



UNIVERSIDAD NACIONAL **UN/M**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

---

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
FACULTAD DE QUÍMICA

“PARTICIPACIÓN DE NF- $\kappa$ B EN LA CARCINOGENICIDAD  
DEL NITRILOTRIACETATO DE HIERRO (FENTA) Y EFECTO  
DE UN EXTRACTO DE SEMILLA DE TAMARINDO (EST)”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**BIÓLOGA. TELMA OLIVIA PARIENTE  
PÉREZ**

Tutor: Dra. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO

MÉXICO, D. F.

AGOSTO/2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Carcinoma de células renales (CCR)	3
2.2 Nítrilotriacetato de hierro (FeNTA)	4
2.3 NF- $\kappa$ B	5
2.3.1 Generalidades	5
2.3.2 I $\kappa$ B: Inhibidor de NF- $\kappa$ B	6
2.3.3 Activación de NF- $\kappa$ B	8
2.4 Estrés oxidante y NF- $\kappa$ B	11
2.5 Receptor del Factor de crecimiento epidermal (EGFR)	14
2.6 Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)	17
2.7 CCR, FeNTA, NF- $\kappa$ B, EGFR y PCNA	19
2.8 Polifenoles y tamarindo	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Diseño experimental	24
6.1.1 Preparación y administración del EST	25
6.1.2 Preparación y administración de N-dietilnitrosamina (DEN)	25
6.1.3 Preparación y administración del nítrilotriacetato de hierro (FeNTA)	25
6.2 Protocolo subcrónico en ratas Wistar macho	26
6.3 Métodos	27
6.3.1 Cuantificación de fenoles totales	27
6.3.2 Evaluación de la capacidad de inactivación del radical superóxido	27
6.3.3 Determinación de la función renal	27
6.3.4 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)	28
6.3.5 Determinación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , EGFR y PCNA por Western blot	29

6.3.6	Análisis estadístico	30
7.	RESULTADOS	31
7.1	Caracterización del EST	31
7.2	Protocolo de tratamiento subcrónico en ratas Wistar macho.	32
7.3	Determinación de la actividad de NF- $\kappa$ B	34
7.3.1	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)	34
7.4	Determinación de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$ por Western blot	36
7.5	Determinación de los niveles de EGFR por Western Blot	38
7.6	Determinación de los niveles de PCNA por Western blot	39
8.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
9.	CONCLUSIONES	45
10.	ANEXOS	46
	Anexo I: Técnicas	46
AI.1	Cuantificación de fenoles totales	46
AI.2	Inactivación del radica superóxido	47
AI.3	Extracción de proteínas nucleares	48
AI.4	Cuantificación de proteínas totales	48
AI.5	EMSA	50
AI.6	Extracción de proteínas de tejido de corteza renal	52
AI.7	Western blot	52
	Anexo II: Soluciones	55
AII.1	Cuantificación de fenoles totales	55
AII.2	Inactivación del radica superóxido	55
AII.3	Cuantificación de proteínas totales	56
AII.4	EMSA	57
AII.5	Western blot	57
11.	BIBLIOGRAFÍA	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

BUN	Nitrógeno ureico sanguíneo
CCR	Carcinoma de células renales
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
DEN	N-dietilnitrosamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidermal
EMSA	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética
EST	Extracto de semilla de tamarindo
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FeNTA	Nitilotriacetato de hierro
FT	Fenoles totales
I $\kappa$ B $\alpha$	Inhibidor de NF- $\kappa$ B
IKK	Cinasa de I $\kappa$ B
LLC-PK1	Células de túbulo proximal de cerdo
MAPKs	Cinasas de proteína activadas por mitógenos
NF- $\kappa$ B	Factor de transcripción $\kappa$ B
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PEST	Región rica en prolina, glutamato, serina y treonina
PTC	Células de túbulo proximal de humano
ROS	Especies reactivas de oxígeno
STAT3	Transductor de señales y activador de la transcripción 3
STAT5	Transductor de señales y activador de la transcripción 5
URD	Unidades relativas de densitometría
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	Western blot

## RECONOCIMIENTOS

Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGAPA-PAIT con el proyecto No. IN227010 y al apoyo de la Facultad de Química bajo el Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado 4194-10.

A la Dra. María Elena Ibarra Rubio por su tutoría en el presente proyecto de investigación.

El comité tutorial que asesoró esta tesis estuvo conformado por:

Dra. María Elena Ibarra Rubio

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Dr. José Pedraza Chaverri

El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (número 81026).

Durante los estudios de maestría el sustentante gozó de una beca otorgada por CONACYT (329513).

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

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 los animales.

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

## DEDICATORIA

A mi padre modelo de entereza y dedicación, por su apoyo, paciencia pero sobre todo por tu infinito amor.

A mi madre símbolo de nobleza y bondad, por su cariño y palabras de aliento brindadas en cada momento.

A mi hermana Zulma muestra de constancia y lucha, por levantarme en cada momento que claudique.

A mi hermano Eliezer y casi hermana Leslie por su apoyo y convivencia día a día.

A la familia Pariente Benítez ejemplo de familia, por su incondicional amor, apoyo pero sobre todo por sus alegrías y sabidurías compartidas.

A todos los amigos-compañeros del Lab 120, Chabetty, Francisco, José, Rocío, Alfredo, Patricia, Karla e Ignacio, por los momentos buenos y malos compartidos, pero más por la sabiduría y enseñanzas impartidas. En especial a Francisco, Rocío y Patricia por su gran amistad y las horas de risas compartidas

A Mau, Anita, Mary, Emilio y Gus por su amistad y creer en mí.

A ti pequeño por tu amor, alegría y por el placer de haber coincidido en esta vida.



Todo pasa por alguna razón, aprende de ella y sigue adelante, no te amargues por lo que pasó, se feliz por lo que puede pasar

# 1. RESUMEN

El cáncer es una enfermedad genética multifactorial cuyo desarrollo se ha dividido en tres etapas: iniciación, promoción y progresión, siendo las dos primeras claves para su control. Entre los factores involucrados en su desarrollo está el estrés oxidante.

Uno de los tipos de cáncer urológico más común en adultos es el carcinoma de células renales (CCR) el cual presenta una alta mortalidad debido a su difícil diagnóstico en etapas tempranas, así como dificultades en su tratamiento, ya que no responde a las quimio y radioterapias convencionales, entre otros factores. Se han reportado diversas alteraciones moleculares en tejido tumoral de pacientes con CCR, sin embargo se desconoce lo que sucede en etapas tempranas del desarrollo de la neoplasia. Ante esta situación, el contar con un modelo experimental bien caracterizado nos podría permitir el estudio del desarrollo de esta enfermedad. Uno de los modelos experimentales que existen de CCR, es aquél inducido en roedores con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA), en el cual está involucrado el estrés oxidante. El tratamiento agudo con el carcinógeno induce insuficiencia renal, mientras que un tratamiento crónico durante cuatro y dos meses de descanso lleva a la formación de tumores renales. En nuestro laboratorio se ha encontrado que con la exposición subcrónica al FeNTA durante un mes, provoca el desarrollo de displasia, una lesión precancerosa, así como algunas alteraciones pro-carcinogénicas en vías de señalización, tales como un incremento en los niveles de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y ciclina D1, entre otras.

Por otra parte, el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) es un factor de transcripción que participa en la inducción de genes involucrados en diversos procesos celulares tales como proliferación celular, inflamación, angiogénesis, invasividad, etc., y cuya activación es inducida por una gran cantidad de estímulos, entre ellos las especies reactivas de oxígeno. En el caso del CCR humano, se ha reportado una actividad constitutiva de NF- $\kappa$ B que correlaciona con una disminución en los niveles de su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  y con un aumento en los niveles de marcadores de proliferación y angiogénesis, como son el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Por otro lado, en estudios *in vitro* realizados en células de túbulo proximal de humano (PTC) y de cerdo (LLC-PK1) expuestas a FeNTA, se observó que el carcinógeno induce un incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B. Del mismo modo, en un estudio *in vivo* de exposición crónica al carcinógeno que llevó a la formación de tumores se observó un incremento en los niveles de NF- $\kappa$ B, aunque los autores no aclaran si el aumento se dio en tejido tumoral o en tejido renal total. No obstante, se



desconoce la participación de NF- $\kappa$ B en etapas tempranas del CCR, tanto en humanos como en el modelo experimental.

Ante las evidencias que vinculan al estrés oxidante con el desarrollo del cáncer, se ha propuesto como alternativa preventiva y/o terapéutica el uso de antioxidantes. En nuestro laboratorio se ha trabajado con un extracto de semilla de tamarindo (EST) que presenta un alto contenido en compuestos polifenólicos y una importante capacidad antioxidante. En estudios agudos con FeNTA, el EST disminuye notoriamente el estrés oxidante y la insuficiencia renal, mientras que en un estudio crónico reduce la incidencia y retarda el grado de avance de los tumores.

Con base en todo lo anterior, se consideró de gran interés analizar la participación de NF- $\kappa$ B en una etapa temprana del modelo de CCR determinando tanto su actividad como los niveles de su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  y de proteínas producto de sus genes blanco como EGFR y PCNA. Para ello, se realizó un protocolo subcrónico con duración de un mes de tratamiento con FeNTA. Se estudiaron 6 grupos experimentales: 1) Control (C); 2) tratado con EST (E); 3) tratado con una dosis única de N-dietilnitrosamina (D) como iniciador tumoral; 4) tratado con el carcinógeno FeNTA (promotor tumoral), el cual fue administrado 2 veces por semana con aumentos graduales en la dosis cada semana, durante un mes; 5) tratado con DEN+FeNTA (D+F) y 6) tratado con EST+DEN+FeNTA (E+D+F). Las ratas fueron sacrificadas por decapitación 48 horas después de la última administración del carcinógeno, obteniendo muestras de tejido renal en las cuales se realizaron las determinaciones antes mencionadas.

En este estudio se encontró que el FeNTA induce un incremento significativo en la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B que correlaciona con una disminución de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$ , su proteína inhibitoria, y con un incremento en los niveles de EGFR y PCNA. Con base en esto, es probable que estas alteraciones estén involucradas desde un principio en el desarrollo del CCR inducido por FeNTA. Así mismo, es posible que se presenten en etapas tempranas en el humano ya que estos eventos se han observado en tejido tumoral de pacientes con CCR. Por su parte, y opuesto a lo esperado, el EST exacerba el incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B en el grupo E+D+F, pero no en los marcadores de proliferación celular por lo que este aumento podría estar relacionado con la disminución en la incidencia y retardo en el desarrollo de tumores observados previamente en nuestro laboratorio, mediante la inducción, por ejemplo, de factores pro-apoptóticos.

Por otro lado, los resultados obtenidos apoyan al modelo como una herramienta útil para el estudio de esta neoplasia.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Carcinoma de células renales (CCR)

El cáncer renal es uno de los tipos de cáncer menos estudiados y comprendidos (Atkins *et al.*, 2000). Existen diferentes tipos de neoplasias renales: el carcinoma de célula transicional que surge en la pelvis del riñón; el carcinoma de células renales (CCR) que se desarrolla en la corteza renal; otros tumores como oncocitomas, tumores de ducto colector y sarcomas renales, los cuales son poco comunes en adultos (Atkins *et al.*, 2000).

El CCR es el cáncer renal maligno más común en adultos, representa del 70 al 80% de las neoplasias renales y constituye el 3% de las muertes por cáncer en general (Jemal, 2007). En el 2004 se reportó que en Europa se diagnosticaban 40,000 pacientes con CCR cada año, provocando 20,000 muertes (Levi *et al.*, 2004); mientras que, en México, en el 2001 se presentaron un total de 1577 casos, de los cuales el 81.7% falleció a causa de este padecimiento (Compendio de Cáncer, Dirección general de Epidemiología en México 2001). Existen varios subtipos histológicos de CCR, los cuales se clasifican en: células claras, cromóforo, papilar tipos 1 y 2, ducto colector y no clasificado (Brenner, 2000). El carcinoma de células claras es la forma más común del CCR, 8 de cada 10 personas con CCR lo presentan y tiene su origen en el túbulo proximal (Atkins *et al.*, 2000).

Este tipo de cáncer no presenta síntomas en etapas tempranas, por lo que su diagnóstico generalmente se da en etapas avanzadas, incluso cuando ya se ha desarrollado metástasis (Dalgin *et al.*, 2007). El CCR es un cáncer resistente a la quimioterapia convencional y la radioterapia (Liebermann, 2007). Además, su tratamiento ha sido difícil hasta el momento debido a que cada subtipo histológico cursa con diferentes alteraciones moleculares, por lo que responden de manera distinta a las terapias (Mancini, 2008).

Por otra parte, uno de los factores vinculados con el desarrollo de varios tipos de cáncer esta el estrés oxidante. En el caso del CCR se ha reportado que muestras de tejido tumoral de pacientes presentan niveles más elevados de ADN oxidado (determinada mediante el marcador 8-oxo-desoxiguanosina) comparándolas con muestras de tejido renal sano, así como una elevada lipoperoxidación (Ganesamoni *et al.*, 2011) Más aún, existe evidencia de que el aumento en la lipoperoxidación observada en las personas obesas e hipertensas es el mecanismo responsable, al menos en parte, del aumento en el riesgo de desarrollar CCR (Gago-Domínguez *et al.*, 2006).

## 2.2 Nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)

Uno de los modelos experimentales de carcinogénesis renal, que existen, es el carcinoma de túbulo proximal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) y en el cual se ha demostrado la participación del estrés oxidante (Bahneman *et al.*, 1998). Este es un compuesto formado por el complejo del ácido nitrilotriacético con  $\text{Fe}^{3+}$ , el cual es una molécula de fácil absorción (Preece *et al.*, 1989) y cuyo órgano blanco es el riñón (Mizote *et al.*, 2002). En el riñón el FeNTA se filtra por el glomérulo hacia el lumen de los túbulos proximales, en donde se ha propuesto que el  $\text{Fe}^{3+}\text{NTA}$  se reduce a  $\text{Fe}^{2+}\text{NTA}$  por acción de los productos de degradación de glutatión como la cisteína o la cisteinglicina, los grupos tiol de estos aminoácidos actúan como reductores del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (Toyokuni, *et al.*, 1996). La oxidación del FeNTA genera radicales superóxido que potencian las reacciones de Haber-Weiss catalizadas por el hierro para producir radicales hidroxilo que inducen la peroxidación lipídica, y daño a proteínas y al ADN (Tsuchiya *et al.* 2005). Además, se ha encontrado que en la orina de ratas tratadas con FeNTA, se excreta 8-Oxo-desoxiguanosina, un marcador de daño oxidante al ADN. (Bahnemann *et al.*, 1998).

En esquemas agudos, la administración intraperitoneal de FeNTA produce necrosis tubular e insuficiencia renal aguda; mientras que, en esquemas de exposición crónica en roedores se desarrolla CCR (Okada *et al.*, 1982). Además, una única administración de N-dietilnitrosamina (DEN), como iniciador tumoral, 10 días antes del tratamiento crónico con FeNTA aumenta sensiblemente la proporción de animales que desarrollan el carcinoma y reduce el tiempo necesario de exposición (Athar *et al.*, 1998; Vargas-Olvera, 2009, Vargas-Olvera *et al.*, 2012).

En nuestro laboratorio se llevó a cabo un esquema de tratamiento crónico con cuatro meses de exposición a FeNTA, y dos meses después de la última administración se obtuvieron tumores renales en ratas macho Wistar sin alterar la función renal tal como sucede en el humano. Además, estudios histopatológicos demuestran que los tumores de CCR inducidos por FeNTA corresponden al subtipo histológico de células clara (CCRcc), subtipo que se presenta con mayor frecuencia en el humano (Vargas-Olvera, 2009). Así mismo, estudios de inmunohistoquímica reportan un aumento en marcadores de estrés oxidante como es malondialdehído y nitrotirosina en muestras de tejido tumoral de CCR inducido por FeNTA. Por otro lado, se ha realizado un protocolo subcrónico de un mes de tratamiento donde se observó la presencia de displasia (lesión precancerosa), así como alteraciones pro-carcinogénicas en vías de señalización tales como un incremento en los niveles de ERK total y fosforilado y de ciclina D1 (Aguilar-Alonso, 2010), entre otras. Dichas alteraciones sugieren que este tiempo podría representar una etapa temprana del modelo de CCR inducido con FeNTA.

## 2.3 NF- $\kappa$ B

### 2.3.1 Generalidades

Es un factor de transcripción nuclear que regula la expresión de genes por unión a secuencias discretas del ADN conocidas como elementos  $\kappa$ B. La mayoría de los sitios  $\kappa$ B tienen una longitud aproximada de 10pb con una secuencia consenso 5' GGGRNWYYCC 3' (R: purina; N: cualquier base; W: adenina o timina; Y: pirimidina) (Gilmore, 2006; Hoffmann *et al.*, 2006; Hayden y Ghosh, 2008). Así, existe una gran variedad de secuencias  $\kappa$ B que permite que varios genes sean regulados por NF- $\kappa$ B (Hayden y Ghosh, 2008).

La familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B consiste en homo o heterodímeros de un grupo de cinco proteínas llamadas RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50 y su precursor p105) y NF- $\kappa$ B2 (p52 y su precursor p100) (Figura 1), las cuales son codificadas por los genes *rela*, *relb*, *rel*, *nfkb1* y *nfkb2*, respectivamente (Gloire *et al.*, 2006; Hayden y Ghosh, 2008). Estas proteínas presentan un dominio de homología REL (RHD) en el extremo-NH<sub>2</sub>, el cual media su dimerización, su interacción con su inhibidor específico y su unión al ADN (Dolcet, 2005; Hayden y Ghosh, 2008).

Las proteínas NF- $\kappa$ B se agrupan en dos categorías dependiendo de la manera en que son sintetizadas:

A) RelA ó p65, c-Rel y RelB que se sintetizan en su forma madura y contienen un dominio de transactivación (TAD), el cual interactúa con el aparato transcripcional y es necesario para la regulación positiva en la expresión de genes (Dolcet, 2005; Hayden y Ghosh, 2008).

B) p50/p105 ó NF- $\kappa$ B1 y p52/100 ó NF- $\kappa$ B2 que se sintetizan en forma de precursores (p105 y p100) los cuales contienen secuencias repetidas tipo ankirina en su extremo-COOH que funcionan como dominios I $\kappa$ B autoinhibitorios. Estos precursores son procesados en el proteosoma resultando en la producción de su forma madura, p50 y p52. Además, p50 y p52 carecen de un dominio de transactivación (TAD) (Dolcet *et al.*, 2005).

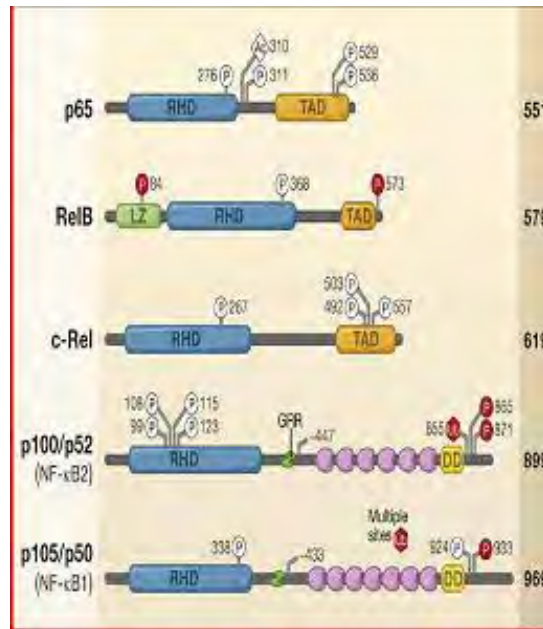


Figura 1. Miembros de la familia de las proteínas NF-κB. El número de residuos de aminoácidos en cada proteína está indicado a la derecha. RHD, dominio de homología a rel (rel homology domain); TAD, dominio de transactivación (transactivation domain); DD, dominio de muerte (death domain) (Hayden y Ghosh, 2008).

La combinación de estas proteínas da como resultado 15 posibles dímeros (homo ó heterodímeros) de NF-κB, de los cuales 12 son capaces de unirse al ADN y regular la transcripción de sus genes blanco; siendo p65/p50 el heterodímero más abundante en diferentes tipos celulares, en especial las células epiteliales (Gloire *et al.*, 2006). Aunque las secuencias κB son diversas, los diferentes dímeros tienen secuencias de reconocimiento específicas lo cual trae como consecuencia una especificidad transcripcional (Hoffman *et al.*, 2006).

### 2.3.2 IκB: Inhibidor de NF-κB

La actividad de NF-κB está altamente regulada por la interacción con su proteína inhibitoria IκB. En la mayoría de las células, los dímeros de NF-κB están asociados a IκB en el citoplasma permaneciendo inactivos transcripcionalmente (Van den Berg *et al.*, 2001; Gilmore, 2006; Hayden y Ghosh, 2008). IκB es una familia de proteínas constituida por: IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ, IκBδ, IκBζ y Bcl-3 (Figura 2), las cuales se caracterizan por presentar dominios de repetición tipo ankirinas (ARD) a través de los cuales interactúan con el dominio RDH de NF-κB (Dolcet *et al.*, 2005; Hayden y Ghosh, 2008).

Además,  $I\kappa B\alpha$  e  $I\kappa B\beta$  presentan una región rica en prolina, glutamato, serina y treonina en el extremo-COOH, llamada PEST, la cual, como se verá más adelante, participa en la activación de NF- $\kappa$ B inducida, principalmente, por peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Schoonbroodt *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2003; Bubici *et al.*, 2006).

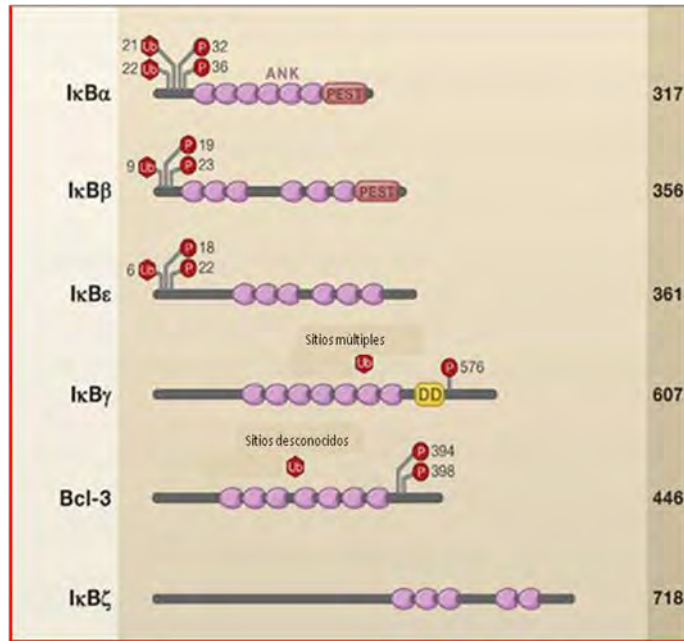


Figura 2. Miembros de la familia de proteínas  $I\kappa B$ . El número de residuos de aminoácidos en cada proteína está indicado a la derecha. Los sitios de fosforilación y ubiquitinación de las proteínas  $I\kappa B$ , los cuales permiten su degradación a través del proteosoma, están indicados en rojo. ANK, dominio de repetición tipo ankirina; PEST, región rica en prolina, glutamato, serina y treonina; DD, dominio de muerte (Hayde y Ghosh, 2008).

En una célula estimulada, las proteínas  $I\kappa B$  son rápidamente fosforiladas, ubiquitinadas por el complejo SCF/ $\beta$ -TrCP ubiquitina ligasa y degradadas por el proteosoma 26S ocasionando que NF- $\kappa$ B se active y se transloque al núcleo a fin de regular la expresión de sus genes blanco (Bowie y O'Neill, 2000; Dolcet *et al.*, 2005; Gloire *et al.*, 2006; Hayden, 2008). La velocidad de degradación de las proteínas  $I\kappa B$  es distinta y depende del estímulo. En el caso de  $I\kappa B\alpha$ ,  $I\kappa B\beta$  e  $I\kappa B\epsilon$  su fosforilación depende de la cinasa de  $I\kappa B$  (IKK) y éstas se realizan en dos residuos de serina (Dolcet *et al.*, 2005).

IKK es un complejo formado por dos subunidades catalíticas con actividad de cinasas altamente homólogas denominadas  $IKK\alpha$  e  $IKK\beta$  y una subunidad regulatoria NEMO ( $IKK\gamma$ ) cada una de las subunidades catalíticas son activadas selectivamente y participan en la activación de NF- $\kappa$ B a través de distintas vías.  $IKK\beta$  fosforila a  $I\kappa B\alpha$  en los residuos de serina 32 y 36 (Ser 32 y Ser36) ó a  $I\kappa B\beta$  en los residuos Ser 19 y Ser 23, principalmente por la vía canónica. Por otra parte,  $IKK\alpha$

participa exclusivamente en la vía alternativa fosforilando a p100 (NF- $\kappa$ B2) (Hayden y Ghosh, 2008).

Los genes de I $\kappa$ B son regulados por NF- $\kappa$ B, por lo que, la regulación de NF- $\kappa$ B tiene una retroalimentación negativa, ya que una vez que se ha sintetizado I $\kappa$ B éste se une al NF- $\kappa$ B nuclear, lo cual ocasiona su exportación del núcleo al citoplasma, disminuyendo la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B (Figura 3) (Hoffmann, 2006; Kobayashi & Kageyama, 2009).

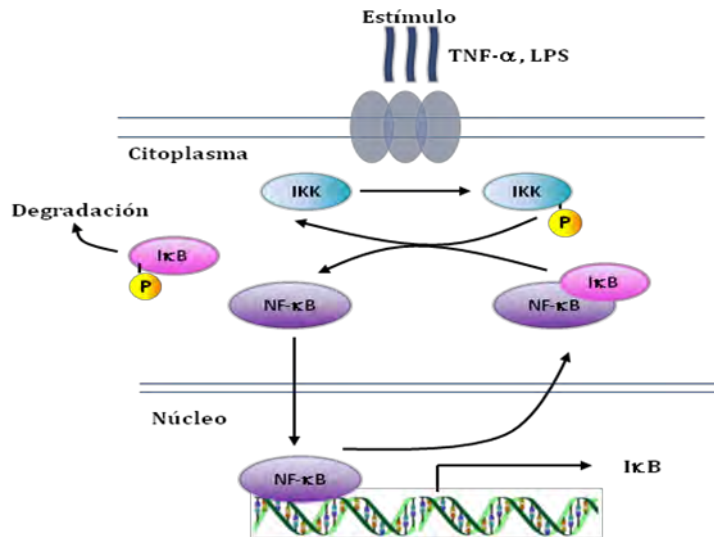


Figura 3. Diagrama de la vía de regulación de la actividad de NF- $\kappa$ B. Un estímulo extracelular, como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o lipopolisacáridos (LPS), activa a IKK, la cual fosforila a I $\kappa$ B, ocasionando su degradación. NF- $\kappa$ B se transloca entonces a núcleo e induce la expresión de sus genes blanco, entre los cuales están I $\kappa$ B. Cuando I $\kappa$ B es sintetizado se transloca a núcleo donde se une a NF- $\kappa$ B promoviendo su exportación al citoplasma (Kobayashi y Kageyama, 2009).

El miembro de la familia de I $\kappa$ B más estudiado es I $\kappa$ B $\alpha$ , el cual exhibe los rasgos característicos de las proteínas I $\kappa$ B, regula predominantemente, aunque no exclusivamente, al heterodímero p65/p50 y su fosforilación y degradación ocurre a través de la vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B, la cual se explica más adelante (Hayden y Ghosh, 2008).

### 2.3.3 Activación de NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B se activa por una amplia variedad de estímulos, incluyendo los 18 miembros de la superfamilia de factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), interleucina (ILs)-1, interleucina-17, interleucina-18, lipopolisacáridos (LPS), ceramidas, ésteres de forbol, factores de

crecimiento, radiación UV, rayos X, radiación  $\gamma$ , así como, las especies reactivas de oxígeno (ROS), en especial el peróxido de hidrógeno (Gloire, 2006; Horion *et al.*, 2007). Se ha reportado en la literatura que existen dos vías principales de activación de NF- $\kappa$ B:

- La vía canónica o clásica
- La vía no canónica o alternativa

### **A) Vía canónica o clásica**

La vía de señalización clásica de NF- $\kappa$ B es activada en respuesta a citocinas pro-inflamatorias, tales como TNF- $\alpha$  e ILs, así como en respuesta a receptores tipo Toll (TLRs), LPS, infecciones virales, daño al ADN y ROS. Todas estas señales convergen en la activación del complejo IKK en la subunidad IKK $\beta$  la cual es la principal responsable de la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en los residuos de Ser32 y Ser36. Una vez fosforilada, I $\kappa$ B $\alpha$  es degradada vía proteosoma y NF- $\kappa$ B es translocado al núcleo donde activa la transcripción de sus genes blanco (Figura 4a) (Dolcet, 2005; Gloire, 2006; Gilmore, 2006; Gloire y Piette, 2009, Hayden y Ghosh, 2008).

### **B) Vía no canónica o alternativa**

Esta vía es inducida por linfotoxina  $\beta$  (LT $\beta$ ), por el factor de activación de células B (BAFF), ligando CD40, por el virus de leucemia humana de células T (HTLV) y por el virus de Epstein Barr (EBV), entre otros estímulos, los cuales activan a la cinasa inductora NF- $\kappa$ B (NIK) quien fosforila a IKK $\alpha$ , que a su vez, fosforila a la proteína p100 (NF- $\kappa$ B1), la cual es subsecuentemente proteolisada para generar su forma madura (p52). Entonces, el dímero que contiene p52 se transloca hacia el núcleo donde puede activar la transcripción de genes blanco (Figura 4b) (Dolcet, 2005; Gloire 2006; Gilmore 2006; Hayden y Ghosh, 2008). La vía alternativa es importante para el desarrollo de los órganos linfoides secundarios, homeostasis tisular y la respuesta inmune (Gloire y Piette, 2009, Pasparakis, 2009).



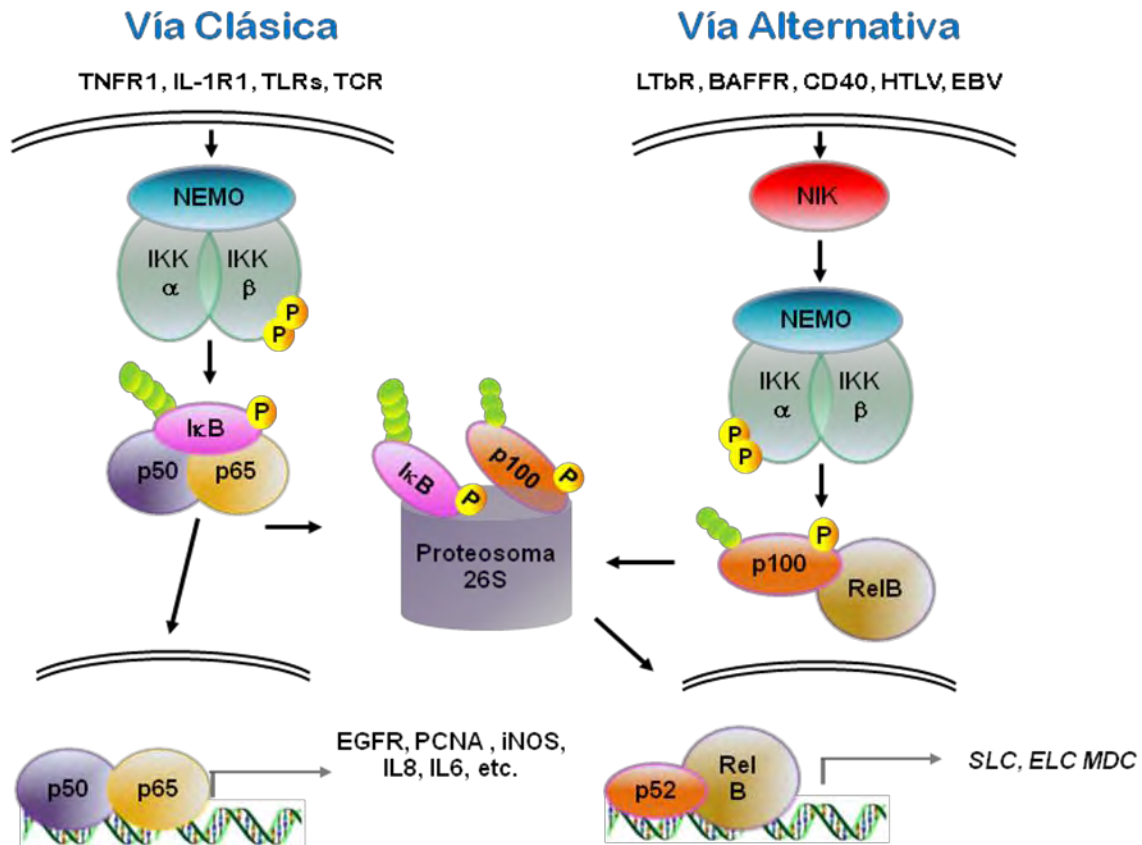


Figura 4. Vía clásica y alternativa de la activación de NF- $\kappa$ B. a) La vía clásica es activada a través de receptores como: receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1); receptor tipo 1 de interleucina 1 (IL-1R1), receptores tipo Toll (TLRs) ó receptor de linfocitos T (TCR), los cuales al unirse su ligando correspondiente inducen la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  dependiente de IKK $\beta$  en los residuos S32 y S36; dichas fosforilaciones promueven ubiquitinación y degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  permitiendo que NF- $\kappa$ B migre al núcleo y transactive genes. b) La vía alternativa involucra la activación del receptor de linfotóxina  $\beta$  (LT $\beta$ R) del receptor de factor de activación de células B (BAFFR); del ligando CD40 o infecciones por virus de leucemia humana de células T (HTLV) ó virus de Epstein Barr (EBV), las cuales promueven la activación de la cinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK), quien a su vez va a activar a IKK $\alpha$  encargada del procesamiento de p100 a p52, y de esta forma permite que el dímero que contiene p52 se transloque al núcleo induciendo la expresión de genes (Gloire *et al.*, 2006, Pasparakis, 2009). Las esferas amarillas representan las fosforilaciones y las verdes las ubiquitinaciones.

Existen algunos reportes en los cuales se observa que ciertos estímulos, como son el pervanadato, hipoxia, sílica y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, activan NF- $\kappa$ B a través de la fosforilación del residuo de tirosina 42 (Try-42) u otro residuo de la región rica en prolina, glutamato, serina y treonina del extremo-COOH llamada PEST (Takada *et al.*, 2003; Bubici *et al.*, 2006; Gloire y Piette, 2009).

Como se puede observar, la activación de NF- $\kappa$ B es un proceso inducible, regulado y transitorio. En las células tumorales, diferentes tipos de alteraciones moleculares ocasionan la pérdida en la

regulación de NF- $\kappa$ B, por lo que llega a ser activado constitutivamente, lo que tiene como consecuencia la expresión desregulada de genes involucrados en el control de apoptosis, del ciclo celular y de procesos de adhesión y migración; dichos procesos participan en el desarrollo y progresión de cáncer, estableciéndose entonces una clara relación entre NF- $\kappa$ B y la carcinogénesis.

## 2.4 Estrés oxidante y NF- $\kappa$ B

Existen reportes que demuestran la participación del estrés oxidante en muchas patologías como enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer, por mencionar algunas (Matés *et al.*, 1999; Van de Berg *et al.*, 2001). En el caso del cáncer por ejemplo, se ha encontrado que las células transformadas producen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Benhar *et al.*, 2001; Szatrowski *et al.*, 1991). Anteriormente se consideraban a las ROS como moléculas destructivas, pero ahora se reconoce su participación en la transducción de señales (Genestra, 2007). Los blancos de las ROS, en la señalización celular son muy diversos e incluyen enzimas y factores de transcripción y de crecimiento. De hecho se sabe que las cinasa y fosfatasa de proteínas de tirosina (PTK y PTP respectivamente), los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B, así como algunas cascadas de señalización celular, específicamente las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs) son reguladas, al menos en parte, por el estado redox, el cual, puede ser modulado por las ROS (Genestra, 2007; Pan *et al.*, 2009), y se ha reportado que el estrés oxidante puede generar una activación o inhibición sostenida de algunas de estas proteínas, lo que resulta en el mantenimiento de fenotipos transformados y la inducción de procesos como metástasis y proliferación (Hso *et al.*, 2000).

En la literatura existe una gran variedad de artículos que establecen la participación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la activación de NF- $\kappa$ B (Baeuerle, 2000; Schoonbroodt *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2003; Bubici *et al.*, 2006; Gloire *et al.*, 2006). Takada y colaboradores (2004) proponen que uno de los mecanismos que permiten la activación de NF- $\kappa$ B por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es a través de la activación de la cinasa de tirosina Syk (Figura 5a). Una vez activada Syk induce la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en el residuo de Tyr-42 o en otro residuo del extremo-COOH (región PEST), y lo que lleva a su degradación mediante proteasas calpainas; sin embargo este mecanismo no está del todo claro. Por otro lado, Storz y colaboradores (2004) proponen otra vía de activación de NF- $\kappa$ B en la cual participa la cinasa de proteína D (PKD). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activan PKD a través de la vía de señalización mediada por Src (Proto oncogen que codifica una cinasa de tirosina). Esta cinasa induce la fosforilación de PKD a través de Abl (proto-oncogen que codifica una cinasa de tirosina)

en el residuo Tyr-463; dicha fosforilación permite que se expongan los residuos S738/S742 de PDK (serina 738/serina 742) para una segunda fosforilación mediada por PKC $\delta$  (cinasa de proteína C $\delta$ ). Esto induce la activación de PKD, la cual, a su vez, activa a IKK $\beta$  quien fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$  en los residuos de Ser 32 y 36 permitiendo la liberación y activación de NF- $\kappa$ B (Figura 5b) (Bubici *et al.*, 2006; Gloire *et al.*, 2006).

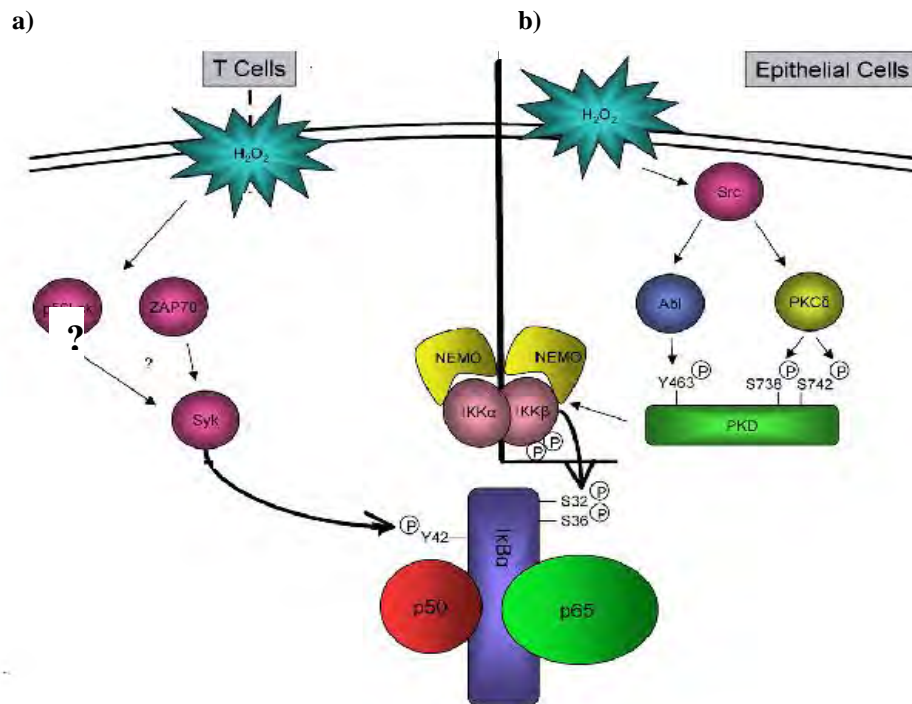


Figura 5.

Mecanismos propuestos para la activación de NF- $\kappa$ B por  $H_2O_2$ . a) El  $H_2O_2$  induce la activación de Syk (cinasa de tirosina) quien fosforila el residuo Tyr-42 de I $\kappa$ B permitiendo que NF- $\kappa$ B se active. b) Otro mecanismo es por medio de la activación de PKD (cinasa de proteína D). Dicha proteína es activada por la vía de señalización mediada por Src (cinasa de tirosina), Src induce la fosforilación de PKD a través de la proteína Abl en el residuo Tyr-463, la cual permite que se expongan los residuos S738/S742 que son fosforilados por PKC $\delta$  (Cinasa de proteína C $\delta$ ) Una vez activa PKD esta fosforila al complejo IKK, que a su vez fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$  permitiendo que NF- $\kappa$ B se active constitutivamente (Gloire *et al.*, 2006).

Otro sistema de activación de NF- $\kappa$ B es por medio de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K). Esta proteína fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$  en el residuo Tyr-42 a través de su subunidad p110, y una posible interacción entre la subunidad p85 e I $\kappa$ B $\alpha$  evita la degradación de esta última. De esta forma, NF- $\kappa$ B es activado sin disminución en los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  (Figura 6) (Bubici *et al.*, 2006).

La activación de NF- $\kappa$ B por exposición de  $H_2O_2$  es un proceso lento (generalmente toma horas) en comparación con su activación por otros estímulos tales como citocinas, la cual es detectada en

pocos minutos (Kobayashi y Kageyama, 2009). Así, la vía de activación como la expresión de los genes blanco de NF-κB depende del estímulo.

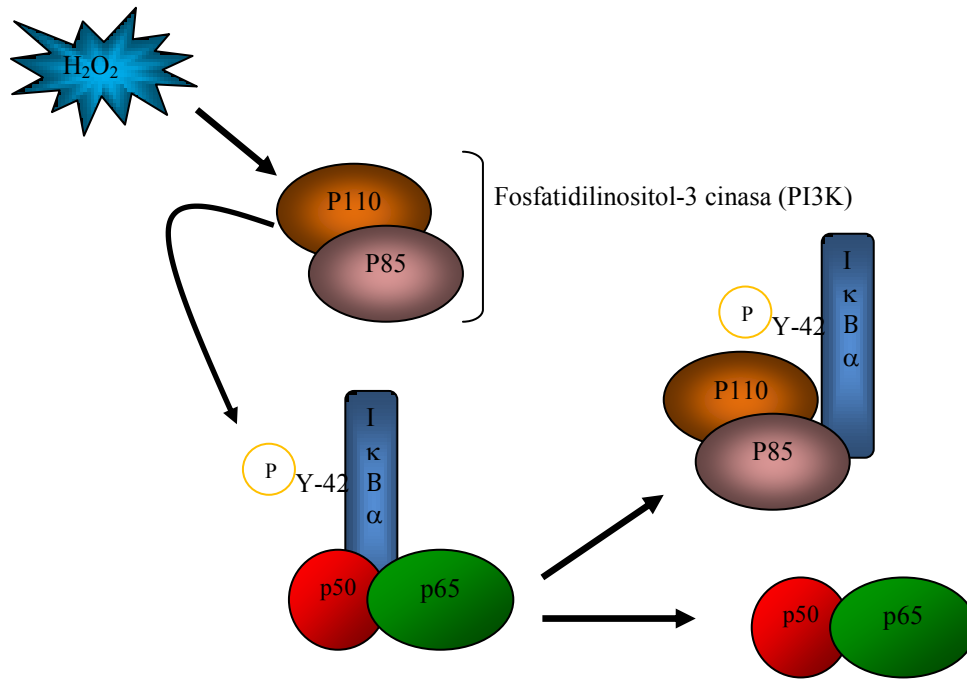


Figura 6. Activación de NF-κB por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la subunidad p110 de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K). La subunidad p110 de PI3K fosforila a IκBα en la Tyr 42 ocasionando que esta última se disocié de NF-κB dejándolo activo, por otro lado, IκB se une a la subunidad p85 de PI3K, lo que evita su degradación (Bubici *et al.*, 2006)

Las ROS no sólo inducen la degradación de IκB en el citoplasma y con ello la translocación de NF-κB al núcleo, sino también inducen varias modificaciones en las proteínas de NF-κB, principalmente en p65, como son fosforilaciones ó acetilaciones que permiten una mayor estabilidad en la interacción con el ADN, ocasionando un aumento en transcripción de sus genes blanco (Gloire y Piette, 2009). Después de la degradación de IκB, p65 es fosforilado en diversos residuos de serina. Estas fosforilaciones promueven su interacción con CBP (CREB binding protein) y p300, dos co-activadores transcripcionales, los cuales tienen actividad de acetilasas. Las fosforilaciones se presentan en distintos residuos como son: en S276 fosforilación realizada por las cinasas de proteína A (PKAc), MSK-1 y MSK-2, y en S311 por PKCζ (z) ó en S536 por IKKα e IKKβ, todas las proteínas antes mencionadas son activadas por las ROS (Gloire y Piette, 2009).

## 2.5 Receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR)

El EGFR es un gen blanco clásico de NF- $\kappa$ B y consiste en una familia de cuatro receptores pertenecientes a la súperfamilia de receptores cinasas de tirosina (RTK) que incluye a EGFR (también conocido como ErbB1/HER-1), ErbB2/Neu/HER-2, ErbB3/HER-3 y ErbB4/HER-4 (Sibilia *et al.*, 2007). Estos receptores son glucoproteínas con un dominio de unión a un ligando extracelular, una parte hidrofóbica transmembranal y una parte citoplásmica que contiene un dominio de cinasa de tirosina (Figura 7) (Thomasson, 2009; Yarden, 2001).

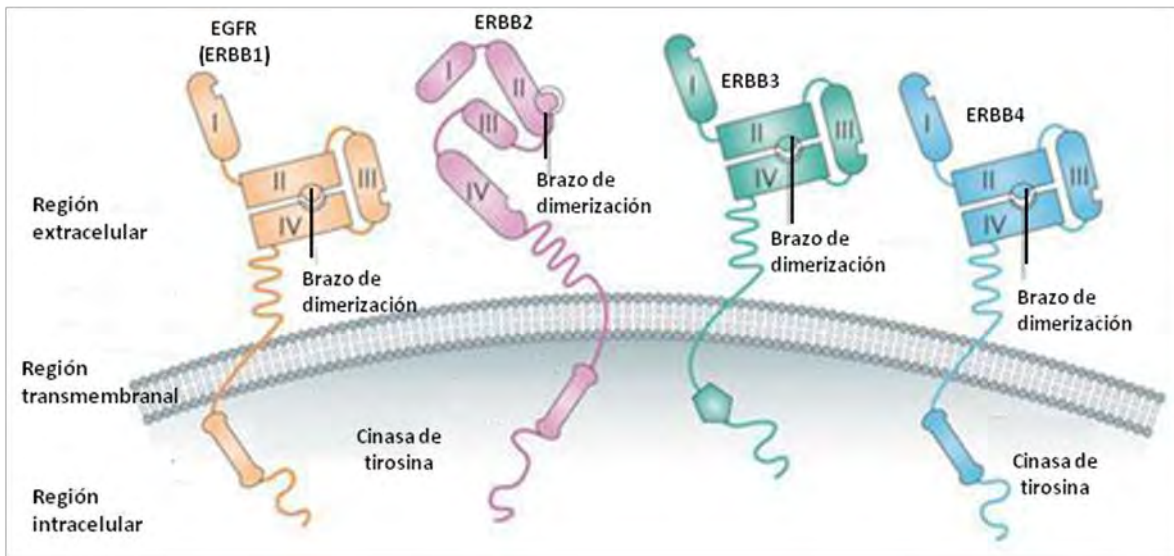


Figura 7. Estructura de los cuatro miembros de la familia de EGFR. Todos los receptores ErbB, excepto el receptor ErbB2, el cual carece de una región extracelular, están compuesto de tres regiones: una región extracelular responsable de la unión del ligando y está constituido de 4 dominios (I-IV) involucrados en el reconocimiento del ligando y la dimerización del receptor; el segmento hélice  $\alpha$  transmembranal y una región intracelular con actividad de cinasa de tirosina, así como residuos que median las interacciones con moléculas de señalización intracelular (Thomasson, 2009).

Los miembros de la familia de EGFR son activados por un gran grupo de factores de crecimiento relacionados con el factor de crecimiento epidermal (EGF), tales como el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), la anfiregulina (AR), la epirregulina (EREG) y las neurregulinas (NRGs), entre otros factores (Prenzel *et al.*, 2001). La unión del ligando a cualquier receptor ErbB, excepto ErbB2, induce la formación de homo- ó heterodímeros del receptor y la activación del dominio de cinasa intrínseco, resultando en transfosforilaciones de los residuos de tirosina específicos en los tallos citoplasmáticos (Figura 8). Los residuos de tirosina fosforilados actúan como sitios de unión para las proteínas que contienen dominios homología Src-2 (SH2) tal como la proteína 2 unida al receptor de factor de crecimiento (Grb2), proteína transformante 1 (SHC) y la fosfolipasa C (PLC $\gamma$ ), los cuales, a su vez, activan cascadas de señalización río abajo, como son Ras-Raf-MEK-ERK $\frac{1}{2}$ ,

STAT3 y STAT 5 que controlan principalmente procesos de proliferación y diferenciación, la cascada PI3K-Akt-mTOR que actúa como una vía de supervivencia y anti-apoptosis (Sibilia *et al.*, 2007) y la vía de PLC $\gamma$  que actúa en la regulación de la movilidad celular a través de la remodelación del citoesqueleto (Thomasson, 2009, Sibilia *et al.*, 2007).

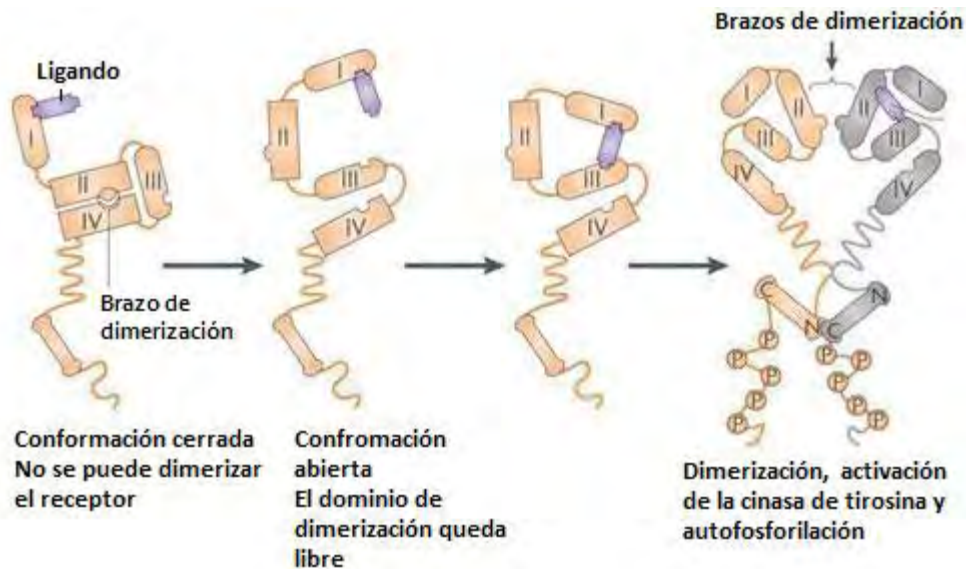


Figura 8. Proceso de dimerización de los receptores ErbB, excepto ErbB2, por la unión de su ligando. El ligando se une al receptor, lo cual induce un cambio conformacional en su estructura exponiendo el brazo de dimerización permitiendo la formación del dímero y la activación funcional de ErbB (Thomasson, 2009).

La presencia del EGFR en la membrana es regulada por la formación de vesículas, ya que después de la formación del complejo ligando-EGFR y la transducción de la señal río abajo, éste es internalizado mediante vesículas que se convierten en endosomas tempranos. Esta internalización puede ser dependiente o independiente de clatrin. Los endosomas tempranos pueden tomar dos direcciones: el reciclamiento del receptor a la membrana o la degradación de éste por la vía de fusión lisosomal (Figura 9). La dirección de las vesículas es determinada por la naturaleza del complejo ligando-receptor; cuando son complejos menos estables el receptor se recicla, mientras que cuando son complejos más estables, éstos van a degradación (Shtiegman y Yarden, 2003) de igual manera, la presencia de atenuadores (como la proteína c-Cbl ó Nrdp1) quienes se unen a sitios fosfotirosina de los ErbB, promueve la internalización del receptor y su degradación lisosomal. El atenuador c-Cbl media la internalización y degradación de receptores formados por ErbB1, mientras que la proteína Nrdp1 lo hace para ErbB2, ErbB3 y ErbB4 (Thomasson, 2009). Además de los atenuadores "tempranos", también existen atenuadores tardíos los cuales se unen al dímero e inhiben su actividad de cinasa, tales como LRIG1 y RALT (Mig-6/Gene 33/ERRFI1) (Thomasson, 2009).



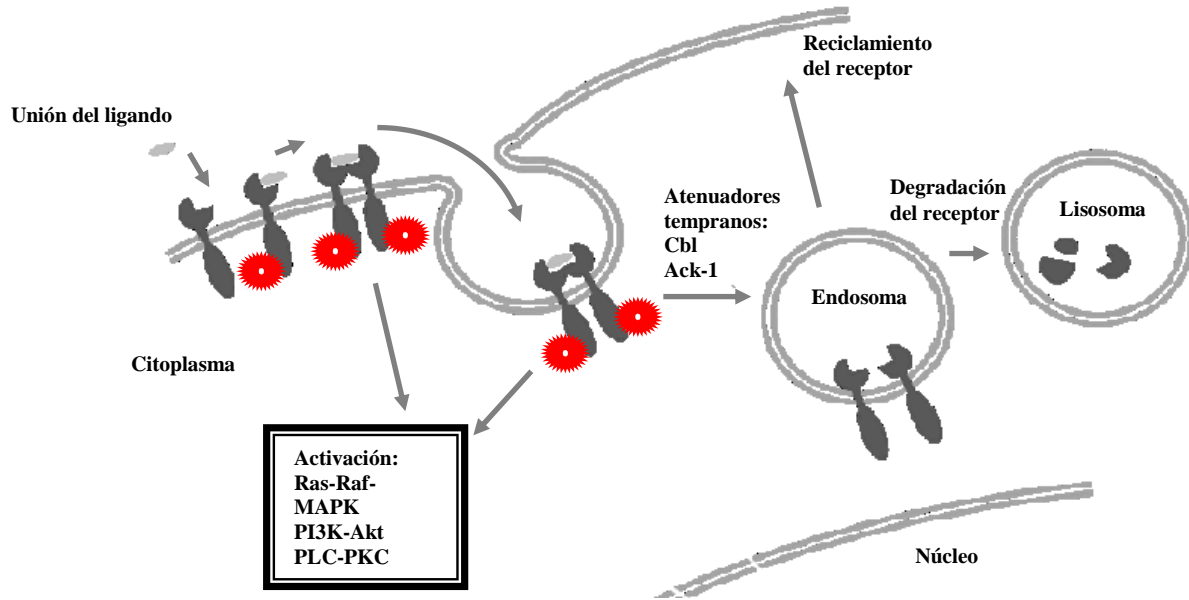


Figura 9. Esquema de la internalización del complejo ligando-ErbB. Después de la unión del ligando al receptor, éste se autofosforila en los residuos de tirosina desencadenando la señalización río abajo. Posteriormente, el complejo formado por el receptor y su ligando es internalizado a través de un endosoma y entonces el receptor puede ser degradado o reciclado (Thomasson, 2009).

Los miembros de la familia de EGFR han sido implicados en el desarrollo del cáncer y se utilizan como marcadores de pronóstico y/o blancos terapéuticos en varios tipos de neoplasias. Diferentes fenómenos son los responsables de la activación anormal de los receptores en los tumores, incluyendo la sobreexpresión, amplificación y mutaciones en sus genes que conllevan a la activación constitutiva del receptor mutante, o bien, ciclos autocrinos de diversos factores de crecimiento (Wykosky *et al.*, 2011; Sibia, 2007; Yarden, 2001). Se han reportado varias deleciones en el dominio intra y extracelular de EGFR en glioblastomas (Ekstrand *et al.*, 1992), en carcinomas de células no pequeñas de pulmón (García de Pallazzo *et al.*, 1993), en cáncer de mama (Wikstrand *et al.*, 1995) y en carcinomas de ovario (Moscatello *et al.*, 1995). La mutación mejor caracterizada y más común en cáncer es la deleción de los exones 2-7, la cual provoca un receptor activo constitutivamente en ausencia de ligando (Wong *et al.*, 1992; Ekstrand *et al.*, 1994).

## 2.6 Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

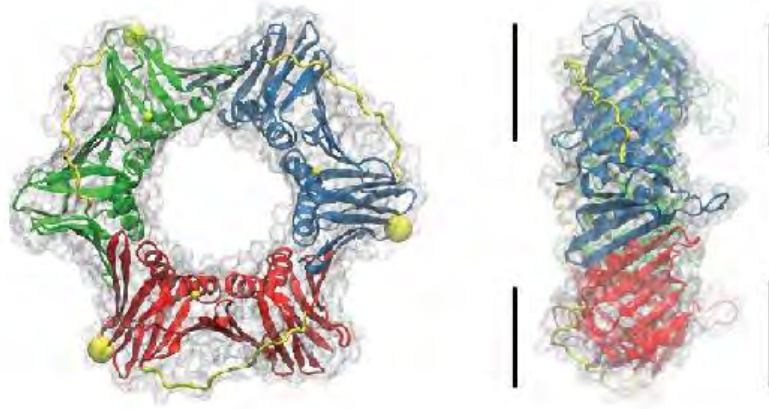
El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína conservada evolutivamente entre los organismos eucariotes desde las levaduras hasta el humano, la cual participa en la síntesis de DNA (Miyachi *et al.*, 1978). La proteína PCNA consiste de tres monómeros idénticos que interaccionan cabeza-tallo formando un anillo homotrímico, cada monómero presenta dos dominios muy similares unidos por un interdominio. La superficie de la proteína tiene una carga negativa; sin embargo, los residuos de aminoácidos internos del anillo tienen carga positiva, los cuales interaccionan con las cargas negativas de la cadena de fosfatos del DNA facilitando el deslizamiento de PCNA a lo largo del DNA. El anillo homotrimérico está dividido en una parte frontal, donde interactúa con proteínas involucradas en la replicación, y una parte lateral, que participa en diferentes procesos (Figura 10).

Funcionalmente, la proteína PCNA está presente en dos formas: la forma unida a cromatina resistente a detergente, la cual está implicada en la replicación y reparación de DNA y la segunda es una forma soluble no unida a cromatina (Wang *et al.*, 2005). Durante la replicación, el PCNA rodea a la doble hélice de DNA y funciona como una pinza móvil deslizante para el reclutamiento de otras proteínas (como DNA polimerasas y ligasas) a la cromatina (Kelma and O'Donnell, 1995); así mismo, está involucrado en los mecanismos de reparación y remodelación de la cromatina, la cohesión de las cromátidas hermanas y en el control del ciclo celular (Stoimenov and Helleday, 2009). En la replicación, el PCNA requiere del complejo RFC (factor de replicación C) para unirse a las hebras de DNA, este complejo permite la ruptura temporal de las interacciones entre subunidades del PCNA y re-ensamblaje del anillo alrededor del DNA. Una vez unida al DNA desplaza a la DNA polimerasa- $\alpha$  y permite que las DNA polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$  interactúen con ella continuando la replicación del DNA (Stoimenov and Helleday, 2009).

PCNA es una proteína que se expresa diferencialmente durante el ciclo celular, su síntesis se incrementa en la transición de la fase G0 a la fase S. En varios tipos de cáncer se ha reportado un aumento en los niveles de PCNA, lo que ha permitido utilizarlo como un marcador de pronóstico en algunos casos (Shen *et al.*, 2011; Stoimenov and Helleday, 2009; Elias, 1997).



A)



B)

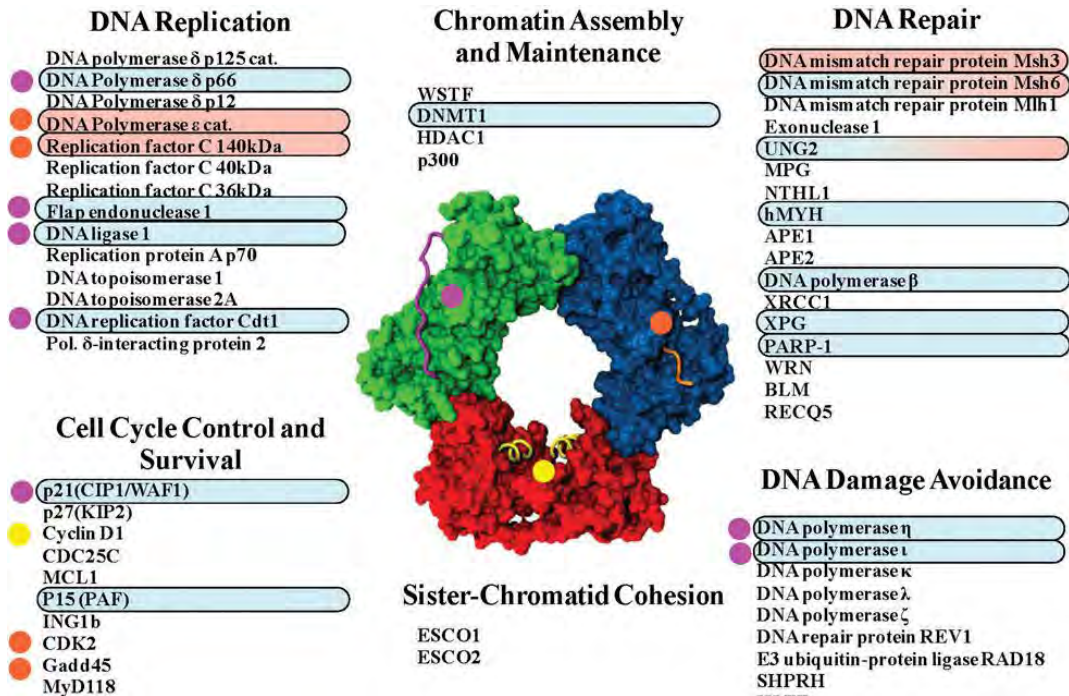


Figura 10. Estructura y proteínas que interactúan con PCNA. A) Vista frontal y lateral de la estructura tridimensional de PCNA, las diferentes subunidades están en color rojo, verde y azul, el interdominio de conexión es de color amarillo y los residuos de aminoácidos importantes están representados con esferas amarillas, la pequeña indica a Tyr<sup>211</sup> y la grande indica Lys<sup>164</sup>. B) Diferentes funciones y proteínas que interactúan con PCNA. Proteína del síndrome de Bloom(BLM);proteína 25C del ciclo celular (CDC25C); factor de transcripción como-helicasa (HLTF), homólogo MutY humano (hMYH); inhibidor de crecimiento 1b (ING1b); secuencia 1 de leucemia de célula miloide (MCL1); MDM2; glucosilasa ADN-metilpurina (MPG); nth endonucleasa III-como 1 (NTHL1); factor asociado a PCNA (PAF); polimerasa 1 poli(ADP-ribosa)(PARP-1) (Stoimenov and Helleday, 2009).

## 2.7 CCR, FeNTA, NF- $\kappa$ B, EGFR y PCNA

Oya y colaboradores (2001) reportaron un incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B, el cual no correlaciona con el grado de avance del tumor en muestras de pacientes con CCR. Posteriormente, Meteoglu y colaboradores (2008) observaron que dicho aumento correlaciona con un aumento en los niveles de EGFR, implicado en la proliferación, migración y adhesión celular; y con los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína involucrada en la vascularización (formación de sistema circulatorio) y angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos a partir de preexistentes); así mismo, correlaciona con una disminución en los niveles de la proteína inhibitoria de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B. Por otro lado, en estudios *in vitro*, realizados tanto en nuestro laboratorio como en otros, en células de túbulo proximal tanto de humano (PTC) como de cerdo (LLC-PK1) se observó que la exposición a FeNTA, induce un incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2001; Dávalos, 2006), la cual se vio disminuida por la presencia de pirrolidina ditiocarbamato, un inhibidor de NF- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2001). De igual forma, en un estudio *in vivo* de exposición crónica con el carcinógeno que llevó la formación de tumores renales se reportó un incremento en los niveles de NF- $\kappa$ B (Tanveer *et al.*, 2009), aunque los autores no aclaran si el incremento se observa en tejido tumoral o tejido renal total.

En el caso del EGFR se ha reportado un aumento en su expresión en muestras de pacientes con CCR, cuyo significado clínico es controversial debido a que algunos autores sugieren que dicho aumento está asociado a una mala prognosis (Shiau *et al.*, 2009; Merseburger *et al.*, 2005; Moch *et al.*, 1997) mientras que otros afirman lo contrario (Kallio *et al.*, 2003). En el caso del modelo de CCR inducido por FeNTA se desconoce el estatus de esta proteína, tanto en etapas tempranas como en los tumores.

Por otro lado, uno de los marcadores clásicos de proliferación celular más utilizados en la prognosis de varios tipos de cáncer, entre ellos el CCR, es la proteína PCNA cuyo gen es regulado por NF- $\kappa$ B. En estudios realizados en muestras de pacientes con CCR se ha reportado un incremento en los niveles de PCNA, el cual correlaciona con el grado del tumor y sobrevivencia del paciente (Cronin *et al.*, 1994; Larsson *et al.*, 1996). En el caso del CCR inducido por FeNTA, Dutta y colaboradores (2005) reportaron un incremento en los niveles de PCNA después de la administración repetida del carcinógeno durante 3 semanas, así como también en tejido tumoral inducido por FeNTA.

## 2.8 Polifenoles y tamarindo

Las múltiples evidencias de la participación del estrés oxidante en el desarrollo del cáncer han llevado a promover desde hace tiempo el uso de compuestos antioxidantes como una posible terapia preventiva y/o curativa (Hu 2011; Ito *et al.*, 1987). Entre los compuestos con mayor capacidad antioxidante están los polifenoles, los cuales se encuentran en una gran cantidad de alimentos como frutas, verduras, semillas y bebidas (Bravo, 1998; Rice-Evans, 2001). Algunos ejemplos de los fitoquímicos fenólicos y extractos probados en diferentes tipos de cáncer, tanto *in vivo* como *in vitro*, y que han mostrado efectos favorables son los isotiocinatos (Hecht, 2000), los polifenoles del té verde y negro (Halder, 2007) y la curcumina (Okazaki *et al.*, 2005). Entre los mecanismos celulares involucrados en el efecto benéfico de los fitoquímicos fenólicos se han reportado inhibición de la lipoperoxidación, inducción de enzimas antioxidantes, efectos antiinflamatorios, inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular e inhibición de metástasis y angiogénesis (Lee y Lee, 2006). Sobre todo en los últimos años, se ha demostrado que algunos de estos efectos se dan por la inhibición de vías de señalización como PI3K/Akt, ERK y Ras/Raf/MAPK y/o la activación de vías como JNK, p53 y caspasas, lo que lleva a la regulación de la expresión de genes como Waf-1, BAX, Bcl-2 y metaloproteinasas de matriz, así como la supresión de la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1 (Lee y Lee, 2006; Nichenametla, 2006).

Entre las especies vegetales que presentan gran contenido de compuestos polifenólicos está *Tamarindus indica* conocida popularmente como tamarindo. Los productos derivados de diferentes partes de esta planta (fruto, hoja, corteza y raíces) se usan en la medicina tradicional de muchos países de América, África y Asia, como antiinflamatorios, laxantes, expectorantes, cicatrizantes y digestivos y en el tratamiento de diarrea, reumatismo, infecciones de tracto urinario y piel, diabetes y malaria, entre otros (Farnsworth y Bunyaphatsara, 1992; Komutarin ., 2004; Maiti *et al.*, 2004; Parrota, 2001).

Se ha comprobado que extractos de tamarindo pueden atenuar las alteraciones causadas por un estrés oxidante exacerbado en diferentes modelos animales (Ramos *et al.*, 2003). Por otro lado, Tsuda y colaboradores (1993) encontraron una mayor actividad antioxidante en la cáscara o testa de la semilla comparada con el endospermo. Estudios sobre la caracterización del extracto derivado de la semilla de tamarindo revelaron la presencia de ocho compuestos principales: procianidinas B<sub>2</sub> (5.5%), (-)-epicatequina (4.8%), trímero(18.1%), tetrámero (30.2%), pentámero (17.6%) y hexámero (23.8%) de procianidina y taninos poliméricos (Sudjaroen *et al.*, 2005).

Debido al alto contenido de polifenoles en la semilla de esta leguminosa, se esperaría un resultado exitoso de su uso en el tratamiento y/o prevención de diversos tipos de neoplasias. La procianidina B<sub>2</sub> inhibe el daño oxidante al DNA inducido por Fe<sup>2+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sakano, 2005), promueve la apoptosis en células de carcinoma de seno y próstata (Agarwal *et al.*, 2007) y activa la producción de caspasa-3 en las células de melanoma. También se ha encontrado que esta procianidina puede inhibir cinasas (ERK, JNK y p38-MAPK) evitando la activación de algunos oncogenes relacionados (Zhang *et al.*, 2006). Así mismo, estabiliza a I $\kappa$ B, suprimiendo la actividad de NF- $\kappa$ B (Zhang *et al.*, 2006). Otro de los polifenoles contenidos en la semilla del tamarindo, la catequina, ha sido ampliamente estudiada respecto a sus propiedades antioxidantes y efectos sobre vías de señalización, factores de transcripción y genes involucrados en procesos cancerosos (Huang *et al.*, 2005).

Estudios realizados en nuestro laboratorio con el extracto de semilla de tamarindo (EST) mostraron que posee un alto contenido de compuestos fenólicos, una notable capacidad de inactivación del radical superóxido y una buena estabilidad a largo plazo. Así mismo, se observó que la dosis de 100mg Fenoles totales (FT)/kg/día no tiene efectos pro-oxidantes o antinutrimientales. (Vargas-Olvera, 2009). En estudios agudos y crónicos con FeNTA el EST disminuye el estrés oxidante y protege de manera significativa contra el daño severo en la función renal inducido por el FeNTA. Además la administración crónica del EST disminuyó la incidencia de CCR en un 21.05 % (Vargas-Olvera, 2009).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo del cáncer se ha dividido en tres etapas: iniciación, promoción y progresión, siendo las dos primeras claves para su control. Entre los factores involucrados en su desarrollo está el estrés oxidante.

Uno de los tipos de cáncer menos comprendidos es el CCR el cual presenta una alta mortalidad debido su difícil diagnóstico y tratamiento. Aunque en la actualidad se conocen algunas alteraciones moleculares presentes en este tipo de neoplasia, aún se desconoce lo que sucede en etapas tempranas del desarrollo de esta enfermedad, por lo que el contar con un modelo experimental bien caracterizado nos podría permitir estudiarlo. Uno de los modelos que existen de CCR es aquél inducido con FeNTA, en el que se ha demostrado la participación del estrés oxidante; sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares implicados en su carcinogénesis.

Por otra parte, una de las alteraciones reportadas en el CCR humano es una actividad constitutiva de NF- $\kappa$ B, la cual se asocia con una disminución en los niveles de I $\kappa$ B y con un incremento de marcadores de angiogénesis y proliferación como son VEGF, EGFR y PCNA, este último correlaciona con el grado del tumor. Respecto al modelo experimental inducido con FeNTA, se ha reportado que tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* de exposición crónica del carcinógeno induce un incremento tanto en los niveles de proteína como en la actividad de NF- $\kappa$ B; sin embargo, se desconoce la participación de éste en etapas tempranas de la carcinogénesis.

Por lo tanto y para continuar con la caracterización del modelo, se consideró de interés determinar la actividad de NF- $\kappa$ B en etapas tempranas del modelo de carcinogénesis renal, así como los niveles de proteínas producto de sus genes blanco, como el EGFR y PCNA. De igual forma, se juzgó importante evaluar si un extracto de semilla de tamarindo, con gran capacidad antioxidante, puede prevenir los efectos inducidos por el FeNTA.

## 4. HIPÓTESIS

NF- $\kappa$ B se encontrará activado e inducirá la expresión de proteínas productos de sus genes blanco, como son EGFR y PCNA en una etapa temprana del modelo de carcinogénesis renal inducida con FeNTA, en el cual está involucrado el estrés oxidante, y la administración de un extracto de semilla de tamarindo con capacidad antioxidante protegerá contra estos efectos.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo General

Estudiar la actividad de NF- $\kappa$ B, así como la expresión de EGFR y PCNA, en etapas tempranas del modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA y el efecto de un extracto de semilla de tamarindo en estas determinaciones.

### Objetivos Particulares

- 1.- Desarrollar un protocolo subcrónico de un mes de tratamiento con FeNTA en ratas Wistar macho.
- 2.- En muestras de corteza renal determinar:
  - La actividad de NF- $\kappa$ B mediante el ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).
  - Los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  mediante Western blot.
  - Los niveles de proteínas productos de los genes EGFR y PCNA por Western blot.
  - Si la actividad de NF- $\kappa$ B correlaciona con la disminución en los niveles de su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  y con un aumento en los niveles del EGFR y PCNA.
- 3.- Investigar el efecto de un extracto de semilla de tamarindo en las determinaciones anteriores.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Diseño experimental

En la figura 11 se presenta el diseño experimental desarrollado, y en la tabla 1 se describe los grupos de estudio. Para el desarrollo del modelo de tratamiento subcrónico con FeNTA se estudiaron un total de 48 ratas Wistar macho (Harlan México-UNAM), cuyo peso inicial estaba entre 50 y 70 g, divididas en 6 grupos: Control (C), Extracto de semilla de tamarindo (E), N-dietilnitrosamina (D), FeNTA (F), DEN+FeNTA (D+F) y EST+DEN+FeNTA (E+D+F).

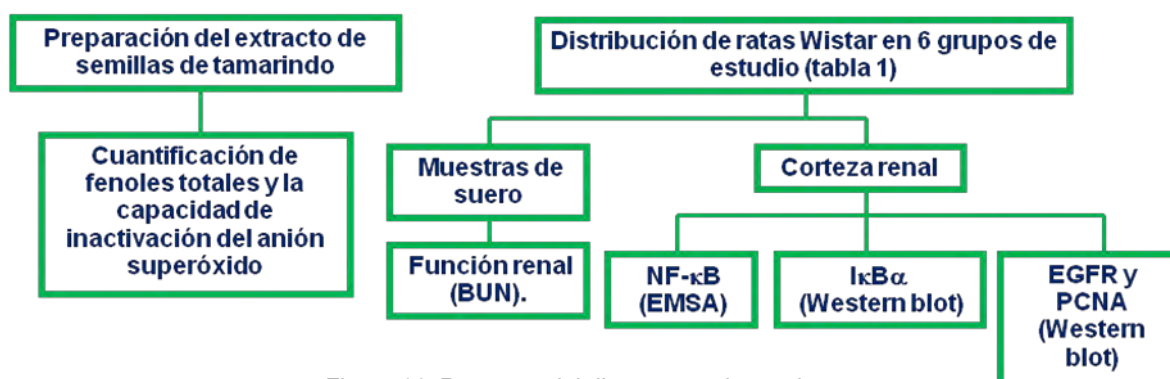


Figura 11. Resumen del diseño experimental.

**Tabla 1. Grupos de estudio de las ratas Wistar macho.**

Grupo	No .de animales	Esquema de tratamiento
Control (C)	7	Vehículos.
EST (E)	7	Administración del extracto de semilla de <i>Tamarindus indica</i> (EST) en el agua de beber en una dosis de 100 mg <sub>FT</sub> /Kg/día.
DEN (D)	7	Administración i.p. única de N-dietilnitrosamina (DEN) en una dosis de 200mg/kg como iniciador tumoral.
FeNTA (F)	7	Administración i.p. de nitrilotiacetato de hierro (FeNTA) dos veces por semanas con aumentos semanales de la dosis (3, 5, 7, 9 mg <sub>Fe</sub> /kg).
D+F	10	Administración de DEN+FeNTA como se describió en los grupos anteriores.
E+D+F	10	Administración del EST+DEN+FeNTA como se describió en los grupos anteriores

FT: Fenoles totales  
i.p.: intraperitoneal

### **6.1.1 Preparación y administración del EST**

Para la preparación del EST se utilizó la cáscara de la semilla del tamarindo, la cual fue obtenida por fragmentación mecánica de la semilla. Se colocaron 25 g de la cáscara de la semilla en 500 mL de etanol anhidro y se dejó macerando durante 24 hrs a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo, el extracto resultante de las semillas se separó de los restos de semilla por decantación, esto se repitió tres veces. El extracto resultante se concentró al vacío en un rotaevaporador hasta obtener un polvo, el cual se denominó extracto de semilla de tamarindo (EST).

El extracto se administró a los grupos correspondientes en el agua de beber en una dosis de 100 mg<sub>FT</sub>/Kg/día, ya que, en estudios previos en nuestro laboratorio, se demostró que es la dosis que presenta la mayor capacidad antioxidante sin producir efectos adversos, como por ejemplo prooxidación (Vargas-Olvera, 2009). Para calcular la cantidad de EST que debe añadirse al agua de beber para que cada rata reciba la dosis antes mencionada de fenoles totales, fue necesario determinar el volumen promedio de agua bebida por los animales y su peso corporal. Dichas mediciones se realizaron a lo largo de todo el protocolo a fin de ajustar la cantidad de EST añadido al agua consumida por los grupos correspondientes.

### **6.1.2 Preparación y administración de N-dietilnitrosamina (DEN)**

El DEN administrado se obtuvo de Sigma Aldrich, Inc. (St Louis MO, EUA) y su preparación se llevó a cabo diluyendo el contenido del vial (1 mL de 990-999 mg/mL) en 11 mL de solución salina y ajustando el volumen a administrar dependiendo del peso de cada animal. El DEN se administró vía intraperitoneal en una dosis de 200mg/Kg (Athar *et al.*, 1998).

### **6.1.3 Preparación y administración del nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)**

La preparación del FeNTA se realizó al momento del ensayo, siguiendo el método de Awai y colaboradores (1979), con ligeras modificaciones. Primero se preparó una solución de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Sigma Aldrich, Inc St Louis MO, EUA) 160mM y otra de nitriloacetato de sodio 320mM, utilizando en ambos casos una solución de NaHCO<sub>3</sub> 120mM como disolvente. Se mezclaron ambas soluciones en una proporción 1:2 v/v. La solución final se ajustó a pH: 7.2 con NaHCO<sub>3</sub> y la concentración final de hierro fue de 2.98 mg<sub>Fe</sub>/mL.



El FeNTA se administró vía intraperitoneal y la cantidad administrada se basó en la concentración de hierro en la solución y en el peso del animal. Para conocer la cantidad de la solución de FeNTA a administrar se efectuó el siguiente cálculo:

Ejemplo: dosis a administrar  $3\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{Kg}$  a una rata cuyo peso es de 0.254 Kg

$(1\text{mL solución de FeNTA}/2.98\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{mL})(3\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{Kg})(0.254 \text{ Kg})=\underline{0.255 \text{ mL de solución de FeNTA}}$ .

## 6.2 Protocolo subcrónico en ratas Wistar macho

El protocolo se comenzó con la administración del extracto a los grupos E y E+D+F, los cuales recibieron una dosis de  $100 \text{ mg}_{\text{Fe}}/\text{Kg}/\text{día}$  en el agua de beber a lo largo del protocolo. Dos semanas después, a los grupos D, D+F y E+D+F se les administró vía intraperitoneal una dosis única de  $200\text{mg}/\text{kg}$  de N-dietilnitrosamina (DEN), el cual es un iniciador tumoral (Khan, 2005). Quince días después de la administración del DEN se comenzó la administración del carcinógeno renal a los grupos F, D+F y E+D+F con un esquema de dos administraciones intraperitoneales semanales, con aumentos graduales en la dosis cada semana, comenzando con 3, 5, 7 hasta  $9\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{kg}$  completando el mes de administración de FeNTA. Es importante aclarar que con este esquema de tratamiento pero continuado durante 4 meses de exposición al carcinógeno más 2 meses de descanso se obtuvieron tumores de CCR en nuestro laboratorio (Vargas-Olvera, 2012). En la figura 12 se muestra el esquema del tratamiento.



Figura 12. Esquema de tratamiento para el desarrollo del protocolo subcrónico de un mes de administración del carcinógeno FeNTA.

Al término del mes de tratamiento se sacrificaron las ratas por decapitación 48 horas después de la última administración del carcinógeno a los grupos correspondientes. Inmediatamente se recolectó una muestra de sangre para la posterior obtención de suero, y se extrajeron los riñones, separando la corteza, la cual se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el día de los análisis.

## 6.3 Métodos

La descripción de las técnicas empleadas en el presente trabajo, así como la preparación de las soluciones, son descritas con mayor detalle en los anexos.

### 6.3.1 Cuantificación de fenoles totales

Se determinó el contenido de fenoles totales del EST mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999) (Anexo AI.1). 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 que se reducen por acción de los fenoles, formando una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilos de la molécula que puede leerse espectrofotométricamente a 765 nm. Para la cuantificación se realizó una curva patrón de ácido gálico en la que se interpolan las absorbancias de las soluciones con diferentes concentraciones del EST. Los resultados se expresan en  $\mu\text{g eq. de ácido gálico /mL de extracto}$ .

### 6.3.2 Evaluación de la capacidad de inactivación del radical superóxido

La inactivación del radical superóxido se midió indirectamente gracias a la capacidad del EST para evitar la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por los radicales superóxido generados *in vitro* en el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Anexo AI.2). La reducción del NBT por efecto del radical superóxido se determina por la formación del formazán, el cual puede medirse espectrofotométricamente a 560 nm (Parejo *et al.*, 2002). Los resultados se expresan en  $\text{Cl}_{50}$  que es la cantidad de EST necesario para atrapar el 50% del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  formado en el sistema xantina-xantina oxidasa.

### 6.3.3 Determinación de la función renal

Con la finalidad de establecer si los tratamientos aplicados inducen alteraciones en la función renal, se determinaron los niveles de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) en las muestras de suero obtenidas del protocolo subcrónico. La urea es un producto de desecho producido por la desaminación oxidante de los aminoácidos y es muy tóxico, por lo que es transportada por la

sangre y eliminada a través de la orina. Mediante la determinación de BUN se puede estimar el daño en la función renal, ya que en una insuficiencia renal la urea no se excreta y se acumula en la sangre. Dicho análisis se llevó a cabo mediante el estuche comercial “Urea 37” de SPINREACT (España) siguiendo las instrucciones del fabricante, cuyo fundamento consiste en que la urea presente en la muestra reacciona con el oftalaldehído en un medio ácido, originando un compuesto colorido que puede cuantificarse espectrofotométricamente a 510nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de urea en la muestra. Los resultados se expresan como mg de BUN/dL de suero.

#### **6.3.4 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)**

La interacción de proteínas con el DNA es el punto central para el control de muchos procesos celulares incluyendo la replicación, la recombinación, la reparación y la transcripción del DNA. Una técnica básica para estudiar la actividad de factores de transcripción es el ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA). El EMSA está basado en la observación del complejo estable proteína-DNA, el cual migra más lentamente que los fragmentos libres de DNA a través de geles de poliacrilamida. La evaluación de la actividad de NF- $\kappa$ B se realizó mediante este ensayo, porque este factor tiene la capacidad de unirse con una secuencia específica de DNA sólo cuando está activo, es decir cuando no tiene unido su inhibidor I $\kappa$ B.

Para la determinación de la actividad de NF- $\kappa$ B, primero se realizó la extracción de proteínas nucleares (Anexo A1.3) a las muestras de corteza renal obtenidas del protocolo y se les determinó el contenido de proteínas mediante el método de Lowry (Anexo A1.4). Además, para el EMSA se utilizó una secuencia consenso de doble cadena 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' que es reconocida por p65. Se decidió utilizar una secuencia reconocida por p65, debido a que el heterodímero p50/p65 es el mejor estudiado y es el más abundante en tejido epitelial. El oligonucleótido de doble cadena se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA (# Cat: sc-2505) y se marcó con digoxigenina -11ddUTP utilizando el estuche comercial DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation de Roche, Mannheim, Alemania (cat No. 03 353 591 910) (Anexo A1.5.1). En la figura 13 se muestra la prueba de eficacia del marcaje. Para la realización del EMSA se utilizó el mismo estuche siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo A1.5).

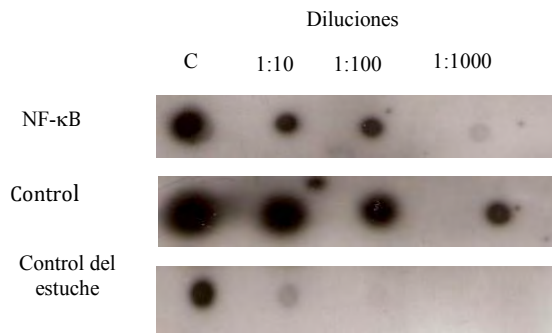


Figura 13. Prueba de la eficacia del marcaje de la secuencia consenso reconocida por NF-κB. Control: es una secuencia que es reconocida por Oct2A y que fue marcada de la misma manera que la secuencia para NF-κB; Control del estuche es la misma secuencia que la anterior pero que fue marcada por el fabricante; C= Solución concentrada de cada una de las secuencias analizadas; 1:10, 1:100, 1:1000 =diluciones realizadas a la solución concentrada de cada secuencia.

### 6.3.5 Determinación de las proteínas IκBα, EGFR y PCNA por Western Blot

Para estudiar las proteínas de interés por Western blot, primero se realizó la extracción de proteínas totales (Anexo A1.6). A cada homogenado se le determinó el contenido de proteínas totales mediante el método de Lowry (Anexo A1.4). Una vez determinado el contenido de proteínas totales a los homogenados y dependiendo de la proteína a analizar, se calculó el volumen necesario para cargar 80 o 100 μg de proteína en cada pozo de los geles de SDS-PAGE. La electroforesis se realizó como se describe en el Anexo A1.7. Después de la separación de las proteínas se continuó con la transferencia de estas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilion-P, Millipore Corporation, MA, EUA) (Anexo A1.7). Una vez terminada se prosiguió al bloqueo de las membranas utilizando leche descremada al 5% o suero bovino fetal (SBF) diluidos en amortiguador de fosfatos (PBS), dependiendo del caso, durante 1 h. Después se dejaron incubando las membranas con el anticuerpo primario durante toda la noche. En la tabla 2 se muestran los anticuerpos utilizados en el presente trabajo. Al día siguiente, se prosiguió con la detección la banda correspondiente a la proteína de interés, para ello se utilizó un anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario, este anticuerpo secundario está acoplado a la peroxidasa de rábano, la cual al adicionarle los sustratos de la peroxidasa (luminol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Millipore Immobion™ Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore Corporation, MA, EUA) emite quimioluminiscencia la cual es captada en una placa de rayos X. Las placas de X obtenidas se analizaron por densitometría utilizando el programa de Imagen J (BrokenSymmetry Soft) y los resultados se expresan como unidades relativas de densitometría (URD) de la proteína estudiada ajustada a un control de carga y comparada contra el grupo C.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en la técnica de Western blot.

Proteína de interés	Marca del Anticuerpo
I $\kappa$ B $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology Inc I $\kappa$ B $\alpha$ (C-21);# cat: sc-371
EGFR	Santa Cruz Biotechnology Inc EGFR(1005); #cat: sc- 03
PCNA	Santa Cruz Biotechnology Inc PCNA(F-2); #cat:sc-25280
Tubulina $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology Inc $\alpha$ -tubulina (B-7); # cat: sc-5286
Anticuerpo secundario anti-cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc Donkey anti goat IgG HRP; # cat: sc-2020
Anticuerpo secundario anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology Inc Goat anti rabbit IgG HRP; # cat: sc-2030
Anticuerpo secundario anti-ratón	Santa Cruz Biotechnology Inc Goat anti mouse IgG HRP; # cat: sc-2005

### 6.3.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se presentan como la media  $\pm$  error estándar (EE). La significancia estadística se estableció por análisis de varianza (ANOVA) y usando el método de comparación múltiple de Newman- Keuls con  $p < 0.05$  utilizando el programa GraphPad Prism Ver. 5.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterización del EST

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

La determinación del contenido de fenoles totales del EST, se realizó interpolando los valores de las absorbancias a 765nm de distintas diluciones del extracto en una curva patrón de ácido gálico, cuya ecuación fue  $ASB=0.0044FT-0.013$  ( $r^2=0.9957$ ). El EST mostró un alto contenido de estos compuestos ( $1.2 \pm 0.027$  mg eq ac. gálico /mg<sub>EST</sub>).

Así mismo, se evaluó la capacidad antioxidante del EST mediante la disminución en la reducción del nitroazul de tetrazolio debido a la inactivación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) generado en el sistema de la xantina-xantina oxidasa. La  $IC_{50}$  obtenida fue de 30.7  $\mu$ g/mL (Figura 14) lo que demuestra una buena capacidad antioxidantes si lo comparamos con otros antioxidantes comúnmente utilizados como el ácido ascórbico cuya  $IC_{50}$ , de terminada con la misma técnica en nuestro laboratorio, fue de 66  $\mu$ g/mL (Cruz-White, 2007).

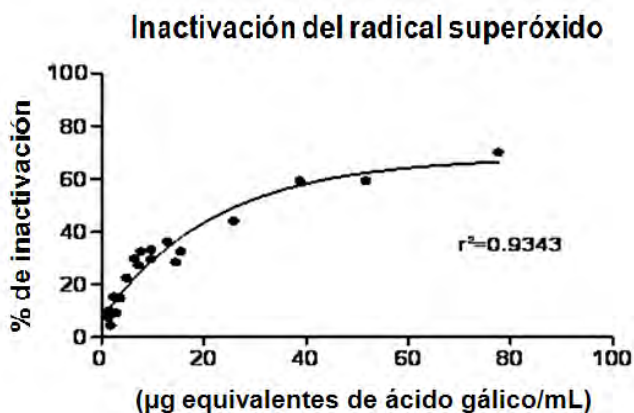


Figura 14. Curva de inactivación del radical superóxido a diferentes concentraciones del EST.  $IC_{50}=30.70$   $\mu$ g de eq de ac gálico/ml.

## 7.2 Protocolo de tratamiento subcrónico en ratas Wistar macho.

- **Curva de crecimiento**

A lo largo del protocolo se registró el peso corporal de los animales como parámetro del desarrollo y de salud del organismo. Como se observa en la figura 15, el grupo E presentó un crecimiento similar al grupo C, lo que nos indica que no hubo efectos antinutrimientales por parte del extracto en las ratas, mientras que el DEN produjo una disminución en peso corporal de los animales, sin embargo, unos días después de su administración el crecimiento de los animales fue similar al grupo control, aunque al final del protocolo no se alcanzó el peso de este grupo. En cambio, los grupos tratados con el carcinógeno (F, D+F y E+D+F) presentaron un crecimiento menor poco después de iniciar la administración del carcinógeno respecto al grupo C, lo que refleja un detrimento en la salud de la rata. Además, podemos ver que el extracto no fue capaz de prevenir tal efecto (Grupo E+D+F).

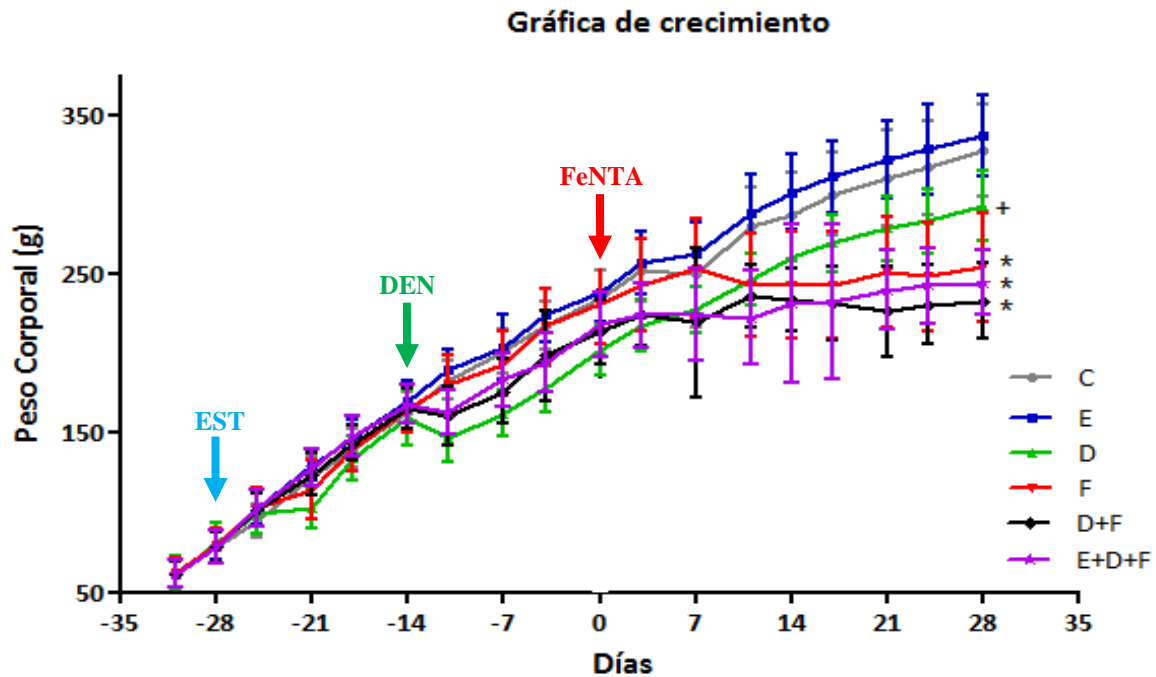


Figura 15. Gráfica del peso corporal (g) de las ratas a lo largo del protocolo subcrónico. Los grupos de estudio fueron Control (C), EST (E), DEN (D), D+F y E+D+F. El día 0 es cuando se inició la administración de FeNTA. El tratamiento con DEN indujo una disminución en el peso, no obstante, no dejaron de crecer; mientras que el tratamiento con FeNTA (F, D+F, E+D+F) retardó el crecimiento de los animales y el EST no es capaz de prevenir este efecto (E+D+F). El \* indica diferencia significativa con respecto al grupo C, + diferencia significativa respecto a todos los demás grupos. En cada punto se presenta la media  $\pm$  EE.

- **Apariencia macroscópica de los riñones**

Por otra parte, se examinaron macroscópicamente los riñones extraídos al término del protocolo. En la figura 16 se muestran imágenes representativas de los grupos de estudio. Los riñones de los grupos E y D presentaron una apariencia y tamaño igual a aquéllos del grupo C. En cambio, los riñones de los grupo F, D+F y E+D+F presentaron una coloración pálida en la corteza, médula irritada signos de un proceso inflamatorio.

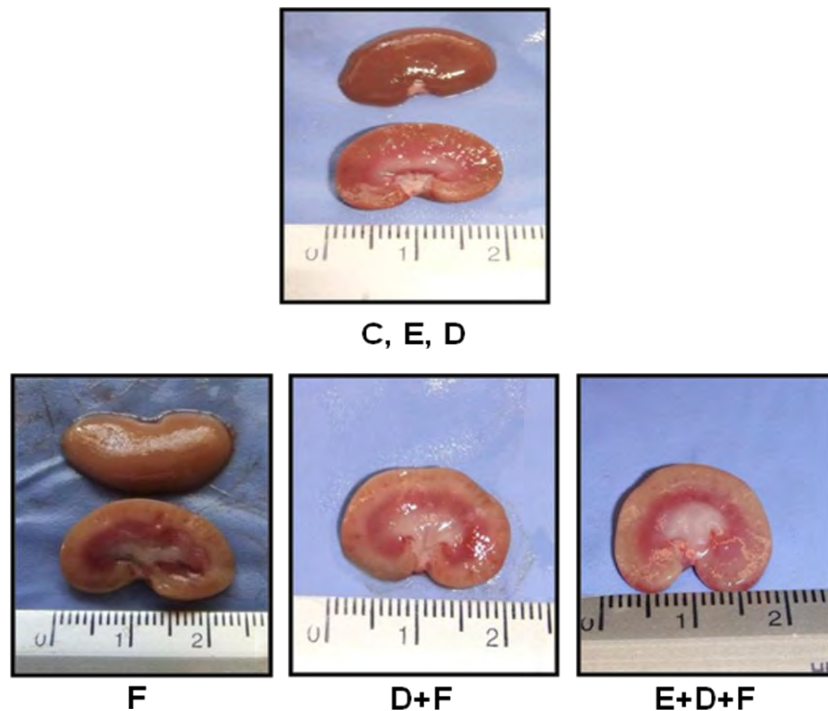


Figura 16. Imágenes representativas de la apariencia macroscópica de los riñones obtenidos a un mes de tratamiento con FeNTA. Los grupos E y D presentan una morfología sana idéntica al grupo C, no así los grupos tratados con el carcinógeno FeNTA, los cuales mostraron alteraciones evidentes como son una corteza pálida, médula irritada y signos de un proceso inflamatorio.

- **Evaluación de la función renal**

Para determinar si los tratamientos aplicados inducen alteraciones en la función renal, se analizaron los valores de nitrógeno uréico en sangre (BUN) al término del estudio. Como se observa en la figura 17, ninguno de los grupos presentó alteraciones en los niveles de este marcador, es decir no se presenta insuficiencia renal.



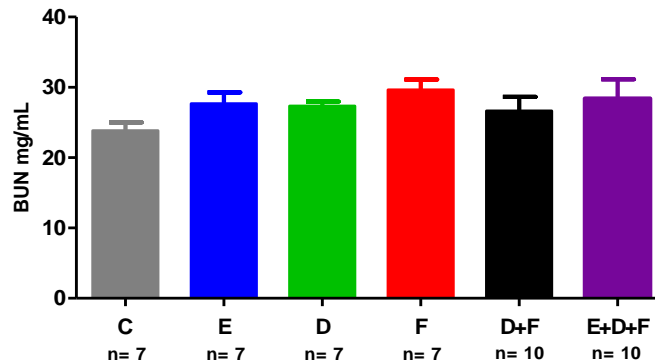


Figura 17. Determinación de los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) en los grupos de estudio. Se observa que no hubo alteraciones en la función renal a un mes de tratamiento con FeNTA. Media  $\pm$ EE.  $P < 0.05$ .

### 7.3 Determinación de la actividad de NF- $\kappa$ B

#### 7.3.1 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

Con la finalidad de determinar el estatus del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en el modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA a un mes de tratamiento, se analizó su actividad a través de la técnica del EMSA. Una vez marcada nuestra secuencia consenso, como se describe en la sección 6.3.4 de la metodología, se prosiguió a estandarizar el EMSA. En la figura 18a se presentan dos autorradiografías representativa de los EMSAs realizados para NF- $\kappa$ B. En la imagen de la izquierda los carriles 1 y 2 se presentan los controles de la técnica, los cuales nos permiten asegurar que la banda observada corresponda a la formación del complejo oligonucleótido marcado-NF- $\kappa$ B (p65): el carril (1) contiene el oligonucleótido marcado sin muestra, la ausencia de banda se debe a que no hay proteína que se una a la secuencia marcada, por lo que no forma el complejo, no obstante, se observan los oligonucleótidos marcados libres en la parte inferior de la placa; mientras que el carril (2) contiene una muestra de extracto protéico nuclear (NF- $\kappa$ B) del grupo control sin oligonucleótido marcado, por lo que tampoco se observa banda, debido a que no hay secuencia que sea reconocida por NF- $\kappa$ B. El siguiente carril corresponde al súper retardo (SS), que consiste en la unión de un anticuerpo específico para p65 al complejo NF- $\kappa$ B-oligonucleótido marcado, a pesar de que no observamos la banda correspondiente al súper retardo en los EMSAs realizados, sí observamos que la banda del retardo disminuye en comparación con las muestras que no tienen el anticuerpo, lo que nos sugiere que existe un reconocimiento del anticuerpo al

complejo NF- $\kappa$ B-oligonucleótido marcado y que p65 forma parte del dímero presente en las muestras. El carril de la competencia contiene el oligonucleótido marcado con un exceso de oligonucleótido sin marcar y una muestra de extracto proteico; la ausencia de la banda se debe a que NF- $\kappa$ B se une a la secuencia no marcada (que está en exceso) indicando así que la banda observada en el retardo (NF- $\kappa$ B-oligonucleótido) no es una banda inespecífica. Por último, los siguientes carriles, al igual que la imagen de la derecha, contienen el oligonucleótido marcado más una muestra de extracto proteico nuclear de cada uno de los grupos estudiados según se indica, en los cuales se llega a observar una banda que corresponde al retardo, es decir, la unión entre NF- $\kappa$ B y su secuencia consenso marcada, donde es evidente una mayor intensidad de la banda en los grupos tratados con FeNTA. En la figura 18b se muestra el análisis densitométrico de las autoradiografías de los EMSAs realizados en el que se observa, que los grupos E y D no presentan alteración en la actividad de NF- $\kappa$ B, lo cual indica que el EST a pesar de su actividad antioxidante no altera el estatus normal de este factor sensible al estado redox y por otro lado el DEN no es suficiente para inducir la actividad del factor a este tiempo. Mientras que el tratamiento con FeNTA (grupos F, D+F, E+D+F) induce un incremento la actividad de NF- $\kappa$ B en comparación con los grupos C, E, D, pero además que el grupo E+D+F tiene un mayor incremento con respecto a D+F.

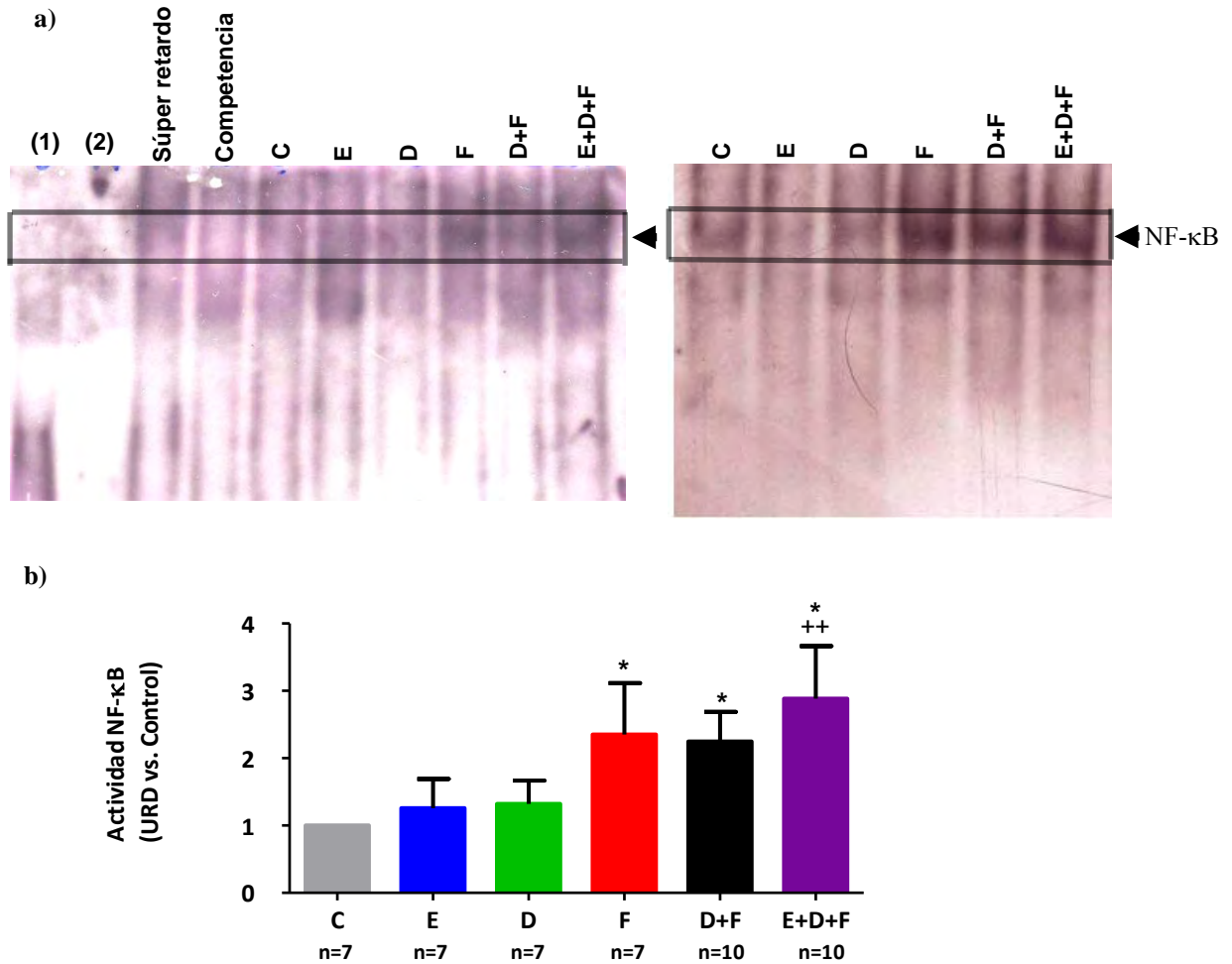


Figura 18. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) para NF- $\kappa$ B. a) Imágenes representativas las autoradiografías. Imagen izquierda, carril (1) oligo sin muestra; (2) muestra sin oligo; súper retardo (muestra D+F+oligonucleótido+anticuerpo anti-p65); competencia (exceso de oligo sin marcar); los siguientes carriles contienen oligo marcado + una muestra de extracto nuclear correspondiente a los grupos C, E, D, F, D+F, E+D+F, al igual que en la imagen derecha b) Análisis densitométrico de las autoradiografías de los EMSAs de NF- $\kappa$ B. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de n de muestras. (\*) Diferencia estadísticamente significativa con respecto a los grupos C, E, D ( $p < 0.05$ ); (++) diferencia significativa respecto al grupo D+F ( $p < 0.05$ ). URD: unidades relativas de densitometría. El tratamiento con FeNTA induce un incremento la actividad de NF- $\kappa$ B y el extracto no es capaz de prevenir este efecto.

#### 7.4 Determinación de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$ por Western Blot

Como se mencionó anteriormente, NF- $\kappa$ B permanece inactivo en el citoplasma, ya que se encuentra unido a su inhibidor (I $\kappa$ B), pero cuando este último es fosforilado y ubiquitinado es enviado a degradación dejando libre a NF- $\kappa$ B, el cual puede traslocarse a núcleo y llevar a cabo su función de factor de transcripción. Es por ello que una forma de determinar la actividad de NF- $\kappa$ B

es midiendo los niveles de su inhibidor ( $I\kappa B\alpha$ ). En este estudio se determinaron los niveles de la proteína  $I\kappa B\alpha$  porque es la principal proteína inhibidora del heretodímero p50/p65, así como también es la mejor caracterizada.

En la figura 19 se muestra una autorradiografía representativa del Western blot y el análisis densitométrico de  $I\kappa B\alpha$  donde se observa que los grupos E y D no presentan alteraciones en los niveles de  $I\kappa B\alpha$ , mientras que los grupos tratados con FeNTA presentan una disminución en los niveles de la proteína en comparación con los grupos controles (C, E y D), lo que nos sugiere que posiblemente el tratamiento con FeNTA induce su fosforilación y con ello su ubiquitinación y degradación permitiendo el traslado de NF- $\kappa$ B del citoplasma al núcleo. Se utilizó como control de carga una banda inespecífica, debido a que se presentaron problemas de detección de los controles de carga convencionales (tubulina y actina).

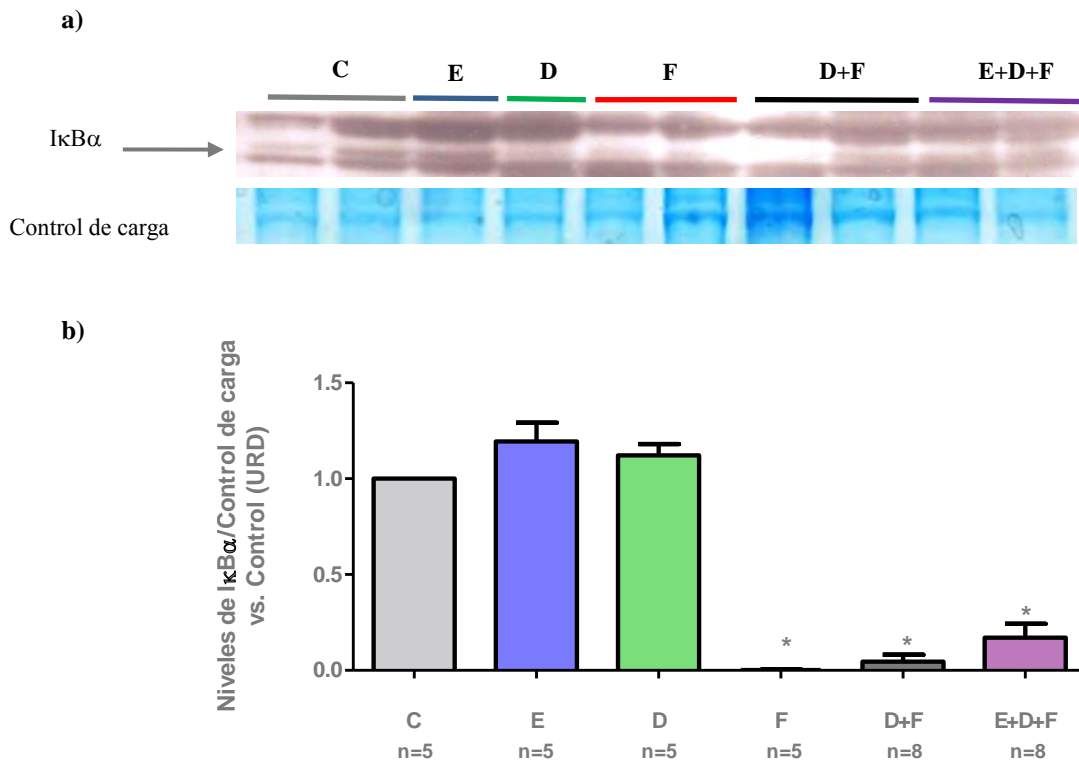


Figura 19. Western blot correspondiente a  $I\kappa B\alpha$  a) Imagen representativa de las autorradiografías y del control de carga. b) Análisis densitométrico de las radiografías ajustado contra el control de carga y con respecto al grupo control. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de n muestras. (\*) Diferencia estadísticamente significativa con respecto a C, E y D ( $p < 0.05$ ). URD: unidades relativas de densitometría.

## 7.5 Determinación de los niveles de EGFR por Western Blot

Una vez evaluada la actividad de NF- $\kappa$ B se determinaron los niveles de proteína producto de uno de sus genes blanco. En este estudio se decidió medir los niveles del EGFR, debido a que este receptor ha sido involucrado en el desarrollo y progresión de diferentes tipos de cáncer, entre ellos el CCR, en donde se ha observado una correlación entre la actividad de NF- $\kappa$ B y los niveles de esta proteína.

Como se observa en la figura 20, los grupos tratados con FeNTA presentaron un incremento notorio en niveles de expresión de EGFR en comparación con los grupos C, E y D, lo cual sugiere que el carcinógeno induce la expresión de EGFR. Para la identificación de la banda correspondiente a EGFR se utilizó como control positivo células HeLa, las cuales lo expresan de manera constitutiva. Se utilizó como control de carga a la tubulina.

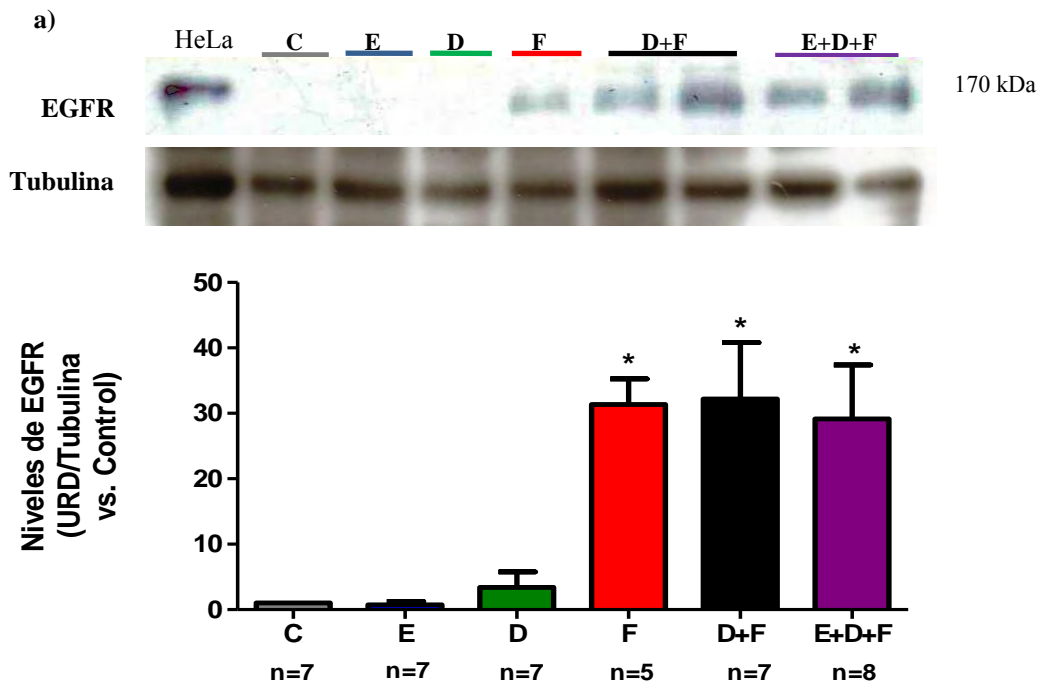


Figura 20. Determinación de los niveles de EGFR por Western blot. a) Imagen representativa del Western blot de EGFR y tubulina. b) Análisis densitométrico de las radiografías ajustado contra tubulina (control de carga) y con respecto al grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  EE. (\*) Diferencia estadísticamente significativa con respecto a los grupos C, E, D ( $p < 0.05$ ). URD: unidades relativas de densitometría. El tratamiento con FeNTA induce un incremento en la expresión de EGFR y el extracto no es capaz de prevenir tal efecto.

## 7.6 Determinación de los niveles de PCNA por Western blot

El Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es otro producto de gen blanco de NF- $\kappa$ B, la cual es una proteína que participa en la síntesis de ADN y es utilizada como marcador de proliferación celular en varios tipos de cáncer. En el CCR se ha reportado un incremento en los niveles de PCNA que se ha relacionado con el grado de avance del tumor y supervivencia del paciente.

En la figura 21 muestras una autorradiografía representativa del Western blot y el análisis densitométrico de PCNA, donde se observa un incremento en sus niveles en los grupos tratados con FeNTA en comparación con los grupos C, E y D, lo cual sugiere que el carcinógeno induce un aumento en los niveles de PCNA. Para el análisis densitométrico se utilizó como patrón de carga a la proteína GAPDH.

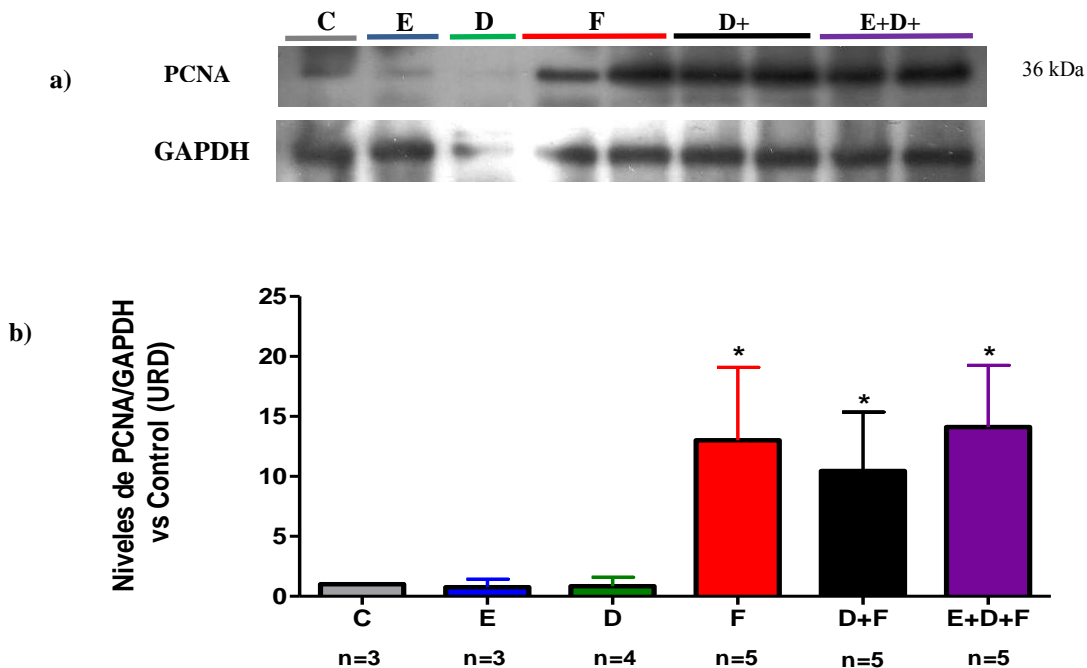


Figura 21 Determinación de los niveles de PCNA por Western blot. a) Imagen representativa de Western blot de PCNA y GAPDH. b) Análisis densitométrico de las autorradiografías ajustado contra GAPDH y con respecto al grupo control. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de n muestras. (\*) Diferencia estadísticamente significativa con respecto a C, E y D ( $p < 0.05$ ). URD: unidades relativas de densitometría. El tratamiento con FeNTA induce un incremento en la expresión de EGFR y, cuyo efecto no es prevenido por el extracto.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La definición de mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de cualquier tipo de cáncer es importante ya que nos permite mejorar estrategias para la prevención, detección oportuna y/o tratamiento del mismo. En el presente trabajo se desarrolló un protocolo de un mes tratamiento con FeNTA, que parece representar una etapa temprana del modelo de carcinogénesis renal, y se analizó el efecto de un EST. Nuestros resultados muestran que las ratas del grupo E presentan un crecimiento similar a las del grupo control, lo cual nos indica que la dosis administrada del EST (100mg<sub>FT</sub>/Kg/día) no tiene efectos adversos sobre la salud del roedor bajo este esquema de tratamiento. Lo anterior es importante dado que se ha reportado que, en dosis altas o bajo ciertas condiciones, los polifenoles pueden actuar como agentes pro-oxidantes o bien tener efectos antinutrimientales, de ahí la importancia de identificar una dosis adecuada (Bravo 1998; Yang *et al.*, 2001; Galati *et al.*, 2004). En nuestro laboratorio se realizaron estudios agudos utilizando dosis de 50, 100 y 150 mg<sub>FT</sub>/Kg/día, en los cuales se observó que la dosis de 100mg<sub>FT</sub>/Kg/día disminuye el aumento en los niveles de peróxido de hidrógeno y protege contra el daño renal inducidos por un tratamiento agudo con FeNTA, mientras que la dosis de 150 mg<sub>FT</sub>/Kg/día tiene efectos secundarios negativos (Vargas-Olvera, 2009). Por otra parte, el DEN produjo una disminución en el peso corporal de los animales, sin embargo, unos días posteriores a su administración el crecimiento de los animales fue similar al del grupo C, aunque el valor del peso no se recuperó. En los roedores tratados con FeNTA se observó un menor crecimiento con respecto a los de los grupos C, E y D que se mantuvo durante todo el estudio, lo cual refleja un deterioro en la salud de los animales.

Por otro lado, a pesar del daño macroscópico observado en los riñones de los grupos tratados con FeNTA, no se presentaron alteraciones en la función renal medida como BUN, lo cual difiere de lo observado en estudios agudos con FeNTA, donde se reporta una severa insuficiencia renal 48 horas después de la administración del carcinógeno (Cruz-White, 2006; Dávalos-Salas, 2006). Esto sugiere que el tiempo estudiado en el presente trabajo representa una etapa distinta a la aguda y, aunado a las alteraciones encontradas en las moléculas estudiadas en el presente y en otros estudios donde incluso se ha detectado ya la presencia de displasia (Vargas-Olvera, 2009; Aguilar-Alonso, 2010), apoya el planteamiento de que con el esquema de tratamiento utilizado se alcanza una etapa temprana de la carcinogénesis. Más aún, en un estudio crónico de carcinogénesis renal por FeNTA realizado en nuestro laboratorio, se obtuvieron tumores de gran tamaño, y aun así no se presentó insuficiencia renal (Vargas-Olvera, 2009). Esto coincide con lo observado en el humano, donde el CCR se desarrolla sin la presencia de alteraciones en la función renal, siendo ésta una de las razones por las que se dificulta su diagnóstico oportuno (Dalgin *et al.*, 2007). Lo anterior muy

probablemente se debe a que las nefronas intactas pueden suplir la función de las nefronas dañadas, es decir, a que los riñones presentan mecanismos de compensación (Dalgin *et al*, 2007).

En relación con las proteínas analizadas (NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , EGFR y PCNA), no se encontraron alteraciones en los grupos E y D, lo cual nos indica que ni el extracto ni el DEN tienen efectos sobre éstas.

En cuanto al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, las alteraciones en su actividad se han relacionado con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, y esto se debe a que regula genes implicados en la proliferación, migración, invasión y evasión de la muerte celular, así como en la inflamación (Chen *et al*, 2008). En el caso del CCR, se ha reportado un incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B en tejido tumoral de pacientes, que correlaciona con una disminución en los niveles de su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  y con un aumento en los marcadores de proliferación y angiogénesis como son EGFR, PCNA y VEGF (Lasson *et al.*, 1996; Oya *et al.*, 2001, Meteoglu *et al.*, 2008). Por otra parte, en estudios *in vitro* en células epiteliales de túbulo proximal tanto de humano (Chen *et al.*, 2001) como de cerdo (Dávalos-Salas, 2006) expuestas a FeNTA, se encontró un incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B, el cual correlaciona con la disminución en los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$ ; mientras que, en un estudio *in vivo* de 4 meses de administración del carcinógeno con dos meses de descanso (similar al protocolo que se desarrolla en nuestro laboratorio), se reportó un incremento en los niveles de NF- $\kappa$ B en tejido renal (Tanveer *et al.*, 2011), aunque estos autores no aclaran si este aumento se vio en tejido tumoral o en tejido renal total. Hasta la fecha, se desconocía el estatus de NF- $\kappa$ B en una etapa temprana del CCR. En el presente estudio, utilizando el método de EMSA se encontró una actividad incrementada de NF- $\kappa$ B en los grupos tratados con FeNTA en comparación con los grupos C, E, D. Así mismo, encontramos que al menos una de las proteínas que constituye al dímero de NF- $\kappa$ B presente en las muestras es la proteína p65 (RelA), ya que para el ensayo se utilizó una secuencia de oligonucleótidos específica para p65, al igual que el anticuerpo empleado para el súper retardo. Este aumento en la actividad de NF- $\kappa$ B correlaciona con una disminución en los niveles de su proteína inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ , lo que sugiere que en los grupos tratados con FeNTA se está llevando a cabo la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ , lo que ocasiona que se disocie de NF- $\kappa$ B, dejándolo libre para que pueda trasladarse al núcleo y llevar a cabo su función de factor de transcripción, mientras que I $\kappa$ B $\alpha$  es ubiquitinada y degradada vía proteosomal (Bowie y O'Neill, 2000; Dolcet *et al.*, 2005; Gloire *et al.*, 2006; Hayden, 2008). De esta forma, la disminución en los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  es una evidencia más del aumento en la actividad de NF- $\kappa$ B en las etapas tempranas de nuestro modelo inducido por FeNTA.



Por otro lado, NF- $\kappa$ B induce la expresión de diversos genes, entre los que están aquéllos que codifican para proteínas involucradas en proliferación celular, como son el EGFR y PCNA. La primera de estas proteínas es un receptor implicado en la transducción de señales extracelulares a través de la activación de vías de señalización río abajo como son la vía PI3K/Akt, RAF/RAS/ERK y JNK/STATs, induciendo procesos biológicos como son proliferación, invasión y supresión de la apoptosis, los cuales están involucrados en la tumorigénesis de muchos tipos de cáncer (Normanno *et al.*, 2006). En el caso del CCR, estudios realizados en muestras de tejido tumoral de pacientes han mostrado un incremento en los niveles del EGFR, cuyo significado clínico es controversial, ya que algunos autores reportan que este aumento es signo de una mala prognosis (Merseburger *et al.*, 2005; Moch *et al.*, 1997) mientras que otros grupos señalan lo contrario (Shiau *et al.*, 2009; Kallio *et al.*, 2003;). Así mismo, se ha reportado una correlación entre el incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B y los niveles de expresión del EGFR en muestras de pacientes con CCR (Oya *et al.*, 2001). Sin embargo, hasta el momento no se habían reportado estudios referentes al estatus del EGFR en el modelo inducido por FeNTA. En este estudio, los resultados obtenidos mostraron un incremento notorio en los niveles de EGFR en los grupos tratados con FeNTA con respecto a los grupos C, E y D, lo cual correlaciona con el incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B; por lo que se sugiere que una de las consecuencias del aumento en la actividad de NF- $\kappa$ B podría ser el incremento en los niveles de EGFR, y que esto podría estar involucrado en la carcinogénesis por FeNTA. Más aún, una de las alteraciones reportadas a un mes de tratamiento con FeNTA en nuestro laboratorio, es el incremento en los niveles de expresión y fosforilación de ERK (Aguilar-Alonso, 2010), molécula que forma parte de la vía Ras/Raf/ERK, que es inducida por el EGFR. De esta forma, se sugiere que el incremento de EGFR podría estar involucrado en la activación de la vía Ras/Raf/ERK y por lo tanto en el aumento en la proliferación celular a este tiempo en el modelo experimental.

Otro de los marcadores moleculares utilizados en la prognosis de algunos tipos de cáncer y producto de la actividad de NF- $\kappa$ B es la proteína PCNA. En tejido tumoral de pacientes con CCR se ha reportado un incremento en los niveles de esta proteína que correlaciona con el grado de avance del tumor y supervivencia del paciente (Dirim *et al.*, 2008). Por otra parte, en el modelo de CCR inducido por FeNTA se ha reportado un aumento en los niveles de PCNA tanto en muestras de tejido renal de roedores tratados durante 3 semanas con el carcinógeno como en tejido tumoral (Dutta *et al.*, 2007). En el presente trabajo se encontró que el carcinógeno induce un incremento en los niveles de PCNA, lo cual coincide con el trabajo de Dutta y colaboradores (2007). Tanto el aumento en los niveles de PCNA como de EGFR apoyan la idea de un aumento en la proliferación

celular al tiempo de exposición a FeNTA estudiado y por lo tanto que representa una etapa temprana de la carcinógenesis.

En resumen, de acuerdo con lo obtenido, se sugiere que el carcinógeno induce la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  ocasionando la liberación de NF- $\kappa$ B y, por lo tanto, un aumento en su actividad, el cual puede ser responsable del aumento encontrado en los niveles de EGFR y PCNA (Figura 22). El aumento en estas proteínas sugiere fuertemente un aumento en la proliferación celular característico en el desarrollo del cáncer. En el modelo inducido por FeNTA, una de las posibles vías de señalización por las cuales el EGFR puede estar induciendo la proliferación celular es a través de la vía Ras/Raf/ERK. Los resultados obtenidos sugieren que estas alteraciones posiblemente estén involucradas en las etapas iniciales del desarrollo del CCR inducido por FeNTA. Así mismo, es posible que las mismas alteraciones se presenten en etapas tempranas en el humano, ya que estos eventos se han observado en tejido tumoral de pacientes con CCR. Además, con base en todo lo anterior se sugiere que el modelo puede ser una herramienta útil para el estudio de esta neoplasia.

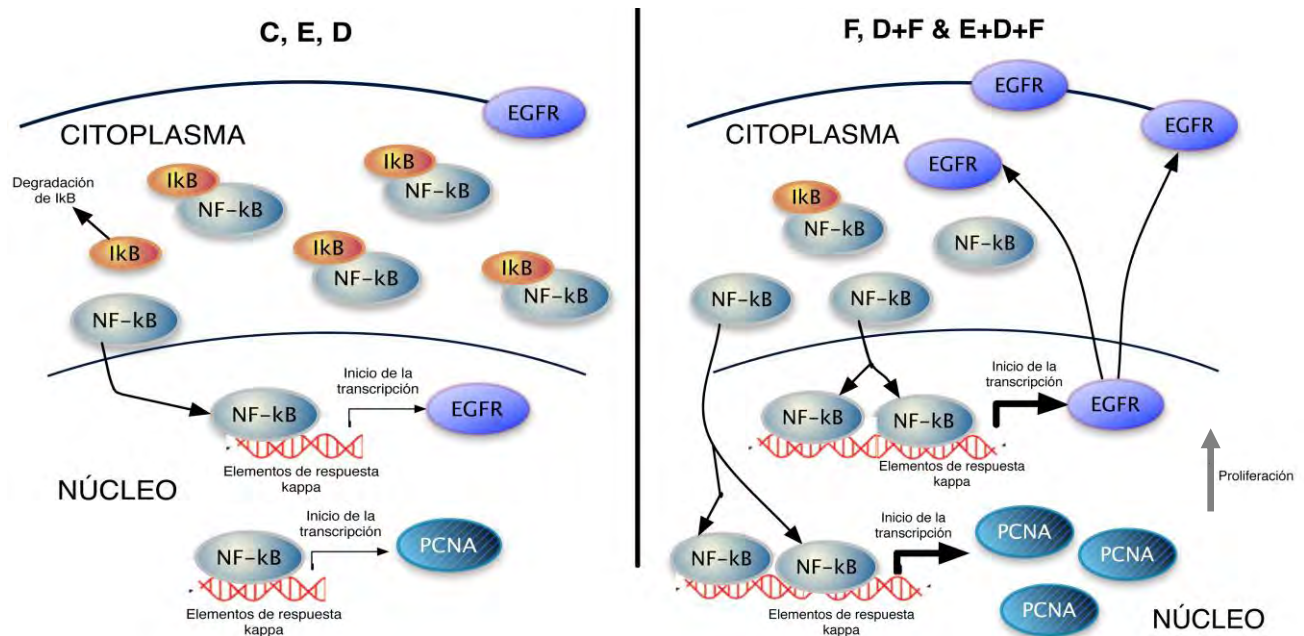


Figura 22. Representación gráfica de los resultados obtenidos para NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , EGFR y PCNA después de un mes de tratamiento con FeNTA. El tratamiento con FeNTA induce la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  ocasionando la liberación de NF- $\kappa$ B y, por lo tanto, un aumento en su actividad, el cual puede ser responsable del aumento en los niveles de EGFR y PCNA, lo que puede estar llevando a un aumento en la proliferación celular.

Por otra parte, NF- $\kappa$ B tiene un papel muy importante en el proceso inflamatorio ya que es el principal factor de transcripción que gobierna la expresión de factores pro-inflamatorios (Sanz *et al.*,

2010). Entonces, otro mecanismo por el cual NF- $\kappa$ B podría estar involucrado en el desarrollo del CCR por FeNTA es a través de la inducción de citocinas proinflamatorias, ya que en el presente trabajo se observaron signos de un proceso inflamatorio y en un estudio previo se identificó por análisis histológico la infiltración de leucocitos (Vargas-Olvera, 2009). El proceso inflamatorio crónico ha sido vinculado con varios tipos de cáncer tales como aquél de pulmón, próstata, mama, estómago, hígado, bazo y varios linfomas (Sanz *et al.*, 2010; Colotta *et al.*, 2009; Chen y Beezhold, 2008). En este proceso se liberan mediadores inflamatorios como quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento, que activan células que participan en la reparación del tejido dañado o en la eliminación del patógeno a través de la generación de estrés oxidante, el cual puede inducir mutaciones y otros cambios en el microambiente conduciendo a la transformación celular y a un incremento en la sobrevivencia y proliferación celular (Maher y Reynolda, 2011). Cuando el estímulo que induce el proceso inflamatorio permanece activo constitutivamente ocasiona, entre otros procesos, una proliferación sostenida, lo que se ha relacionado con el desarrollo del cáncer (Maher y Reynolda, 2011). Por todo lo anterior, una línea de trabajo a seguir sería estudiar la participación de moléculas pro-inflamatorias en el modelo experimental.

En cuanto al efecto del EST, contrario a lo esperado, encontramos un mayor incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B en el grupo E+D+F en comparación con el grupo D+F, lo cual sugiere que el EST exacerba la actividad del factor en combinación con el carcinógeno, ya que no se observa este comportamiento cuando se administra únicamente el extracto. En cambio, los niveles en el grupo E+D+F de los marcadores de proliferación celular analizados, EGFR y PCNA, se mantienen similares a aquéllos del grupo D+F, es decir el extracto no exacerbó su incremento. Por lo tanto, la exacerbación de la actividad de NF- $\kappa$ B por el EST parece no estar dirigiéndose hacia procesos pro-proliferativos. Entonces, tomando en cuenta esto, y que en un protocolo crónico el extracto disminuyó la incidencia y retardó el grado de avance de los tumores, se podría pensar que el incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B en el grupo E+D+F podría estar induciendo genes vinculados con eventos pro-apoptóticos tales como Fas-ligando, ya que se ha demostrado que NF- $\kappa$ B puede inducir genes pro-proliferativos o pro-apoptóticos dependiendo del estímulo que lo active (Perkins, 2012). Sin embargo, esto es sólo una hipótesis que habría que demostrar por lo que se propone como una de las perspectivas del presente trabajo. Por otro lado, sería necesario determinar si estas moléculas presentan el mismo comportamiento en otras etapas del modelo.

## 9. CONCLUSIONES

El tratamiento de un mes con FeNTA induce la actividad renal de NF- $\kappa$ B, lo cual correlaciona con una disminución en los niveles de su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ , así como con un aumento en los niveles de EGFR y PCNA, y estas alteraciones podrían estar involucradas en el desarrollo del CCR en este modelo experimental.

El EST exagera el incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B, pero no en los marcadores de proliferación celular, por lo que parece ser que esta exacerbación no está relacionada con eventos pro-proliferativos. Esto coincide con la protección por parte del extracto previamente observada en relación a la disminución en la incidencia y retardo en el desarrollo de tumores inducidos por FeNTA.

## 10. ANEXOS

### Anexo I: Técnicas

#### AI.1 Cuantificación de fenoles totales

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 de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu en un medio básico, que da como resultado un complejo colorido que absorbe a 765 nm (Pourmorad *et al.*, 2006).

#### Procedimiento:

1. Utilizar tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
2. Colocar 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M
3. Agregar 50  $\mu\text{L}$  de estándar, agua (blanco) o muestra (extracto vegetal)\*.
4. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10.
5. Agitar 5" e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Leer a 765 nm.

\*El extracto vegetal generalmente debe diluirse para que caiga dentro de la curva patrón. Para extracto etanólico de tamarindo es suficiente con realizar diluciones 1:10, 1:20 y 1:50.

#### Curva patrón

De la solución stock de ácido gálico [10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] se realiza las siguientes diluciones:

Concentración [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	$\mu\text{L}$ de estándar	$\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}$ destilada
50	5	995
100	10	990
150	15	985
200	20	980
250	25	975

## AI.2 Inactivación del radical superóxido

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se mide indirectamente por la capacidad del antioxidante de evitar la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los radicales superóxido generados *in vitro* por el sistema de la xantina-xantina oxidasa. La reducción del NBT por efecto del radical superóxido se determina por la formación de formazán el cual puede medirse espectrofotométricamente a 560 nm.

### **Procedimiento:**

Preparación de muestras

1.- Se realizan las diluciones enlistadas en la tabla

Diluciones	Agua ( $\mu\text{L}$ )	Extracto polifenólico ( $\mu\text{L}$ )
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  $\mu\text{L}$  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 minutos en un baño a 27°C.

5.- Detener la reacción con 330  $\mu\text{L}$  de cloruro de cobre.

6.- Realizar la cuantificación espectrofotométrica 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  $\mu\text{L}$  de muestra para cada una de las diluciones utilizadas.

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

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

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

### **AI.3 Extracción de proteínas nucleares**

Con la finalidad de determinar la actividad de NF-κB por EMSA se realizó la extracción de proteínas nucleares de las muestras de corteza renal como se describe a continuación:

Se colocaron 100mg de tejido renal en 800mL de buffer A (HEPES 10 mM, pH: 7.9, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.5 Mm y una tableta de inhibidor de proteasas complete mini® (Roche Indianapolis, IN, EUA) y se homogenizó con un Politrón PT-1035 GT (Kinematica, Bohemia, NY) a 40,248 x g entre 8 a 20 segundos. Se incubó por 2 min en baño de hielo y se adicionó 5 µL de NP-40 (Nonidet P-40, Sigma St. Louis M.) agitándose 10 veces en intervalos de 2 min. Posteriormente se centrifugó (centrifuga Thermo Scientific LEGET RT+, Alemania) durante 15 minutos a 1500 x g y 4°C, se separó el sobrenadante (fracción citosólica), mientras que el precipitado se resuspendió con 100 µL de buffer B (HEPES 20 mM, pH: 7.9, NaCl 420 mM, 25% glicerol, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, PSMF 0.5 mM, DTT 0.5 mM y una tableta del inhibidor de proteasas complete mini® (Roche Indianapolis, IN, EUA) y se mezclaron 10 veces en intervalos de 2 min. Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 13,000 x g a 4°C, el sobrenadante obtenido es la porción que contiene las proteínas nucleares, el cual es almacenado a -20°C hasta el día de su análisis. La determinación de la concentración de proteínas fue realizada por el método de Lowry.

### **AI.4 Cuantificación de proteínas totales**

El método de Lowry se basa en la formación de un complejo entre los iones Cu<sup>2+</sup> con del nitrógeno de los aminoácidos en condiciones alcalinas. Así mismo, el complejo reacciona con el reactivo de

Folin Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotungsteno) para formar un compuesto colorido que puede medirse espectrofotométricamente a 660 nm (Lowry *et al.*, 1951).

**Procedimiento:**

1. Diluir con agua 1:50 el sobrenadante del homogenado (3.33  $\mu\text{L}$  del sobrenadante + 496.67 $\mu\text{L}$  de agua destilada)
2. Colocar 200 mL de muestra de la dilución del homogenado o estándar de albúmina sérica bovina al 0.05% por cada tubo.
3. Adicionar a todas las muestras 1 mL de la solución C e incubar durante 10 minutos.
4. Transcurrido el tiempo, agregar 100  $\mu\text{L}$  de la solución D con agitación simultánea e incubar durante 30 minutos.
5. Leer en el espectrofotómetro a 660 nm.

La concentración de proteínas totales se calcula interpolando la absorbancia de los tubos problema en la curva patrón de albúmina sérica bovina y los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  de proteína/ $\mu\text{L}$  de muestra.

Tabla 2. Curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) al 0.05%

Tubo	Volumen del stock ( $\mu\text{L}$ ) de ASB al 0.05%	H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final de Albúmina sérica Bovina [ASB] $\mu\text{g}/0.2$ mL
1	0	200	Blanco
2	10	190	5
3	20	180	10
4	30	170	15
5	50	150	25
6	70	130	35
7	100	100	50



## **AI.5 EMSA**

Una técnica básica para estudiar la actividad de NF- $\kappa$ B en las fracciones nucleares, para llevarla a cabo se necesita de una secuencia de oligonucleótidos reconocida por NF- $\kappa$ B, la cual debe ser marcada con digoxigenina-11ddUTP (DIG-ddUTP).

### **AI.5.1 Marcaje de la secuencia de oligonucleótidos con DIG-ddUTP.**

Colocar 100 ng de oligonucleótido (en volumen 5  $\mu$ L) en 5  $\mu$ L de agua destilada estéril.

Añadir en baño de hielo y en orden los siguientes reactivos:

- 4  $\mu$ L del buffer de marcado del estuche de Roche (Vial 1)
- 4  $\mu$ L de la solución de CoCl<sub>2</sub> del estuche de Roche (Vial 2)
- 1  $\mu$ L de la solución DIG-ddUTP (Vial 3)
- 1  $\mu$ L de la transferasa terminal (Vial 4)

Mezclar suavemente e incubar 15 min a 37°C

Colocar en baño de hielo y detener la reacción añadiendo 2  $\mu$ L de EDTA 0.2 M pH=8

Adicionar 3  $\mu$ L de agua destilada estéril para obtener un volumen final de 25  $\mu$ L con una concentración de 4ng/ $\mu$ L de oligonucleótido marcado.

### **AI.5.2 Preparación y pre corrimiento del gel:**

Preparar un gel de poliacrilamida 8x8x0.1 cm al 5% en TBE 0.5X

Pre-correr el gel durante 30-60 minutos a 80V

### **AI.5.3 Preparación de las reacciones de unión**

Descongelar los componentes de la reacción y ponerlos en hielo

1.-Preparar en tubos eppendorf de 500  $\mu$ L las reacciones de unión, las cuales se realizan de la siguiente manera (según el manual del estuche).

4  $\mu$ L de buffer de unión (Vial 5)

1  $\mu$ L de poli [d(I-C)] (Vial 9)

1  $\mu$ L de poli L-lisina (Vial 11)

2 ng del oligonucleótido marcado (0.5  $\mu$ L)

Volumen correspondiente a 90 mg de la muestra.

Se ajusta el volumen con agua destilada estéril para alcanzar un volumen final de 25  $\mu$ L.

2.- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

3.- Para el súper-retardo se agrega 2.5  $\mu$ L del anticuerpo para la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.

4.- Añadir a todos los tubos de las reacciones 4  $\mu$ L del buffer de carga, homogenizar suavemente utilizando la micropipeta.

#### **AI.5.4 Electroforesis**

Después del pre-corrimento del gel, las muestras se cargan en los pozos.

El voltaje de corrimiento de las muestras es de 80V durante 2 hrs, el frente de corrimiento debe correr 2/3 del tamaño del gel.

#### **AI.5.5 Transferencia**

1.-Hidratar la membrana de nylon Roche (cat # 1417240) en TBE 0.5X por lo menos durante 10 minutos.

2.-La transferencia es húmeda, para ello se hace un sándwich con el gel y la membrana en una unidad de transferencia limpia, la cual se coloca en una cámara de transferencia para geles de 8x8x0.1 cm.

3.-Transferir a 400 mA durante 30 minutos y en un baño de hielo.

4.-Transcurrido el tiempo de la transferencia se toman las membranas y se colocan, con el bromofenol hacia arriba, sobre un papel filtro, previamente humedecido con buffer SSC 2X y se procede al entrecruzamiento (Cross link).

#### **AI.5.6 Entrecruzamiento**

Se coloca el papel filtro que sostiene a las membranas en un UV crosslinker CL 1000 a 120 mJ durante 60 segundos de exposición utilizando la función de auto-entrecruzar.

#### **AI.5.7 Detección del retardo por quimioluminiscencia**

Se utiliza el estuche Roche, cuyo instructivo es el siguiente:

1.-Inmediatamente después del entrecruzamiento se colocan las membranas en 20 mL de buffer de lavado (Ácido maléico 0.1M, NaCl 0.15M, 0.3%Tween-20,pH=7.5),durante 5 minutos en agitación.

2.-Posteriormente, se elimina el buffer de lavado y se coloca el buffer de bloqueo (Estuche Roche vial 16, diluido en buffer de ácido maléico (ácido maléico 0.1M, NaCl 0.15M pH=7.5) y se deja incubando durante 30 minutos en agitación.

3.-Retirar el buffer de bloqueo e incubar durante 30 minutos en 20 mL de una dilución del anticuerpo de anti-Diogoxigenina-(vial 14) en una proporción de 1:10000 en buffer de bloqueo.

4.-Transcurrido el tiempo se continua con los lavados de la membrana con buffer de lavado (se realizan dos lavados) de 15 minutos en agitación.

5.-Después de los lavados se decanta el buffer de lavado y se incuba con 20 mL de buffer de detección (Tri-HCl 0.1M, NaCl 0.1M, pH= 9.5) durante 5 minutos en agitación.

6.-Colocar la membrana sobre un acetato y se le agrega 500  $\mu$ L de una dilución 1:100 de CSPD (vial 15) en buffer de detección. Por último se coloca otro acetato encima de la membrana y se coloca en un cassette para película y se expone a una película de rayos X durante 12 hrs.

7.-Revelar la película de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **AI.6 Extracción de proteínas de tejido de corteza renal:**

En el momento del sacrificio de los animales se extraen los dos riñones de la rata, se les separa la corteza de la médula y la corteza es dividida en fragmentos, los cuales son almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el día de su análisis.

La extracción de proteínas se realiza de la siguiente manera:

1.-Colocar 100 mg de tejido renal de cada muestra en 600  $\mu$ L de buffer de lisis, el cual contiene DTT 1mM, TRIS HCl 10mM, Glicero 30%, EDTA 1Mm, Triton X-100 al 1%, Ortovanadato 1mM, PMSF 1Mm, Azida de sodio 15mM. A este buffer se le adiciona inhibidores de proteasas "Complete mini<sup>®</sup>" (Roche –Indianapolis, IN, EUA) y de fosfatasas "Phospho shop" (Roche-Indianapolis, IN, EUA).

2.-Homogenizar con un Politrón PT-1035 GT (Kinematica, Bohemia, NY) a 40,248 x g entre 8 a 20 segundos.

3.-Centrifugar los homogenados resultantes a 19,722 rpm.

4.- Separar el sobrenadante y almacenarlo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **AI.7 Western blot**

##### **AI.7.1 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 de 1.0 cm, antes de que se llene.

4.-Añadir 100 mL de isopropanol a la superficie del gel de resolución para aplanar.

5.-Una vez que ha polimerizado el gel de resolución se elimina el isopropanol por decantación.

6.-Hacer tres lavados con agua para eliminar el isopropanol remanente.

7.-Utilizar papel filtro para eliminar la humedad.

8.-Preparar el "stacking gel" al 5% y vaciarlo al molde, sobre el gel de resolución.

9.-Insertar inmediatamente el peine evitando la formación de burbujas.

10.-Esperar a que polimerice y desprender cuidadosamente el peine del gel.

11.-Colocar los moldes con los geles en una cámara de electroforesis y agregar el buffer de electroforesis.

#### **Al.7.2 Preparación de las muestras**

1.-Agregar a un tubo eppendorf buffer de carga, el volumen dependerá de la cantidad de la muestra a colocar.

2.-Colocar el mismo volumen de la muestra y mezclar suavemente hasta obtener un homogenado.

3.-Colocar los tubos en un baño maría durante 5 minutos (Desnaturalización de las proteínas por calor)

4.-Transcurrido ese tiempo se sacan los tubos del baño y se colocan en hielo durante 2 minutos.

5.-Se procede a cargar las muestras en los pozos del “stacking gel”.

#### **Al.7.3 Electroforesis**

Correr los geles a 20mV/ gel durante 2.5 hrs, o hasta que el frente de corrimiento salga del gel.

Una vez terminada la electroforesis, se procede a desmontar los moldes y extraer los geles para la transferencia. A los geles se les elimina el “stacking gel”, el gel de resolución se sumerge en buffer de transferencia.

#### **Al.7.4 Transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)**

1.-Efectuar el siguiente procedimiento 20 minutos antes del término de la electroforesis:

- Recortar cada membrana (IMMPBIOLON-P) con las siguientes medidas 9X8 cm.
- Colocar las membranas en un recipiente con etanol durante 5 minutos.
- Transcurrido ese tiempo se pasan las membranas a otro recipiente con agua destilada durante 2 minutos.
- Por último las membranas son sumergidas en buffer de transferencia por alrededor de 10 minutos como mínimo.

2.-Montar el equipo de transferencia semiseca (BIO-RAD) según las instrucciones del fabricante, el cual consiste en colocar primero un papel filtro Whatman, enseguida se colocan las membranas de PVDF, posteriormente se acomodan los geles sobre estas, evitando la formación de burbujas, por último se pone un segundo papel filtro Whatman y se cierra la cámara de transferencia.

Nota: durante el montaje de la transferencia se debe evitar que las membranas se sequen.

3.-Transferir a 70mA/gel durante 1h y media.

#### **Al.7.5 Bloque de las membranas e hibridación con los anticuerpos**

- 1.-Antes del término de la transferencia preparar la solución de bloqueo, la cual puede ser suero fetal bovino (SFB) o leche descremada al 1% disueltos en solución amortiguadora de fosfatos (PBS-tween).
- 2.-Una vez transcurrido el tiempo de la transferencia se desmonta el equipo de transferencia, se elimina el gel y cada membrana es colocada en un recipiente con solución de bloqueo.
- 3.-Poner en agitación los recipientes con las membranas durante 1 h.
- 4.-Posteriormente se elimina la solución de bloqueo y se coloca la dilución del anticuerpo primario en PBS-tween, previamente preparada.
- 5.-Dejar incubando las membranas toda la noche a 4°C con la dilución del anticuerpo primario.
- 6.-Al día siguiente, eliminar el anticuerpo primario y se realizan tres lavados con PBS-tween con duración de 15 minutos cada lavado.  
En el último lavado se elimina el PBS-tween y se coloca la dilución del anticuerpo secundario previamente preparada. El anticuerpo secundario tiene acoplada la enzima peroxidasa de rábano, la cual va a reaccionar al adicionar su sustrato (detección de proteína).
- 7.-Incubar las membranas con el anticuerpo secundario durante 1 h en agitación.  
Pasado el tiempo de incubación se eliminar el anticuerpo secundario y realizar 3 lavados con PBS-tween con duración de 15 minutos cada uno.

#### **AI.7.6 Detección de proteínas**

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

- 1.-Preparar el agente quimiolumincente en tubo falcón cubierto con papel aluminio.
- 2.-En el cuarto oscuro, apagar la luz blanca y encender 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.-Añadir 400 µL del agente quimiolumincente a la membrana.
- 6.-Colocar encima de la membrana un acetato para distribuir uniformemente el agente quimiolumincente.
- 7.-Poner una placa de autoradiografía encima del acetato y de forma concéntrica a la membrana.
- 8.-Cerrar el cassette y exponer la placa durante un determinado periodo, dependiendo de la intensidad de la señal producida por el agente quimiolumincente.

#### **AI.7.7 Revelado**

- 1.-Abrir cuidadosamente el cassette una vez transcurrido el tiempo de exposición determinado.
- 2.-Transferir las placas de autoradiografía a un recipiente con agente revelador (1:30)-
- 3.-Agitar suavemente el recipiente y esperar hasta que se lleguen a visualizar las bandas.

- 4.-Cuando se observem las bandas de manera nítida, hay que pasar la placa en agua e inmediatamente sumergirla en la solución fijadora y mover cuidadosamente.
- 5.-Dejar las placas en la solución hasta que estén completamente fijadas (se vean transparentes)
- 6.-Transferir las placas a un recipiente con agua.
- 7.-Secar las placas a temperatura ambiente para su posterior análisis.

## **Anexo II: Soluciones**

### **AII.1 Cuantificación de fenoles totales**

#### **Carbonato de sodio 1M**

Pesar 26.5 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , disolver en agua destilada y aforar a 250 mL.

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

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

#### **Folin 2N**

Hacer una dilución 1:10 con agua destilada.

### **AII.2 Inactivación del radical superóxido**

#### **Xantina 0.3 mM**

Pesar 0.0228 g de xantina, agregar 4-5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  400 mM y aforar a 500 mL de agua destilada.

#### **EDTA 0.6 mM**

Pesar 0.01118 g de EDTA y disolverlos en 500 mL de agua destilada con agitación.

#### **$\text{Na}_2\text{CO}_3$ 400 Mm**

Se pesan 21.2 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y se disuelven en 500 mL de agua con agitación.

#### **Albúmina (ABS) 0.1%**

Pesar 0.25 g de albúmina y disolverlos en 250 mL de agua destilada con agitación.

#### **Azul de nitrotetrazolio (NBT) 150 $\mu\text{M}$**

Pesar 0.0368 g de NBT, agregar 300 mL de agua destilada con agitación.

De las soluciones anteriores se realiza la mezcla de reacción, la cual se prepara de la siguiente manera:

Solución	Volumen
----------	---------



Se prepara al momento del ensayo y se obtiene diluyendo el reactivo de Folín–Ciocalteau en agua destilada en una proporción 1:2.

#### **AII.4 EMSA**

##### **Buffer TBE 10X (890 mM TRIS-base, 890 mM ácido bórico, 20 mM EDTA)**

Pesar 107.81 g de TRIS-base, 55.02 g de ácido bórico y 7.4 g de EDTA, disolver todos los reactivos en 1000 mL de agua destilada en agitación.

##### **Buffer de ácido maléico (0.1 M ácido maléico, 0.15 M NaCl pH=7.5)**

Disolver 11.61 g de ácido maléico y 8.766 g de NaCl en 1000 mL de agua destilada estéril, ajustar el pH a 7.5 y aforar.

##### **Buffer de lavado (0.1 M ácido maléico, 0.15 M NaCl, 0.3% tween<sup>®</sup> 20 pH=7.5)**

Disolver 11.61 g de ácido maléico y 8.766 g de NaCl en 1000 mL de agua destilada estéril, añadir 3 mL de Tween 20 y ajustar el pH 7.5.

##### **Buffer de detección (0.1 Tris-HCl, 0.1 M NaCl pH=9.5)**

Disolver 3.94 g de TRIS-HCl y 1.461 g de NaCl en 250 mL de agua destilada estéril, ajustar el pH=9.5).

##### **Buffer de bloqueo 10X**

Disolver el reactivo de bloqueo (vial 16) en buffer de ácido maléico en constante agitación sobre un block caliente; la solución es opaca y a partir de esta solución se prepara alícuotas para preparar soluciones al 1X.

##### **Buffer 2X SSC**

Disolver 17.53 g de NaCl y 8.82 g de Citrato de sodio en 800 mL de H<sub>2</sub>O. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y aforar a un litro. Se esteriliza por autoclave.

#### **AII.5 Western blot**

##### **Gel de poliacrilamida al 30%**

Disolver 29 g de acrilamida y 1 g de N,N'-bisacrilamida en 100 mL de agua destilada. Una vez disueltos los reactivos se filtra la solución y se mide el pH con ayuda de una tira para pH.

##### **Buffer de electroforesis (25 mM TRIS-base, 250 mM Glicina, 0.1% SDS)**

Pesar 3.02 g de TRIS-base, 18.8 g de glicina y 1 g de SDS, disolver todos los reactivos en 1000 mL de agua en agitación y aforar.

##### **Buffer de transferencia (25 mM TRIS-base, 120 mM glicina, 0.1% SDS y 20% metanol)**



Disolver 5.8 g de TRIS-base, 2.9 g de glicina, 0.37 g de SDS en agua con agitación; añadir 200 mL de metanol y aforar la solución a 1000 mL.

**Solución amortiguadora de fosfatos 10X (PBS-tween)**

Pesar 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14.4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y disolverlos en 990 mL de agua destilada con agitación, una vez disueltos los reactivos se añade 10 mL de Tween<sup>®</sup> 20 y se afora la solución.

Para preparar 30mL de FeNTA se toman 20 mL de la solución de Na<sub>2</sub>NTA 120 mM y mezclan con 10 mL de la solución de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 160 mM, posteriormente se ajusta el pH a 7.4 con NaHCO<sub>3</sub>, el cual se agrega lentamente y con agitación. Una vez alcanzado el pH se procede a su administración. El pH se ajusta en el transcurso de la administración, debido a que, el pH de la solución incrementa con el transcurso del tiempo.

## 11. BIBLIOGRAFÍA:

- Aguilar- Alonso F. A., (2010). Alteraciones en AP-1, MAPKS y ciclina D1 inducidas por la exposición subcrónica al carcinógeno renal FeNTA y efecto de un extracto de semillas de tamarindo (EST). Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de química UNAM.
- Athar M. and Iqbal M., (1998). Ferric nitrilotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis* 19(6):1133-9.
- Atkins M. B., George D. J. and Jonasch E., (2001). Renal neoplasia en Brenner & Rector's the kidney. Vol 2, 6<sup>th</sup> edition, WB Saunder's company; 1844-1862.
- Awais M., Narasaki M., Yamanoi Y. and Seno S., (1979). Induction of diabetes in animals by parenteal administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Am J. Pathol.* Jun 95(3):663-73.
- Baeuerle P. A., (2000). Reactive oxygen species as costimulatory signals of cytokine-induced NF- $\kappa$ B activation pathways. *Antioxidant and Redox Regulation of Genes*, Academic Press, 181-201.
- Bahnemann R., (1998). Different patterns of kidney toxicity after subacute administration of Na-nitriloacetic acid and Fe-nitrilotriacetic acid to wistar rats, *Toxicol. Scien.* 46:166-175.
- Benhar M., Dalyot I., Engelberg D., and Levitzki, (2001). Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N terminal kinase and p38 mitogen activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol Cell Biol.* 21: 6913-6926.
- Bowie A. and O'Neill Luke A. J., (2000). Oxidative stress and nuclear factor  $\kappa$ B activation, *Biochem. Pharma.* 59:13-23.
- Bubici C., Papa S., Dean K. and Fandranzoso G., ( 2006). Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. *Oncogene* 25: 6731-6748.
- Chen L., Wang Y., Kairaitis L. K., Zhang B. H. and Harris D. C., (2001). Molecular mechanism by which iron induce nitric oxide synthesis in cultured proximal tubule cell. *Exp Nephrol*, 9: 198-204.

Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C. and Mantovani A., (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30(7):1073-1081.

Cruz A., (2007). Efecto del pretratamiento con un extracto de semillas de uva sobre el daño oxidativo y otras alteraciones inducidas por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en un estudio *in vivo*. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de química, UNAM.

Dávalos M., (2006) Efecto del tratamiento con un concentrado de arándano sobre alteraciones inducidas por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) tanto *in vivo* como *in vitro*. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de química, UNAM.

Dirim A., Haberal AN., Goren MR., Tekin MI., Peskircioglu L., Demirhan B. and Ozkardes H., (2008). VEGF, COX-2 and PCNA expression in renal cell carcinoma subtypes and their prognostic value. *Int. Urol. Nephrol.* 40:861-868.

Dolcet X., Llobet D., Pallares J. and Matias-Guiu X., (2005). NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer, *Virchows Arch* 446: 475-482.

Dutta K., Nishinaka Y., Masutani H., Akatsuka S., Aung T., Shirase T., Lee W-H., Yamada Y., Hiai H., Yodoi J. and Toyokuni S., (2005). Two distinct mechanisms for loss of thioredoxin-binding protein-2 in oxidative stress-induced renal carcinogenesis. *Laboratory investigation* 85:798-807.

Elias J. M., (1997). Cell proliferation indexes: a biomarker in solid tumors. *Biotech. Histochem.* 72: 78-85.

Gago-Domínguez M. and Castela J., (2006). Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radic. Biol. Med* 40(4): 721-733.

Ganesamoni R., Bhattacharyya S., Kumar S., Chauhan A., Mete U., Agarwal M., Mavuduru R., Kaushik G., Mandal A. and Singh S., (2011). Status of oxidative stress in patients with renal cell carcinoma. *J. Urology.* 187: 1172-1176.

Genestra M., (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cel. Signal.* 19: 1807-1819.

Gilmore TD., (2006). Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25: 66.

Gloire G., Dejardin E. and Piette J., (2006). Extending the nuclear roles of I $\kappa$ B kinase subunits, *Biochem. Pharma.* 72: 1081-1089.

Gloire G., Legrand-Poels S. and Piette J., (2006). NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem. Pharma.* 72:1493-1505.

Gloire G. and Piette J., (2009). Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF- $\kappa$ B activation. *Antioxi. & Red. signal.* 11(9): 2209-2221.

Ghosh, S. and Hayden MS., (2008). "New regulators of NF-kappaB in inflammation." *Nat Rev Immunol* 8(11): 837-848.

Hayden MS. and Ghosh S., (2008). Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell* 132: 344-361.

Hoffmann A., Savinova OV. and Ghosh G., (2009). The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes. *Molecular Cell* 34: 591-602.

Hoffmann A., Natoli G. and Ghosh G., (2006). Transcriptional regulation via the NF- $\kappa$ B signaling module. *Oncogene* 25: 6706-67

Hsu T., (2000). Activator protein 1 (AP-1) and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radica Biol Med.*, 28:1338-1348.

Hu ML., (2011). Polyphenols: antioxidant/anticancer agents. *Chang Gung Med J* 34(5):450-462.

Jemal A., (2007). Cancer statistics, CA. *A Cancer Journal of Clinicians*, 57: 43-66.

Jun- Li L., Kamata H. and Karin M., (2005) IKK/NF- $\kappa$ B signaling: balancing life and death- a new approach to cancer therapy, *J. of Clin. Inv.* 115: 2625-2631.

Kallio JP., Hirvikoski P., Helin H., Kellokumpu-Lehtinen P., Luukkaala T., Tammela TL. and Martikainen PM., (2003). Membranous location of EGFR immunostaining is associated with good prognosis in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 89:1266-1269.

Kamata H., Manabe T., Kakuta J., Oka SI. and Hirata H., (2002). Multiple redox regulation of the – cellular signaling system linked to AP-1 and NF-κB: Effects of N- acetylcysteine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the receptor tyrosine kinases, the MAP Kinase cascade and IκB kinases. Department of Life Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Ako-gun, Hyogo, 678-1297.

Jason K., Artero R. and Baylles MK., (2000) Non-radioactive electrophoretic mobility shift assay using digoxigenin-ddUTP labeled probes, *Dros. Inf Serv* 83: 185-188.

Kelma Z. & O'Donnell M., (1995). Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. *Nucleic Acids Res.* 23: 3613-3620.

Kobayashi T. and Kageyama R., (2009). Dynamic advances in NF- κB signalin analysis. *Cell Biol.* vol 2 issue 81 (47): 1-2.

Lee KW and Lee HJ., (2006). The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *BioFactors* 26:105-121.

Levi F., (2004). Declining mortality from kidney cancer in Europe. *Annals of Oncol.* 15: 1130.

Libermann T., (2007). Genomics of renal cell cancer: the biology behind and the therapy ahead, *Clin. Cancer Res.* 13: 685-692.

Lui Y. T., Shang D., Akatsuka S., Ohara H., Dutta K. K., Mizushima K., Izumiya M., Abe K., Nakagama H., Noguchi N. and Toyokuni S., (2007). Chronic oxidative stress causes amplification and overexpression of ptpnz1 protein tyrosine phosphatase to activate b-catenin pathway. *The Am. J. of Pathol.* 171 (6): 1978-1988.

Loo G., (2003). Redox-sensitive mechanism of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *J. Nutr Biochem* 14(2):64-73.

Maher S. G and Reynolds J., (2011). Basic concepts of inflammation and its role in carcinogenesis. *Inflammation and gastrointestinal cancers.* *Cancer Res.* 185:1-23.

Mancini V., (2008). Current insights in renal cell cancer pathology. *Urol. Oncology*, 26: 225-238.

Matés JM., Pérez-Gómez C. and Nuñez de Castro I., (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 32(8):595-603.

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

Merseburger A., Hennenlottter J., Simon P., Kruck S., Koch E., Horstmann M., Kuehs U., Küfer R., Stenzl A. and Kuczyk M., (2005). Membranous expression and prognostic implications of epidermal growth factor receptor protein in human renal cell cancer. *Anticancer Res.* 25:1901-1908.

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

Miyachi K., Fritzler M. J. and Tan E. M., (1978). Autoantibody to nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunology*, 121: 2228-2234.

Nichenametla SN., (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 46(2):161-183.

Okada S., (1982) Induction of rat renal adenocarcinoma by ferric-nitriloacetate (FeNTA). *Jpn Arch Intern Med* 29: 485-491

Okamoto T., Tetsuka T., Yoshida S and Kawabe T., (2000). Redox regulation of NF- $\kappa$ B, antioxidant and redox regulation of genes. *Academic Press*, 203-215.

Omoya T., Shimizu I., Zhou Y., Inoue H., Lu G., Itonaga M., Honda H., Nomura M., (2001). Effects of idoxifene and estradiol on NF- $\kappa$ B activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress, *Liver* 211:183-199.

Pacifico F. and Leonardi A., (2006). NF- $\kappa$ B in solid tumors, *Biochemical Pharmacology* 72: 1142-1152.

Pan JS., (2009). Reactive oxygen species: A double-edged sword in oncogenesis. *World J Gastroenterol.* 15: 1702-1707.

Pasparakis M., (2009). Regulation of tissue homeostasis by NF- $\kappa$ B signalling: implications for inflammatory diseases. *Nature Rev.* (9): 768-788

Pourmorad F., Hosseinimehr S. and Shahabimajd N., (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Af. J. of Biotech.* 5(11):1142-1145.

Preece N E., Hall D E., Howarth J A., King L J. and Parke D V., (1989). Effects of acute and subchronic administration of iron nitrilotriacetate in the rat. *Toxicology* 59: 37-58.

Sanz A., Sánchez-Niño M., Ramos A., Moreno J., Santamaria, Ruiz-Ortega M., Egido J and Ortiz A., (2010). NF- $\kappa$ B in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* 21: 1254-1262.

Schoonbroodt S., Ferreira V., Best-Belpomme M., Boelaert JR., Legrand-Poels S., Korner M. and Piette J., ( 2000). Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I $\kappa$ B $\alpha$  in NF- $\kappa$ B activation by an oxidative stress. *The Am. Asso. of Immunologists*.

Shen F., Kirmani K., Xiao Z., Thirlby B., Hickey R. and Malkas L., (2011). Nuclear protein isoforms: implications for cancer diagnosis and therapy. *J Cell Biochem*. 112 (3): 756-760

Sibilia M., Kroismayr R., Lichtenberger BM., Natarajan A., Hecking M. and Holcman M., (2007). The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Dif*. 75:770-787.

Shiau Pu Y., Yuan Huan C., Zih Kuo Y., Yi Kang W., Yaw Liu G., Mei Huang A., Jeng Yu H., Pin Huang S., Jeng Wu W., Jaw Chiou S. and Chyuan Hour T., (2009). Characterization of membranous and cytoplasmic EGFR expression in human normal renal cortex and renal cell carcinoma. *J. of Biomed. Sci*. 16(82):1-13.

Szatrowski TP. and Nathan CF., (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*. 51(3):794-798.

Tanveer S., Arjumand W., Seth A., Nafees S., Rashid S., Ali N. and Sultana S., (2011). Preclinical renal cancer chemopreventive efficacy of geraniol by modulation of multiple molecular pathways. *Tox*. 290: 69-81.

Takada Y., Mukhopadhyay A., Gopal C., Kundu, Ganapati H., Mahabeleshwar, Singh S. and Aggarwa BI., (2003). Hydrogen peroxide activates NF- $\kappa$ B through tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  and serine phosphorylation of p65. *The J. of Biol. Chem*. 278 (26): 24233-24241.

Thomasson M., (2009). Expression and prognostic value of LRIG1 and the EGF-receptor family in renal cell and prostate cancer . Department of radiation Sciences, Oncology. UMEA University, Sweden.

Thoms H V., Dunlop M. G. and Stark L. A.,(2007). p38-Mediated Inactivation of cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 stimulates nucleolar translocation of RelA and apoptosis in colorectal cancer Cells, *Cancer Res* 67: 1660-1664.

Toyokuni S., (1996) Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Rad. Biol. and Med.* 20:553-566.

Yarden Y., (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Euro. J. of Cancer* S3-S8.

Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M., (2006). Free Radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico.biological interaction.* 160:1-40.

Van der Berg H. and Bast A., (2001). Transcription factor NF- $\kappa$ B as potencial biomarker for oxidative stress, *Brit. J. of Nut.* 86: s121-s127.

Vargas-Olvera C., (2009). Efecto de un extracto de semillas de tamarindo (EST) sobre el desarrollo de cáncer renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de química, UNAM.

Vargas-Olvera CY., Sánchez-González DJ., Solano JD., Aguilar-Alonso FA., Montalvo-Muñoz F., Martínez-Martínez CM., Medina-Ocampos ON. and Ibarra-Rubio ME., (2012). Characterization of N-diethylnitrosamine-initiated and ferric nitrilotriacetate-promoted renal cell carcinoma experimental model and effect of a tamarind seed extract against acute nephrotoxicity and carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.*

Weidner U., Peter S., Strohmeyer T., Hussanätter R., Ackermann R. and Sies H., (1990). Inverse relationship of epidermal growth factor receptor and HER2/*neu* gene expression in human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 50: 4504-4509