de exposición [Ansar y cols. 1999]. En este fenómeno, al igual que en el daño renal agudo, está involucrado el estrés oxidante y el abatimiento de las defensas antioxidantes [Athar e Iqbal, 1998]. Entre las pocas caracterizaciones moleculares de los tumores inducidos por FeNTA, Tanaka y cols. [1999] informaron que el 38-44% de los carcinomas desarrollados presentaban la pérdida o la inactivación de los alelos p15 o p16, este último relacionado con las vías de la proteína de retinoblastoma y de p53. De hecho, Hiroyasu y cols. en 2002 encontraron ya la pérdida del alelo p16^{INK4A} desde unas semanas después de

administraciones repetidas de FeNTA. También se ha encontrado que no hay mutaciones, o hay una baja incidencia de éstas, en los oncogenes ras y en el gen supresor de tumores p53 en los carcinomas inducidos por FeNTA [Nishiyama y cols. 1995]. Ambos grupos concluyeron que ni los genes de ras ni el gen de p53 son blancos principales de mutaciones inducidas por FeNTA. Sin embargo, aunque un gen específico no presente mutaciones, puede expresarse anormalmente por efecto de otros genes, por mecanismos epigenéticos o por señales intracelulares alteradas como ocurre en el CCR humano.

Por las evidencias de la participación del estrés oxidante en este modelo, se han probado diferentes antioxidantes contra el daño inducido por el FeNTA *in vivo* como la melatonina, el aceite de ajo, la vitamina E, carotenoides, curcumina y farnesol, entre otros [Jahangir y cols. 2006; Okada, 2003; Okazaki y cols. 2005], así como un carotenoide en un estudio *in vitro* con fibroblastos de riñón de mono verde [Matos y cols. 2000]. En estos estudios, en conjunto, se ha encontrado que los antioxidantes disminuyen el daño al ADN, la lipoperoxidación, la incidencia de cáncer y el abatimiento de los antioxidantes celulares. Recientemente, Khan y Sultana [2005a,b] encontraron que extractos polifenólicos de *Ficus racemosa*, una planta comúnmente usada en la preparación de platillos en India, y de *Nymphaea alba*, especie utilizada en la medicina tradicional en ese país, disminuyen la incidencia del CCR así como el estrés oxidante en el esquema agudo. Más recientemente este mismo grupo encontró que el pretratamiento durante 7 días con ácido gálico, un polifenol presente en hojas de té, avellanas, uvas, etc., disminuye el estrés oxidante y marcadores como la actividad de ornitina descarboxilasa e incorporación de timidita tritiada, 12 horas después del tratamiento con FeNTA [Prasad y cols. 2006]. También se ha visto que extractos alcohólicos de polifenoles de flores de *Salix caprea* y *Punica granatum* protegen contra el daño hepático inducido por FeNTA en ratones [Alam y cols. 2006; Kaur y cols. 2006].

2.7 Tamarindo

Entre las especies vegetales que presentan gran contenido de compuestos polifenólicos está *Tamarindus indica* L. conocida popularmente como tamarindo. Esta especie proviene de la familia Leguminosae, se considera nativa de África y Asia, y crece de manera natural en regiones tropicales y sub-tropicales como México [Parrota, 2001; Phakruschaphan, 1982]. Productos derivados de diferentes partes de esta planta (fruto, hojas, corteza y raíces) se usan en la medicina tradicional de muchos países de América, África y Asia, aplicándose como antiinflamatorio, laxante, febrífugo, expectorante,

cicatrizante y digestivo, y en el tratamiento de padecimientos como diarrea, reumatismo, infecciones del tracto urinario y piel, diabetes y malaria, entre otros [Farnsworth y Bunyapraphatsara, 1992; Komutarin y cols. 2004; Maiti y cols. 2004; Parrota, 2001]. En nuestro país, sin embargo, el uso medicinal del tamarindo prácticamente no está explotado, a pesar de que se cultiva y su fruto es muy popular.

Se ha comprobado que extractos de tamarindo pueden atenuar las alteraciones causadas por un estrés oxidante exacerbado en diferentes modelos animales [Komutarin, 2004; Landi Librandi y cols. 2007; Martinello y cols. 2006; Ramos y cols. 2003]. Así mismo, actualmente se sabe que muchas de sus aplicaciones en la medicina tradicional, sobre todo del fruto, son gracias a sus propiedades antioxidantes debidas principalmente al alto contenido de compuestos fenólicos.

Tsuda y colaboradores [1993] encontraron una mayor actividad antioxidante en la cáscara o testa de la semilla comparada con el endospermo. Posteriormente se demostró que esta capacidad antioxidante se debe a compuestos fenólicos como 2-hidroxi-3',4'-dihidroxiacetofenona, metil 3,4-dihidroxibenzoato, 3,4-dihidroxifenilacetato y epicatequina [Tsuda y cols. 1994]. En 1999, Pumthong describió la actividad antioxidante de los extractos del pericarpio y semilla del tamarindo y determinó que el extracto de semillas de tamarindo está compuesto de flavonoides incluyendo taninos, antocianidinas y proantocianidinas oligoméricas. Más específicamente en 2005, el perfil de los compuestos polifenólicos en las semillas realizado en estudios por HPLC, reveló la presencia de 8 compuestos principales: procianidina B₂ (5.5%), (-)epicatequina (4.8%), trímero (18.1%), tetrámero (30.2%), pentámero (17.6%) y hexámero (23.8%) de procianidina y taninos poliméricos. También se demostró que las semillas presentan un contenido mayor de fenoles totales con respecto al pericarpio [Sudjaroen y cols. 2005].

Debido al alto contenido de polifenoles en la semilla de esta leguminosa, se esperaría un resultado exitoso de su uso en el tratamiento y/o prevención de diversos tipos de neoplasias. Algunos compuestos específicos presentes en la cáscara de la semilla se han estudiado por separado en este sentido. Por ejemplo, la procianidina B₂ inhibe el daño oxidante al ADN inducido por Fe²⁺ y H₂O₂ [Sakano y cols. 2005], promueve la apoptosis en células de carcinoma de seno y próstata [Agarwal y cols. 2007] y activa la producción de caspasa-3 en células de melanoma [Sakano y cols. 2005]. También se ha encontrado que esta procianidina puede inhibir cinasas (ERK, JNK y p38-MAPK), evitando la activación de algunos oncogenes relacionados [Zhang y cols. 2006]. Así mismo, estabiliza a Iκβ, suprimiendo la actividad del NF-κβ [Zhang y cols. 2006]. Otro de los

III. JUSTIFICACIÓN

Existe una relación entre el estrés oxidante y el desarrollo de cáncer, y se ha observado que algunos compuesto antioxidantes son capaces de proteger contra el desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Los polifenoles son productos del metabolismo secundario de las plantas y presentan una gran capacidad antioxidante y esté tipo de compuestos son abundantes en el tamarindo.

El cáncer renal es uno de los tipos de cáncer menos estudiados, y el modelo de carcinogénesis renal más aceptado es aquél en el que se utiliza nitrilotriacetato de hierro (FeNTA), compuesto que induce estrés oxidante y desarrollo de CCR. Los mecanismos moleculares involucrados en este modelo se desconocen, sin embargo, se ha reportado una tasa de mutación muy baja del gen *p53*, pero no se han realizado estudios a tiempos intermedios, como en el caso de un protocolo subcrónico.

IV. HIPÓTESIS

Los niveles de estrés oxidante producidos por el carcinógeno renal FeNTA inducirán un aumento en la expresión de p53, sin embargo esta proteína no cumplirá con su función biológica y los niveles de las proteínas producto de los genes responsivos no se alterarán. El EST contrarrestará los efectos del carcinógeno.

OBJETIVOS

General.

- 5.1 Estudiar el papel de la proteína p53 y el efecto de un extracto de tamarindo en un modelo subcrónico de tratamiento con un carcinógeno renal.

Particulares.

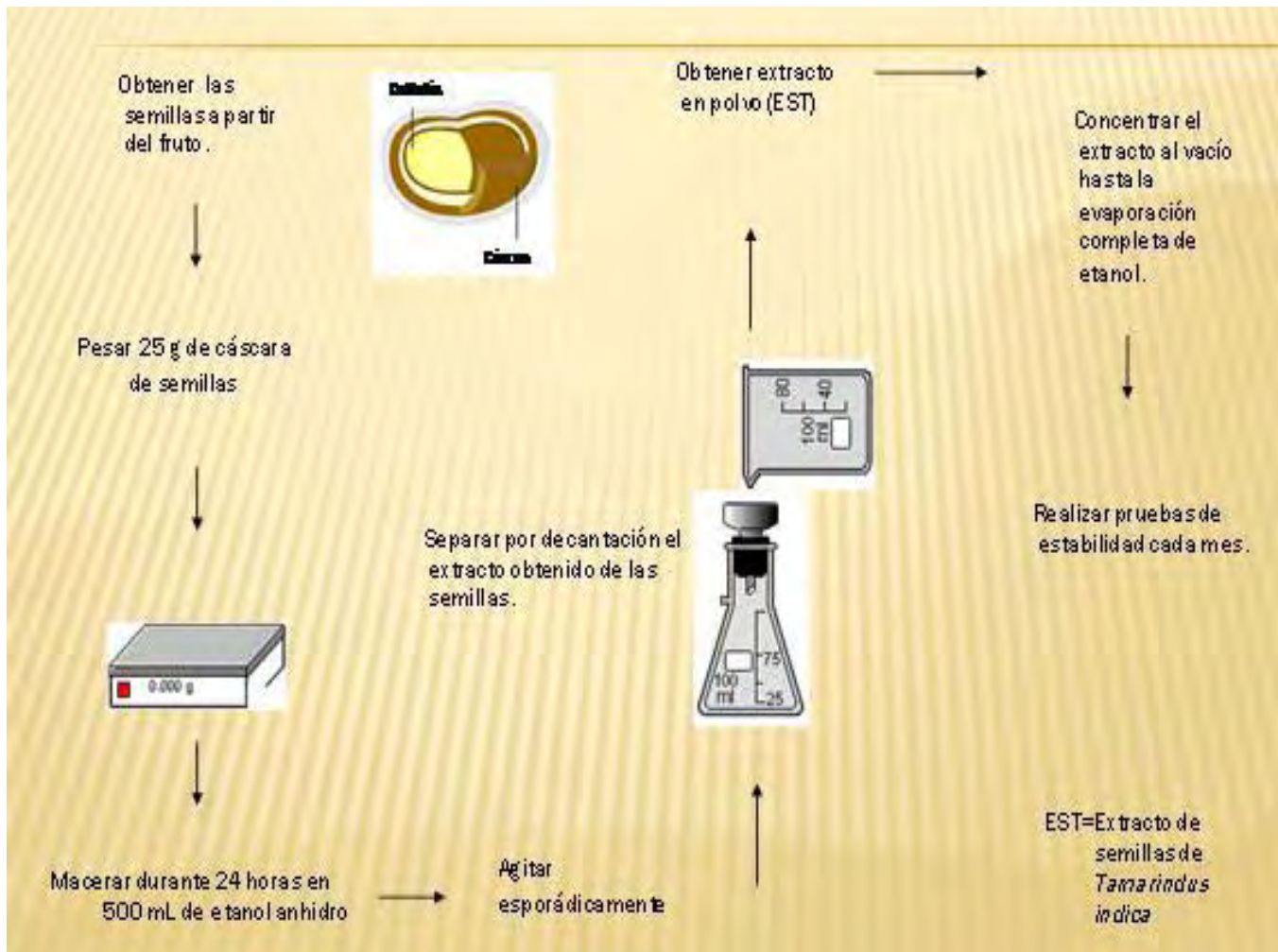
- 5.2 Obtener un extracto de la testa o cáscara de la semilla de tamarindo (EST) rico en polifenoles con gran capacidad antioxidante.
- 5.3 Implementar un modelo subcrónico de tratamiento con el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en ratas Wistar macho.
- 5.4 Realizar técnicas de cuantificación de lipoperoxidación y concentración de peróxido de hidrógeno en tejido renal.
- 5.5 Implementar el análisis de inmuno-detección para p53 por Western blot en tejido renal.
- 5.6 Implementar el análisis de inmuno-detección para proteínas reguladas por p53: mdm2, BAX y Bcl-2 por Western blot en tejido renal.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Preparación del extracto de semillas de *Tamarindus indica*.

En la Figura 2 se muestra un esquema general de la preparación del EST.

6.1.1 Obtención de la cáscara de semillas de tamarindo.



Se utilizó *Tamarindus indica* L. tipo Colima.. La semilla de tamarindo se encuentra constituida por dos estructuras principales, la cáscara de color café oscuro y el cotiledón en su interior de color blanco. La fragmentación mecánica de las semillas de tamarindo se realizó utilizando un molcajete para golpear las semillas con el tejolote. La posición para golpear la semilla y poder separar más fácilmente la cáscara del cotiledón, fue colocándola sobre los bordes de la misma semilla y después realizar golpes suaves de tal forma que ocurriera la fragmentación. Figura 2. Esquema general de la preparación del extracto de semillas de *Tamarindus indica*.

6.1.2 Obtención del extracto etanólico.

Veinticinco gramos de cáscara de semillas de tamarindo se sometieron a maceración durante 24 horas (agitando en el momento de la preparación y esporádicamente a lo largo de las 24 horas) en 500 mL de etanol anhidro a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió 3 veces utilizando la misma cáscara.

6.1.3 Obtención del extracto en polvo.

El extracto resultante se separó de las semillas por decantación, (en caso de observar una cantidad excesiva de polvo de semillas en el extracto ya decantado éste se filtró en un embudo con papel filtro) y se concentró al vacío hasta la evaporación completa del etanol. En este último paso es importante considerar la temperatura del rotaevaporador, la cual preferentemente debe ser no mayor a 40°C, pues se ha observado cierto efecto de la temperatura sobre la estructura de los compuestos fenólicos presentes en el extracto (Moure y cols. 2001). El polvo se colocó en un recipiente que evitara la exposición a la luz y la humedad. El residuo seco café claro mínimo obtenido partiendo de 25 g de cáscara de semilla mediante este procedimiento fue de 8.066 g.

6.2 Caracterización del extracto.

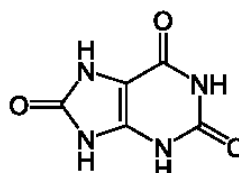
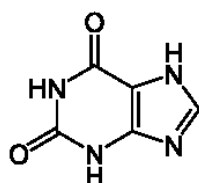
Se determinó la cantidad de fenoles totales presentes en el EST por el método de Folin Ciocalteau (Soares, 2006) y su capacidad de inactivación del anión superóxido (Parejo, 2002).

6.2.1 Cuantificación de fenoles totales (Folin Ciocalteau).

Esta prueba tiene su fundamento en la reacción en medio básico de compuestos fenólicos con el reactivo de Folin Ciocalteau que da como resultado un complejo colorido que absorbe a 765 nm (Pumorad y cols. 2006) utilizando una curva patrón construida con ácido gálico en donde se interpola el valor.

6.2.2 Evaluación de la inactivación del anión superóxido.

Esta técnica se basa en la producción de radical superóxido usando el sistema generador xantina – xantina oxidasa y su acoplamiento para formar Formazán (especie que absorbe a 560 nm) a partir de nitro azul de tretazolio (NBT) (Bielski y cols. 1980). Para esta determinación el EST se adiciona a una mezcla de reacción que contiene NBT y el sistema xantina –xantina oxidasa. Si el EST inhibe al radical superóxido, el NBT no será reducido y por lo tanto no se observará cambio de coloración en la solución.



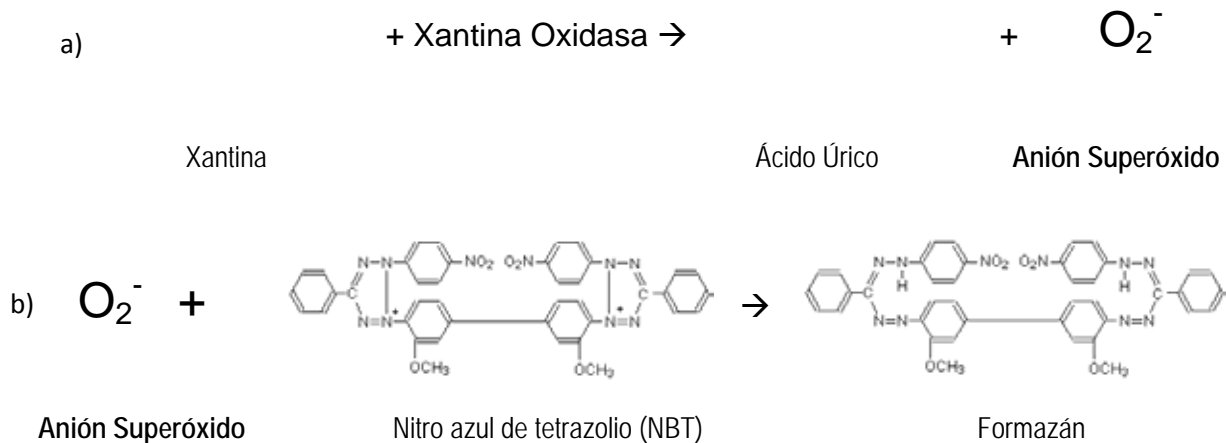


Figura 3. a) Formación de anión superóxido. b) Reacción del anión superóxido con NBT.

Posteriormente se realizan los cálculos para obtener el porcentaje de inhibición utilizando como valor de 100% de reducción los tubos control a los cuales no se adiciona EST y por lo tanto equivalen al 100% de reducción de NBT. Con estos datos se construyó una curva patrón con diferentes concentraciones del extracto para poder calcular la IC_{50} .

6.2.3 Preparación de las soluciones del extracto en polvo en agua para su administración.

Se pesó la cantidad de extracto en polvo de acuerdo a la dosis de fenoles totales (100 mg/Kg) y se esparció sobre la superficie del agua calculada con base en la cantidad bebida promedio en cada grupo. Se dejó que el polvo se disolviera por sí mismo algunos minutos; si se observaba parte del polvo en el fondo se agitaba posteriormente la solución hasta homogeneizarla; mediante este método se evita que se formen grumos del extracto.

6.3 Implementación de un modelo subcrónico de tratamiento con el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en ratas Wistar macho.

Se estudiaron un total de 30 ratas Wistar macho (Harlan México-UNAM) de 75 – 100 g de peso que se dividieron en 5 grupos como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos estudiados.

Grupo	No. De Animales	Esquema de Tratamiento
Control	6	Vehículos
DEN	6	Administración única de N-dietilnitrosamina (DEN) i.p. (200 mg/kg)

EST	6	Extracto de testa de semillas de <i>Tamarindus indica</i> (EST) (100mg/kg)
D+F	6	Admon. única de DEN i.p. (200 mg/kg) + FeNTA i.p., aumento semanal de dosis (3, 5, 7 y 9 mg/kg) 2 veces a la semana.
E+D+F	6	EST (100 mg/kg) + Admon. única de DEN i.p. (200 mg/kg) + FeNTA i.p., aumento semanal de dosis (3, 5, 7 y 9 mg/kg) 2 veces a la semana.

En la Figura 4 está representado el diseño experimental que se describe a continuación: Primero se tuvo un período de adaptación de los animales de 5 días. Posteriormente los grupos EST y E+D+F recibieron una dosis de 100 mg de fenoles totales por kilogramo de peso corporal en el agua de beber a lo largo de todo el protocolo. Dos semanas después a los grupos DEN, D+F y E+D+F se les administró una dosis única de 200 mg/Kg de N-dietilnitrosamina (DEN), vía intraperitoneal, el cual es un iniciador de la carcinogénesis (Khan, 2005). Dos semanas más tarde comenzó la administración del carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA), con un esquema de dos administraciones intraperitoneales semanales con aumento semanal en la dosis, comenzando en 3 mg Fe/Kg y llegando a un máximo de 9 mg Fe/Kg (Athar, 1998). Estas administraciones continuaron las siguientes 4 semanas. A los grupos Control y EST se les administró los vehículos de los tratamientos. Los animales se sacrificaron por decapitación con obtención de muestras de sangre y corteza renal.

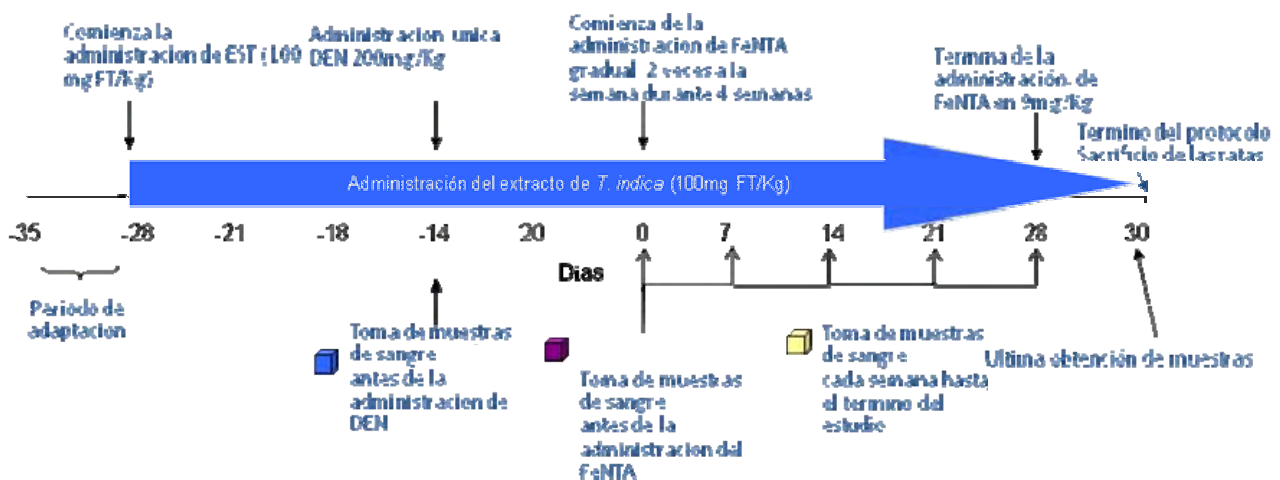


Figura 4. Diseño experimental del protocolo subcrónico.

6.4 Evaluación de la función renal.

La urea es un producto de desecho que se sintetiza a partir de amonio, el cual se produce por la desaminación oxidante de los aminoácidos, formándose amonio (NH_3) el que es muy tóxico. Mediante la determinación del nitrógeno de urea en sangre (BUN), se puede estimar el daño en la función renal al medir la cantidad de urea presente en una muestra de suero sanguíneo debido a que ésta se elimina por el riñón. La urea presente en la muestra reacciona con el o-ftalaldehído en medio ácido originando un compuesto colorido que puede cuantificarse espectrofotométricamente a $\lambda=510$ nm (Figura 5). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de urea en la muestra ensayada.

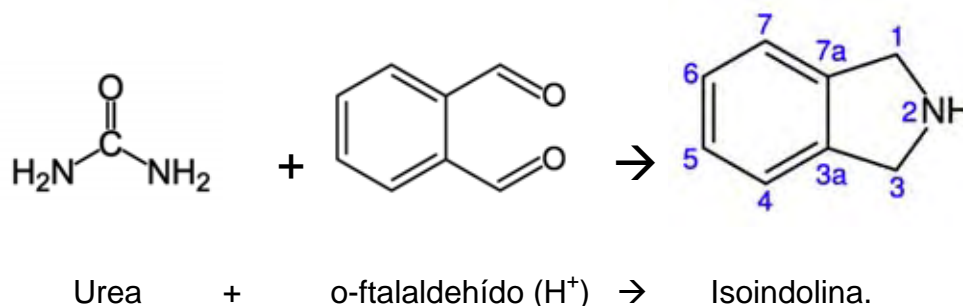


Figura 5: Reacción de urea con o-ftalaldehído para formar isoindolina.

6.5 Lipoperoxidación.

Uno de los marcadores clásicos de estrés oxidante es la determinación de productos de la peroxidación de lípidos que finalmente llevan a la pérdida de la función e integridad de las membranas. El MDA es uno de los productos derivados de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados y ésteres relacionados. La determinación de MDA se llevó a cabo con un método colorimétrico específico para MDA en el que esta molécula reacciona con N-metil 2-fenilindol en medio ácido a 45°C , lo que genera un compuesto colorido que absorbe a 586 nm. En las mismas muestras se determinó el contenido de proteínas totales por el método de Lowry para expresar la cantidad de MDA en nmol/mg proteína [Gerard-Monnier y cols. 1998; Erdelmeier y cols. 1998].

6.6 Daño oxidante a proteínas

Otro marcador clásico de estrés oxidante es la determinación de grupos carbonilo (C=O) que se originan por acción de las especies reactivas de oxígeno sobre las proteínas convirtiendo algunos aminoácidos (leucina, valina, lisina, arginina, prolina, treonina e isoleucina) en derivados carbonilo. Además, los grupos carbonilo también son producidos por la fragmentación de reacciones de rompimiento de enlaces peptídicos, e incluso por la interacción de las cadenas laterales de los aminoácidos (grupos sulfhidrilo de la cisteína, grupos imidazol de la histidina y grupos amino de la lisina) con productos de lipoperoxidación como 4-hidroxi-2-nonenal, acroleína y malondialdehído. Así mismo, como resultado de reacciones de glicación/glicoxidación, indirectamente se forman derivados de N-carboximetil-lisina que debido a su fuerte capacidad quelante son capaces de promover la generación de grupos carbonilo por reacciones catalizadas por metales. Esta determinación se llevó a cabo basándose en su reactividad con dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas de proteína, las cuales absorben la luz a 370 nm. En las mismas muestras se determinó la concentración de proteínas totales para expresar el contenido de grupos carbonilo en nmol/mg de proteína [Nyström, 2005].

6.7 Peróxido de hidrógeno

Esta determinación se llevó a cabo por el método de FOX, que está basado en la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} por el peróxido de hidrógeno en condiciones ácidas. El ión férrico se une con el naranja de xilenol (3,3'-bis[N,N-di(carboximetil)-aminometil]-o-cresolsulfonafenoftaleína, sal sódica) para formar un complejo estable colorido que se puede medir a 560 nm [Long y cols. 1999].

6.8 Determinación de los niveles de diferentes proteínas por Western blot.

La evaluación de los niveles de las proteínas p53, mdm2, BAX y Bcl-2, se realizó mediante la técnica de Western blot. Se colocaron 80 μ g de proteína extraída de las muestras de corteza renal en geles de poliacrilamida-SDS al 12% para resolverlas por

electroforesis. Las muestras se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), se bloquearon con solución bloqueadora de leche descremada en polvo al 5% en PBS-Tween 0.1% y después del bloqueo se incubaron con anticuerpos específicos anti-p53 (FL-393, SantaCruz Biotechnology), anti-mdm2 (SMP14, SantaCruz Biotechnology), anti-BAX (P-19, SantaCruz Biotechnology) o anti-Bcl-2 (N-19, SantaCruz Biotechnology). Después de la incubación durante una noche con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano durante 60 minutos. La detección final se llevó a cabo con reactivos de quimioluminiscencia HRP (Millipore Co.). Se realizaron las autorradiografías que se analizaron por densitometría, expresando los resultados corregidos con α -tubulina (B-7, SantaCruz Biotechnology). Se realizó un análisis densitométrico de las autorradiografías utilizando el programa AlphaEaseFC™ Chemilmager 4400 Software, (Alpha Innotech Co.).

6.9 Análisis estadístico.

Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Los datos se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de comparaciones múltiples, y después se aplicó una post-prueba de Newman Keuls. Para esto se utilizó el programa PRISM® 4.00 (GraphPad). Una $p < 0.05$ se consideró significativa (*).

VII. RESULTADOS

7.1 Caracterización del EST.

Las características del EST son las siguientes: es un polvo café rojizo fácilmente soluble en agua sin necesidad de agitación.

7.1.1 Cuantificación de fenoles totales (Folin Ciocalteu).

La concentración de fenoles del extracto obtenido es de: 1.26 mg FT/mg EST. En la Figura 6 se muestra la curva patrón obtenida.

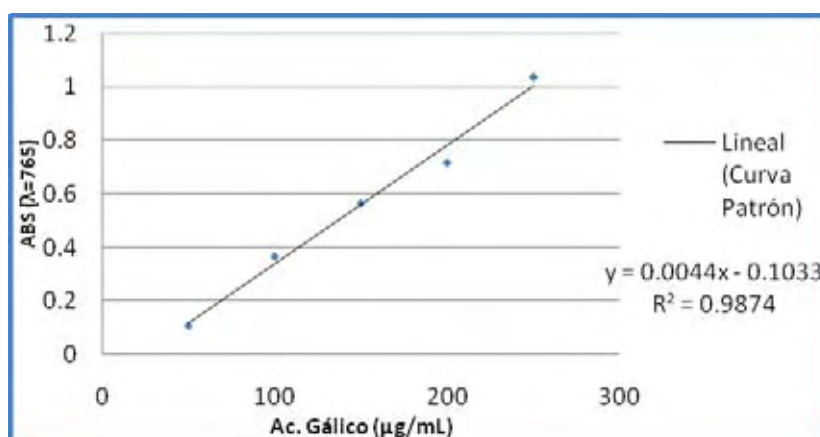


Figura 6. Curva patrón para fenoles totales con ácido gálico.

7.1.2 Evaluación de inactivación del anión superóxido.

Según el ajuste no lineal que se muestra en la Figura 7, la concentración media inhibitoria del EST es $IC_{50} = 2.7 \mu\text{g}$ de FT/mL. Comparativamente, a la vitamina C se le encontró en nuestro laboratorio un valor de $IC_{50} = 20.8 \mu\text{g}$ de FT/mL

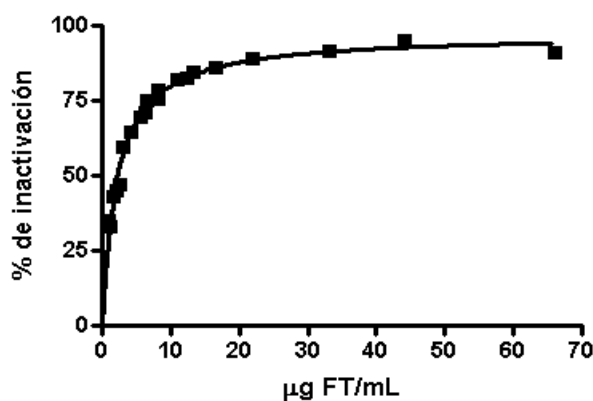


Figura 7. Ajuste no lineal de la curva de atrapamiento del radical superóxido por el EST.

7.2 Protocolo de tratamiento subcrónico con el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en ratas Wistar macho.

A lo largo del protocolo se registró el peso corporal de los animales (Figura 8). El desarrollo de las ratas de los grupos Control, EST y DEN fue normal, y sólo se aprecia una disminución estadísticamente significativa en el peso de los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA, al día del sacrificio.

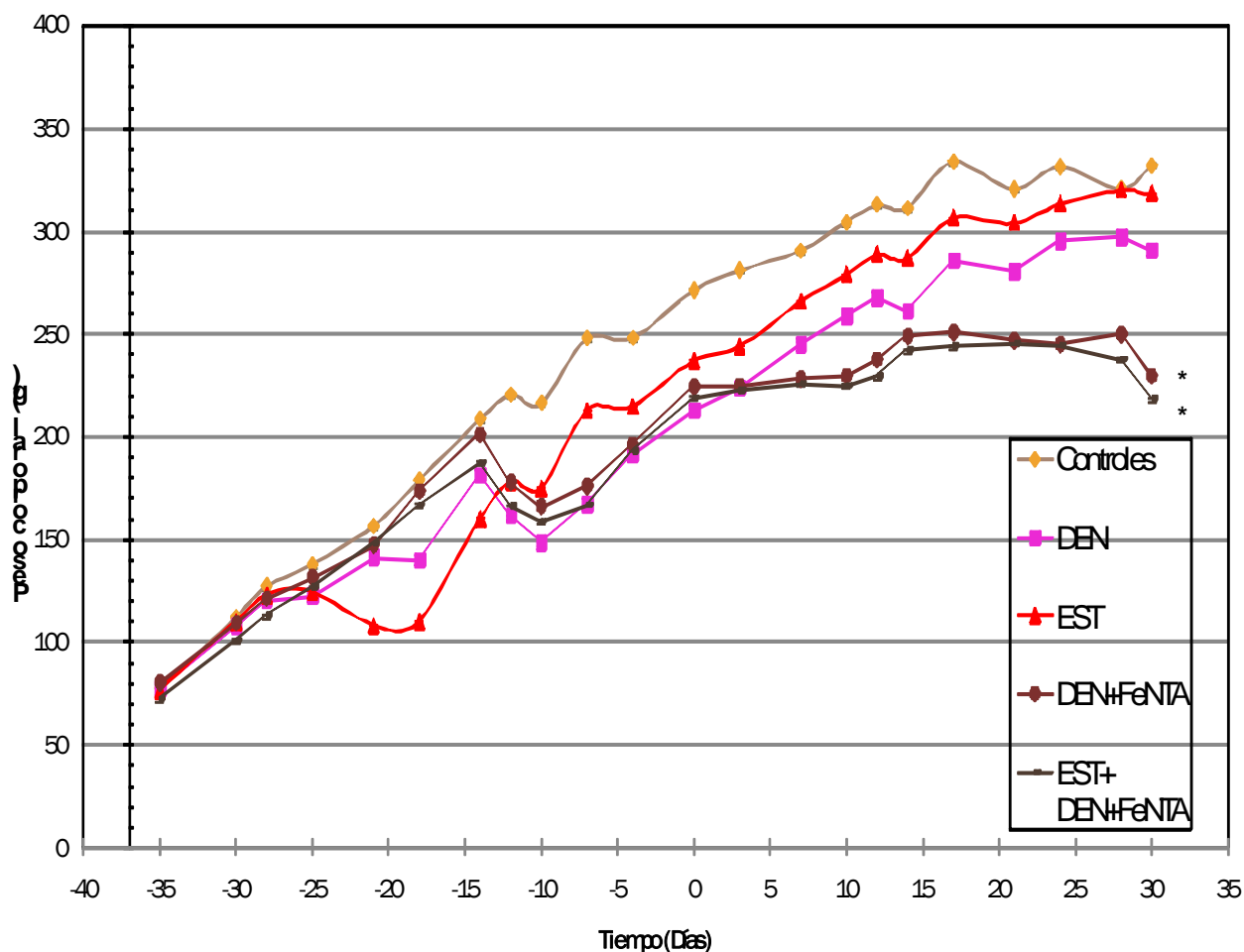


Figura 8. Gráfica de peso corporal (g) vs tiempo (días).

7.3 Evaluación de la función renal.

En las muestras obtenidas el día de sacrificio de los animales no existe diferencia estadísticamente significativa en los valores de éste parámetro entre los grupos estudiados (Figura 9).

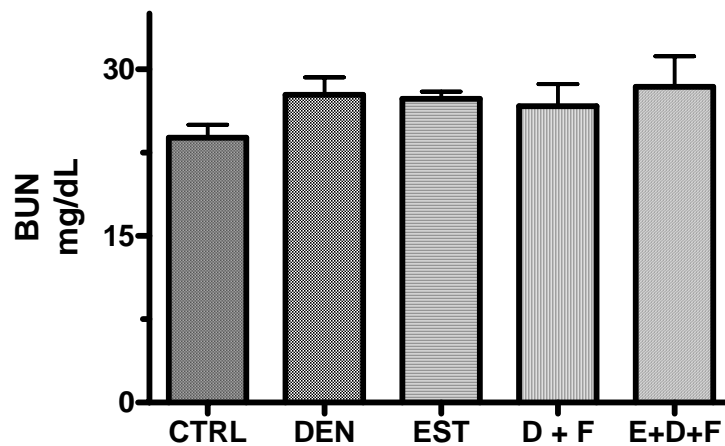


Figura 9. Valores de BUN del día 30. No existen diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan la media \pm el error estándar de 4 a 6 determinaciones.

7.4 Lipoperoxidación.

En la Figura 10 muestran los resultados de la determinación del contenido de malondialdehido (MDA) en corteza renal al día del sacrificio. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados.

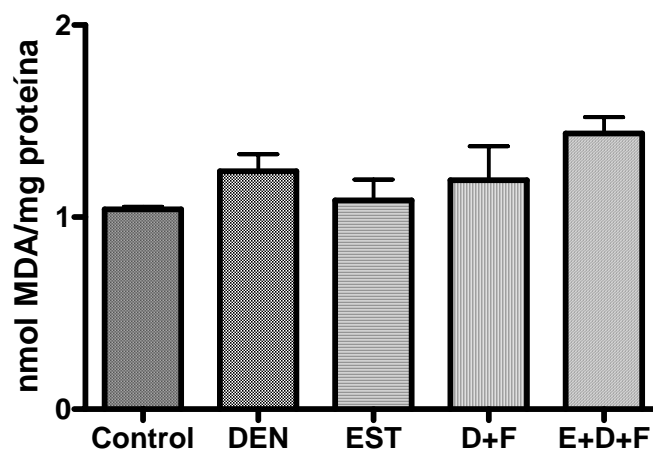


Figura 10. Determinación de MDA. No existen diferencias significativas. Las barras representan la media \pm el error estándar de 4 a 6 determinaciones.

7.5 Daño oxidante a proteínas.

En la Figura 11 se presentan los resultados de la determinación de grupos carbonilo en el tejido de corteza renal al día del sacrificio. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados.

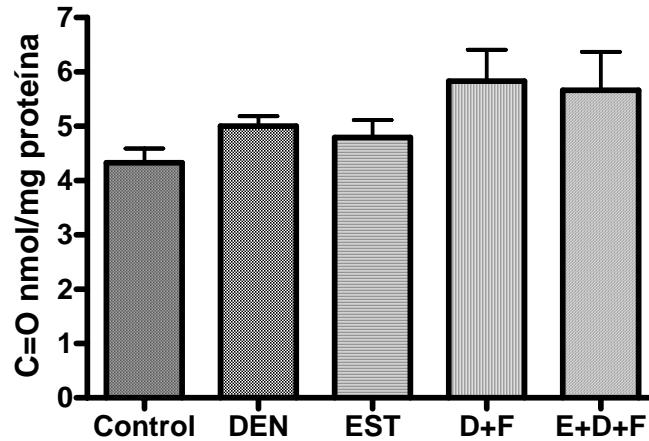


Figura 11. Determinación de grupos carbonilo. No existen diferencias significativas. . Las barras representan la media \pm el error estándar de 4 a 6 determinaciones

7.6 Peróxido de hidrógeno.

En la Figura 12 se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de peróxido de hidrógeno en la corteza renal.

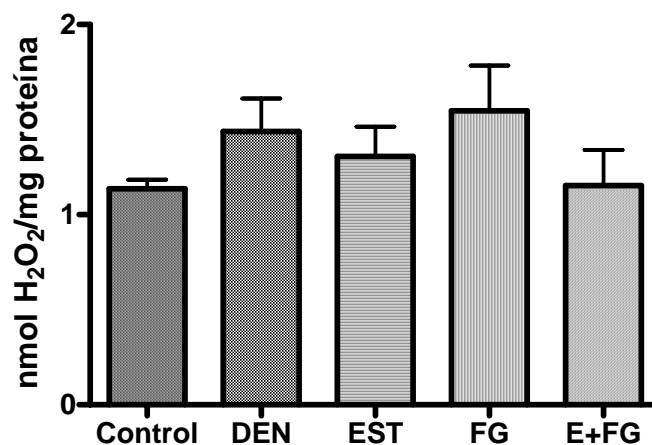


Figura 12. Niveles de peróxido de hidrógeno en corteza renal. No existen diferencias significativas. Las barras representan la media \pm el error estándar de 4 a 6 determinaciones.

7.7 Determinación de los niveles de diferentes proteínas por Western blot.

7.7.1 p53.

Por medio de la técnica de Western blot se determinaron los niveles de la proteína supresora de tumores p53 presente en la corteza renal. En la Figura 13 se muestra una imagen representativa de una auto-radiografía del Western blot. Como control de carga se inmuno-detectó la proteína constitutiva α -tubulina.

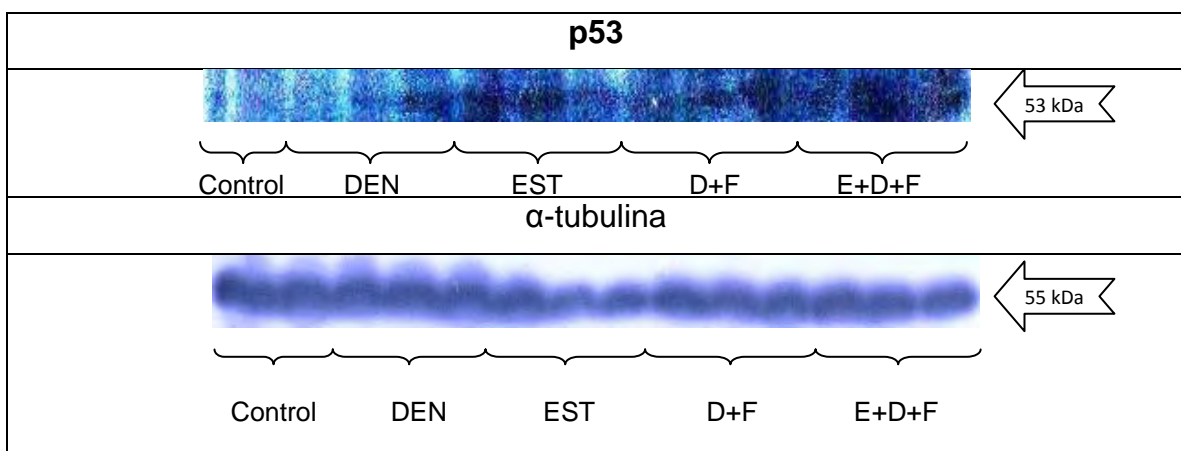


Figura 13. Imagen representativa de una autoradiografía de Western blot de p53

Se realizó un análisis densitométrico de las bandas de las autoradiografías y los datos obtenidos se muestran en la Figura 14. Se observan diferencias significativas entre el grupo Control y los grupos, D+F y E+D+F.

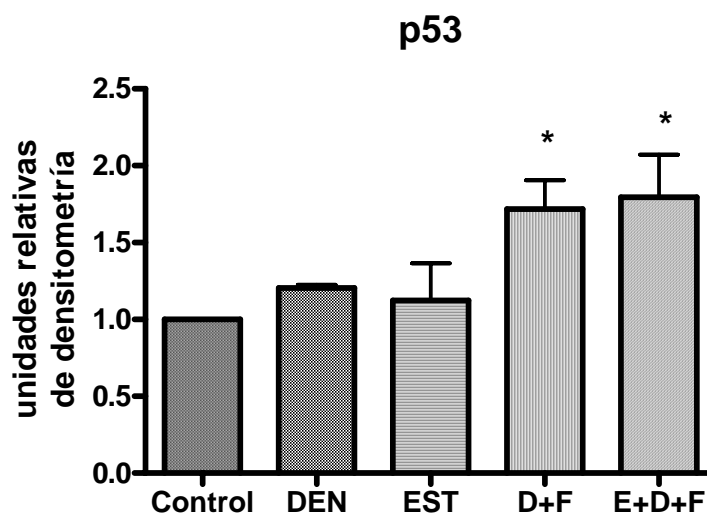


Figura 14. Análisis densitométrico de la autoradiografía del Western blot de p53. . Las barras representan la media \pm el error estándar de 3 a 5 determinaciones.

7.7.2 Mdm2.

Por medio de la técnica de Western blot se determinaron los niveles de la proteína reguladora de p53, mdm2, en la corteza renal. En la Figura 15 se muestra una imagen representativa de una auto-radiografía del Western blot. Como control de carga se immuno-detectó la proteína constitutiva α -tubulina. El análisis densitométrico indica que existe una disminución estadísticamente significativa en la expresión de ésta proteína en el grupo E+D+F (Figura 16).

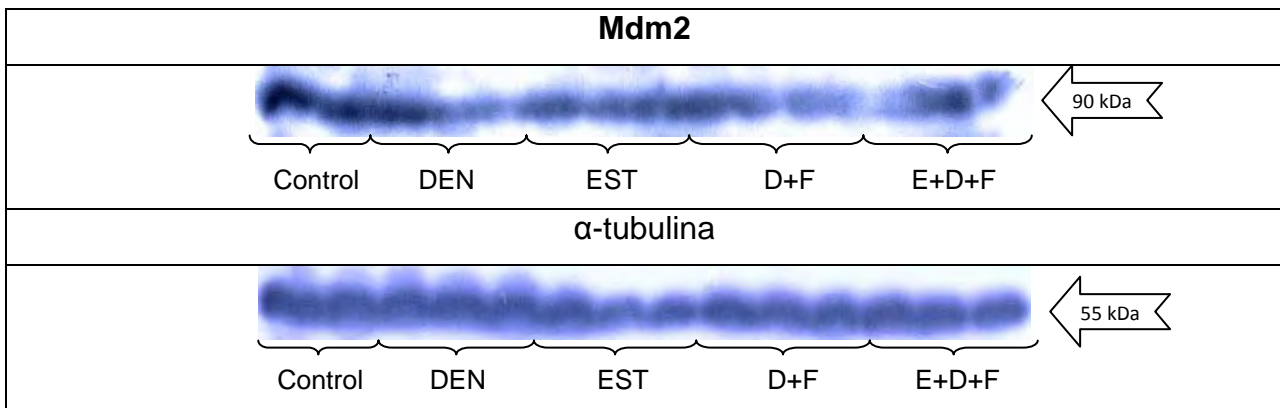


Figura 15: Imagen representativa de una autoradiografía del Western blot de mdm2.

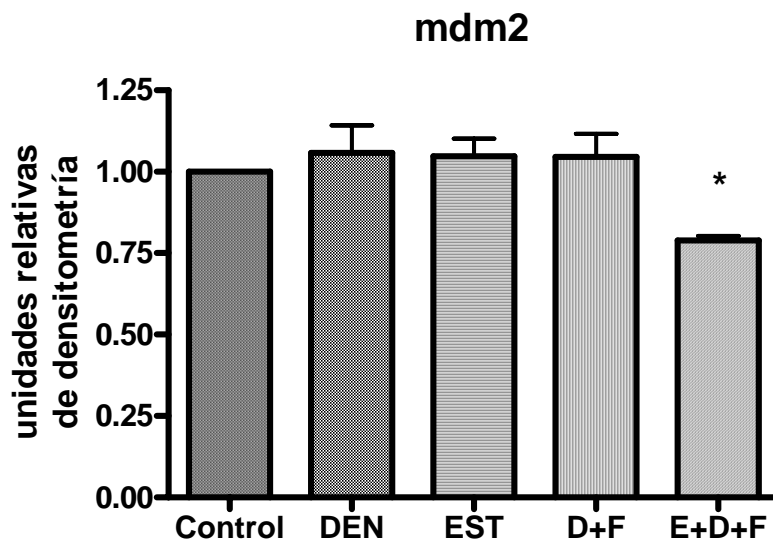


Figura 16. Análisis densitométrico de la auto-radiografías del Western blot de mdm2. Las barras representan la media \pm el error estándar de 4 a 5 determinaciones.

7.7.3 BAX

Por medio de la técnica de Western blot se determinaron los niveles de la proteína pro-apotótica BAX en la corteza renal. En la Figura 17 se muestra una imagen representativa de una auto-radiografía del Western blot. Como control de carga se inmuno-detectó la proteína constitutiva α -tubulina.

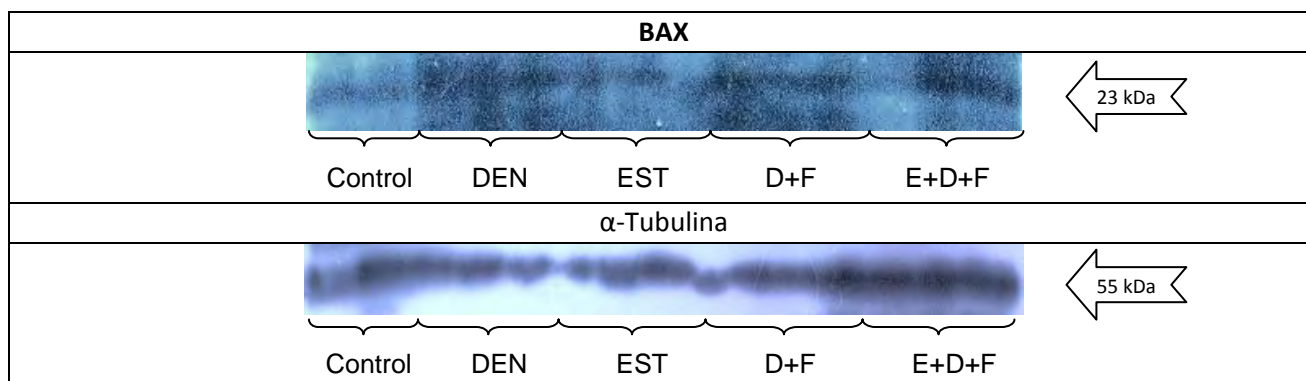


Figura 17. Imagen representativa de una autoradiografía del Western blot de BAX.

El análisis densitométrico indica que existe un aumento significativo en la expresión de BAX en el grupo tratado únicamente con EST. No existe ninguna alteración significativa en la expresión de ésta proteína en los demás grupos estudiados respecto al grupo Control (Figura 18).

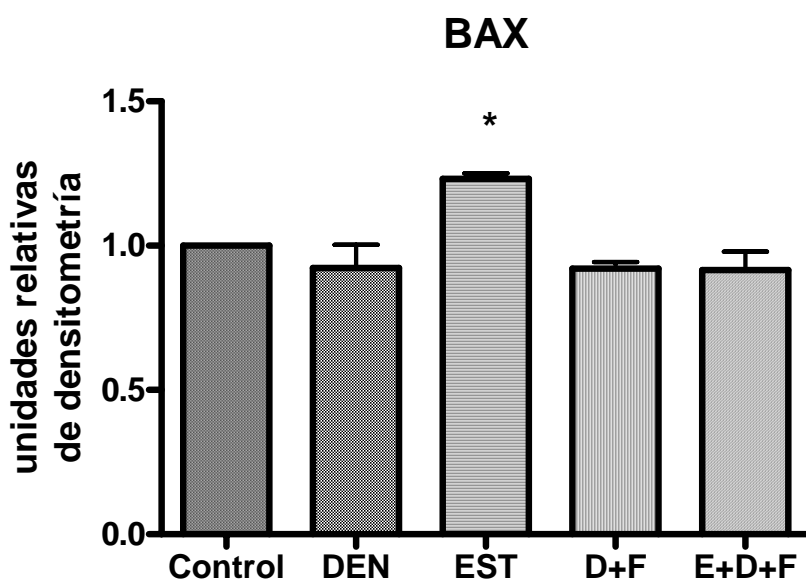


Figura 18. Análisis densitométrico de la autoradiografías del Western blot de BAX. Las barras representan la media \pm el error estándar de 4 a 5 determinaciones.

7.7.4 Bcl-2

Por medio de la técnica de Western blot se determinaron los niveles de la proteína anti-apotótica Bcl-2 en la corteza renal. En la Figura 19 se muestra una imagen representativa de una auto-radiografía del Western blot. Como control de carga se inmuno-detectó la proteína constitutiva α -tubulina.

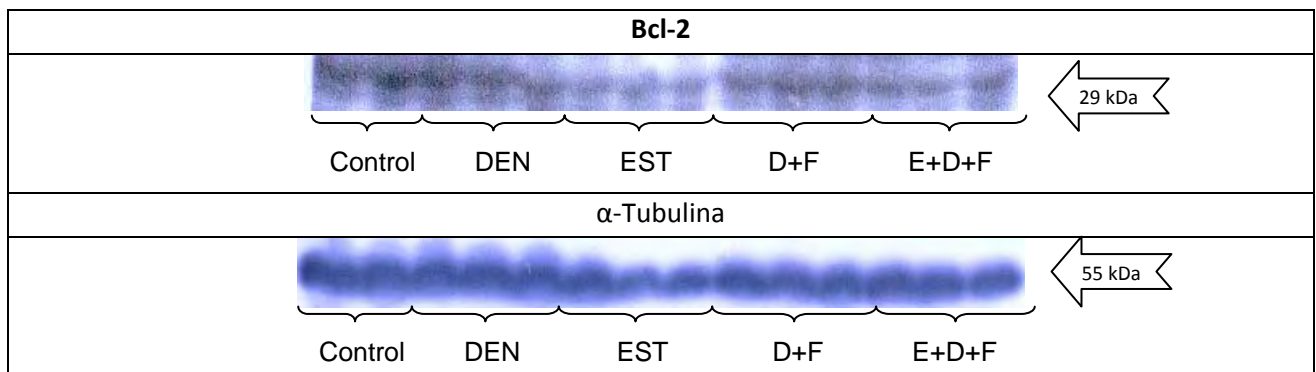


Figura 19. Imagen representativa de una autoradiografía de Western blot de Bcl-2.

El análisis densitométrico reveló que existe una diferencia significativa en la expresión de Bcl-2 entre los grupos EST y E+D+F.

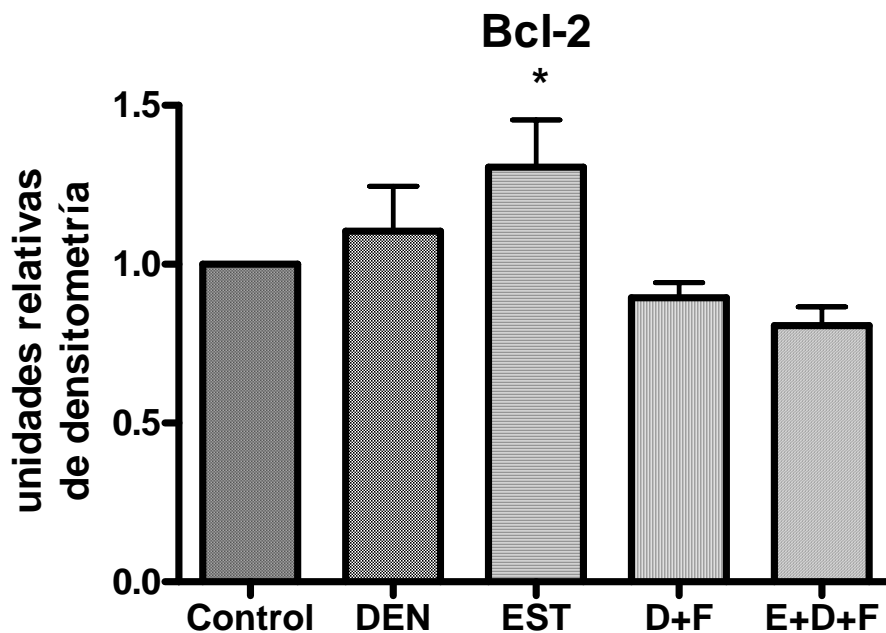


Figura 16. Análisis densitométrico de la autoradiografías del Western blot de Bcl-2. Las barras representan la media \pm el error estándar (e.e.) de 4 a 5 determinaciones.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el metabolismo de los organismos aerobios normalmente se forman EROs que en concentraciones fisiológicas son esenciales para el funcionamiento adecuado de la célula. Sin embargo, cuando estas concentraciones aumentan pueden inducir diferentes patologías, incluyendo el desarrollo y mantenimiento de células tumorales. Por tanto, no es sorprendente que p53 juegue un papel importante y complejo en la regulación de los niveles intracelulares de ERO's, ya que cumple funciones pro- y anti-oxidantes que contribuyen a la misma finalidad: suprimir tumores [Vousden y Bensaad, 2007]. Consecuencias de estrés celular tales como daño al ADN o expresión de oncogenes, llevan a la estabilización y posterior activación de la proteína supresora de tumores p53 por mecanismos postransduccionales. La respuesta celular a p53 depende de muchos elementos, incluyendo el tipo celular, su entorno, y si la célula presenta otras alteraciones oncogénicas [Schuler y Green, 2001].

La capacidad de p53 para inducir arresto del ciclo celular ó conducir a apoptosis son aparentemente dos funciones diferentes y separables [Rowan y cols. 1996; Ryan y Vousden, 1998]. En condiciones de estrés leve, concentraciones bajas de p53 son suficientes para inducir la expresión de varios genes involucrados en el arresto del ciclo celular, reparación del ADN y protección contra estrés oxidante, permitiendo la supervivencia de la célula. Cuando el estrés es continuo o el daño al ADN es irreparable, un nivel elevado de p53 induce genes pro-oxidantes y reprime la transcripción de varios genes antioxidantes, lo que se traduce en un aumento de los niveles de EROs intracelulares que dañan al ADN e incrementan la tasa de mutaciones. En células con p53 funcional, este escenario ayudaría a aumentar la apoptosis, pero cuando p53 se encuentra inactivo, conduciría a aumentar enormemente el riesgo de tumorigénesis. [Sablina y cols. 2005].

Los resultados del presente estudio demuestran que no hay aumento en los niveles de marcadores de estrés oxidante en el momento en que se tomaron las muestras de corteza renal (48 h después de la última inyección de FeNTA), sin embargo, en estudios agudos empleando el mismo carcinógeno se ha demostrado que estos marcadores alcanzan niveles máximos una hora después de su administración [Dávalos-Salas MI,2006]. No es sorprendente, entonces, que en la inmuno-detección de p53 se haya encontrado que el tratamiento con FeNTA produzca una sobre expresión de esta proteína. Sin embargo, la acumulación de p53 en el tejido renal no produce el

consiguiente aumento en la expresión de BAX, una de sus proteínas responsivas que tiene funciones pro-apoptóticas.

Éste podría ser uno de los mecanismos que ayuden a la inducción del desarrollo de CCR por la exposición al FeNTA. De hecho, se ha probado que el gen *p53* tiene una incidencia muy baja de mutaciones en tumores inducidos por el tratamiento con FeNTA [Akiyama y cols. 1995; Nishiyama y cols. 1995], por lo que resulta muy probable que *p53* sea de tipo silvestre pero esté inactivada, representando esto una semejanza del presente modelo experimental con la gran mayoría de CCR humanos, en donde a partir de líneas celulares de CCR primarios, se ha encontrado que *p53* lleva a cabo todos los pasos esenciales la activación en respuesta al daño al ADN, incluyendo la estabilización, acumulación nuclear y unión a ADN, pero falla al activar la transcripción. Más aún, esta inactivación parece no tener relación tampoco con las modificaciones postranscripcionales, pues en ese mismo estudio demostró que las líneas de CCR no presentaban afectación en fosforilaciones clave (Ser⁶, Ser¹⁵, Ser⁴⁶, Ser³⁹²) [Gurova y cols. 2004].

Estos hallazgos resultan particularmente interesantes al observar que en nuestro estudio *mdm2*, la proteína encargada de la ubiquitinación de *p53* y su consecuente degradación, no está sobre expresada, sino que presenta niveles constantes, e incluso está regulada a la baja en el caso del grupo pretratado con EST, situación que aumentaría de forma indirecta la cantidad de *p53* disponible.

En este sentido, también se ha propuesto que *p53* presenta funciones pro-apoptóticas independientes de sus funciones como factor de transcripción, mismas que están relacionadas con la vía intrínseca de apoptosis mediada por la mitocondria, y que aún teniendo mecanismos diferentes, ambas vías tienen su punto de convergencia en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa mediante la activación de BAX o BAK, [Moll y cols. 2005] y al encontrar en el presente trabajo niveles normales de BAX, podríamos decir que aún esta vía pro-apoptótica de *p53* probablemente esté también comprometida.

Por otro lado, tampoco la proteína Bcl-2 presentó alteraciones en los grupos tratados con FeNTA donde debía de haber disminuido a consecuencia del aumento en el nivel de *p53*, lo que confirma que esta proteína no es capaz de dar inicio a esta vía de apoptosis.

Asimismo, el hecho de que tampoco aumenten los niveles de Bcl-2, indica que probablemente el mecanismo de carcinogenicidad del FeNTA no involucra la sobreexpresión de esta proteína anti-apoptótica.

El EST preparado en nuestro laboratorio demostró tener una capacidad antioxidante sobresaliente, como se puede observar en la determinación de inactivación del anión superóxido, y en el protocolo *in vivo* no produce alteraciones en el desarrollo normal de las ratas, como disminución en el peso corporal, además de que los animales lo consumen sin problemas ya que el volumen bebido por el grupo control es igual a aquél de EST consumido por los grupos correspondientes.

Sin embargo, es necesario establecer su función antioxidante *in vivo* a los tiempos de mayor nivel de estrés oxidante, que como ya se comentó, son una hora después de la administración del FeNTA. Por otro lado, se encontró una disminución estadísticamente significativa en el peso corporal de las ratas tratadas con FeNTA, lo cual se ha observado con anterioridad y se relaciona con el desarrollo de cáncer en este modelo [Ebina y cols. 1986; Preece y cols. 1989] y el tratamiento con EST no evitó o disminuyó este efecto.

Con base en los resultados, se puede afirmar que en esta etapa subcrónica del modelo de carcinogénesis por FeNTA hay un aumento en los niveles de p53 pero que esta proteína no induce al aumento de BAX ni la disminución de Bcl-2, por lo que al menos en este sentido se puede concluir que la proteína no está funcional.

Asimismo, el mecanismo que inactiva a p53 es independiente de los niveles de la proteína mdm2. Este escenario es semejante al presente en muchos de los casos de CCR humanos. El tratamiento con EST no modificó la expresión de p53 ni su funcionalidad para inducir BAX o regular la inhibición de Bcl-2.

IX. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un extracto de la testa de semillas de tamarindo, rico en polifenoles con gran capacidad antioxidante.
- Se implementó un modelo *in vivo* de tratamiento subcrónico con FeNTA, el cual indujo aumento en los niveles de la proteína p53 en la corteza renal
- Se observó que la proteína p53 no fue capaz de modular los niveles de sus proteínas responsivas mdm2, BAX y Bcl-2
- Los resultados muestran que el modelo de carcinogénesis podría tener similitudes con los carcinomas de células renales humanos.
- El tratamiento con EST en ratas Wistar macho no modifica el aumento en los niveles p53 ni la pérdida de su funcionalidad en la regulación de las proteínas responsivas estudiadas.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal C, y cols. (2004) Anti-angiogenic efficacy of grape seed extract in endothelial cells. *Oncol Rep* 11(3):681-5.
- Agarwal C, y cols. (2007) Fractionation of high molecular weight tannins in grape seed extract and identification of procyanidin B2-3,3-di-O-gallate as a major active constituent causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis* 28(7):1478-84.
- Akiyama T, y cols. (1995) Absence of ras mutations and low incidence of p53 mutations in renal cell carcinomas induced by ferric nitrilotriacetate. *Jpn J Cancer Res*; 86(12):1143-1149
- Alam MS, y cols. (2006) Evaluation of antioxidant activity of *Salix caprea* flowers. *Phytother Res* 20(6):479-83.
- An J, Rettig MB (2005) Mechanism of von Hippel-Lindau protein-mediated suppression of nuclear factor kappa B activity. *Mol Cell Biol* 25(17):7546-56.
- Ansar S, y cols. (1999) Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitrilotriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. *Carcinogenesis* 20(4):599-606.
- Athar M, Iqbal M (1998) Ferric nitrilotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis* 19(6):1133-9.
- Atkins MB, y cols. (2000) Renal neoplasia. En: Brenner BM. *Brenner & Rector's: The Kidney*, Vol. 2, 6th Edition, W.B. Saunders Company pp 1844-62.
- Bagchi D, y cols. (2003) Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Res* 523-524:87-97.
- Bendia E, y cols. (2005) Effect of cyanidin 3-O-beta-glucopyranoside on hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis induced by oxidative stress. *Dig Liver Dis* 37(5):342-8.
- Benhar M, y cols. (2001) Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates cJun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 21:6913-26.
- Bosetti C, y cols. (2007) Flavonoids and the risk of renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(1):98-101.
- Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition reviews* 56:317-33.
- Buffoli B, y cols. (2005) Provinol prevents CsA-induced nephrotoxicity by reducing reactive oxygen species, iNOS, and NF- κ B expression. *J Histochem Cytochem* 53(12):1459-68.
- Burcham PC. (1998) Genotoxic lipid peroxidation products: DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 13:287-305.
- Chen L, y cols. (2001) Molecular mechanisms by which iron induces nitric oxide synthesis in cultured proximal tubule cells. *Exp Nephrol* 9:198-204.

- Cheng KC, y cols. (1992) 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions. *J Biol Chem* 267:166-72.
- Cho DS, y cols. (2005) Cyclooxygenase-2 and p53 expression as prognostic indicators in conventional renal cell carcinoma. *Yonsei Med J* 46(1):133-40.
- Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death: Critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-219.
- Dávalos Salas MI. (2006) Efecto del tratamiento con un concentrado de arándano sobre alteraciones inducidas por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) tanto in vivo como in vitro. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Bioquímicas). Facultad de Química, UNAM, México.
- Deguchi J, y cols. (1995) Sex hormone dependent renal cell carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in Wistar rats. *Jpn J Cancer Res* 86(11):1068-71.
- Ebina Y, y cols. (1986) Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of iron- and aluminum-nitrilotriacetate complexes in rats. *J Natl Cancer Inst* 76(1):107-13.
- Elledge RM, y cols. (1995) Life and death by p53. *BioEssays* 17:923-30.
- Farnsworth NR, Bunyapraphatsara N (1992) Thai medicinal plants recommended for primary health care system. Prachachon, Thailand.
- Feng R, y cols. (2005) Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem* 280(30):27888-95.
- Floyd RA. (1990) The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11:1447-50.
- Fukuda A, y cols. (1996) 4-Hydroxy-2-nonenal cytotoxicity in renal proximal tubular cells: protein modification and redox alteration. *Arch Biochem Biophys* 333(2):419-26.
- Gallagher, S.J., y cols. (2006) The ARF tumour suppressor. *Int. J. Biochem. Cell Biol*; 38, 1637–1641.
- Gago-Domínguez M, y cols. (2002) Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States) *Cancer causes and Control* 13:287-93.
- Gago-Domínguez M, Castelao J Esteban (2006) Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: Further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radic Biol Med.* 40:721-33.
- Gemmill RM, y cols. (2005) Synergistic growth inhibition by Iressa and Rapamycin is modulated by VHL mutations in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 20;92(12):2266-77.
- Genestra M. (2007) Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* 19(9):1807-19.
- Gudkov AV, Komarova EA. (2007) Dangerous habits of a security guard: the two faces of p53 as a drug target *Human Molecular Genetics*, Vol. 16, Review Issue 1 R67–R72.
- Gurova KV, y cols. (2004) p53 pathway in renal cell carcinoma is repressed by a dominant mechanism. *Cancer Res.* 2004;64(6):1951-8.
- Halder B, y cols. (2007) Molecular mechanism of black tea polyphenols induced apoptosis in human skin cancer cells: involvement of Bax translocation and mitochondria mediated death cascade. *Carcinogenesis* 4 [Epub ahead of print]

- Halliwell B, y cols. (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we know?. *J Lab Clin Med* 199:598-620.
- Hansen J, y cols. (2006) Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox Signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 46:215-34.
- Hara S, y cols. (2005) Akt activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor. *Ann Oncol* 16(6):928-33.
- Harris SL, Levine AJ.(2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*; 24, 2899–2908.
- Haupt, Y, y cols. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*; 387, 296–299.
- Hecht SS. (2000) Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab Rev* 32:395-411.
- Hermanns RC, y cols. (1998) Urinary excretion of biomarkers of oxidative kidney damage induced by ferric nitrilotriacetate. *Toxicol Sci* 43: 241-9.
- Hiroyasu M, y cols. (2002) Specific allelic loss of p16INK4A tumor suppressor gene after weeks of iron-mediated oxidative damage during rat renal carcinogenesis. *Am J Pathol* 160(2):419-23.
- Horiguchi A, y cols. (2003) Elevated Akt activation and its impact on clinicopathological features of renal cell carcinoma. *J Urol* 169(2):710-3.
- Huang Q, y cols. (2005) "(+)-Catechin, an ingredient of green tea, protects murine microglia from oxidative stress-induced DNA damage and cell cycle arrest", *J Pharmacol Sci* 98:16-24.
- Ichihashi K, y cols. (2001) Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes. *J Biol Chem* 276(26):23903-13.
- Iliopoulos O. (2005) Molecular therapeutic options for management of advanced renal cell carcinoma. American Society of Clinical Oncology, 2005 Educational Book. 41st Annual Meeting. May 13-17 Orlando FL.
- Inoue S, y cols. (1987) Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric-nitriloacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res* 47:6522-7.
- Ito N, y cols. (1987) The role of antioxidants in chemical carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 78:1011-26.
- Jahangir T, y cols. (2006) Farnesol prevents Fe-NTA-mediated renal oxidative stress and early tumour promotion markers in rats. *Hum Exp Toxicol* 25(5):235-42.
- Kallio J, y cols. (2003) Membranous location of EGFR immunostaining is associated with good prognosis in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 6;89(7):1266-9.
- Kaur M, y cols. (2006) Grape seed extract inhibits in vitro and in vivo growth of human colorectal carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 12(20 Pt 1):6194-202.
- Kaur G, y cols. (2006) Punica granatum (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol* 44(7):984-93.
- Kawanishi S, y cols. (2002) The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 32:822-32.

- Khan AU, y cols. (1995) Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem Biol* 2:437-45
- Khan N, Sultana S. (2005a) Anticarcinogenic effect of *Nymphaea alba* against oxidative damage, hyperproliferative response and renal carcinogenesis in Wistar rats. *Mol Cell Biochem* 271(1-2):1-11.
- Khan N, Sultana S. (2005b) Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sci* 77(11):1194-210.
- Komutarin T. (2004) Extract of seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo, *Food Chem Toxicol* 42:649-658.
- Kramer BA, y cols. (2005) Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 173(5):1496-501.
- Kubbutat, MH y cols. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*; 387, 299–303.
- Landi Librandi A, y cols. (2007) Effect of the extract of the tamarind (*Tamarindus indica*) fruit on the complement system: studies in vitro and in hamsters submitted to a cholesterol-enriched diet. *Food Chem Toxicol* 45(8):1487-95.
- Langner C, y cols. (2004) Are heterogenous results of EGFR immunoreactivity in renal cell carcinoma related to non-standardised criteria for staining evaluation? *J Clin Pathol.* 57(7):773-5.
- Lee KW, Lee HJ. (2006) The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *BioFactors* 26:105-21.
- Li JL, y cols. (1987) Subacute nephrotoxicity and induction of renal cell carcinoma in mice treated with ferric nitrilotriacetate. *Cancer Res* 47(7):1867-9.
- Linehan WM. (2005) Genetic basis of renal cell carcinoma: Disease specific approaches to therapy. American Society of Clinical Oncology, 2005 Educational Book. 41st Annual Meeting. May 13-17, Orlando FL.
- Linehan WM. (2007) Genetic basis of kidney cancer: opportunity for disease-specific approaches to therapy. American Society of Clinical Oncology, 2007 Educational Book. 43st Annual Meeting. June 1-5 Chicago IL.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, y cols. (2002) Cáncer, en *Biología Celular y Molecular*, 4a Edición, Ed. Panamericana, Madrid: 1076-1078.
- Loo G. (2003) Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation(1) (review). *J Nutr Biochem* 14(2):64-73
- Lu D, y cols. (2007) The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *Biochem J* 15;401(2):559-67.
- Mackenzie G, y cols. (2003), Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF- κ B activation at multiple steps in Jurkat T cells, *FASEB* 18(1):167-9
- Maiti R, y cols. (2004) Antidiabetic effect of aqueous extract of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 92(1):85-91.

- Manna SK, y cols. (1998) Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem* 273(21):13245-54
- Martinello F, y cols. (2006) Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food Chem Toxicol* 44(6):810-18.
- Matés JM, y cols. (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595-603.
- Matos H, y cols. (2000) Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch Biochem Biophys* 383(1):56-9.
- May P, May, E.(1999) 20 years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* (18): 7621–7636.
- Merseburger AS, y cols. (2005) Membranous expression and prognostic implications of epidermal growth factor receptor protein in human renal cell cancer. *Anticancer Res* 25(3B):1901-7.
- Michael D, Oren M. (2003) The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin. Cancer Biol*; 13, 49–58.
- Moch H, y cols. (1997) Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor cell proliferation in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 28(11):1255-9.
- Moll UM, y cols. (2005) Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol*; 17(6):631-636.
- Morais C, y cols. (2006) Pyrrolidine dithiocarbamate exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects in renal cell carcinoma cell lines. *Nephrol Dial Transplant*. En prensa.
- Nichenametla SN, y cols. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46(2):161-83.
- Nishiyama Y, y cols. (1995) 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 rat induced by ferric nitrilotriacetate. *Cancer Res* 55:1150-8.
- Nelson E, y cols. (2007) Renal cell carcinoma: current status and emerging therapies. *Cancer Treat Rev* 33(3):299-313.
- Oberley TD. (2002) Oxidative damage and cancer. *Am J Pathol* 160(2):403-8.
- Oberley TD, y cols. (1999) Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free radical Biol Med* 27:695-703.
- Okada S, y cols. (1982) Induction of rat renal adenocarcinoma by ferric-nitriloacetate (FeNTA). *Jpn Arch Intern Med* 29:485-91.
- Okada S. (2003) Prevention of free-radical mediated tissue damage and carcinogenesis induced by low-molecular-weight iron. *Biometals* 16:99-101.
- Okamoto K, y cols. (1994) Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 58:825-29.
- Okamoto K, y cols. (1996) Overexpression of human mutT homologue gene messenger RNA in renal-cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. *Int J Cancer* 65(4):437-41.

- Okazaki Y, y cols. (2005) Suppressive effects of dietary curcumin on the increased activity of renal ornithine decarboxylase in mice treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Biochim Biophys Acta* 1740(3):357-66.
- Olsen BB, y cols. (2007) Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway: A study on its mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):227-37.
- Omoya T, y cols. (2001) Effects of idoxifene and estradiol on NF-kappaB activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver* 21(3):183-91.
- Oya M, y cols. (2001) Constitutive activation of nuclear factor-kB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* 20:3888-96.
- Oya M, y cols. (2003) Increased nuclear factor-κB activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 24:377-84.
- Pammer J y cols. (1998) Expression of bcl-2, bcl-x, bax and bak in renal parenchyma, oncocytomas and renal cell carcinomas. *Pathol Res Pract.*194(12):837-45.
- Parejo I, y cols, (2002) Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*; 50(23):6882-90.
- Parrota J. (2001) *Healing plants of penninsular India*, Wallingford, UK, CAB International, ISBN 0857899: 501-2.
- Phakruschaphan T. (1982) Comparison of peeling and extraction methods in the production of Tamarind seed gum. *The Kasetsart Journal of Natural Sciences* 16 (2):74-81.
- Pourmorad F, y cols. (2006) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*; 5(11), 1142-45
- Prasad L, y cols. (2006) Effect of gallic acid on renal biochemical alterations in male Wistar rats induced by ferric nitriloacetic acid. *Hum Exp Toxicol* 25(9):523-9.
- Preece NE, y cols. (1989) Effects of acute and sub-chronic administration of iron nitrilotriacetate in the rat. *Toxicology*. 1989 Nov;59(1):37-58.
- Ramos A, y cols. (2003) Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 87:241-6
- Rathmell KW. (2007) Clinical implications of the von Hippel-Lindau gene *American Society of Clinical Oncology, 2007 Educational Book. 43st Annual Meeting. June 1-5 2007 Chicago IL.*
- Rice-Evans CA, y cols. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 20:933-56.
- Rice Evans CA, y cols. (2001) Flavonoid antioxidant. *Current Med Chem* 8:797-807.
- Rowan S, y cols.(1996) Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *EMBO J*; 15(4):827-838.
- Ryan KM, Vousden KH (1998) Characterization of structural p53 mutants which show selective defects in apoptosis but not cell cycle arrest. *Mol Cell Biol*. 1998; 18(7):3692-3698.
- Sablina AA, Budanov AV. (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med*; 11: 1306-1313.

- Sakano K, y cols. (2005) "Procyanidin B2 has an anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage". *Free Rad Biol Med* 39:1041-9.
- Salah N, y cols. (1995) Poliphenolicflavonals as scavengers aqueous phase radicals and chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 322:339-46.
- Schuler M, Green DR. (2001) Mechanism of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*; 29(Pt 6): 684-688.
- Schwarts O, y cols. (2005) p53 is an independent predictor of tumor recurrence and progression after nephrectomy in patients with localized renal cell carcinoma. *J Urol* 173(3):725-8.
- Shahidi F, y cols. (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32:67-103.
- Shankar S, y cols. (2007) Green tea polyphenols: biology and therapeutic implications in cancer. *Front Biosci* 1;12:4881-99.
- Soares SM, y cols. (2006) Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food Chem Toxicol* 44(6):810-8.
- Staehler M, y cols. (2005) Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Curr Drug Targets* 6(7):835-46.
- Stoner GD, y cols. (1995) Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J Cell Biochem Supplement* 22:169-80.
- Sudjaroen Y, y cols. (2005) Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp, *Food and chemical Toxicology* 43:1673-82
- Szatrowski TP, y cols. (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51:794-8.
- Tanaka T, y cols (1999) High incidence of allelic loss on chromosome 5 and inactivation of p15INK4B and p16INK4A tumor suppressor genes in oxystress-induced renal cell carcinoma of rats. *Oncogene* 18(25):3793-7.
- Toyokuni S, y cols. (1993) DNA single and double-strand breaks produced by ferric nitriloacetate in relation to renal tubula carcinogenesis. *Carcinogenesis* 14:223-7.
- Toyokuni S, y cols.(1994) 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* 91(7):2616-20.
- Toyokuni S, y cols. (1995) Treatment of Wistar rats with renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate causes DNA-protein cross linking between thymine and tyrosine in their renal chromatin. *Int J Cancer* 62:309-13
- Tsuda T. (1993) Screening for antioxidative activity of edible pulses. *Biosci Biotech Biochem* 57:1606-8.
- Tsuda T. (1994) Antioxidative components isolated from the seed of Tamarind (*Tamarindus indica* L.), *J Agric Food Chem* 42:2671-4.
- Umemura T, y cols. (1990) Formation of 8-hydroxydiguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitriloacetate. *Carcinogenesis* 11:345-7.

- Valko M, y cols. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160:1-40.
- Veal EA, y cols. (2007) Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 13;26(1):1-14.
- Vousden KH (2002). Activation of the p53 tumor supresor protein. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1602: 47-59.
- Vousden KH, Bensaad K. (2007) p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol*; 17(6): 286-291.
- Walker CL. (2005) Cell-signaling defects in renal cell carcinoma. *American Society of Clinical Oncology, 2005 Educational Book. 41st Annual Meeting. May13-17 2005 Orlando FL. Michael Perry Ed.*
- Wattenberg LW. (1985) Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* 45:1-8.
- Yoshioka K, Nakamura S. (2001) Chromosome 9 and 17 aberrations and p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization in renal-cell carcinoma. *Mol Urol* 5(1):11-7.
- Zamzami N, Kroemer G. (2005) p53 in apoptosis control: An introduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331 685–687.
- Zhang W, y cols. (2006) “Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4b-8)-epicatechin] suppress the expression of cyclooxygenase-2 in endotoxin treated monocytic cells”, *Biochem Biophys Res Commun* 345:508-15.
- Zhang XY, y cols. (2005) Proanthocyanidin from grape seeds enhances doxorubicin-induced antitumor effect and reverses drug resistance in doxorubicin-resistant K562/DOX cells. *Can J Physiol Pharmacol* 83(3):309-18.