



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**COMPORTAMIENTO DE LA PROTEÍNA CINASA C ϵ
(PKC ϵ) EN UNA ETAPA TEMPRANA DEL MODELO DE
CARCINOGENESIS RENAL POR FeNTA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:

ALFREDO TLAHUITZIN RANGEL GÓMEZ



MÉXICO, D.F

2011



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: José Pedraza Chaverri

Vocal: María Elena Ibarra Rubio

Secretario: Samuel Canizales Quinteros

Suplente 1: Marta Alicia Menjivar Iraheta

Suplente 2: Vanessa Rebeca Maya Ampudia

Sitio en donde se desarrolló la tesis:

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

ASESOR DEL TEMA: María Elena Ibarra Rubio

SUPERVISOR TÉCNICO: José Dolores Solano Becerra

SUSTENTANTE (S): Alfredo Tlahuitzin Rangel Gómez

RECONOCIMIENTOS

El proyecto se realizó con apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico bajo el PAPIIT No. IN-227010.

A la **Dra. María Elena Ibarra Rubio** por su tutoría en este proyecto de investigación.

Al **M. en C. José Dolores Solano Becerra** por su asesoría y asistencia técnica.

Al personal de la Unidad de Experimentación Animal, especialmente a **M.V.Z. Lucía Macías Rosales**, por su indispensable colaboración en el cuidado y manejo de animales.

A los miembros del jurado asignado para la revisión de la tesis por sus comentarios y observaciones.

Agradecimientos

A mis padres, por todo su cariño, apoyo, perseverancia y dedicación para formar no sólo un profesionista sino una persona con valores, capaz de demostrar fortaleza, determinación, humildad y principalmente bondad ante la vida. Sencillamente no tengo palabras para demostrar mi inmensa gratitud.

A mis hermanos, por ser parte de mi vida, por su cariño, afecto y admiración.

A la Dra. María Elena Ibarra, por haber dado un giro en mi vida desde el momento en que entró al aula como mi profesora, fomentó en mí: la pasión, la curiosidad e inspiración hacia lo maravilloso y complejo que es el fenómeno de la vida. Con su ahínco y tenacidad me hizo comprender que los grandes logros se recogen como frutos producto de la dedicación, disciplina, orden y arduo trabajo. Gracias por creer en mí.

A José Solano, por toda su paciencia, disposición, interés, compartir su experiencia y conocimientos, pero principalmente por su amistad y apoyo desde mi llegada al laboratorio.

A mis tíos, Rocío, Mary, Salvador, Edén, Luis, Paco y Celia por verme crecer, por consentirme, por su interés, apoyo, pero sobre todo su inmenso afecto.

A mis entrañables compañeros y amigos del laboratorio 120, por todos los momentos que compartimos juntos desde que llegué al laboratorio por primera vez. Desde el trabajo en equipo, la agradable convivencia, hasta el desarrollo de una sincera amistad.

A Chabetty, Telma, Chío y Francisco, por fungir como figuras de ejemplo a seguir, por todo su interés tanto en mi desarrollo personal como profesional, por siempre estar en plena disposición para escucharme no solo en el plano académico sino también en un plano personal; gracias por su amistad, confianza y sobre todo su afecto.

A Karla y Paty, por ser excelentes compañeras para trabajar y además para compartir buenos momentos de agradable convivencia, fue muy grato para mí aprender a su lado. Gracias por su cariño e interesarse en mi persona.

A mis entrañables Boluños, por haber compartido tantos momentos y experiencias inolvidables, por su sincera y valiosa amistad y en particular.

A Mariela, Luz, Luis y Alan, por todos los buenos y malos momentos que pasamos durante la carrera, por su preocupación, cariño e interés en mis problemas.

A Daniela, Tania, Erick, Alfonso, Diego, Ramón, por todos los gratos momentos, por siempre estar dispuestos a escucharme cuando más lo necesitaba pero sobre todo por su confianza y sincero afecto.

A mis compañeros y amigos de la carrera, Sandra C., Guadalupe, Jocelyn, Carmen, Narda, Areli, Cecy, Kary, Oscar e Iván, con quienes conté con la dicha de toparme con ustedes desde un inicio, compartimos tanto buenos como malos momentos durante todos estos años, lo cual fortaleció la amistad y desde luego el afecto.

A mis amigos Mónica y Sandra W., por todos los años de amistad que llevamos desde que nos conocimos en la preparatoria. **También a Jesús y Diego**, por todos los años de amistad y buenos momentos, pero sobre todo por demostrar una amistad incondicional ya que siempre estuvieron cuando más lo necesité.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BUN	Nitrógeno ureico sanguíneo
CCR	Carcinoma de células renales
ccCCR	Carcinoma de células renales de células claras
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
DAG	Diacilglicerol
DEN	N-dietilnitrosamina
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EST	Extracto de semillas de tamarindo
FeNTA	Nitritotriacetato de hierro
FT	Fenoles totales
MAPKs	Cinasas de proteína activadas por mitógenos
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
NBT	Azul de nitrotetrazolio
PKC ϵ	Proteína cinasa C ϵ
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
PI3-K	Cinasa de fosfatidil inositol trifosfato.
PLC	Fosfolipasa C
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK-1	Cinasa dependiente de fosfoinosítido I
PVDF	Fluoruro de polivinilo
RTK	Receptor de cinasa de tirosinas
SFB	Suero fetal bovino
WB	Western blot

ÍNDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Antecedentes	3
2.1 Cáncer y estrés oxidante	3
2.2 Carcinoma de células renales	5
2.3 Nitritotriacetato de hierro (FeNTA) como modelo de estudio del CCR	5
2.4 Generalidades de Proteína cinasa C (PKC)	8
2.4.1 Estructura de PKC	9
2.4.2 Mecanismos de activación e inactivación de PKC	10
2.4.3 PKC en cáncer	13
2.4.4 PKC y estrés oxidante	14
2.4.5 PKC en cáncer renal	15
2.5 Proteína cinasa C ϵ (PKC ϵ)	16
2.6 Antioxidantes	18
2.6.1 Extracto de semillas de tamarindo	19
3. Justificación	21
4. Hipótesis	22
5. Objetivos	22
6. Material y métodos	23
6.1 Diseño experimental	23
6.1.1 Administración del EST	26
6.1.2 Preparación y administración del DEN	26
6.1.3 Preparación y administración del FeNTA	26
6.1.4 Sacrificio y toma de muestras	27
6.2 Métodos	28
6.2.1 Obtención del EST	28
6.2.2 Caracterización del EST	28
6.2.3 Función renal	29
6.2.4 Niveles de expresión de PKC ϵ fosforilada	30
6.3 Análisis estadístico	32
7. Resultados	33
7.1 Caracterización del EST	33
7.2 Desarrollo del protocolo	34
7.3 Observaciones macroscópicas de los riñones	35
7.4 Evaluación de la función renal	36
7.5 Niveles de expresión de PKC ϵ fosforilada	36

	Página
8. Discusión de resultados	38
9. Conclusiones	41
10. Apéndice	42
11. Referencias	54

1. RESUMEN

El carcinoma de células renales (CCR) es uno de los tipos de cáncer menos estudiados, su diagnóstico generalmente se da en etapas muy avanzadas, por lo que presenta una elevada tasa de mortalidad y se dificulta su estudio en etapas tempranas. Uno de los modelos establecidos para inducir cáncer renal en ratas es el modelo de nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). La administración intraperitoneal aguda, es decir a las 24 h de una inyección con FeNTA, produce necrosis renal con incrementos en los niveles de estrés oxidante, y su administración en estudios crónicos (4 meses de inyecciones repetidas) lleva al desarrollo de CCR. En nuestro laboratorio hemos encontrado que después de un mes de exposición al carcinógeno ya se encuentran lesiones preneoplásicas. Aún cuando se sabe que el estrés oxidante está involucrado en la carcinogénesis por FeNTA, el modelo no está totalmente caracterizado. Por otro lado, la PKC ϵ es una isoforma perteneciente al grupo novel de la familia de enzimas PKC y se caracteriza por estar expresada en una gran variedad de tejidos. La PKC ϵ se ha asociado con diversas vías de señalización involucradas en proliferación, diferenciación y contracción muscular, entre otros procesos celulares. Por otra parte, la evidencia sugiere que también existe un papel crítico de PKC ϵ en varias enfermedades como Alzheimer y cáncer. En líneas celulares de CCR se ha reportado que la sobreexpresión de PKC ϵ correlaciona con una alta actividad proliferativa y que su localización membranal refleja la activación de la enzima, asociándose con un alto potencial de invasividad. Además, con base en diferentes estudios se ha llegado a sugerir que la alteración de esta proteína está asociada con la carcinogénesis de muchos tipos celulares. Así mismo, otros hallazgos indican que el estrés oxidante ejerce efectos directos e indirectos que llevan a la activación de esta familia de enzimas.

La participación de especies reactivas de oxígeno como parte del mecanismo de la carcinogénesis renal, nos ha conducido a la búsqueda de antioxidantes para prevenir o disminuir el desarrollo del cáncer. Por tal razón, en nuestro laboratorio se elaboró un extracto de semillas de tamarindo (EST), con un alto contenido de compuestos polifenólicos, que logró disminuir el desarrollo y la incidencia de CCR en el modelo experimental crónico por FeNTA.

Con base en todo lo anterior, se consideró de gran relevancia analizar el comportamiento de PKC ϵ en etapas tempranas del modelo e investigar el efecto del EST sobre éste. Para esto se montó un protocolo de 1 mes de tratamiento con el carcinógeno FeNTA. El protocolo experimental se llevó a cabo con ratas macho Wistar que se dividieron en los siguientes grupos: a) Control; b) tratado con EST (antioxidante) el cual se administró en el agua para beber a lo largo del estudio; c) tratado con dietilnitrosamina (DEN, iniciador tumoral) que se administró en una dosis única por vía intraperitoneal; d) tratado con FeNTA (promotor tumoral) administrado por vía intraperitoneal 2 veces a la semana con aumento gradual en la dosis por semana, durante 1 mes; e) tratado con DEN+FeNTA (D+F); y f) tratado con EST+DEN+FeNTA (E+D+F). Al final del protocolo se sacrificaron las ratas por decapitación

a las 48 horas de la última administración del carcinógeno. Acto seguido, se recolectaron muestras sanguíneas y se extrajeron los dos riñones de cada rata, obteniendo la corteza que fue almacenada a -70°C hasta el día la determinación de PKCε.

Durante el desarrollo del protocolo, se registró el peso corporal de los animales y los resultados obtenidos nos indican que el EST no tiene efectos negativos sobre el crecimiento de las ratas. Por otro lado, el grupo tratado con DEN presenta una disminución del peso corporal al día siguiente de su administración; sin embargo, después presentó un crecimiento normal, aunque no alcanzó el peso del grupo control al final del protocolo. En cambio, en los grupos de tratamiento con el carcinógeno (FeNTA, D+F y E+D+F) no hubo tal restablecimiento a lo largo del estudio y el EST no fue capaz de prevenir tal efecto. Por lo anterior, se sugiere que estos últimos grupos de ratas sufrieron deterioro en su salud.

Para determinar si la función renal sufrió alteraciones debidas a los tratamientos, se analizaron los niveles de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) al final del estudio, encontrando que no hubo alteraciones, lo que sugiere que no hay fallas en la función renal. Esto también nos sirvió de referencia para averiguar si con el esquema de tratamiento utilizado se alcanzó una etapa diferente a la etapa de daño agudo por FeNTA ya que en éste se induce insuficiencia renal aguda. Además, los resultados obtenidos en los niveles de BUN coinciden con lo observado en el CCR humano, en el cual no hay alteraciones en la función renal durante el desarrollo de esta neoplasia, siendo ésta una de las razones que dificulta su diagnóstico oportuno.

En cuanto al comportamiento de PKCε, se encontró que los niveles de su forma fosforilada están significativamente incrementados en la corteza renal de los grupos FeNTA y D+F con respecto al grupo control. En cambio, en los grupos tratados con EST y DEN únicamente, no hubo alteraciones. Por otro lado, el EST ejerció una protección ya que los niveles de PKCε fosforilada en el grupo E+D+F no fueron diferentes significativamente a aquellos del grupo control, sin embargo, esta protección fue parcial ya que el grupo E+D+F tampoco presentó diferencias significativas con respecto a los grupos FeNTA y D+F.

En conclusión se estableció un protocolo subcrónico de tratamiento con FeNTA el cual podría representar una etapa temprana del desarrollo del CCR, ya que se encontró un aumento en la expresión de PKCε fosforilada, lo cual posiblemente esté asociado con la malignización de las células renales y el EST protege parcialmente contra este aumento.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer y estrés oxidante

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

El cáncer se define como el crecimiento tisular producido por la proliferación descontrolada y continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Este padecimiento es un conjunto de enfermedades con diversos signos y síntomas, que se clasifica de acuerdo al tejido y célula de origen (Alberts *et al.*, 2002).

El desarrollo del cáncer comprende un conjunto de etapas en donde ocurren diferentes cambios genéticos. La mayoría de los tumores se derivan de una sola célula en la que ocurrieron varias mutaciones que le confirieron algunas ventajas para proliferar. De esta forma, todas las células derivadas de la primera heredan su genotipo y les ocurren otras mutaciones que van acumulándose de tal forma que se da una transformación progresiva hacia células cancerosas malignas (Hanahan *et al.*, 2000).

Cualquier célula es susceptible a desarrollar cáncer, y éste puede clasificarse de acuerdo al tipo de células que dió origen al tumor (Arbiser *et al.*, 2004). Por ejemplo, si la primera célula que desarrolló una anomalía funcional fue epitelial se le conoce con el nombre de carcinoma, mientras que si la célula progenitora fue del tejido conectivo o muscular se le conoce como sarcoma; además, existen otro tipo de neoplasias fuera de esta clasificación como serían las leucemias (Alberts *et al.*, 2002).

El desarrollo de una neoplasia es un proceso complejo donde deben combinarse y acumularse una serie de alteraciones en el funcionamiento celular, este proceso se ha dividido en tres etapas: a) iniciación, cuando las células sufren mutaciones no letales, esta

etapa puede ser reversible mediante sistemas de reparación del ADN; b) promoción, cuando las células iniciadas comienzan, por mecanismos de inducción, a proliferar y a evitar mecanismos de apoptosis, dando como resultado células en estado preneoplásico, que pueden ser controladas por procesos de senescencia o apoptosis, este proceso ya no es reversible pero es contenible; y c) progresión, cuando las células preneoplásicas sufren alteraciones que les permitirán convertirse en células neoplásicas, las cuales tendrán una proliferación anormal que generará un tumor que posteriormente podrá diseminarse por un proceso llamado metástasis (Valko *et al.*, 2006). Entonces, para que una célula pueda malignizarse y convertirse en una célula cancerosa deberá saltar todos los procesos de reparación genética y de control del ciclo celular, lo cual puede favorecerse por exposiciones a diversos factores. Entre estos factores destacan: a) compuestos químicos (carcinógenos), que pueden causar daño en el ADN; b) radiación, que generalmente causa rupturas y traslocaciones en los cromosomas; c) virus, que introducen versiones oncogénicas de genes que controlan el ciclo celular; y d) alteraciones en la regulación epigenética que incluyen cambios en los patrones de metilación (hipo e hipermetilación) que modifican la expresión génica (Feinberg *et al.*, 2004). Se ha sugerido que los diferentes genotipos de células cancerosas son una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente dirigen el crecimiento celular maligno: 1) autosuficiencia en señales de crecimiento, 2) insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, 3) evasión de la muerte celular programada o apoptosis, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogénesis continua e invasión de tejidos adyacentes y 6) metástasis (Hanahan *et al.*, 2000).

Cada vez hay más evidencias que relacionan al cáncer con el estrés oxidante. Está ampliamente demostrado que el daño directo a ADN está íntimamente relacionado con mutagénesis y el desarrollo de cáncer (Oberley *et al.*, 2002). El daño por oxidación al ADN puede resultar en la interrupción o inducción de la transcripción, en errores en la replicación y/o en inestabilidad genómica, y estas alteraciones se encuentran asociadas al proceso de carcinogénesis (Valko *et al.*, 2006). Por otro lado, productos de la oxidación de lípidos (por ejemplo malondialdehído), pueden formar aductos con las bases nitrogenadas, que pueden conducir a mutaciones en proto-oncogenes y/o genes

supresores de tumores e incrementar así la probabilidad de inducir células cancerosas por estrés oxidante (Umemura *et al.*, 1996; Burcham *et al.*, 1998).

Por otra parte, se ha encontrado que muchos tipos de células cancerosas generan constitutivamente grandes, aunque tolerables cantidades de peróxido de hidrógeno, el cual aparentemente funciona como molécula de señalización que incrementa la actividad de una variedad de cinasas de proteínas involucradas en la mitogénesis, lo que conduce a la activación de factores de transcripción sensibles al estado redox y genes que están involucrados tanto en la supervivencia de las células cancerosas como en su proliferación (Loo *et al.*, 2003).

2.2 Carcinoma de células renales (CCR)

El carcinoma de células renales (CCR) es el cáncer renal más común, ya que representa del 70 al 80% de todas las neoplasias del riñón, es uno de los tipos de cáncer urológico más letales y constituye el 3% de todas las neoplasias en adultos (Nelson *et al.*, 2007). Este tipo de cáncer se divide en diferentes subtipos histológicos que son: de células claras, papilar, cromóforo, de ducto colector y no clasificado. Cada subtipo histológico presenta patrones de expresión genética diferentes y características morfológicas específicas. El CCR de células claras (ccCCR) es el subtipo histológico descrito con mayor frecuencia (Kovacs *et al.*, 1997).

El CCR es asintomático lo que dificulta su diagnóstico oportuno en etapas tempranas y también es de difícil tratamiento debido a la existencia de diferentes alteraciones moleculares para cada subtipo histológico, lo que hace que respondan de manera diferente a las terapias (Stadler *et al.*, 2004). Todo esto lleva a una alta tasa de mortalidad.

2.3 Nitritotriacetato de hierro (FeNTA) como modelo de estudio del CCR

El modelo experimental de carcinogénesis renal más utilizado para el estudio del CCR es aquél inducido por el compuesto nitritotriacetato de hierro (FeNTA), el cual es un compuesto formado por la complejación del ácido nitritotriacético con Fe^{3+} que tiene efectos como promotor tumoral (Figura 1). Se ha observado que la administración intraperitoneal de este compuesto induce necrosis tubular proximal renal aguda, pero

cuando se administra de forma crónica produce adenocarcinoma de células renales en ratas (Hamazaki *et al.*, 1986). Otros estudios realizados con ratas macho y hembra han demostrado que las ratas macho son más susceptibles a la toxicidad subaguda y efectos carcinogénicos del FeNTA (Deguchi *et al.*, 1995). Por otra parte, se ha observado que la administración de una dosis única de N-dietilnitrosamina (DEN) en el protocolo de inducción de cáncer renal por FeNTA, disminuye el tiempo de tratamiento para inducir el cáncer y aumenta el número de animales con CCR (Athar *et al.*, 1998). Las nitrosaminas se han reconocido como moléculas inductoras de cáncer, son compuestos N-alquilados que necesitan de activación enzimática para transformarse en carcinógenos que actúen sobre el ADN. La activación de este tipo de compuestos da lugar a moléculas como el diazometano, el cual se considera como intermediario en la acción sobre el ADN al transferir directamente el grupo metilo a esta molécula (Bansal *et al.*, 2005).

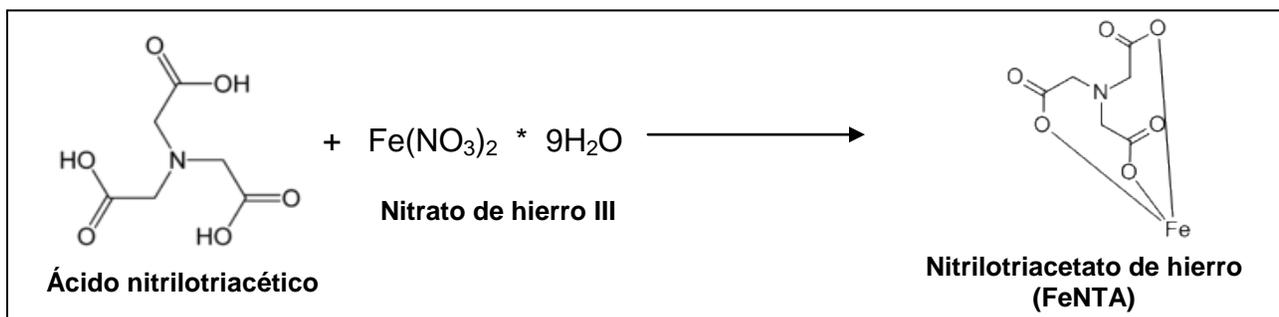


Figura 1. Reacción de complejación entre el ácido nitrilotriacético y el nitrato de hierro III para la formación subsecuente del nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).

Posterior a la administración intraperitoneal del carcinógeno FeNTA, este es absorbido hacia la vena porta y enviado a circulación después de pasar por el hígado. Una vez en circulación, el FeNTA, debido a su bajo peso molecular, se filtra fácilmente a través del glomérulo hacia el lumen de los túbulos proximales renales (Toyokuni *et al.*, 1996), en donde se ha propuesto que el Fe^{3+}NTA se reduce a Fe^{2+}NTA por acción de los productos de degradación del glutatión como la cisteína o la cisteinilglicina. En la superficie del túbulo proximal, la enzima γ -glutamiltanspeptidasa se encarga de hidrolizar al glutatión a cisteinilglicina, que a su vez se degrada rápidamente a cisteína y glicina mediante la enzima transpeptidasa. Se ha propuesto que los grupos tiol de estos aminoácidos actúan como reductores del Fe^{3+} a Fe^{2+} (Figura 2). La oxidación del FeNTA genera radicales superóxido que potencian las reacciones de Haber-Weiss (Figura 3) catalizadas por hierro

para producir radicales hidroxilo que inducen peroxidación lipídica, y daño a proteínas y al ADN (Tsuchiya *et al.*, 2005).

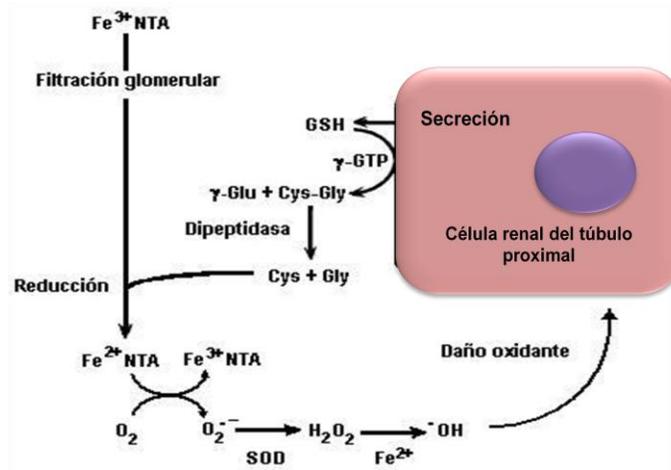


Figura 2. Mecanismo propuesto de nefrototoxicidad inducida por FeNTA (Modificado de Toyokuni *et al.*, 1996).

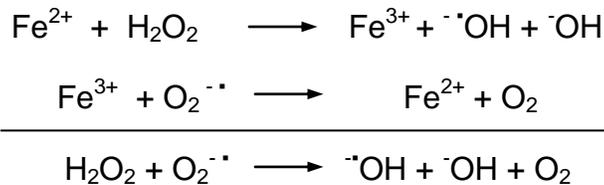


Figura 3. Generación de EROs vía reacción de Fenton-Haber Weiss.

Aunque este modelo de carcinogénesis renal, es el modelo más utilizado, no está bien caracterizado y aún se desconocen las alteraciones moleculares asociadas a la carcinogenicidad del FeNTA. Existen evidencias de que los tumores inducidos por FeNTA parecen ser contraparte del CCR humano y la histopatología indica que se trata del CCR más común, el de células claras (Vargas *et al.*, 2009), por lo que la caracterización del modelo, haría de este una herramienta valiosa para la búsqueda de alteraciones específicas y de nuevos marcadores que permitan la detección del CCR de manera oportuna y para la identificación de blancos para el posterior desarrollo de agentes terapéuticos más eficaces.

2.4 Generalidades de Proteína cinasa C (PKC)

La proteína cinasa C (PKC) comprende una familia de cinasas de serina y treonina que regulan una amplia variedad de procesos celulares entre los cuales están: contracción muscular, exocitosis, quimiotaxis, proliferación, etc (Mellor *et al.*, 1998). Esta familia participa en diversas vías de señalización que son desencadenadas por causa de estímulos que reciben las células a través de la interacción ligando-receptor. Los estímulos pueden ser hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, etc (Azzi *et al.*, 1992).

En esta familia existen 11 isoformas diferentes, las cuales están clasificadas en 3 grupos basándose en su estructura primaria y en sus características bioquímicas como su requerimiento de calcio (Ca^{2+}) y fosfolípidos tales como diacilglicerol (DAG) y ésteres de forbol para su completa activación (Figura 4). El primer grupo denominado como PKCs clásicas (cPKC), comprende las isoformas: α , β I, β II y γ , y se activa cooperativamente por Ca^{2+} y DAG, mientras que las PKC del segundo grupo, conocido como novel (nPKC), cuyas isoformas son δ , ϵ , θ y η , no requieren calcio para su activación y sólo se encuentran reguladas por DAG. Por último, el tercer grupo contiene las isoformas de PKC atípicas: ζ , ι y λ , las cuales pueden activarse en ausencia de calcio y DAG, y cuya regulación aún no está muy clara.

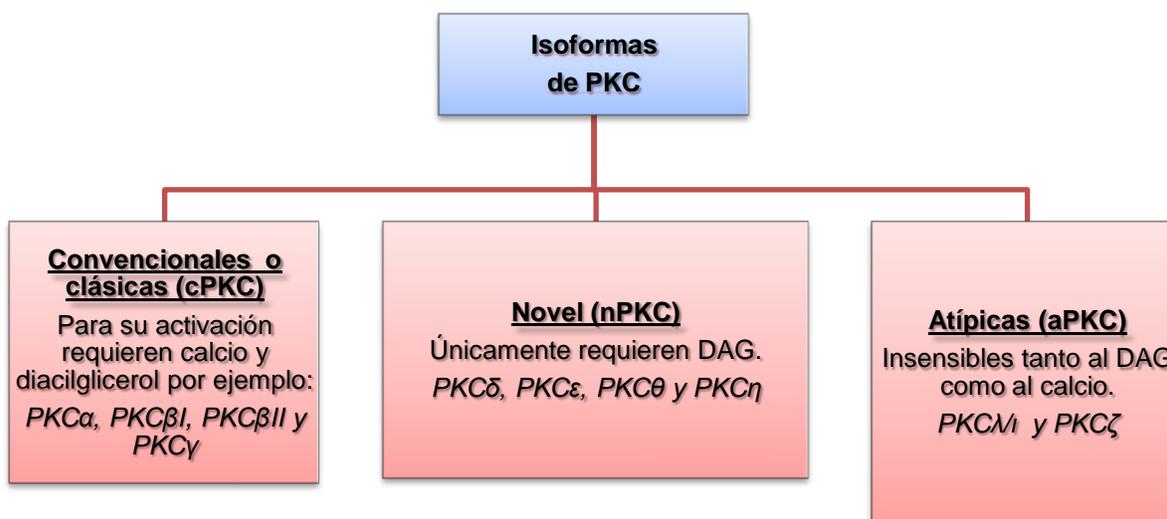


Figura 4. Clasificación de las isoformas de la familia de PKC de acuerdo a los cofactores requeridos para su activación.

Cada isoforma de PKC está expresada en una amplia variedad de tipos celulares, y al mismo tiempo, diferentes isoformas están expresadas en un mismo tipo celular, lo que hace de este grupo de enzimas una familia ubicua, sugiriendo también que distintas isoformas pueden activar diferentes rutas de señalización y fosforilar diferentes sustratos (Hoffman *et al.*, 1997).

Las isoformas PKC α , PKC β y δ son las más abundantes en la mayoría de los tejidos (Wetsel *et al.*, 1992). La activación de diferentes isoenzimas de PKC, inducen diferentes respuestas celulares. Además, existe una amplia intercomunicación entre las diferentes isoenzimas, y el total de respuestas parece depender de la presencia o actividad de otras isoenzimas dependiendo del tipo particular de célula (Newton *et al.*, 2010).

En general, las PKCs están involucradas en varios procesos celulares. La activación transitoria de PKC está asociada a menudo con eventos de corto plazo tales como la secreción y la entrada de iones. En contraste, se sugiere que la activación sostenida o prolongada induce efectos a largo plazo tales como la proliferación, diferenciación, apoptosis, migración o desarrollo tumoral (Erin *et al.*, 2007).

2.4.1 Estructura

Los miembros de la familia PKC constan de una única cadena polipeptídica, que comprende una región regulatoria en el extremo amino, una región catalítica en el extremo carboxilo y una región bisagra que se encarga de unir la región regulatoria con la catalítica (Newton *et al.*, 1995).

El dominio regulatorio se encarga de mantener a la enzima en una conformación inactiva ya que posee una secuencia pseudosustrato cuya función es autoinhibitoria presentando una secuencia que contiene un residuo de alanina en lugar del sitio aceptor de fosfatos que es de residuos de serina y/o treonina. Cabe mencionar que en esta región también se lleva a cabo la unión a cofactores como el Ca²⁺ y los fosfolípidos. Por otra parte, el dominio catalítico se encuentra altamente conservado dentro de la familia y posee un sitio de unión a ATP el cual provee de fosfatos a la cinasa para que esta última pueda fosforilar a sus sustratos correspondientes, y sufre las fosforilaciones indispensables para su activación: una fosforilación por la enzima cinasa dependiente de fosfoinosítidos I (PDK-1)

en una región conocida como bucle de activación, y dos autofosforilaciones posteriores. Este comportamiento está presente en los grupos convencional y novel, mientras que el grupo de las PKCs atípicas solo requiere de dos fosforilaciones (Corbalán *et al.*, 2006; Steinberg *et al.*, 2008; Dempsey *et al.*, 2000; Erin *et al.*, 2007).

A lo largo de la cadena polipeptídica, cada isoenzima de PKC posee cinco dominios variables (V1-V5) separados por cuatro dominios conservados (C1-C4) (Steinberg *et al.*, 2008).

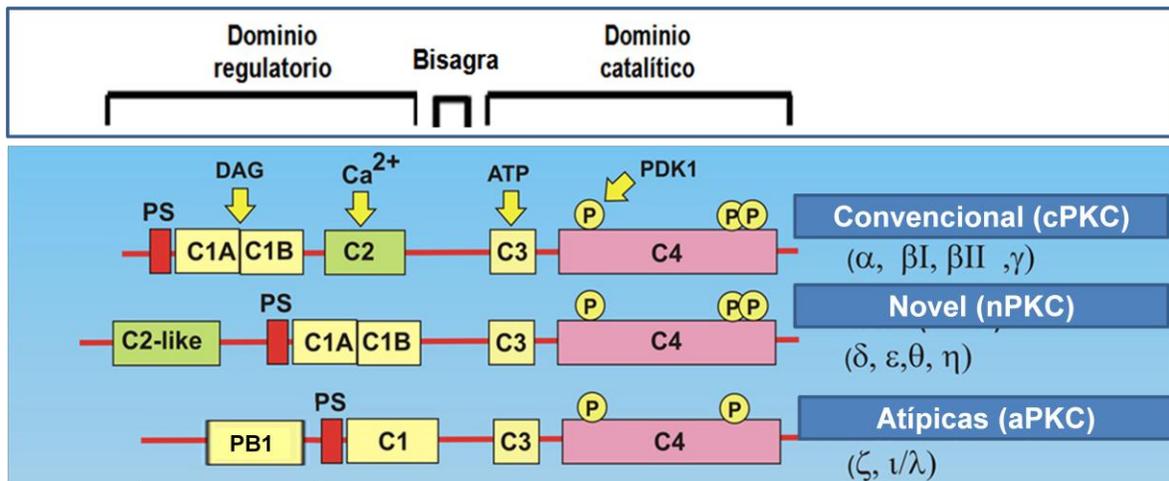


Figura 5. Dominios en la estructura de las diferentes isoformas de PKC (Modificado de Mathews *et al.*, 2002).

2.4.2 Mecanismos de activación de PKC.

• Maduración: fosforilación y autofosforilación

Estudios previos han demostrado que las isoformas de los grupos convencional y novel de PKC llevan a cabo un proceso de maduración antes de que comience su activación, mientras que el mecanismo de activación para las isoformas atípicas aún no está muy comprendido. El proceso de maduración involucra una serie de fosforilaciones en la región catalítica. Como previamente se había descrito, la primera fosforilación ocurre en el sitio denominado bucle de activación y es mediada por la cinasa dependiente de fosfoinosítido 1 (PDK-1); posteriormente, el motivo de giro y el hidrofóbico quedan expuestos en el extremo carboxilo terminal y sufren autofosforilaciones que favorecen la estabilización de la enzima (Dempsey *et al.*, 2000). La forma madura de PKC, apta para la

activación por DAG y calcio (este último solo para cPKC), mantiene una conformación inactiva debido a la interacción del dominio catalítico con el pseudosustrato (ubicado en el dominio regulatorio) (figura 6) (Newton *et al.*, 2010).

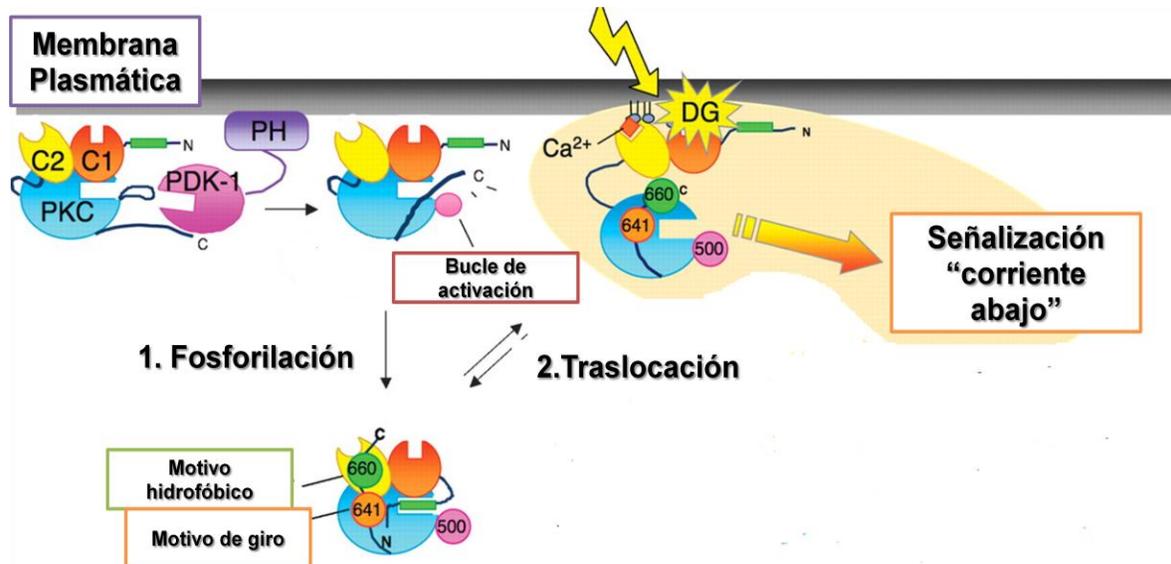


Figura 6. Representación esquemática de la interacción de PDK-1 con su sustrato que puede ser cualquier miembro de la familia PKC. La enzima PDK-1 anclada a la membrana celular por medio de la interacción de su dominio PH con fosfoinosítidos de la membrana va a resultar en la subsecuente activación de PDK-1 y así pueda fosforilar a sus múltiples sustratos, entre ellos se puede encontrar cualquier isoforma de la familia PKC. La fosforilación se lleva a cabo en un sitio denominado bucle de activación y es seguida por dos autofosforilaciones. Al completar las tres fosforilaciones la PKC adoptará una conformación que favorecerá su traslocación a la membrana debido a su afinidad por DAG adoptando un estado activo (Modificado de Newton *et al.*, 2010).

- **Activación: Los dominios C1 y C2 como sensores de cofactores**

En las isoformas convencionales o clásicas (cPKC) y novel (nPKC), la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC por sus siglas en inglés) se encarga de generar a los mensajeros químicos diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3) a partir del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) de la membrana plasmática (figura 7). Tales sustancias denominadas también “segundos mensajeros” van a ser necesarias para completar la activación de las PKC convencionales y novel una vez que la enzima haya alcanzado su maduración, es decir, que tenga sus fosforilaciones correspondientes.

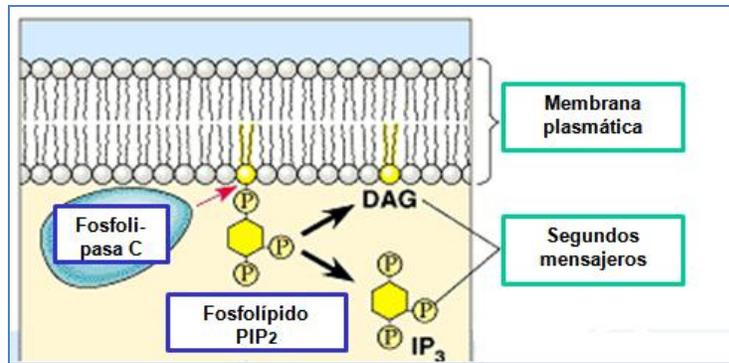


Figura 7. Representación esquemática de la escisión del fosfolípido IP₂ a DAG e IP₃ llevada a cabo por la enzima fosfolipasa C (Mathews *et al.*, 2002).

El IP₃ libera Ca²⁺ de las reservas intracelulares del retículo endoplasmático. El catión liberado actúa como cofactor que contribuye a la activación de las PKC convencionales uniéndose al dominio C2. Las PKC novel no requieren de Ca²⁺ para su activación debido a que carecen del dominio C2 y poseen en su lugar un dominio tipo C2 incapaz de reconocer al Ca²⁺. Sin embargo, para compensar esa falta de sensibilidad por el Ca²⁺, las PKC novel poseen una mayor afinidad por el DAG que las cPKCs. En cambio, el DAG es un cofactor requerido tanto por las PKC convencionales como por las PKC novel uniéndose al dominio C1 presente en ambos grupos (Erin *et al.*, 2007; Ron *et al.*, 1997). En la figura 8 se muestra integrado el mecanismo de activación para las isoformas convencionales y novel de PKC.

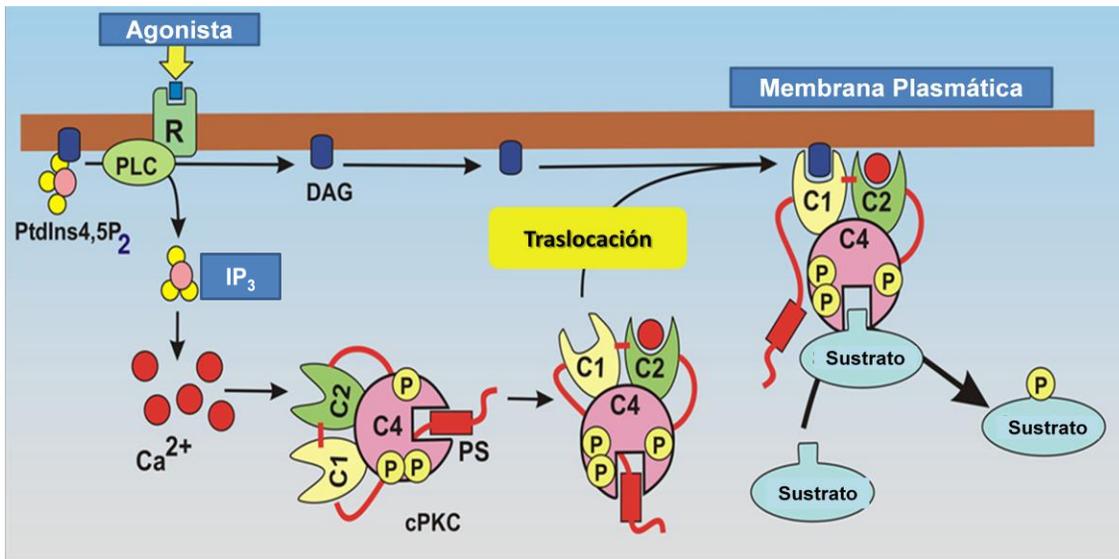


Figura 8. Integración del mecanismo general de activación de PKC. La activación del receptores como los de cinasas de tirosinas por algún agonista produce la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC), la cual media la generación del DAG e IP₃; éste último promueve la liberación del Ca²⁺ del retículo endoplasmático. El DAG activa y transloca a PKC a la membrana plasmática. Finalmente, la PKC activada fosforila sustratos específicos en residuos de serina/treonina (Modificado de Mathews *et al.*, 2002).

2.4.3 PKC en cáncer

Las alteraciones de las isoenzimas de PKC durante la progresión del cáncer son variables y dependen del tipo de cáncer por lo que no se pueden hacer conclusiones generales de los patrones de expresión con respecto a la carcinogénesis. También se ha demostrado que la expresión de isoformas no necesariamente está correlacionada con los niveles respectivos de RNA mensajero, sugiriendo una regulación postranscripcional de las isoenzimas (Dempsey *et al.*, 2000; Koivunen *et al.*, 2006).

Estudios en varios tipos celulares tanto normales como cancerosos confirman la participación de las isoformas de PKC en la mitogénesis, supervivencia y malignización. Por ejemplo, los ésteres de forbol pueden cooperar con el oncogen Ras para la transformación en células malignizadas, y se ha observado que la producción desregulada de DAG desemboca en la transformación celular mediada por Ras, indicando que Ras y PKC pueden cooperar entre sí para la transformación (Hsiao *et al.*, 1989). Conexiones funcionales entre PKC y otros oncogenes, tales como FOS y Myc, fueron

identificados posteriormente, colocando a PKC en el centro de las señalizaciones ligadas a cáncer (Gorin *et al.*, 2009). Aunque se sabe que las isoformas de PKC tienen una participación evidente en la carcinogénesis, éstas han representado un desafío para establecer la contribución individual de cada isoforma en el proceso de carcinogénesis, debido a las vastas diferencias en las funciones de cada isoforma de PKC y al hecho de que las funciones varían acorde al tipo celular. En este sentido, hay un interés por entender las funciones opuestas observadas generalmente en algunas isoformas del grupo novel en eventos de proliferación y supervivencia en células cancerosas, como es el caso de PKC ϵ y PKC δ . Por otra parte, la PKC ϵ ha demostrado ser un oncogén en células epiteliales y en fibroblastos, y la sobreexpresión de esta isoforma confiere una ventaja proliferativa a varios tipos de células malignizadas. En contraste, se ha considerado a PKC δ como supresor tumoral, y en células malignizadas se ha observado una disminución en la expresión de ésta enzima (Basu *et al.*, 2007).

2.4.4 PKC y estrés oxidante

El estrés oxidante está involucrado en la patogénesis de varias enfermedades degenerativas incluyendo el cáncer. Existe evidencia de que el estrés oxidante incrementa la actividad de las rutas de señalización involucradas en la proliferación celular, ya sea que estimule la fosforilación de proteínas de transducción de señales, o bien que haya un incremento en la actividad de enzimas reguladas por receptores tales como las fosfolipasas A₂, D y C (Gopalakrishna *et al.*, 2010). Los segundos mensajeros lipídicos derivan de estas reacciones, los cuales son conocidos como activadores corriente arriba de cinasas de proteínas y otras moléculas de señalización. La exposición oxidante también incrementa la actividad de una variedad de cinasas de proteínas involucradas en la mitogénesis incluyendo PKC, cinasa de fosfatidil-inositol trifosfato (PI3-K), las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y varias cinasas de tirosinas (Genestra *et al.*, 2007; Gopalakrishna *et al.*, 2000).

La familia PKC presenta características únicas estructurales que la hacen susceptible a modificaciones oxidativas. El dominio regulatorio (ubicado en el extremo amino) contiene sitios de unión a zinc los cuales son motivos ricos en cisteína y pueden ser susceptibles a

oxidación por EROs como el peróxido de hidrógeno. Cuando estos sitios son oxidados, la función autoinhibitoria es comprometida y consecuentemente la actividad celular de PKC es estimulada (Gopalakrishna *et al.*, 2010; Konosih *et al.*, 1997). En contraste, el dominio catalítico (ubicado en el extremo carboxilo) contiene varias cisteínas, cuyos grupos sulfhidrilo reaccionan con compuestos polifenólicos oxidados, compuestos del selenio o también con agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, inhibiendo la actividad celular de PKC y así interfiriendo con la acción de la promoción tumoral (figura 9). Los grupos sulfhidrilo de las cisteínas son indispensables para la actividad catalítica de la enzima, y en ausencia de éstos ocurre una subsecuente inactivación de la actividad enzimática. Asimismo, los dos dominios de PKC responden de manera opuesta a modificaciones redox; y debido a la elevada homología, éste comportamiento se presenta en las isoformas convencionales y novel, pero se desconoce lo que ocurre con las atípicas (Gopalakrishna *et al.*, 1995).

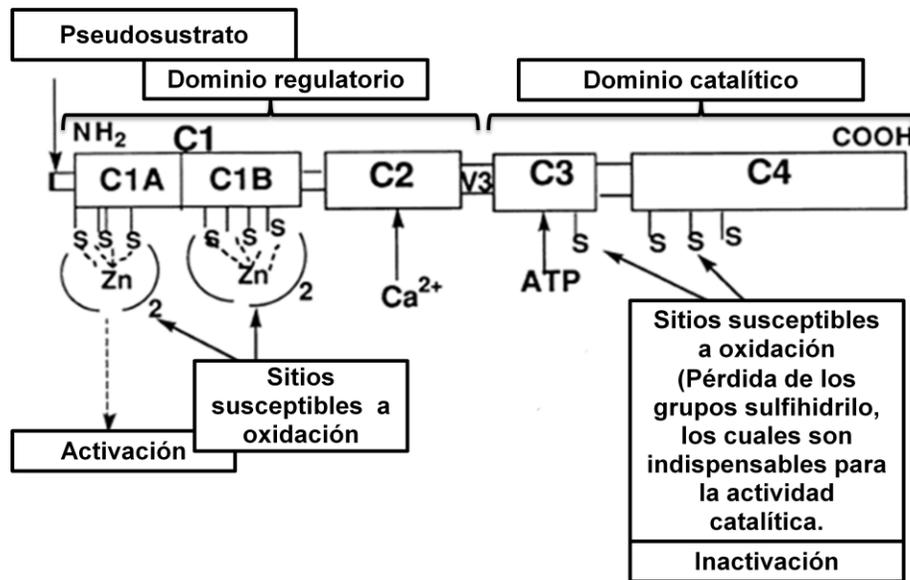


Figura 9. Sitios susceptibles a modificaciones redox dentro de los dominios regulatorio y catalítico de PKCs convencionales y novel (Modificado de Gopalakrishna *et al.*, 2000).

2.4.5 PKC en cáncer renal

Casi todas las isoformas de PKC se expresan en tejido renal sano y en células cancerosa de riñón, a excepción de las isoformas γ y θ (Engers *et al.*, 2000). En CCR avanzado se ha observado una expresión alterada de varias isoformas de PKC, comparada con la expresión de tejido renal sano; entre las isoformas con alteraciones están: la α , δ , ϵ , η y

ζ (Ashhar *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 1994; Engers *et al.*, 2000; Gorin *et al.*, 2009). Sin embargo, aún se desconoce el estatus de las isoformas de PKC en la carcinogénesis. Por otro lado, en etapas avanzadas de varios tipos celulares de cáncer incluyendo el CCR, se ha observado que la sobreexpresión de PKCε está correlacionada con un incremento de la proliferación celular, resistencia a fármacos, migración e invasividad (Marengo *et al.*, 2011; Brenner *et al.*, 1996). Además, varios autores han asociado a esta isoforma con vías de señalización antiapoptóticas y mitogénicas (Basu *et al.*, 2007). También se sabe que PKCε promueve la supervivencia celular en muchos tipos de células a través de un incremento en la activación de la vía de Akt (Lu *et al.*, 2006). Por otra parte, la sobreexpresión de PKCε se ha asociado a la resistencia quimioterapéutica en varios tipos celulares (Marengo *et al.*, 2011). Con base en todo lo anterior, esta enzima resulta un blanco muy interesante para estudiar su estatus en una etapa temprana del modelo de carcinogénesis por FeNTA (Ashhar *et al.*, 2009; Akita *et al.*, 2002; Basu *et al.*, 2007).

2.5 Proteína cinasa Cε (PKCε)

La PKCε es una isoforma de 90 KDa perteneciente al grupo novel de PKC, grupo caracterizado por ser insensible al Ca^{2+} y tener mayor afinidad por el DAG que las PKCs convencionales (Stahelin *et al.*, 2005). Por otro lado, la PKCε se caracteriza por estar expresada en una gran variedad de tejidos, pero con mayor abundancia en células neuronales, hormonales y del sistema inmune (Wetsel *et al.*, 1992). Hasta el momento, se ha asociado a PKCε en diversas vías de señalización como de proliferación, diferenciación, contracción muscular, metabolismo, transporte, exocitosis y endocitosis, asimismo también se ha demostrado su participación en procesos inflamatorios, inmunes y circulatorios (Akita *et al.*, 2002; Aziz *et al.*, 2010; Garczarczyk *et al.*, 2009; Nowak *et al.*, 2003; Saurin *et al.*, 2009). Por otra parte, la evidencia sugiere que también existe un papel crítico de PKCε en varias enfermedades como Alzheimer, diabetes y cáncer (Akita *et al.*, 2002; Lord *et al.*, 1995).

2.5.1 Fosforilación y activación de PKCε.

La PKCε es regulada por cuatro mecanismos clave: unión de cofactores, fosforilación, interacción proteína-proteína y regulación por degradación. Uno de los principales activadores endógenos es el DAG generado por la PLC mediante la hidrólisis de fosfoinosítidos (Nishizuka *et al.*, 1995).

Como ocurre con otras isoformas de PKC, la PKCε debe sufrir primero de una serie de fosforilaciones para alcanzar su maduración y responder a los reguladores alostéricos como el DAG. Dentro del dominio catalítico, la PKCε inicialmente es fosforilada en el bucle de activación (Thr⁵⁶⁶) por PDK1, las siguientes son autofosforilaciones y tienen lugar en el motivo de giro (Thr⁷¹⁰) y en la región hidrofóbica (Ser⁷²⁹) muy cercana al extremo carboxilo tal y como lo indica la figura 10 (Cenni *et al.*, 2002; Durgan *et al.*, 2008).

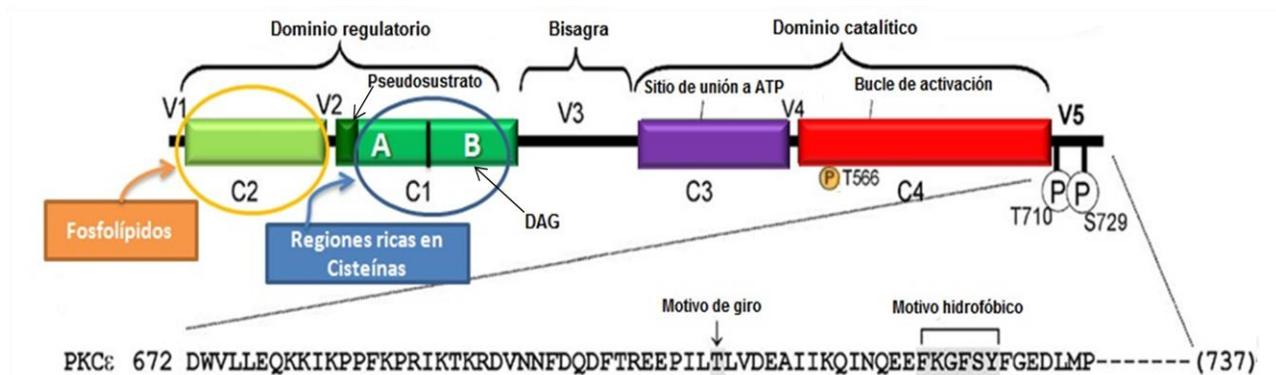


Figura 10. Sitios de fosforilación de PKCε: Thr566 en el bucle de activación, de autofosforilación; Thr 710 en el motivo de giro y Ser 729 en la región hidrofóbica. Estos sitios están ubicados en el extremo carboxilo de la enzima (Modificado de Zhu *et al.*, 2006).

Estas tres fosforilaciones secuenciales son indispensables para sensibilizar a la enzima a segundos mensajeros y así la enzima pueda alcanzar una forma madura pero inactiva. La forma madura de PKCε se activa por la unión de la enzima a segundos mensajeros tales como el DAG (diacilglicerol), y la fosfatidilserina producidos por estímulos fisiológicos tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Newton *et al.*, 2010).

El funcionamiento de esta cinasa de acuerdo a su localización subcelular depende parcialmente del tipo del segundo mensajero que se una al dominio C1. La PKCε se trasloca a la membrana plasmática y/o citoesqueleto en respuesta al DAG y ácidos tridecanoicos, mientras que se trasloca hacia la red de Golgi en respuesta al ácido

araquidónico y ácidos linoleicos (Steinberg *et al.*, 2008). Asimismo, Engers y cols (2000) han descrito en líneas celulares de CCR que los niveles de expresión de CCR correlacionan positivamente con una elevada actividad proliferativa. También sugieren que la localización membranal de PKC ϵ determinada por microscopía de inmunofluorescencia indica un estatus de activación que asocian con un elevado potencial de invasividad.

2.6 Antioxidantes

Son aquellos compuestos capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Entre los compuestos que presentan una notable capacidad antioxidante están los polifenoles, los cuales están entre los compuestos antioxidantes más abundantes en la dieta (Williamson *et al.*, 2005).

Una de las clases de compuestos fenólicos más abundantes es la de los flavonoides. Estos fitoquímicos son parte integral de la dieta en humanos y se encuentran presentes en muchas plantas medicinales. Por otro lado, se ha demostrado que los flavonoides pueden inhibir la carcinogénesis gracias a su actividad como antioxidantes (Figura 11), o por modulación del metabolismo de los carcinógenos originados por modificaciones de ciertos alimentos a través de la inhibición y/o inducción de las enzimas de fase I y II (Soobrattee *et al.*, 2005); asimismo, se ha visto que los flavonoides inhiben la proliferación celular anormal de lesiones preneoplásicas, lo que puede ser consecuencia de la inhibición de varias enzimas involucradas en la respuesta celular a factores de crecimiento, incluyendo la PKC, la PI3-K y las cinasas de tirosina, inhibiendo así la expresión de varios genes relacionados con el desarrollo de tumores como los genes de proteínas antioxidantes o los genes supresores de tumores como p53 (Soobrattee *et al.*, 2005).

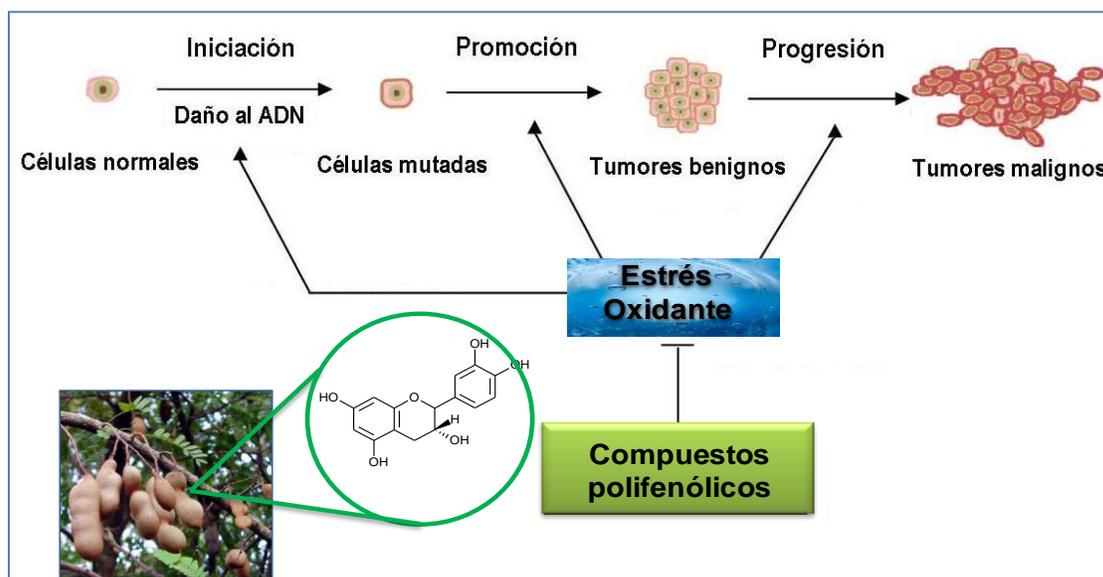


Figura 11. Inhibición del desarrollo de cáncer en sus tres etapas por los compuestos polifenólicos gracias a su actividad contra el estrés oxidante (Modificado de Moon, *et al.*, 2006).

2.6.1 Extracto de semillas de tamarindo (*Tamarindus indica*)

El consumo de frutas, vegetales y granos está asociado, con la reducción del riesgo de presentar enfermedades por radicales libres, como lo es el cáncer. En la actualidad, los compuestos fenólicos en este tipo de alimentos son identificados como los de mayor capacidad antioxidante (Heo *et al.*, 2007).

Un producto natural con alto contenido polifenólico y que se consume con mucha frecuencia en México es el tamarindo (*Tamarindus indica*). Éste pertenece a la familia Leguminosae, es considerado especie nativa de África y crece de manera natural en regiones tropicales y sub-tropicales como nuestro país. El tamarindo es utilizado ampliamente en la medicina tradicional debido a sus múltiples propiedades tales como actividad antimicrobiana, antihiperlipidémica, antidiabética, antiinflamatoria y antioxidante (Srinivasan *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha reportado que el pericarpio y la semilla de tamarindo presentan mayor actividad antioxidante con respecto a otras estructuras de la planta, en parte debido a su elevado contenido en polifenoles. Así mismo, se ha

demostrado que la capacidad antioxidante de las semillas es mayor que en pericarpio (Sudjaroen *et al.*, 2005).

En nuestro laboratorio se preparó un extracto de semilla de tamarindo (EST) que presenta un alto contenido de compuestos fenólicos y una notable capacidad de inactivación del radical superóxido, además de tener buena estabilidad a largo plazo. En estudios de tratamiento agudo y crónico con FeNTA, se observó que el EST, a una dosis de 100 mg Ft/kg/día, disminuye la producción renal de peróxido de hidrógeno y protege de manera significativa contra el daño severo en la función renal inducida por el tratamiento agudo con FeNTA, además de que disminuye la incidencia de CCR por exposición crónica en un 21.05 % (Vargas *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

El carcinoma de células renales es uno de los tipos de cáncer menos estudiados, su diagnóstico en etapas tempranas es difícil por ser asintomático y presenta una elevada tasa de mortalidad.

El modelo de inducción de CCR por FeNTA es el más utilizado, y se sabe que hay participación del estrés oxidante; sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis, y no se han caracterizado las etapas de desarrollo del cáncer.

Por otra parte, en estudios previos se ha observado que la enzima PKC ϵ , que es sensible al estado redox, está involucrada en la carcinogénesis de diferentes tipos celulares y se ha demostrado que en líneas celulares de CCR humano, los niveles de PKC ϵ y su localización membranal correlacionan con proliferación e invasividad. Sin embargo, se desconoce su comportamiento en etapas tempranas del desarrollo del CCR. Con base en lo anterior, se considera de suma importancia identificar las alteraciones de PKC ϵ en etapas tempranas del modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA, y probar si un extracto de semillas de tamarindo rico en polifenoles, es capaz de prevenir los efectos inducidos por el carcinógeno.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento subcrónico por un periodo de un mes con el carcinógeno FeNTA, inducirá alteraciones sobre los niveles de expresión de la PKC ϵ y un extracto de semillas de tamarindo con elevada capacidad antioxidante disminuirá los efectos del carcinógeno.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la enzima PKC ϵ se encuentra alterada en una etapa temprana del modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA, y evaluar si un extracto de semillas de tamarindo puede proteger contra esas alteraciones.

Objetivos particulares

- Desarrollar un protocolo experimental en ratas macho Wistar durante un mes de tratamiento con el carcinógeno FeNTA.
- Montar un ensayo de Western blot específico para PKC ϵ fosforilada en ser 729.
- Analizar los niveles de PKC ϵ en corteza renal de los grupos experimentales.
- Evaluar el efecto de un extracto de semillas de tamarindo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

En la figura 12 se presenta de forma general el diseño experimental desarrollado. En este protocolo subcrónico se utilizaron 30 ratas Wistar macho con un peso inicial de 60-90 g que se distribuyeron como se observa en la tabla 1, y en la tabla 2 se resume el esquema de tratamiento seguido en el presente estudio. Cabe señalar que éste esquema de tratamiento seguido durante 4 meses, se montó exitosamente en nuestro laboratorio para inducir CCR (Vargas *et al.*, 2009).



Figura 12. Diseño experimental para el desarrollo del protocolo subcrónico.

Tabla 1. Grupos experimentales del protocolo subcrónico

Grupo	Número de animales	Tratamiento
Control	7	Vehículo
DEN	7	Administración i.p única de dietilnitrosamina (DEN) (200 mg/Kg)
EST	7	Extracto en el agua de beber (100 mg de FT/Kg/día) 15 días antes y durante el estudio
FeNTA	7	Administración i.p de FeNTA dosis gradual (3,5,7,9 mg de Fe/Kg) 2 veces a la semana por 4 semanas
DEN + FeNTA	10	Administración i.p única de DEN (200 mg/kg) + Administración i.p de FeNTA dosis gradual (3,5,7,9 mg de Fe/Kg) 2 veces a la semana por 4 semanas
EST + DEN + FeNTA	10	Extracto en el agua de beber (100 mg de FT /Kg) 15 días antes y durante el estudio + Administración i.p única de DEN (200 mg/Kg) + Administración i.p FeNTA dosis gradual (3,5,7,9 mg de Fe /Kg) 2 veces a la semana por 4 semanas

i.p= intraperitoneal; EST= extracto de semillas de tamarindo; DEN= dietilnitrosamina; FeNTA: nitrilotriacetato de hierro.

Tabla 2. Esquema de desarrollo del protocolo subcrónico a un mes de estudio.

Días	-35	-34	-33	-32	-31	-30	-29
	 <i>Periodo de adaptación</i>					Inicia la administración de EST (100 mg de FT/kg)	
	-28	-27	-26	-25	-24	-23	-22
	-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15
	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8
Administración i.p única de DEN (iniciador) 200mg/kg							
	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
	0	1	2	3	4	5	6
Comienza la administración i.p de FeNTA (3 mg de Fe/kg)				Administración i.p de FeNTA (3 mg de Fe/kg)			
	7	8	9	10	11	12	13
Administración i.p de FeNTA (5 mg de Fe/kg)				Administración i.p de FeNTA (5 mg de Fe/kg)			
	14	15	16	17	18	19	20
Administración i.p de FeNTA (7 mg de Fe/kg)				Administración i.p de FeNTA (7 mg de Fe/kg)			
	21	22	23	24	25	26	27
Administración i.p de FeNTA (9 mg de Fe/kg)				Administración i.p de FeNTA (9 mg de Fe/kg)			
	28	29	30				
Término de la administración i.p de FeNTA (9 mg de Fe/kg)			Término del protocolo de carcinogénesis (Sacrificio de las ratas)				



Administración del EST



Administración del FeNTA

6.1.1 Administración del EST

Para llevar a cabo este protocolo, y con base en la información obtenida en estudios previos (Vargas *et al.*, 2009), se utilizó una dosis de EST de 100 mg fenoles totales/Kg de peso, ya que en estudios agudos con FeNTA se había observado que ésta dosis presentaba el mayor efecto antioxidante (Vargas *et al.*, 2009).

Durante el período de adaptación se determinó el volumen promedio de agua bebida por las ratas para calcular la cantidad de EST que debe añadirse al agua de beber y así el animal recibiera una dosis correspondiente a 100 mg/kg peso corporal/día.

A lo largo del protocolo se continuó con el monitoreo tanto del volumen de agua bebida por las ratas como del peso de las mismas con el objeto de ajustar la cantidad de EST que debía agregarse para mantener la dosis.

6.1.2 Preparación y administración de la N-dietilnitrosamina (DEN)

Se administró una dosis única i.p de DEN (Sigma-Aldrich EUA) de 200 mg/kg_{peso corporal} a los grupos correspondientes. Esta dosis se eligió con base en la literatura y observaciones de nuestro laboratorio (Vargas *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2005). La preparación consistió en diluir el contenido del frasco (1mL de 990-999 mg DEN/mL) en 11 mL de solución salina y se ajustó el volumen a inyectar de acuerdo al peso de cada rata.

6.1.3 Preparación y administración del FeNTA

La administración del carcinógeno renal FeNTA a los grupos F, D+F y E+D+F, comenzó catorce días después de la administración del DEN con un esquema de dos administraciones intraperitoneales por semana y aumentos graduales en la dosis, iniciando con 3 mg_{Fe}/kg, 5 mg_{Fe}/kg, 7 mg_{Fe}/kg hasta 9 mg_{Fe}/kg. Este esquema se eligió con base en la literatura y con algunas modificaciones de nuestro laboratorio (Athar *et al.*, 1998; Takizawa *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2009). El FeNTA se preparó al momento de administrarlo a las ratas, siguiendo el método de Awai y cols (1979) con ligeras modificaciones. Se preparó una solución 160 mM de Fe(NO₃)₃ (Sigma Aldrich Inc., St Louis MO, EUA) y una solución 320 mM de nitrilotriacetato de sodio (Sigma Aldrich Inc., St Louis MO, EUA) utilizando para ambos una solución 120 mM de Na₂HCO₃ como disolvente. Se mezclaron estas soluciones en una proporción de dos volúmenes de

nitilotriacetato de sodio por cada volumen de la solución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, y se ajustó el pH con Na_2HCO_3 hasta llegar a 7.4. Esta solución tiene una concentración de hierro de 2.98 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}$. La administración del carcinógeno a las ratas se basó en la cantidad de hierro contenida en la solución y no del complejo FeNTA. A continuación se muestra un ejemplo de un cálculo para determinar el volumen a inyectar.

Para una rata de 250 g a la que se deseará administrar una dosis de 5 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{Kg}$:

$$1 \text{ mL de solución de FeNTA} \longrightarrow 2.98 \text{ mg}_{\text{Fe}}$$

$$X=1.67 \text{ mL de solución de FeNTA} \longrightarrow 5 \text{ mg}_{\text{Fe}}$$

$$(1 \text{ mL solución FeNTA}/2.98 \text{ mg}_{\text{Fe}})(3 \text{ mg}_{\text{Fe}})= 1.67 \text{ mL de solución FeNTA}$$

$$1.67 \text{ mL de solución de FeNTA} \longrightarrow 1 \text{ Kg de peso}$$

$$X=0.41 \text{ mL de solución de FeNTA} \longrightarrow 0.25 \text{ Kg de peso}$$

$$(1.67\text{mL de solución FeNTA})(.25 \text{ Kg})= 0.417 \text{ mL de solución de FeNTA para una rata de } 250 \text{ g}$$

$$0.417 \text{ mL} \left(\frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \right) = \boxed{417.5 \mu\text{L de solución de FeNTA}}$$

6.1.4 Sacrificio y toma de muestras:

Una vez transcurridas 48 horas después de la última administración de FeNTA a los grupos correspondientes, las ratas de todos los grupos se sacrificaron por decapitación. Se recolectó la sangre para la obtención de suero e inmediatamente se extrajeron los 2 riñones y se separó la corteza renal de la médula. La corteza, a su vez, se dividió en fragmentos que se congelaron lo más rápido posible en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta la determinación de $\text{PKC}\epsilon$.

6.2 Métodos

6.2.1 Obtención del EST

Veinticinco gramos de cáscara de semillas de tamarindo se someten a maceración durante 24 horas en 500 mL de etanol anhidro a temperatura ambiente. El extracto resultante se separa de las semillas por decantación y se concentra al vacío hasta la evaporación completa del etanol obteniéndose 8.066 g de un residuo seco café claro. El polvo de extracto obtenido a partir de este procedimiento se denominará como extracto de semillas de tamarindo (EST) (Vargas *et al.*, 2009).

6.2.2 Caracterización del EST

- **Fenoles totales**

Se determinó el contenido de fenoles totales del EST mediante la técnica Folin-Ciocalteu (Ver apéndice 10.2). En esta técnica, los fenoles se oxidan por el reactivo de Folin, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, los cuales se reducen por acción de los fenoles, formando una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno que puede leerse espectrofotométricamente a 765 nm. Para realizar la cuantificación de fenoles totales, se realiza una curva patrón con concentraciones conocidas de ácido gálico en la que se interpolan las absorbancias de soluciones con diferentes concentraciones de EST. El método proporciona una medida aproximada de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en una muestra vegetal (Singleton *et al.*, 1999; Pourmorad *et al.*, 2006).

- **Inactivación del radical superóxido**

El radical superóxido es generado *in vitro* por acción de la enzima xantina oxidasa sobre la xantina. El radical reacciona con el azul de nitrotetrazolio (NBT) para generar formazán, un compuesto que absorbe a 560 nm. La inactivación del radical superóxido por acción de los polifenoles se detecta gracias a la disminución del formazán generado debida a la disminución del radical superóxido (Bielski *et al.*, 1980). El mecanismo de reacción se describe en la figura 13.

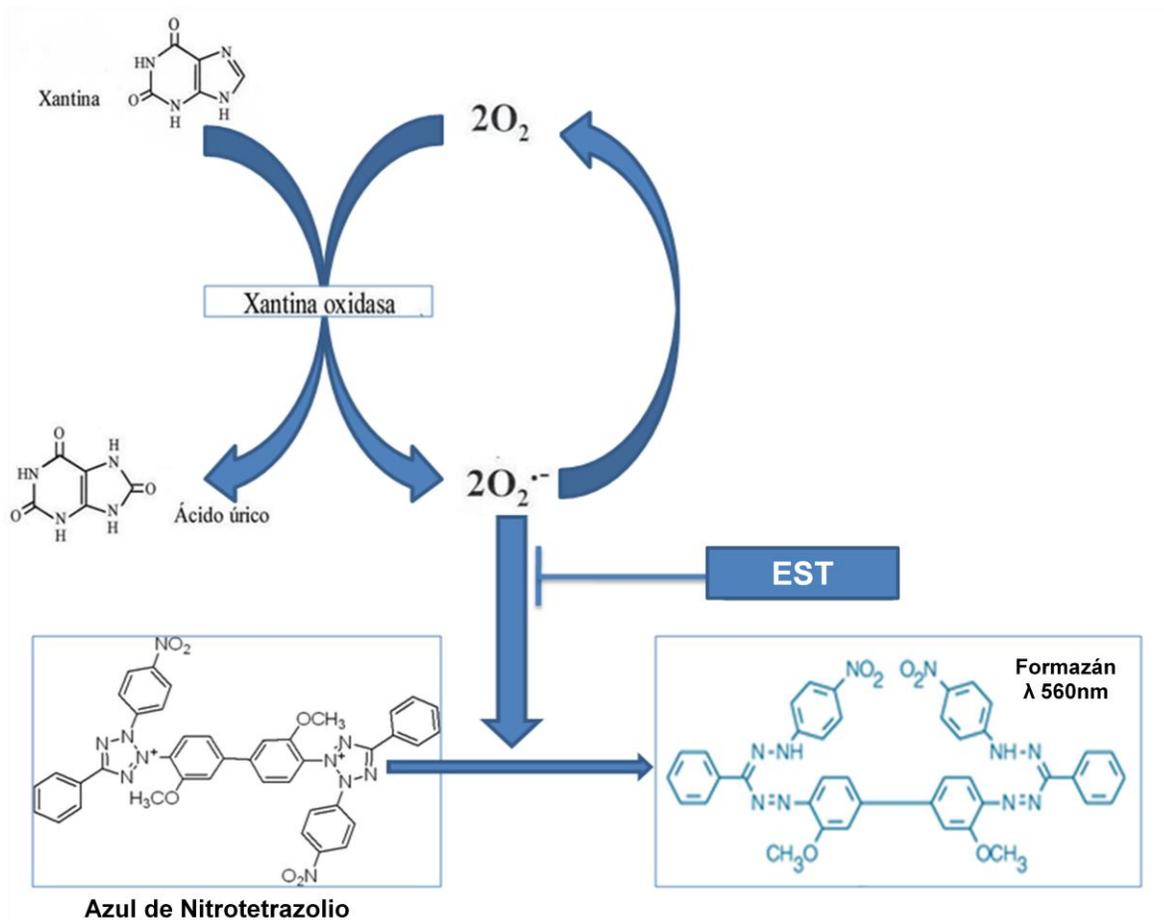


Figura 13. Fundamento para la determinación del radical superóxido y evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de *Tamarindus indica* L.

6.2.3 Función renal

Se llevó a cabo la determinación de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN por sus siglas en inglés), con el objetivo de establecer si en nuestras condiciones de tratamiento, el FeNTA tiene efecto sobre la función renal. La urea es un producto de desecho del metabolismo del nitrógeno, se transporta en la sangre y se filtra en el glomérulo renal para ser eliminada en la orina. En una insuficiencia renal la urea no se excreta por la orina, lo que produce un aumento en los niveles sanguíneos.

La determinación de la urea se llevó a cabo mediante el estuche comercial “Urea 37” de SPINREACT (España), el cual se fundamenta en la reacción de la urea con o-ftalaldehído en medio ácido para formar un compuesto colorido que absorbe a 510 nm.

6.2.4 Niveles de expresión de PKC ϵ fosforilada por Western blot

Como se mencionó en la introducción, PKC ϵ sufre tres fosforilaciones secuenciales que son indispensables para sensibilizar a la enzima a segundos mensajeros y así la enzima pueda alcanzar una forma madura aunque aún inactiva. La última de ellas se da en el residuo de la serina 729, por lo que esta fosforilación indica que la PKC ϵ ha completado sus fosforilaciones en el dominio catalítico. Posteriormente, la forma madura de PKC ϵ se activará por la unión de la enzima a segundos mensajeros tales como el DAG (diacilglicerol) y la fosfatidilserina producidos por estímulos fisiológicos tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Newton *et al.*, 2010). Por esta razón se decidió determinar por Western blot los niveles de PKC ϵ fosforilada en el residuo de serina 729. Para esto se obtuvieron las cortezas renales y se homogenizaron como se detalla en el apéndice 10.7. La determinación de contenido de proteínas totales se llevó a cabo por el método de Lowry (Ver apéndice 10.8). Posteriormente se cargó en geles de SDS-poliacrilamida al 10% un volumen del homogenado de corteza renal equivalente a 100 μ g de proteína y se realizó la electroforesis (Ver apéndice 10.9.3). Posterior a la separación de proteínas, se realizó la transferencia de éstas a una membrana de fluoruro de polivinilo (PVDF) como se describe en el apéndice 10.9.4. Para poder realizar la detección de PKC ϵ específicamente, se utilizó el anticuerpo primario policlonal pPKC ϵ Ser 729 (Santa Cruz Biotech inc, California-EUA, #cat: sc-5286), el cual se incubó en la membrana de PVDF por 24 h, transcurrido este tiempo se incubó por una hora el anticuerpo secundario ratón-anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotech inc, California-EUA, #cat: sc-2357), el cual se une al anticuerpo primario. Finalmente se preparó el agente quimioluminiscente (estuche de detección de INMOBILON millipore # catálogo WBKLS0500) que contiene el sustrato que reacciona con la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario para emitir una señal quimioluminiscente en forma de banda, esta señal se va ajustando con el tiempo de exposición al agente para después revelarla en placas de rayos X.

Las placas de rayos X se digitalizaron para determinar la intensidad de las bandas por medio del análisis densitométrico, para el cual se utilizó el programa "Image J" (National Institutes of Health, USA). Se realizó esta determinación con PKC ϵ y el control de carga. Posteriormente, en todos los grupos experimentales se obtuvo la relación entre PKC ϵ y el

control de carga para poder ajustarla con respecto al promedio de la relación PKC ϵ /control de carga del grupo control. Los datos se expresaron como unidades relativas de densitometría (URD) y se graficaron con el programa “Graphpad Prism” Versión 5.

Inicialmente se probaron diferentes condiciones para el western blot de PKC ϵ , algunas de las cuales se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones experimentales iniciales para la detección de PKC ϵ fosforilada por Western blot.

Proteína total	Bloqueo	Dilución de anticuerpo 1 ^{ario}	Dilución de anticuerpo 2 ^{ario}	Tiempo de exposición
60 μ g	Suero fetal bovino al 10% (SFB)	1:200	1:50,000	10 min
60 μ g	SFB al 10%	1:500	1:40,000	10 min
60 μ g	SFB al 10%	1:1000	1:60,000	10 min
60 μ g	SFB al 10%	1:1500	1:60,000	10 min
80 μ g	SFB al 10%	1:300	1:60,000	15 min
80 μ g	SFB al 10%	1:300	1:80,000	15 min
80 μ g	SFB al 10%	1:300	1:90,000	15 min
80 μ g	SFB al 10%	1:300	1:100,000	15 min

En los siguientes ensayos para la búsqueda de la dilución más apropiada de anticuerpo secundario, se emplearon varias diluciones (1:60,000, 1:90,000), detectando que aún era factible seguir aclarando la imagen de la placa para obtener una señal aún más definida de PKC ϵ fosforilada. Finalmente, las condiciones ideales para la detección de PKC ϵ fosforilada se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones experimentales finales para la detección de PKC ϵ por Western blot.

Proteína total	Bloqueo	Dilución de anticuerpo 1^{ario}	Dilución de anticuerpo 2^{ario}	Tiempo de exposición
100 μ g	Suero fetal bovino al 10% (SFB)	1:400	1:50,000	40 min

6.3 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm error estándar. Se utilizó el programa “Graphpad Prism” Versión 5. Los datos se analizaron por análisis de varianza de una vía (ANOVA), y posteriormente se utilizó el método de comparación múltiple Newman-Keuls con $P < 0.05$ para determinar las diferencias significativas entre los grupos.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización del EST

- **Fenoles totales e inactivación del radical superóxido**

Para la determinación experimental de la cantidad de fenoles totales del EST, el polvo se disolvió en agua, y se realizaron diferentes diluciones (Ver apéndice 10.2). Los valores de absorbancia de las diluciones, se interpolaron en una curva patrón de ácido gálico para obtener la concentración de fenoles totales. Los resultados obtenidos indican que el EST presenta un alto contenido de polifenoles ($1.189 \pm 0.027 \text{ mg}_{\text{eq}} \text{ác gálico} / \text{mg}_{\text{EST}}$).

Así mismo, para evaluar la capacidad antioxidante del extracto obtenido, se determinó la capacidad de éste para inactivar el anión superóxido *in vitro*. En la figura 14 se presenta la curva de inactivación del radical a diferentes concentraciones de EST. Con la información proporcionada por la curva, se pudo determinar la CI_{50} del EST, que es la concentración a la que el extracto es capaz de inactivar el 50% del anión superóxido generado, la cual fue de $30.7 \mu\text{g/mL}$. Esto nos dice que el EST posee una buena capacidad antioxidante si lo comparamos con otros antioxidantes comúnmente utilizados como es el caso de la vitamina C cuya CI_{50} para el anión superóxido es de $66 \mu\text{g/mL}$ (Cruz, et al., 2007).

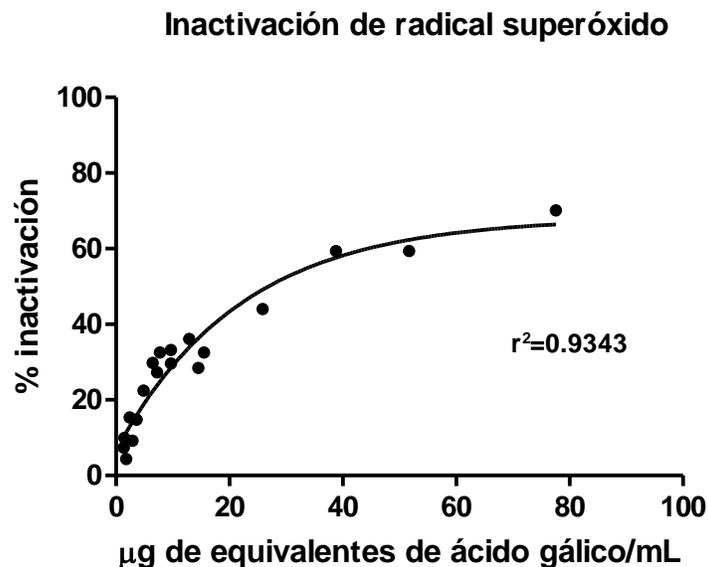


Figura 14. Curva de inactivación del radical $O_2^{\cdot -}$ a diferentes concentraciones del EST. $CI_{50}=30.7 \mu\text{g}$ de eq. ác gálico/mL.

7.2 Desarrollo del protocolo

- **Curva de peso corporal**

En la figura 15 se presenta la curva de peso corporal, reflejo del desarrollo de las ratas durante el protocolo. Comparando con los valores del grupo control, el grupo EST presentó un crecimiento normal y, por lo tanto, se puede decir que no se presentaron efectos adversos por el extracto en este sentido. El grupo tratado con DEN presenta una disminución del peso corporal al día siguiente de su administración; sin embargo, después presentó un crecimiento normal, aunque no alcanzó el peso del grupo control al final del protocolo. En cambio, los grupos de tratamiento con el carcinógeno (FeNTA, D+F y E+D+F) presentaron una disminución en su crecimiento a lo largo del estudio y el EST no fue capaz de prevenir tal efecto. Por lo anterior, se sugiere que estos últimos grupos de ratas sufrieron deterioro en su salud.

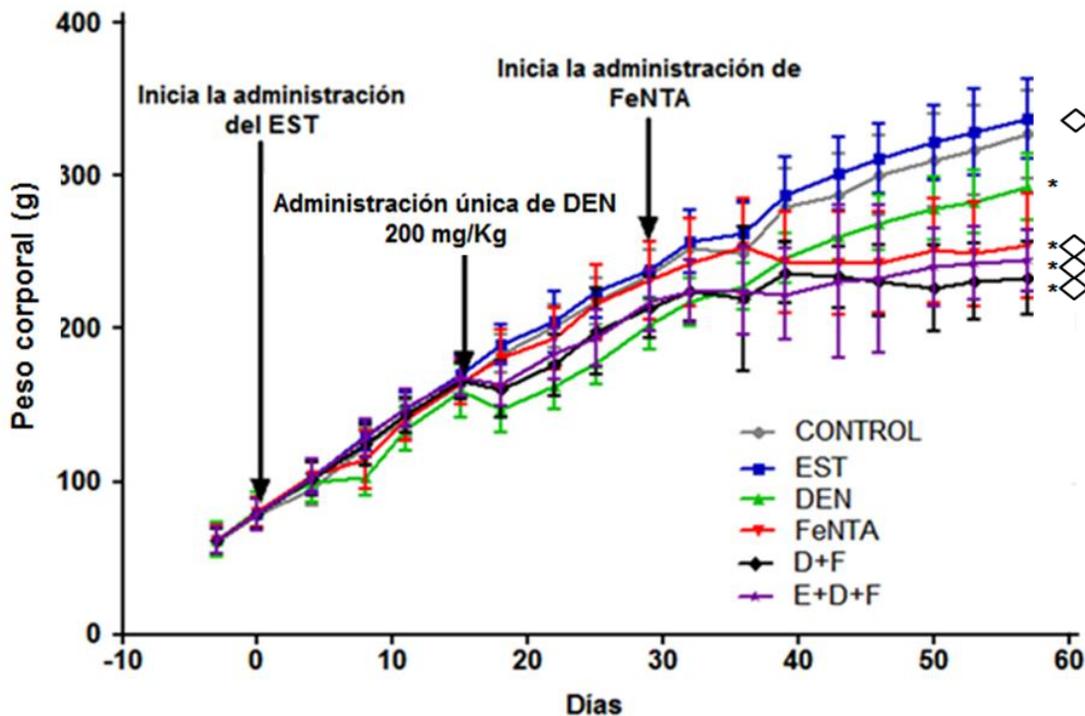


Figura 15. Gráfica de peso corporal a lo largo del protocolo. El tratamiento con el iniciador DEN ocasiona una disminución en el peso de las ratas. Sin embargo, ocurre una recuperación a los pocos días de su administración. En contraste, los grupos tratados con el carcinógeno FeNTA no se recuperaron ante la caída de peso y el EST no es capaz de evitarlo. El * indica diferencias significativas con respecto al control y el ◇ indica diferencias significativas con respecto al DEN, las barras representan la media \pm EE ($P < 0.05$).

7.3 Observaciones macroscópicas de los riñones.

Al momento de la extirpación de los riñones, se realizó un análisis macroscópico que nos permitiera identificar algún cambio de la morfología por el tratamiento con FeNTA. En la figura 16 se presentan imágenes representativas de cada grupo. En las que se logra apreciar que los riñones de los grupos EST y DEN presentan características morfológicas macroscópicas similares a las del grupo control. Sin embargo, en los grupos FeNTA, D+F y E+D+F, se observa un tono pálido en las zonas correspondientes a la corteza renal, además de irritación medular. En el caso del grupo E+D+F, el EST no

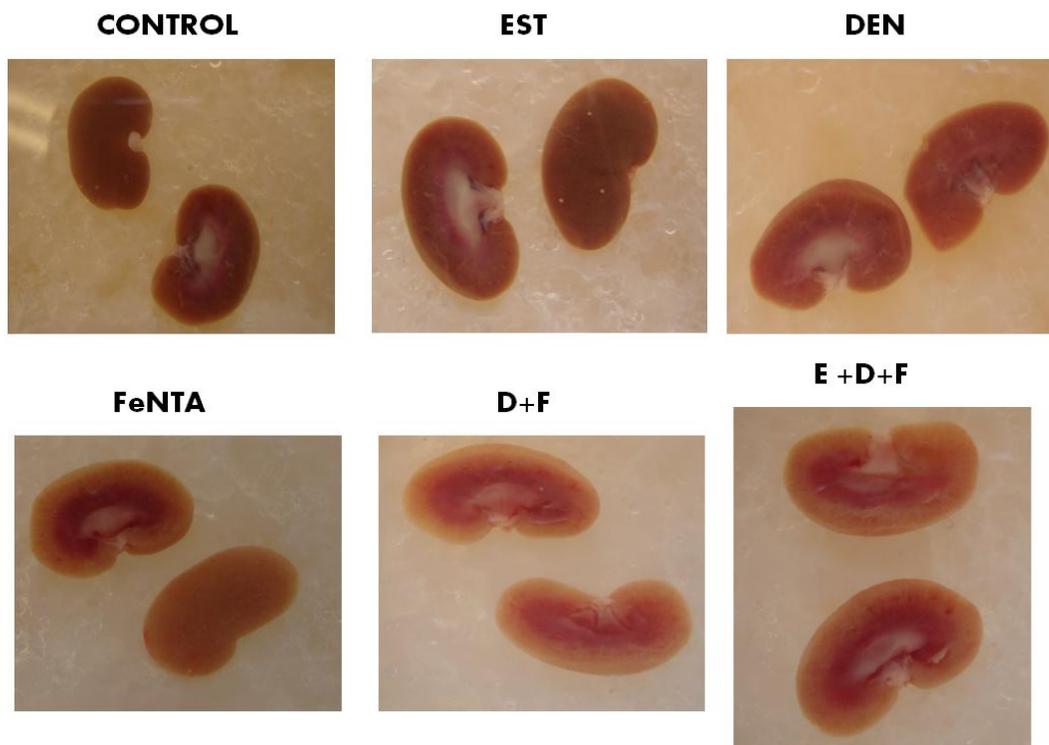


Figura 16. Fotografías representativas de los riñones al final del protocolo subcrónico a un mes de tratamiento con FeNTA. No hay diferencias en la apariencia macroscópica en los riñones de los grupos EST y DEN con respecto al grupo control, mientras que los grupos FeNTA, DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA mostraron daños evidentes que se pueden apreciar en la coloración pálida de la corteza e irritación medular.

7.4 Evaluación de la función renal.

Para determinar si los tratamientos aplicados provocaron alteraciones en la función renal, se analizaron los niveles de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) al final del estudio. En la figura 17 se observan los niveles de BUN determinados en todos los grupos. Estos resultados nos indican que con éste esquema de tratamiento durante un mes, no se inducen fallas en la función renal.

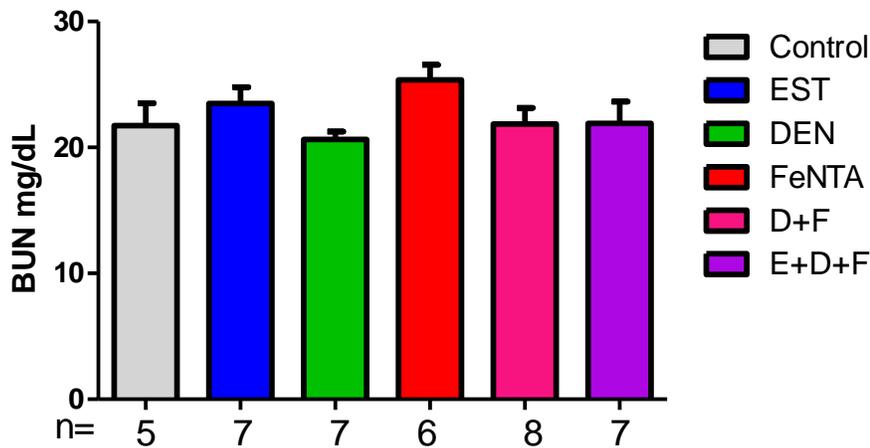


Figura 17. Análisis de la función renal expresada como BUN al final del estudio. Ningún grupo mostró alteraciones en la función renal. Las barras representan la media \pm EE.

7.5 Niveles de expresión de PKC ϵ fosforilada

Con la finalidad de investigar el comportamiento de PKC ϵ fosforilada, se realizó un Western blot para la detección de esta proteína. En el presente trabajo no se utilizó como control de carga ninguna proteína de citoesqueleto, ya que se tuvieron muchos problemas metodológicos para la detección de la tubulina, haciendo que no resulten confiables como control de carga. Por lo anterior, se eligió como control de carga una banda inespecífica del Western Blot cercana a la banda de interés (Imagen inferior, panel A, figura 18), en la que se observa una expresión constante en todos los grupos experimentales. Así mismo, en la imagen superior del panel A se observan las bandas correspondientes a PKC ϵ fosforilada, en las cuales se puede distinguir que la señal de PKC ϵ fosforilada es más intensa en todos los grupos tratados con FeNTA, principalmente el grupo D+F.

En la figura 18, panel B se muestra que el tratamiento subcrónico con FeNTA y DEN+FeNTA, induce un incremento significativo en los niveles de esta proteína fosforilada y que el EST ejerce una protección parcial al no tener diferencia significativa con el control ni con los grupos FeNTA y DEN+FeNTA.

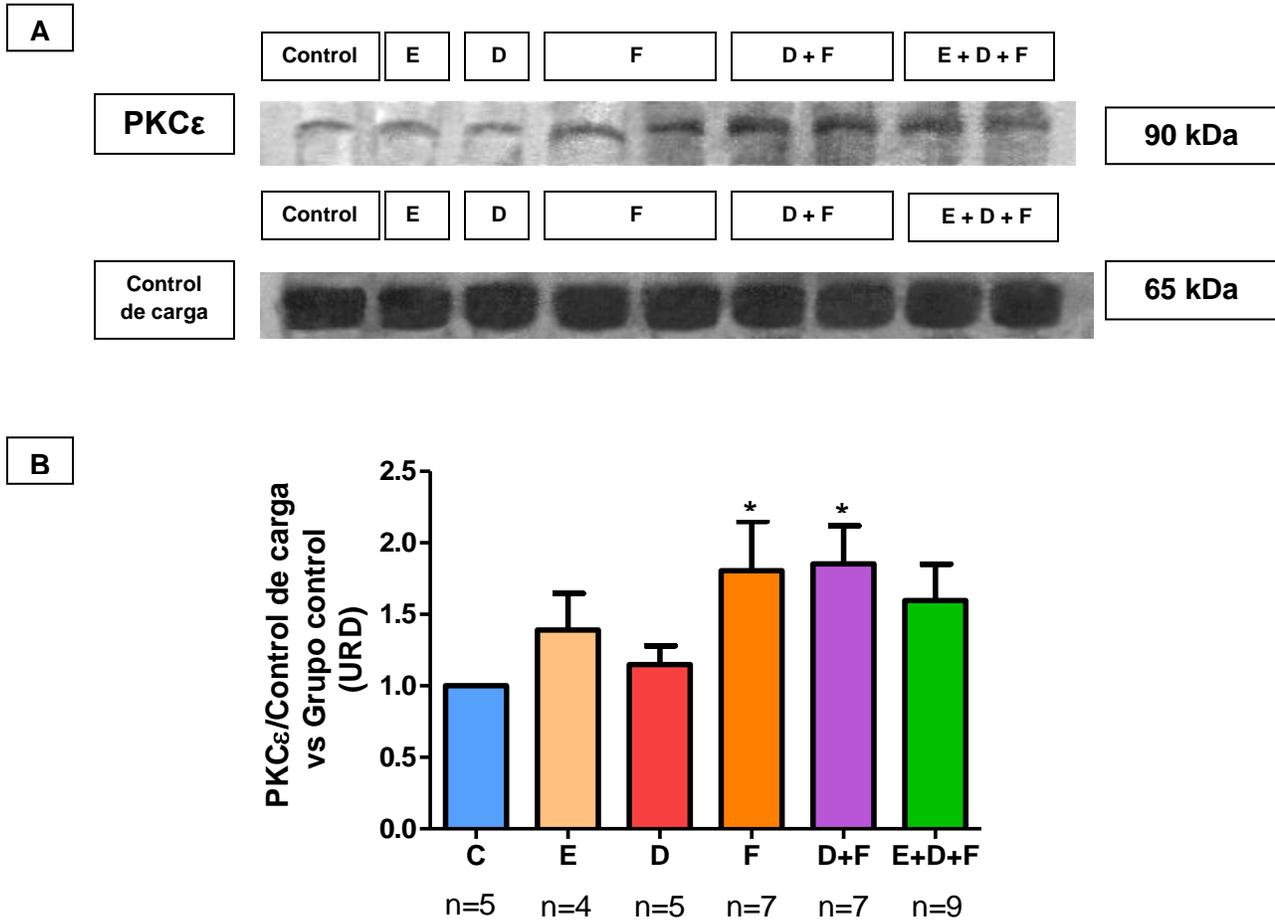


Figura 18. (A) Imagen representativa para la detección de PKC ϵ en corteza renal, así como la banda inespecífica como control de carga. **(B)** Análisis densitométrico de las radiografías ajustado contra la banda inespecífica y con respecto al grupo control. Cada barra representa la media \pm EE de n muestras. (*) Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control, EST, DEN y E+D+F ($p < 0.05$). El tratamiento con FeNTA y DEN+FeNTA induce un incremento en los niveles de pPKC ϵ , y el EST protege de dicho efecto. URD: Unidades relativas de densitometría.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer es una patología multifactorial y se ha demostrado que el estrés oxidante juega un papel importante en el proceso de carcinogénesis. El CCR es uno de los tipos de cáncer menos estudiados, de difícil diagnóstico por ser asintomático, que presenta resistencia a tratamientos y una elevada tasa de mortalidad (Kovacs *et al.*, 1997; Stadler *et al.*, 2004). Por ello, se requiere un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis renal para mejorar la eficacia en el tratamiento de esta enfermedad y facilitar un diagnóstico oportuno. El modelo experimental más utilizado para el estudio de este tipo de cáncer, es aquél inducido por FeNTA en roedores (Athar *et al.*, 1998). Sin embargo, este modelo aún no se ha caracterizado. Por otro lado, la generación de EROs como parte del mecanismo de carcinogenicidad del FeNTA (Toyokuni *et al.*, 1996; Tsuchiya *et al.*, 2005), ha llevado a la búsqueda de compuestos antioxidantes para prevenir o disminuir el desarrollo de cáncer. El tamarindo es un fruto con propiedades antioxidantes por ser rico en compuestos polifenólicos, presentando una mayor actividad antioxidante en la semilla (Heo *et al.*, 2007; Sudjaroen *et al.*, 2005). En el presente trabajo se obtuvo un extracto de semillas de tamarindo rico en polifenoles y que posee una notable capacidad antioxidante inactivando al anión superóxido con una CI_{50} de 30.7 $\mu\text{g/mL}$. Esta capacidad antioxidante es incluso mayor que, por ejemplo, la de la vitamina C que presenta una CI_{50} de 66 $\mu\text{g/mL}$ (Cruz *et al.*, 2006) y es considerada un antioxidante clásico. Otra observación importante respecto al EST fue que la dosis empleada no presentó un efecto antinutricional a lo largo del estudio, ya que no se obtuvieron cambios en el peso corporal de las ratas del grupo EST con respecto al grupo control. Esto es importante debido a que se ha demostrado que algunos polifenoles pueden tener efectos antinutricionales (Cruz *et al.*, 2006). En contraste, sí hubo un efecto negativo del DEN sobre el peso corporal de los animales al día siguiente de su administración, pero posteriormente, en el grupo que únicamente recibió este compuesto, hubo una recuperación, en cambio, en los grupos tratados con FeNTA no hubo tal restablecimiento a lo largo del estudio, lo que nos indica que el carcinógeno repercute en la salud de los animales.

Por otra parte, los tratamientos realizados no indujeron alteraciones sobre la función renal evaluada como BUN. Estos resultados muestran diferencias con lo observado en estudios de tratamiento agudo con FeNTA, en los cuales el FeNTA induce una severa insuficiencia renal aguda (Cruz *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2008). Estas diferencias sugieren que con el esquema de tratamiento utilizado en el presente trabajo se alcanzó una etapa diferente a la etapa de daño agudo por FeNTA. Además, los resultados obtenidos en los niveles de BUN coinciden con lo observado en el CCR humano, en el cual no hay alteraciones en la función renal durante el desarrollo de esta neoplasia, siendo ésta una de las razones que dificulta su diagnóstico oportuno (Richie *et al.*, 2005). Todo esto, junto con la presencia de alteraciones moleculares, sugiere que el esquema de tratamiento desarrollado en el presente trabajo podría representar una etapa temprana del desarrollo de CCR.

Nuestros resultados indican que los niveles de PKC ϵ fosforilada están incrementados en las cortezas renales obtenidas al término del protocolo de los grupos FeNTA y D+F, no así en el grupo tratado únicamente con DEN, lo que sugiere que la inducción de PKC ϵ está dada por el carcinógeno y no por el iniciador tumoral en este esquema de tratamiento. Por otro lado, el EST ejerció una protección disminuyendo los niveles de PKC ϵ fosforilada en el grupo E+D+F con respecto a los grupos FeNTA y D+F; esta protección fue parcial ya que el grupo E+D+F a pesar de no presentar diferencias significativas con respecto al control, tampoco las tiene con respecto a los grupos FeNTA y D+F, que sí presentaron diferencias significativas con respecto al control. Un hecho muy interesante es que esta protección parcial coincide con la protección parcial contra el desarrollo del CCR observada previamente en nuestro laboratorio (Vargas *et al.*, 2009). La protección por parte del EST puede ser consecuencia de la inhibición de mecanismos de señalización inducidos por el estrés oxidante generado por el FeNTA que lleven a la sobreexpresión de PKC ϵ fosforilada como por ejemplo, la vía de PI3-K.

Ahora bien, el hecho de que el aumento que observamos en el presente trabajo sea en la PKC ϵ fosforilada en la ser 729 indica que la cinasa está completamente madura y lista para ser activada por sus segundos mensajeros lipídicos como el DAG (Newton *et al.*, 2010). La sobreexpresión en los niveles de PKC ϵ es una de las alteraciones moleculares que se han asociado a la malignización celular en diferentes tipos de cáncer y se ha

demostrado que esta enzima está involucrada en procesos de antiapoptosis, proliferación, motilidad e invasividad celular (Basu *et al.*, 2007; Marengo *et al.*, 2011). Particularmente, en líneas celulares de CCR se ha encontrado que la sobreexpresión de PKC ϵ correlaciona con una alta actividad proliferativa y que su localización membranal, que refleja la activación de la enzima, se asocia con un alto potencial de invasividad (Engers *et al.*, 2000). En el presente trabajo, y gracias al uso de un modelo experimental de carcinogénesis renal, se demuestra por primera vez que esta isoenzima de la familia PKC está inducida en etapas preneoplásicas, lo que nos lleva a sugerir su posible participación en el proceso de carcinogénesis renal por FeNTA y que probablemente también esté involucrada en la carcinogénesis en el humano pudiendo ser un blanco terapéutico específico.

9. CONCLUSIONES

- Se logró montar un protocolo de 1 mes de tratamiento con FeNTA, que podría representar una etapa temprana en el desarrollo del CCR.
- El tratamiento con FeNTA durante 1 mes induce un aumento en los niveles de PKCε fosforilada, lo que sugiere su participación en la carcinogénesis.
- El extracto protege parcialmente contra el aumento en PKCε fosforilada lo que coincide con la protección parcial contra el desarrollo del CCR observada previamente en nuestro laboratorio.

10. APÉNDICE

10.1 PREPARACIÓN DEL EST

1. Desprender la semilla de la pulpa del tamarindo
2. Separar la cáscara de la semilla por abrasión
3. Tomar 25 g de cáscara de semillas de tamarindo y colocar en 500 mL de etanol anhidro
4. Macerar las semillas de tamarindo en etanol por un lapso de 24 h a temperatura ambiente.
5. Separar la cáscara del extracto por decantación y/o filtración.
6. Concentrar al vacío el extracto, hasta obtener un polvo seco color café claro.

10.2 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

Fundamento

El método utiliza una curva patrón construida a partir de diferentes concentraciones de ácido gálico, donde se interpola la absorbancia obtenida de la muestra. Se basa en la reacción en medio básico de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, que da como resultado un complejo colorido que absorbe a 765 nm (Singleton *et al.*, 1999).

Soluciones:

- **Carbonato de sodio 1 M**

Pesar 26.5 g de Na_2CO_3 , disolver en agua destilada y aforar a 250 mL.

- **Estándar ácido gálico para la curva patrón [10 mg/mL]**

Pesar 50 mg de ácido gálico y disolver en 5 mL de metanol al 50% en agua destilada.

- **Folin 2 N**

Hacer una dilución 1:10 con agua destilada.

Procedimiento

1. Utilizar tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
2. Colocar 400 μL de Na_2CO_3 1 M.
3. Agregar 50 μL de estándar, agua (blanco), o muestra (EST).
4. Adicionar 500 μL del reactivo de Folin Ciocalteu diluido 1:10.

5. Agitar durante 5 min e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Leer absorbancia a 765 nm.
7. Interpolar resultados en la curva patrón.

Curva patrón (preparación de las soluciones estándar):

De una solución stock de ácido gálico (1 mg/mL) se realizan diluciones enlistadas en la tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones de ácido gálico de la curva patrón para la cuantificación de fenoles totales.

Concentración [$\mu\text{g/mL}$]	μL del stock	μL de agua destilada
50	5	995
100	10	990
150	15	985
200	20	980
250	25	975

10.3 INACTIVACIÓN DEL RADICAL SUPERÓXIDO

Fundamento:

La inactivación del radical superóxido se mide indirectamente gracias a la capacidad del antioxidante para evitar la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los radicales superóxido generados *in vitro* en el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Figura 18). La reducción de NBT por efecto del radical superóxido se determina por la formación de formazán el cual puede medirse espectrofotométricamente a 560 nm (Parejo *et al.*, 2002).

Soluciones para la preparación de la mezcla de reacción

- **Xantina 0.3 mM**

Pesar 0.0228 g de xantina, agregar 4-5 mL de Na_2CO_3 400 mM y aforar con 500 mL de agua destilada.

- **EDTA 0.6 Mm**

Pesar 0.1117 g de EDTA y disolverlos en 500 mL de agua destilada con agitación.

- **Azul de nitrotetrazolio (NBT) 150 μ M**

Pesar 0.0368 g de NBT y disolverlos en 300 mL de agua destilada con agitación.

- **Na₂CO₃ 400 mM**

Pesar 21.2 g de Na₂CO₃ y disolver en 500 mL de agua destilada con agitación.

- **Albúmina sérica bovina 0.1 %**

Pesar 0.25 g de albúmina y disolver en 250 mL de agua destilada.

Mezcla de reacción

Mezclar las soluciones en el volumen indicado a continuación:

Reactivo	Volumen
Xantina	30 mL
EDTA	15 mL
NBT	15 mL
Na ₂ CO ₃	9 mL
ABS	4.5 mL
Total	73 mL

- **Amortiguador de fosfatos 50mM pH: 7.4**

Pesar 1.0524 g de KH₂PO₄ y 0.6745 g de Na₂HPO₄ para preparar 250 mL de solución.

- **Sulfato de amonio 2M**

Pesar 66g de sulfato de amonio y aforar en 250 mL de agua destilada.

- **Xantina oxidasa 168 U/L**

Para preparar 1mL de xantina oxidasa 168 U/L a partir de un lote de 0.09 U/mg de sólido:

$$0.096 \text{ U} \longrightarrow 1 \text{ mg} \qquad 1750 \text{ mg} \longrightarrow 1000 \text{ mL}$$

$$168 \text{ U} \longrightarrow x = 1750 \text{ mg} \qquad x = 1.75 \text{ mg} \longleftarrow 1 \text{ mL}$$

Disolver la cantidad calculada (1.75 mg) de xantina oxidasa en 1 mL de sulfato de amonio 2 M.

- **Cloruro de cobre CuCl₂ · 2H₂O 0.8 mM**

Pesar 0.07 g de CuCl₂ · 2H₂O y disolver en 500 mL de agua destilada.

Procedimiento

Preparación de las muestras

1. Se realizan las diluciones enlistadas en la tabla 6.

Tabla 6. Diluciones del extracto polifenólico en la determinación de inactivación del radical superóxido.

Diluciones	Agua (μL)	Extracto polifenólico (μL)
1:50	1960	40
1:75	1480	20
1:100	1000	1000 de 1:50
1:150	1000	1000 de 1:75
1:200	1000	1000 de 1:100
1:250	1494	6
1:300	1000	1000 de 1:150
1:400	1000	1000 de 1:200
1:500	500	500 de 1:250
1:600	500	500 de 1:300

2. Agregar 815 μL de la mezcla de reacción a cada determinación y añadir los reactivos en la forma como se indica en la tabla 7 preparando un C-100%*, un blanco problema y un problema por cada dilución de extracto polifenólico.

3. Contabilizar el tiempo de incubación desde que se agregan los reactivos de manera simultánea en el primer tubo.

4. Incubar los tubos 15 min en un baño a 27°C.

5. Detener la reacción con 330 μL de cloruro de cobre.

6. Realizar la cuantificación espectrofotométricamente a 560 nm

7. Expresar los resultados como porcentaje de inactivación del radical superóxido en función de la cantidad de fenoles totales presentes en los 165 μL de muestra para cada una de las diluciones utilizadas.

Tabla 7. Reactivos adicionados para cada dilución de extracto polifenólico en la determinación de la capacidad de inactivación del radical superóxido.

C-100%*	Blanco problema	Problema
165 µL amortiguador de fosfatos	165 µL dilución extracto polifenólico	165 µL dilución extracto polifenólico
20 µL xantina oxidasa	20 µL amortiguador de fosfatos	20 µL xantina oxidasaµ

*C 100%: Cantidad total del radical superóxido generada por el sistema xantina-xantina oxidasa.

10.4 PREPARACIÓN DE N-DIETILNITROSAMINA (DEN)

1. Diluir el contenido del frasco (1mL de 990-999 mg DEN/mL) en 11 mL de solución salina.
2. Ajustar el volumen a inyectar de acuerdo al peso de cada rata.

10.5 PREPARACIÓN DE NITRILOTRIACETATO DE HIERRO (FeNTA)

La solución de nitrilotriacetato de hierro se prepara en el momento del ensayo de acuerdo a la metodología descrita en la literatura (Awai *et al.*, 1979) siguiendo una relación molar 1:4 de las soluciones nitrato de hierro y nitrilotriacetato de sodio respectivamente. En nuestro laboratorio se utilizó el doble de la concentración de nitrilotriacetato de sodio para hacer la solución de FeNTA en proporción 1:2 y la solución se ajustó a pH: 7.4 con bicarbonato de sodio 120 mM.

Reactivos

- **Nitrato de hierro $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 160 mM**

Pesar 0.6462 g de nitrato de hierro y aforar con 10 mL de NaHCO_3 120 mM

- **Nitrilotriacetato de sodio Na_2NTA 320 mM**

Pesar 1.8809 g de Na_2NTA en 25 mL de solución de bicarbonato 120 mM

Tomar 20 mL de esta solución y mezclarla con 10 mL de nitrato de hierro $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 160 mM

- **Bicarbonato de sodio NaHCO₃ 120 mM (Vehículo del carcinógeno)**

Pesar 0.504 g de NaHCO₃ y aforar con 50 mL de agua desionizada.

Para preparar 30 mL de solución de FeNTA se mezclan 10 mL de nitrato de hierro 160 mM con 20 mL de nitrilotriacetato de sodio 300 mM, y se agregan 0.2 g de bicarbonato de sodio 120 mM lentamente y con agitación para ajustar a pH 7.4. Una vez obtenido el pH deseado, se interrumpe la agitación con la finalidad de mantener constante este pH por mayor tiempo.

Ajuste del pH de la solución de FeNTA durante el transcurso de los ensayos

El ajuste de pH debe realizarse con un potenciómetro con la modalidad que permita medir los cambios de pH durante todo el tiempo, ya que la solución nunca se mantendrá a pH constante, esta solución presenta variaciones pequeñas de pH que se incrementan con la agitación durante el transcurso del ensayo. Para evitar la preparación de una nueva solución de FeNTA durante el ensayo (en caso de que este sobrepase el pH de 7.4), se debe preparar otra solución de FeNTA sin agregar bicarbonato de sodio, para poder disminuir el pH de la primera solución de FeNTA.

Precauciones

Para preparar la solución de nitrato de hierro 160 mM, disolver lentamente el nitrato de hierro en bicarbonato de sodio 120 mM ya que la efervescencia de este reactivo puede ocasionar derrame de la solución antes de completar el aforo. La solución de FeNTA debe protegerse de la luz.

10.6 CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO UREICO SANGUÍNEO

- **Reactivo de trabajo**

Mezclar volúmenes iguales de o-ftaladehído 4.8 mM y de la solución de borato 87 mM.

10.7 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE TEJIDO DE CORTEZA RENAL

En el momento del sacrificio de los animales

1. Extraer los dos riñones de la rata.
2. Separar la corteza renal de la médula.
3. Dividir la corteza renal en fragmentos.

4. Congelar lo más rápido posible en nitrógeno líquido.
5. Almacenar a -70°C hasta la determinación de $\text{PKC}\epsilon$.

En el momento de determinación de $\text{PKC}\epsilon$

1. Colocar 100 mg de tejido de cada muestra 600 μL de buffer de DTT, Tris-HCl 10 mM pH 7.4, glicerol 30%, EDTA 1 mM pH 8, Tritón X-100%, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF por sus siglas en inglés) 1 mM, azida de sodio 15 mM, inhibidor de proteasas "Complete mini" (Roche- Indianapolis, IN, EUA) e inhibidor de fosfatasa "phospho shop" (Roche- Indianapolis, IN, EUA).
3. Centrifugar los homogenados resultantes a 14,000 rpm.
4. Separar el sobrenadante.
5. Almacenar a -20°C hasta su uso.

10.8 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Fundamento

El método de Lowry se basa en la formación de un complejo entre iones Cu^{2+} con el nitrógeno de los aminoácidos en condiciones alcalinas. Asimismo, el complejo reacciona con reactivo de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotungsteno) para formar un compuesto colorido que puede medirse espectrofotométricamente a 660 nm (Lowry *et al.*, 1951).

Soluciones

- **Ácido tricloroacético al 10%**

Pesar 10 g de TCA y disolverlos en 100 mL de agua destilada.

- **NaOH 0.1 M**

Pesar 0.4 g de hidróxido de sodio y aforar con 100 mL de agua destilada.

- **Estándar albúmina sérica bovina al 0.05%**

Pesar 0.05 g de ABS y aforar con 100 mL de agua destilada.

- **Solución A:**

Preparar una solución con Na_2CO_3 al 2%, NaOH al 0.4% y tartrato de sodio al 0.02% en agua destilada.

- **Solución B**

Preparar una solución con sulfato de cobre al 0.5% en agua destilada.

- **Solución C**

Mezclar la solución B y la solución A en proporción 1:50 respectivamente.

- **Solución D**

Diluir Folin 1 N con agua destilada en proporción 1:2.

Procedimiento

1. Diluir con agua 1:150 el sobrenadante del homogenado (3.33 μL sobrenadante + 496.67 μL de agua).
2. Colocar 200 μL de muestra de homogenado de tejido o estándar de albúmina sérica bovina al 0.05% por cada tubo.
4. Adicionar a todas las muestras 1 mL de la solución C.
5. Incubar durante 10 minutos
6. Agregar 100 μL de la solución D con agitación simultánea.
7. 30 minutos después de la adición de la solución D, leer en el espectrofotómetro a 660 nm.
8. La concentración de proteínas totales se calcula interpolando la absorbancia de los tubos problema en la curva patrón de albúmina sérica bovina (Tabla 8), y los resultados se expresan en μg de proteína/ μL de muestra.

Tabla 8. Concentraciones de albúmina sérica bovina al 0.05% de la curva patrón para la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry.

[ASB] $\mu\text{g}/0.2 \text{ mL}$	ASB (μL)	H₂O (μL)
Blanco	0	200
5	10	190
10	20	180
15	30	170
25	50	150
35	70	130
50	100	100

10.9 WESTERN BLOT

10.9.1 Preparación de los geles SDS-poliacrilamida para electroforesis

1. Preparar el “resolving gel” de acrilamida al 10% a partir de una solución de acrilamida al 30%.
2. Agitar suavemente.
3. Vaciar la mezcla al molde 1.5 cm antes de que se llene.
4. Añadir 200 μ L de isopropanol a la superficie del gel de resolución para aplanar.
5. Dejar polimerizar por un tiempo aproximado de 30 min.
5. Eliminar el isopropanol por decantación
6. Hacer tres lavados con agua para eliminar el isopropanol remanente y la acrilamida que no haya polimerizado.
7. Utilizar papel filtro para eliminar la humedad.
8. Preparar el “stacking gel” al 5%.
9. Colocar la mezcla sobre el “resolving gel” (sin llenar el molde).
10. Insertar el peine cuidadosamente evitando la formación de burbujas.
11. Esperar 30 minutos para que se complete la polimerización del segundo gel.
11. Desprender cuidadosamente.
12. Colocar los moldes en una cámara de electroforesis.
13. Vaciar en la cámara buffer de electroforesis, el volumen vaciado dependerá de la cantidad de geles que se encuentren en la cámara.

10.9.2 Preparación de las muestras

1. Depositar en un tubo eppendorf un volumen de muestra correspondiente a 100 μ g de proteína.
2. Añadir sobre el tubo, el mismo volumen de buffer de carga o desnaturizante.
3. Resuspender tres veces hasta lograr un homogenado.
4. Colocar los tubos en un refractario con agua hirviendo durante 3 min.

5. Colocar sobre hielo las muestras y cargar en los pozos del gel concentrador.

10.9.3 Electroforesis.

1. Correr los geles a 20 mV/gel durante 3.5 h.

2. Desmontar los moldes y sumergir en buffer de electroforesis los vidrios para poder retirar los geles.

3. Desprender cuidadosamente con ayuda de una cuña, el gel concentrador del gel de resolución.

4. Preparar los geles para su posterior transferencia a membranas de PVDF.

10.9.4 Transferencia a membranas de fluoruro de polivinilo (PVDF)

1. Efectuar los siguientes procedimientos 20 minutos antes del término de la electroforesis:

- Recortar cada membrana (IMMPBIOLON-P) a una dimensión de 9x8 cm.
- Transferir las membranas recortadas a un recipiente con metanol y sumergirlas por un tiempo de 5 min.
- Pasar las membranas a la brevedad posible a un recipiente con agua y sumergir por 2 min.
- Retirar las membranas del recipiente con agua y colocar en buffer de transferencia por un tiempo aproximado de 10 min.

2. Colocar en el equipo de transferencia semiseca (BIO-RAD) papel filtro Whatman humedecido con buffer de transferencia.

3. Colocar cuidadosamente las membranas de PVDF encima del papel filtro Whatman, eliminando las burbujas (Evitar que la membrana se seque).

4. Colocar inmediatamente el gel en forma concéntrica encima de la membrana de PVDF eliminando las burbujas formadas.

5. Cubrir el sándwich con un segundo papel filtro.

6. Cerrar cuidadosamente el equipo.

7. Transferir a 70 mA/gel durante 1 h y media.
8. Preparar la solución de bloqueo que es suero fetal bovino (SFB) en PBS-tween unos minutos antes de que termine la transferencia.
9. Desmontar el equipo al terminar la transferencia y pasar la membrana con proteínas a 5 mL de solución de bloqueo.
10. Poner en agitación durante una hora.
11. Preparar la dilución correspondiente de anticuerpo primario en PBS-tween minutos antes de que termine el bloqueo.
12. Eliminar el SFB de las membranas.
13. Adicionar a la membrana 5 mL de la solución del anticuerpo primario.
14. Incubar el anticuerpo primario toda la noche y dejar agitando a una temperatura de 4°C.
15. Al término de éste periodo, retirar el anticuerpo primario de las membranas
16. Enjuagar con PBS-tween.
17. Esperar 15 min en agitación
18. Repetir el mismo procedimiento 3 veces más.
19. Preparar la dilución del anticuerpo secundario el cual esta acoplado a una enzima peroxidasa. La dilución se hace en PBS-tween y depende del tipo de proteína a detectar.
20. Adicionar al término del último lavado, 5 mL de la solución de anticuerpo secundario.
21. Incubar durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente.
22. Eliminar el anticuerpo secundario una vez transcurrida la hora.
23. Repetir tres veces los enjuagues con PBS-tween (15 min entre cada enjuague).

10.9.5 Detección de proteínas

Se utilizó el estuche de detección de INMOBILON (millipore # catálogo WBKLS0500)

1. Preparar el agente quimioluminiscente en un tubo falcón cubierto con papel aluminio.
2. Apagar la luz blanca y encende la luz roja.

3. Recortar las placas de autoradiografía en las mismas proporciones que las membranas.
4. Colocar las membranas en un cassette para detección.
5. Adicionar 400 μ L del agente quimioluminiscente a la membrana.
6. Colocar encima de la membrana un acetato para distribuir uniformemente el agente quimioluminiscente (eliminar las burbujas que se formen).
7. Poner una placa de autoradiografía encima del acetato y de forma concéntrica a la membrana.
8. Cerrar el cassette y exponer la placa de autoradiografía durante un periodo de 20 min (el periodo de exposición depende del tipo de proteína a detectar).

10.9.6 Revelado

9. Abrir cuidadosamente el cassette una vez que haya transcurrido el periodo de exposición.
10. Transferir las placas de autoradiografía a un recipiente con agente revelador
11. Agitar suavemente el recipiente y esperar la aparición de bandas.
12. Cuando se observen las bandas de manera nítida, hay que sumergir la placa en la solución fijadora y mover continuamente.
13. Dejar las placas en la solución durante 6 min.
14. Transferir las placas a un recipiente con agua.
15. Secar las placas a temperatura ambiente, para su posterior análisis.

11. REFERENCIAS

- Akita, Y., Protein Kinase C- ϵ (PKC- ϵ): Its Unique Structure and Function. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2002; **132**, 847-52.
- Alberts, B., Molecular Biology of the Cell 4th EDITION. Garland Science Taylor and Francis Group, 2002; 1313-62.
- Arbiser, J., Molecular regulation of angiogenesis and tumorigenesis by signal transduction pathways: evidence of predictable and reproducible patterns of synergy in diverse neoplasms. *Seminars in Cancer Biology*, 2004; **14**, 81-91.
- Ashhar, S., Exploitation of protein kinase C: A useful target for cancer therapy. *Cancer treatment reviews*, 2009; **35**, 1-8.
- Athar, M., Ferric nitrilotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis*, 1998; **19**, 1133-39.
- Awai, M., Induction of Diabetes in Animals by Parenteral Administration of Ferric Nitrilotriacetate. *American Journal of Pathology*, 1979; **95**, 663-74.
- Azzi, A., The protein kinase C family. *European Journal of Biochemistry*, 1992; **208**, 547-57.
- Aziz, M., Protein kinase C ϵ mediates StatSer727 phosphorylation, Stat 3-regulated gene expression, and cell invasion un various human cancer cell lines trough integration with MAPK cascade (RAF-1,MEK 1/2, and ERK1/2). *Oncogene*, 2010; **29**, 3100-09.
- Basu, A., Proteolytic activation of protein kinase C ϵ by caspase-mediated processing and transduction of antiapoptotic signals. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; **277**, 41850-56.
- Basu, A., Protein kinase C ϵ makes the life and death decision. *Cellular signaling*, 2007; **19**, 1633-42.
- Bansal, A., Protective role of vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 2005; **156**, 101-11.
- Bielski, B., Reduction of nitro blue tetrazolium by CO₂⁻ and O₂⁻ radicals. *Journal of Physical Chemistry*, 1980; **84**, 830-33.

- Brenner, W., Regulation of β_1 integrin expression by PKC ϵ in renal cancer cells. *Seminars in cancer biology*, 1996; **7**, 99-109.
- Burcham, P., Genotoxic lipid peroxidation products: DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis*, 1998; **13**, 287-93.
- Cenni, V., Regulation of novel protein kinase C ϵ by phosphorylation. *Biochemical Journal*, 2002; **363**, 537-45.
- Corbalán, S., Protein kinase C regulatory domains: The art of decoding many different signals in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006; **176**, 633-54.
- Cruz, A. Efecto del pre-tratamiento 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. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Bioquímicas), México, Facultad de Química, U.N.A.M. 2007.
- Deguchi, J., Sex Hormone-dependent Renal Cell Carcinogenesis Induced by Ferric Nitritotriacetate in Wistar Rats. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1995; **86**, 1068-71.
- Dempsey, E., Protein kinase C isozyme and the regulation of diverse cell response. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2000; **279**, 429-35.
- Dong, L., Protein kinase C Isozyme Expression and Down-Modulation in Growing, Quiescent, and Transformed Renal Proximal Tubule Epithelial Cells. *Cell Growth and Differentiation*, 1994; **5**, 881-90.
- Durgan, J., The identification and characterization of novel PKC ϵ phosphorylation sites provide evidence for functional cross-talk within the PKC superfamily. *Biochemical Journal*, 2008; **411**, 319-31.
- Engers, R., Protein kinase C in human renal cell carcinomas: role in invasion and differential isoenzyme expression. *British Journal of Cancer*, 2000; **82**, 1063-69.
- Erin, M., Protein kinase C and other diacylglycerol effectors en cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2007; **7**, 281-91.
- Feinberg, A., The epigenetics of cancer etiology. *Seminars in Cancer Biology*, 2004; **14**, 427-32.

- Garczarczyk, D., Signal Transduction of constitutively active protein kinase C epsilon. *Cellular signalling*, 2009; **21**, 745-52.
- Genestra, M., Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signalling*, 2007; **19**, 1808-19.
- Gopalakrishna, R., Modification of cysteine-rich regions in protein kinase C induced by oxidant tumor promoters and the enzyme specific inhibitors. *Methods in Enzymology*, 1995; **252**, 134–48.
- Gopalakrishna, R., Protein kinase C and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000; **28**, 1349-61.
- Gopalakrishna, R., Antioxidant regulation of protein kinase C in Cancer Prevention. *Journal of Nutrition*, 2010; **40**, 50-4.
- Gorin, M., Protein kinase C ϵ : an oncogene and emerging tumor biomarker. *Molecular Cancer*, 2009; **8**, 1-4.
- Hanahan, D., The Hallmarks of Cancer. *Hormone Research*, 2000; **100**, 57-70.
- Hamasaki, S., Nephrotoxicity of ferric nitrilotriacetate, an electron-microscopic and metabolic study. *The American Journal of Pathology*, 1986; **123**, 343-50.
- Heo, H., Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, 2007; **104**, 87-92.
- Hsiao, W., Cells that overproduce protein kinase-C are more susceptible to transformation by an activated H-Ras oncogene. *Molecular and Cellular, Biology*, 1989; **9**, 2641-47.
- Hofmann, J., The potential for isoenzyme –selective modulation of protein kinase C. *The FASEB journal*, 1997; **11**, 649-69.
- Khan, N., Attenuation of potassium bromated-induced nephrotoxicity by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats: chemoprevention against free radical-mediated renal oxidative stress and tumor promotion response. *Redox Report*, 2004; **9**, 19-28.
- Khan, N., Anticarcinogenic effect of *Nymphaea alba* against oxidative damage, hyperproliferative response and renal carcinogenesis in Wistar rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2005; **271**, 1-11.

- Khan, N., Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sciences*, 2005; **77**, 1194-210.
- Koivunen, J., Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Letters*, 2006; **235**, 1-10.
- Konishi, H., Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997; **94**, 11233-37.
- Kovacs, G., The Heidelberg classification of renal cell tumors. *Journal of Pathology*, 1997; **183**, 131-33.
- Loo, G., Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (Review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2003; **14**, 64-73.
- Lord, M., Protein kinase C: a family of isoenzymes with distinct roles in pathogenesis. *Molecular Pathology*, 1995; 48(2), 57-64.
- Lowry, O., Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 1951; **193**, 265.
- Lu, D., Protein kinase C ϵ activates protein kinase B/Akt via DNA-PK to protect against tumor necrosis factor- α -induced cell death. *The journal of Biological Chemistry*, 2006; **281**, 22799-807.
- Marengo, B., Protein Kinase C: An Attractive Target for Cancer Therapy. *Cancers*, 2011; **3**, 531-67.
- Mathews, C., Biochemistry 4^o edition. Pearson education, 2002; 960-74.
- Mellor, H., The extended protein kinase C superfamily. *Biochemical Journal*, 1998; **332**, 281-92.
- Moon, Y., Dietary flavonoids: effect on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*, 2006; **20**, 187- 210.
- Nelson, E., Renal cell carcinoma: Current status and emerging therapies. *Cancer Treatment Reviews*, 2007; **33**, 299-313.
- Newton, A., Protein kinase C: structure, function, and regulation. *The journal of Biological Chemistry*, 1995; **270**, 28495-98.

- Newton, A., Protein kinase C: poised to signal. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 2010; **298**, 395-402.
- Newton, P., The substrates and binding partners of protein kinase Cε. *Biochemical Journal*, 2010; **427**, 189-96.
- Nishizuka, Y., Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *The FASEB journal*, 1995; **9**, 484-92.
- Nowak, G., Protein kinase Cε modulates mitochondrial function and active Na⁺ transport after oxidant injury in renal cells. *American Journal of Physiology- Renal Physiology*, 2003; **286**, 307-16.
- Oberley, T., Oxidative damage and cancer. *American Journal of Pathology*. 2002; **160**, 403-08.
- Pourmorad, F., Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 2006; **5**, 1142-45.
- Richie, J., Urologic Oncology, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005, 812.
- Ron, D., New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *The FASEB journal*, 1999; **13**, 1658-71.
- Saurin, A., Protein kinase C epsilon in cell division. *Cell cycle*, 2009; **8**, 4.
- Singleton, V., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin - Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999; **299**, 152-78.
- Soobratte, M., Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and action, *Mutation research*, 2005; **579**, 200-13.
- Srinivasan, D., Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001; **74**, 217-20.
- Stadler, W., Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer*, 2005; **104**, 2323-33.

- Stahelin, R., Diacylglycerol-induced Membrane Targeting and Activation of Protein Kinase C ϵ . *The Journal of Biological Chemistry*, 2005; **280**, 19784-93.
- Steinberg, R., A protein kinase C ϵ - Anti-apoptotic Kinase Signaling Complex Protects Human Vascular Endothelial Cells against Apoptosis through Induction of Bcl2. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007; **282**, 32288-97.
- Steinberg, S., Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiological Reviews*, 2008; **88**, 1341-78.
- Sudjaroen, Y., Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp, *Food and Chemical Toxicology*, 2005; **43**, 1673-82.
- Takizawa, T., Enhancement of hepatocarcinogenesis by Kojic acid rat two stage models after initiation with N-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine or N-diethylnitrosamine. *Toxicological Sciences*, 2004; **81**, 43-49.
- Tanaka, Y., Coordinated induction of Nrf2 target genes protects against iron nitrilotriacetate (FeNTA)-induced nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008; **231**, 364-73.
- Torres, M., Efecto del tratamiento con un extracto de *Tamarindus indica* sobre el daño inducido por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). Tesis para obtener el Título de Química Farmacéutica Biólogo, México, Facultad de Química, U.N.A.M. 2007.
- Toyokuni, S., Iron-Induced Carcinogenesis: The Role of Redox Regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996; **20**, 553-66.
- Tsuchiya, K., Oxygen radicals photo-induced by ferric nitrilotriacetate complex. *Biochimica and Biophysica Acta*, 2005; **1725**, 111-19.
- Umemura, T., Prevention by 2-mercaptoethane sulfonate and N-acetylcysteine of renal oxidative damage in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1996; **87**, 882-86.
- Vargas, O., Efecto de un extracto de semillas de tamarindo (EST) sobre el desarrollo de cáncer renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA), Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencia Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM. 2009.
- Valko, M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 2006; **160**, 1-40.

- Wetsel, W., Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *The Journal of Cell Biology*, 1992; **17**, 121-33.
- Williamson, G., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2005; **81**, 43-55.
- Zhu, Y., The very C-terminus of protein kinase C ϵ is critical for the full catalytic competence but its hydrophobic motif is dispensable for the interaction with 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *Cellular Signalling*, 2006; **18**: 807-18.