



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

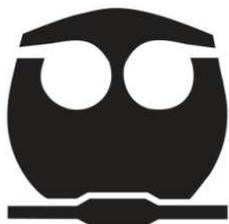
COMPORTAMIENTO DE LA PROTEÍNA CINASA Cz EN ETAPAS  
TEMPRANAS DE UN MODELO DE CARCINOGENESIS RENAL INDUCIDA  
POR FeNTA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUIMICA FARMACÉUTICA-BIÓLOGA

P R E S E N T A:

PATRICIA CURIEL MUÑIZ



MÉXICO, D.F.

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.

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

VOCAL: Dr. José Pedraza Chaverri

SECRETARIO: Dra. María Elena Ibarra Rubio

1er. SUPLENTE: M. en C. José Ignacio Páramo Ramírez

2° SUPLENTE: Dra. Laura Carmona Salazar

**Sitio en donde se desarrolló la tesis:**

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

ASESOR DEL TEMA: Dra. María Elena Ibarra Rubio

\_\_\_\_\_

SUPERVISOR TÉCNICO: José Dolores Solano Becerra

\_\_\_\_\_

SUSTENTANTE: Patricia Curiel Muñiz

\_\_\_\_\_

## RECONOCIMIENTOS

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT con el proyecto No. IN-227010.

La sustentante de la presente tesis contó con el apoyo de una beca por parte del Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT con el proyecto No. IN-227010, en su etapa inicial.

El Colegio de Profesores de la Facultad de Química y la Sección 024 de la AAPAUNAM apoyaron el desarrollo de la presente tesis al haber otorgado la Cátedra “Javier Padilla”.

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

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.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína Activadora 1
BUN	Nitrógeno ureico sanguíneo
CCR	Carcinoma de células renales
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
DAG	Diacilglicerol
DEN	N-dietilnitrosamina
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EST	Extracto de semillas de tamarindo
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FIH-1	Factor inhibidor de HIF 1
FeNTA	Nitrilotriacetato de hierro
FT	Fenoles totales
JNK	Cinasa del amino terminal de c-Jun
HIF	Factor inducible por hipoxia
i.p.	Intraperitoneal
MAPKs	Cinasas de proteína activadas por mitógenos
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NF-κB	Factor nuclear κB
PB	Dominio Phox y Bem1p
PDK-1	Cinasa dependiente de fosfoinosítido 1

PI3-K	Cinasa de fosfatidil inositol trifosfato
PKCz	Proteína cinasa C zeta
PS	Pseudosustrato
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VHL	Von Hippel Lindau
WB	Western blot

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
<b>2.1 Cáncer y estrés oxidante</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Carcinoma de células renales</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) como         modelo de estudio de carcinogénesis renal</b>	<b>4</b>
<b>2.4 Antioxidantes</b>	<b>6</b>
2.4.1. Extracto de semillas de tamarindo	7
<b>2.5 Proteína cinasa C (PKC)</b>	<b>8</b>
<b>2.6 La PKC en cáncer</b>	<b>8</b>
<b>2.7 La PKC y estrés oxidante</b>	<b>9</b>
<b>2.8 Estructura y activación de PKCz</b>	<b>9</b>
<b>2.9 La PKCz en CCR</b>	<b>11</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>12</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>13</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>14</b>
<b>6.1 Preparación del extracto de semillas de <i>Tamarindus indica</i></b>	<b>14</b>
<b>6.2 Caracterización del extracto</b>	<b>14</b>
<b>6.3 Desarrollo del modelo subcrónico de tratamiento con         el carcinógeno FeNTA en ratas Wistar macho</b>	<b>15</b>
<b>6.3.1 Preparación y administración del EST</b>	<b>17</b>
<b>6.3.2 Preparación y administración de N-dietilnitrosamina                 (DEN)</b>	<b>17</b>
<b>6.3.3 Preparación y administración del nitrilotriacetato de                 hierro (FeNTA)</b>	<b>17</b>
<b>6.4 Evaluación de la función renal</b>	<b>18</b>
<b>6.5 Extracción de proteínas del tejido renal</b>	<b>19</b>
<b>6.6 Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry</b>	<b>19</b>
<b>6.7 Determinación de la proteína PKCz total por Western blot</b>	<b>19</b>
<b>6.8 Análisis estadístico</b>	<b>21</b>

<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>21</b>
7.1	Caracterización del extracto	21
7.2	Curva de peso corporal	22
7.3	Observación macroscópica de los riñones	23
7.4	Evaluación de la función renal	24
7.5	Niveles de expresión de PKCz total	25
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>30</b>
<b>10</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>31</b>
10.1	Cuantificación de fenoles totales	31
10.2	Inactivación del radical superóxido	32
10.3	Preparación de nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)	35
10.4	Evaluación de la función renal	35
10.5	Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry	35
10.6	Electroforesis	37
10.6.1	Preparación de los geles para electroforesis	37
10.6.2	Preparación de las muestras	37
10.7	Transferencia a membrana de fluoruro de polivinilo (PVDF)	38
10.8	Detección de proteínas	39
10.9	Revelado de las placas de rayos X	39
<b>11</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>40</b>

## 1. RESUMEN

El cáncer es un problema serio de salud pública en el mundo y en nuestro país. Entre los tipos de cáncer menos comprendidos se encuentra el cáncer renal, del cual, el carcinoma de células renales (CCR) es el más común y presenta muchas complicaciones que llevan a una alta tasa de mortalidad, como es su detección en estadios muy avanzados, por lo que también su estudio en etapas tempranas es casi imposible.

El modelo de carcinogénesis renal inducida en ratas por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) es un modelo ya establecido, sin embargo, aún no está bien caracterizado ni se han identificado las etapas del desarrollo del cáncer. Las evidencias señalan al estrés oxidante como uno de los responsables del desarrollo de CCR en este modelo, no obstante, los mecanismos moleculares directamente involucrados en la carcinogénesis no están definidos. En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha visto que después de un mes de tratamiento con el FeNTA se presentan alteraciones moleculares procarcinogénicas en riñón como un incremento en los niveles de la proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK 1/2), de ciclina D1, del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) y de la proteína cinasa C épsilon fosforilada (p-PKC $\epsilon$ ), así como un incremento en la actividad de los factores de transcripción NF $\kappa$ B y AP-1 y la presencia de displasia.

La superfamilia de las cinasas de proteínas C (PKC) cataliza la fosforilación de diversos sustratos con diferentes efectos biológicos que pueden estar involucrados en el desarrollo de cáncer. PKC $\zeta$ , la isoforma perteneciente al grupo de las PKC atípicas, se encuentra ligada a vías de señalización que activan la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la angiogénesis. De hecho, los tumores de CCR humano están altamente vascularizados y presentan un incremento de VEGF; sin embargo, no se conocen completamente los mecanismos de este incremento.

Por otro lado, las semillas de tamarindo (*Tamarindus indica*) contienen una gran cantidad de compuestos fenólicos, los cuales presentan una capacidad antioxidante notable. Recientemente se ha demostrado que algunos de estos componentes tienen propiedades anticancerígenas, por lo que las semillas de tamarindo podrían ser una fuente importante y muy accesible de fitoquímicos fenólicos con actividad quimiopreventiva. En estudios previos

realizados en nuestro laboratorio se demostró que un extracto etanólico de semillas de tamarindo (EST) tiene un alto contenido de compuestos fenólicos y una notable capacidad de inactivación del radical superóxido, que protege de manera significativa contra el daño severo en la función renal inducido por el FeNTA en estudios agudos, y que disminuye la incidencia y retarda el desarrollo de CCR.

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se planteó estudiar el comportamiento de PKCz en etapas tempranas del modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA como probable mecanismo molecular de carcinogenicidad del FeNTA y el efecto del EST sobre este comportamiento.

Para este fin, se preparó el EST, en el cual se determinó una concentración de fenoles totales de  $1.2 \pm 0.027$  mg<sub>eq. ác. gálico</sub>/mg<sub>EST</sub> y una capacidad de inactivación del radical superóxido *in vitro* con una concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de 30.70 µg/eq ác. Gálico. Así mismo, se desarrolló un protocolo de 1 mes de tratamiento en ratas macho Wistar que se dividieron en 6 grupos: **CONTROL**: vehículos; **EST**: tratado con extracto de semillas de tamarindo en el agua de beber (100 mg FT/kg/día); **DEN**: administración única de N-dietilnitrosamina i.p (200 mg/kg, iniciador tumoral); **FeNTA**: administraciones i.p. 2 veces por semana durante 4 semanas, con incrementos graduales de la dosis cada semana (3, 5, 7 y 9 mg/Kg); **D+F**: tratado con DEN y FeNTA; **E+D+F**: tratado con EST, DEN y FeNTA. Los animales se sacrificaron por decapitación 48 h después de la última administración de FeNTA y se obtuvieron muestras de sangre para determinar los niveles de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) como marcador de la función renal, y de corteza renal para medir los niveles de PKCz por Western blot.

Los niveles de BUN no se encuentran alterados en este esquema de tratamiento. Sin embargo, se encontró un incremento significativo en los niveles de PKCz en los grupos D+F y E+D+F respecto al grupo control. Al comparar los grupos D+F y E+D+F no hay una diferencia significativa lo que indica que el EST no fue capaz de contrarrestar este aumento. El aumento en los niveles de PKCz sugiere que esta enzima podría estar involucrada en la carcinogénesis renal por FeNTA.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cáncer y estrés oxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ERO's) son moléculas que tienen uno o más electrones desapareados y que pueden existir independientemente, como el anión superóxido  $O_2^{\cdot -}$  y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), o bien, a diferencia de los anteriores, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que no tiene electrones desapareados, pero que tiene una reactividad considerable (Valko *et al.*, 2006).

Las ERO's participan en una variedad de procesos biológicos. Por ejemplo, se encuentran involucradas en la respuesta inmune, en eventos de señalización y en el control de permeabilidad vascular (Valko *et al.*, 2006). Sin embargo, la acumulación de estas especies generadas por el metabolismo energético, procesos inflamatorios o factores externos, se ha asociado con la patogénesis de cáncer en humanos, entre otros padecimientos (Matés *et al.*, 1999).

El desequilibrio entre la concentración de las ERO's y los sistemas antioxidantes endógenos conducen a un estado celular conocido como estrés oxidante, lo que provoca daño en lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Khan y Sultana, 2004).

Cada vez hay más evidencia de la relación entre el estrés oxidante y el cáncer, y se han propuesto varios mecanismos mediante los cuales se da esta relación. Algunas ERO's, como el  $H_2O_2$ , pueden funcionar como segundos mensajeros en la modulación de vías de señalización y factores de transcripción sensibles al estado redox celular y relacionadas con el desarrollo de células tumorales (Loo, 2003). Por otro lado, las EROs pueden dañar directamente al ácido desoxirribonucleico (ADN) o mediante los aldehídos formados por la lipoperoxidación que tiene como consecuencia la formación de aductos (Oberley *et al.*, 1999; Burcham, 1998); además, la reparación deficiente del daño al ADN puede conducir a mutaciones en protooncogenes y/o supresores de tumores lo que puede convertir una célula normal en una célula con fenotipo maligno (Umemura *et al.*, 1990).

## **2.2 Carcinoma de células renales**

El carcinoma de células renales (CCR) es el tipo de cáncer urológico más común en adultos, representa el 3% de todos los tipos de cáncer y comprende el 90% de neoplasias renales (Atkins *et al.*, 2000; Jemal *et al.*, 2007). La clasificación histológica distingue varios subtipos de CCR: el de células claras, papilar, cromóforo, oncocitoma y ducto colector, siendo el primero el más común. En México, aunque la estadística no se encuentra actualizada, de acuerdo con el Compendio de Cáncer de 2001 de la Dirección General de Epidemiología en México, se sabe que en el 2001 se presentaron un total de 1577 casos, de los cuales el 81.7% falleció a causa de este padecimiento.

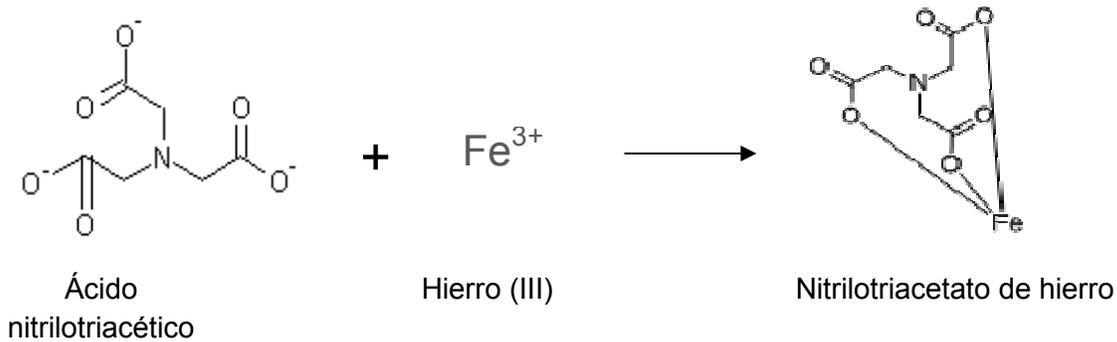
El CCR es una enfermedad histológicamente diversa, es de difícil diagnóstico por ser asintomático sobre todo en etapas tempranas (cuando el cáncer, en general, es más controlable o, incluso, curable) y por lo general se detecta en etapas avanzadas e incluso cuando ya está presente la metástasis (Stadler, 2005; Nelson *et al.*, 2007). Además, la respuesta a las terapias convencionales comúnmente es limitada, ya que los subtipos histológicos presentan diversas alteraciones moleculares y por lo tanto responden de manera diferente a las terapias (Mancini, 2008).

En cuanto a la presencia de estrés oxidante en CCR, se ha visto que muestras de tejido de CCR presentan niveles más elevados de ADN oxidado comparándolas con muestras de tejido normal (Okamoto *et al.*, 1996), y que hay una elevada lipoperoxidación en CCR de células claras (Oberley *et al.*, 1999). Más aún, existen evidencias de que el aumento en la liperoxidación observada en las personas obesas e hipertensas es el mecanismo responsable, al menos en parte, del aumento en el riesgo que corren estos pacientes a desarrollar CCR (Gago-Domínguez *et al.*, 2006).

## **2.3 Nitritotriacetato de hierro (FeNTA) como modelo de estudio de CCR**

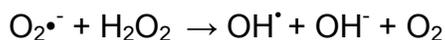
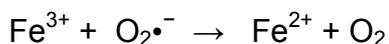
Un modelo experimental de carcinogénesis renal es el de carcinoma de túbulo proximal inducido por nitritotriacetato de hierro (FeNTA) (Bahneman *et al.*, 1998). El FeNTA es un

complejo pequeño formado por la unión de ácido nitrilotriacético con  $\text{Fe}^{3+}$  (Figura 1), el cual es una molécula de fácil absorción (Preece *et al.*, 1989) y su órgano blanco es el riñón.



**Figura 1. Formación del nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).**

Una vez en la sangre, el FeNTA es capaz de pasar a través del glomérulo por ser una molécula de bajo peso molecular, y en el lumen de los túbulos proximales el  $\text{Fe}^{3+}$ -NTA es reducido a  $\text{Fe}^{2+}$ -NTA por los productos de degradación del glutatión: cisteína y cisteína-glicina (Toyokuni *et al.*, 1994). Ya reducido, el hierro es capaz de generar radicales  $\text{OH}^{\bullet}$  mediante la reacción de Fenton Haber-Weiss (Figura 2), dicho radical provoca daño oxidante a biomoléculas (Mizote *et al.*, 2002). Por ejemplo, se ha demostrado la formación de lesiones oxidativas al ADN en sistemas tanto *in vitro* (Kawanishi *et al.*, 2002) como *in vivo* (Toyokuni *et al.*, 1994).



**Figura 2. Generación de ERO's mediante la reacción de Fenton-Haber-Weiss.**

En roedores, administraciones agudas intraperitoneales de FeNTA producen necrosis tubular e insuficiencia renal severa (Cruz-White, 2007; López-Ramos, 2007; Torres-Martínez, 2007) y en esquemas de exposición crónica se desarrolla CCR (Okada, 1982). Además, la administración única de N-dietilnitrosamina (DEN) como iniciador 10 días antes del tratamiento crónico con FeNTA aumenta sensiblemente la proporción de animales que

desarrollan el carcinoma de células renales y reduce el tiempo necesario de exposición al carcinógeno (Athar e Iqbal, 1998; Ansar *et al.*, 1999; Vargas-Olvera, 2009). En nuestro laboratorio, con un esquema de tratamiento crónico de cuatro meses de exposición a FeNTA y dos meses de descanso después de la última administración, se desarrollaron tumores renales en ratas macho Wistar sin que se alterara la función (Vargas-Olvera, 2009). Los datos histopatológicos de ese estudio indican que los tumores corresponden al subtipo histológico de células claras, que es el subtipo más común en el CCR humano y que presentan un aumento en los marcadores de estrés oxidante como 4-hidroxinonal y nitrotirosina. Por otra parte, en un esquema de tratamiento durante 1 mes, los riñones expuestos a D+F presentan displasia, además de alteraciones moleculares tales como: incremento en los niveles de expresión de la ciclina D1, PKCε fosforilada, ERK1/2 y EGFR, así como un aumento en la activación de los factores de transcripción NFκB y AP-1 (Aguilar-Alonso, 2010; Rangel-Gómez, 2011).

## 2.4 Antioxidantes

Dada la vinculación de las ERO's con el desarrollo del cáncer, en los últimos años se ha ampliado la búsqueda de compuestos antioxidantes presentes en alimentos que puedan disminuir el riesgo de desarrollar cáncer (Matés *et al.*, 2011).

Entre los compuestos con mayor capacidad antioxidante están los polifenoles, los cuales se encuentran en una gran cantidad de alimentos como frutas, vegetales y semillas (Bravo, 1998; Rice-Evans, 2001).

Se han probado algunos fitoquímicos fenólicos y extractos ricos en estos compuestos en diferentes tipos de cáncer, tanto *in vivo* como *in vitro*, y se han encontrado resultados positivos, como el del té verde y negro (Halder *et al.*, 2006) y la curcumina (Okazaki *et al.*, 2005). Entre los mecanismos celulares involucrados en el efecto benéfico de los fitoquímicos fenólicos, se han descrito los siguientes: inhibición de la lipoperoxidación, inducción de enzimas antioxidantes, efectos antiinflamatorios, inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular e inhibición de metástasis y angiogénesis (Matos *et al.*, 2000). 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 y

la supresión de la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1 (Lee *et al.*, 2006; Nichenametla *et al.*, 2006).

Entre las especies vegetales que presentan gran contenido de compuestos polifenólicos se encuentra el *Tamarindus indica* conocido popularmente como tamarindo. Los productos derivados de diferentes partes de esta planta (fruto, hoja, corteza y raíces) se usan en la medicina tradicional como antiinflamatorios, laxantes, expectorantes, cicatrizantes y digestivos, entre otros (Parrota, 2001; Komutarin *et al.*, 2004; Maiti *et al.*, 2004).

#### 2.4.1 Extracto de semillas de tamarindo

Se ha comprobado que extractos de tamarindo pueden atenuar las alteraciones causadas por un estrés oxidante exacerbado en diferentes modelos animales (Pumthong, 1999; Ramos *et al.*, 2003). Así mismo, el perfil de los compuestos polifenólicos de la semilla de tamarindo reveló la presencia de seis compuestos principales: procianidinas B<sub>2</sub>, epicatequina, tetrámero, pentámero y hexámero de procianidina y taninos poliméricos (Tsuda *et al.*, 1994; 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 neoplasias. Por ejemplo, la procianidina B<sub>2</sub> inhibe el daño oxidante al ADN inducido por Fe<sup>2+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sakano *et al.*, 2005) y promueve la apoptosis en células de carcinoma de seno y próstata (Agarwal *et al.*, 2007). 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).

En estudios realizados en nuestro laboratorio con un extracto etanólico de semilla de tamarindo (EST) se demostró que posee un alto contenido de compuestos fenólicos y una notable capacidad de inactivación del radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, además de que tiene una buena estabilidad a largo plazo. Así mismo, se observó que la dosis de 100mg<sub>FT</sub>/kg/día no tiene efectos pro-oxidantes o antinutricionales ni a corto ni a largo plazo, y en estudios agudos con FeNTA disminuye la producción renal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y protege de manera significativa contra el daño severo en la función renal inducido por el FeNTA. Por otra parte, la administración del

EST disminuyó la incidencia de CCR en un 21.05 % en estudios crónicos con FeNTA (Vargas-Olvera, 2009).

## 2.5 Proteína cinasa C (PKC)

La superfamilia de las proteínas cinasas C (PKC) cataliza la fosforilación de diversos sustratos con diferentes efectos biológicos indispensables para el buen funcionamiento celular. Esta familia está constituida por 11 isoformas, las cuales están clasificadas en 3 grandes grupos con base en su modo de activación: a) El grupo de las PKC clásicas o convencionales (cPKC) que consiste en las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ II y  $\gamma$ , y que dependen de  $\text{Ca}^{2+}$  y diacilglicerol (DAG) como cofactores; b) las isoformas independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  pero dependientes de DAG pertenecen a las PKC nuevas (nPKC) que incluyen a las isoformas  $\delta$  (delta),  $\epsilon$  (épsilon),  $\eta$  (eta) y  $\theta$  (teta); y c) el grupo conocido como PKC atípicas (aPKC) ya que no dependen de  $\text{Ca}^{2+}$  ni de DAG para su activación, y dentro de este grupo se encuentran las isoformas  $\iota/\lambda$  (iota/lambda),  $\mu$  (mu),  $\nu$  (nu) y  $z$ . Todas las PKC son reguladas por fosforilaciones sucesivas en sitios específicos, lo que desencadena la unión a su cofactor y por lo tanto su activación (Webb *et al.*, 2000; Dutil *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006; Newton, 2010; Rosse *et al.*, 2010).

## 2.6 La PKC en cáncer

PKC participa en procesos celulares tales como proliferación, ciclo celular, diferenciación y apoptosis (Blobe *et al.*, 1994; Stabel, 1994; Liu, 1996). Las aberraciones en la expresión y localización de la PKC se han implicado en el desarrollo de múltiples enfermedades, siendo la relación más prominente de la PKC con la promoción y progresión del cáncer (Fields *et al.*, 2003). La PKC actúa como oncogen en el cáncer de mama, mientras que en el cáncer de colon participa como anti-oncogen (Blobe *et al.*, 1994); esas diferencias se deben a que la expresión de las isoenzimas varía de acuerdo al tipo celular y las condiciones bajo las que se analiza (Jaken, 1996). Aunque se ha estudiado la expresión de las isoformas en diferentes tejidos de rata y ratón y en líneas celulares, poco se sabe sobre la expresión en los tumores humanos así como sus implicaciones funcionales en el comportamiento del tumor (Bareggi *et al.*, 1995). En células cancerosas de riñón, se expresan todas las isoformas de PKC a

excepción de la PKC $\gamma$  y la PKC $\theta$  (Engers *et al.*, 2000). La PKC $\alpha$  funciona como supresor de tumores y se ha encontrado que en este tipo de tumores se encuentra disminuida en comparación con el tejido normal. Por otra parte, los niveles expresión de PKC $\epsilon$  se correlacionan con una alta actividad proliferativa, y su localización membranal es asociada con un potencial altamente invasivo (Brenner *et al.*, 2004; Marengo, 2011).

## **2.7 PKC y estrés oxidante**

El estrés oxidante a niveles bajos induce modificaciones en las proteínas señalizadoras que repercuten en su funcionalidad. Las isoformas de los grupos convencionales y novel de la familia PKC presentan características que las hacen susceptibles a modificaciones oxidantes (Gopalakrishna y Jaken, 2000; Genestra, 2007). Por un lado, el dominio regulatorio N-terminal contiene dedos de zinc que son motivos ricos en cisteína que pueden ser oxidados, lo que desencadena que la función autoinhibitoria del dominio regulatorio quede comprometida y como consecuencia la actividad enzimática sea estimulada (Gopalakrishna y Gundimeda, 2002). Esta susceptibilidad a modificaciones redox se desconoce con las isoformas atípicas, ya que estas carecen de dedos de zinc (Gopalakrishna, 1995). No obstante, Giorgi y cols. (2010) realizaron trabajos con fibroblastos embrionarios de ratón en donde el estrés oxidante desencadena la translocación de las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  del citosol a la membrana celular y PKC $\zeta$  se transloca al núcleo.

## **2.8 Estructura y activación de PKC $\zeta$**

La PKC $\zeta$  posee un dominio regulatorio y un dominio catalítico unidos por una región bisagra al igual que el resto de las PKC (Figura 3). Esta isoforma presenta 3 regiones conservadas (C1, C3 y C4) y 5 regiones variables (V1-V5). La región C1 está dentro del dominio regulatorio y, a diferencia de las isoformas de los grupos convencional y novel, también posee un dominio denominado PB1 rico en cisteínas que le permite a la enzima interactuar con otras proteínas que también poseen este dominio, entre ellas se encuentran MEK5, p62 y Par-6. A través de este tipo de interacciones, la PKC $\zeta$  puede ser regulada (Hirai *et al.*,

2003; Gálvez *et al.*, 2009; Rosse *et al.*, 2010). Las regiones C3 y C4 se encuentran dentro del dominio catalítico de la enzima (Li *et al.*, 2006).

Dentro del dominio regulatorio se encuentra una secuencia antoinhibitoria o pseudosustrato (PS), que se une a la región que acepta al sustrato dentro del dominio catalítico y mantiene a la enzima en una conformación “cerrada” o inactiva (House y Kemp, 1987; Hurley *et al.*, 1997).

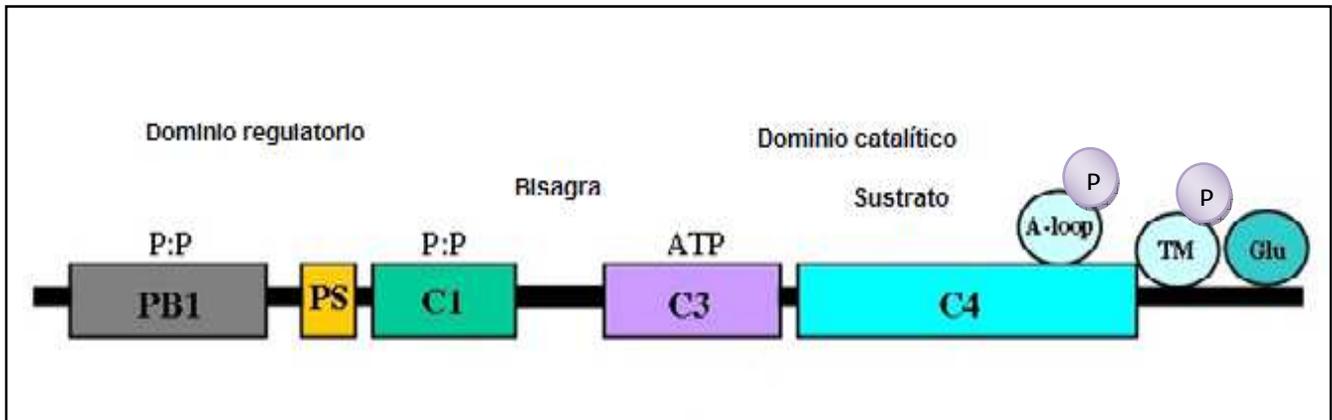


Figura 3. Representación de la estructura de PKCz. PS: pseudosustrato, A-loop: bucle de activación, TM: motivo de giro, Glu: glutamato, P: P: unión de proteínas. Modificado de Freeley *et al.*, 2011.

La conversión de la enzima a su forma “abierta” ocurre cuando la afinidad del PS por la región catalítica decrece en respuesta a la unión de fosfatidilserina o ceramida que se encuentran en la membrana plasmática (Johnson *et al.*, 2000; Newton, 2001; Sonnenburg *et al.*, 2001; Gallegos *et al.*, 2008); este es uno de los dos mecanismos críticos que regulan la actividad y localización de la enzima.

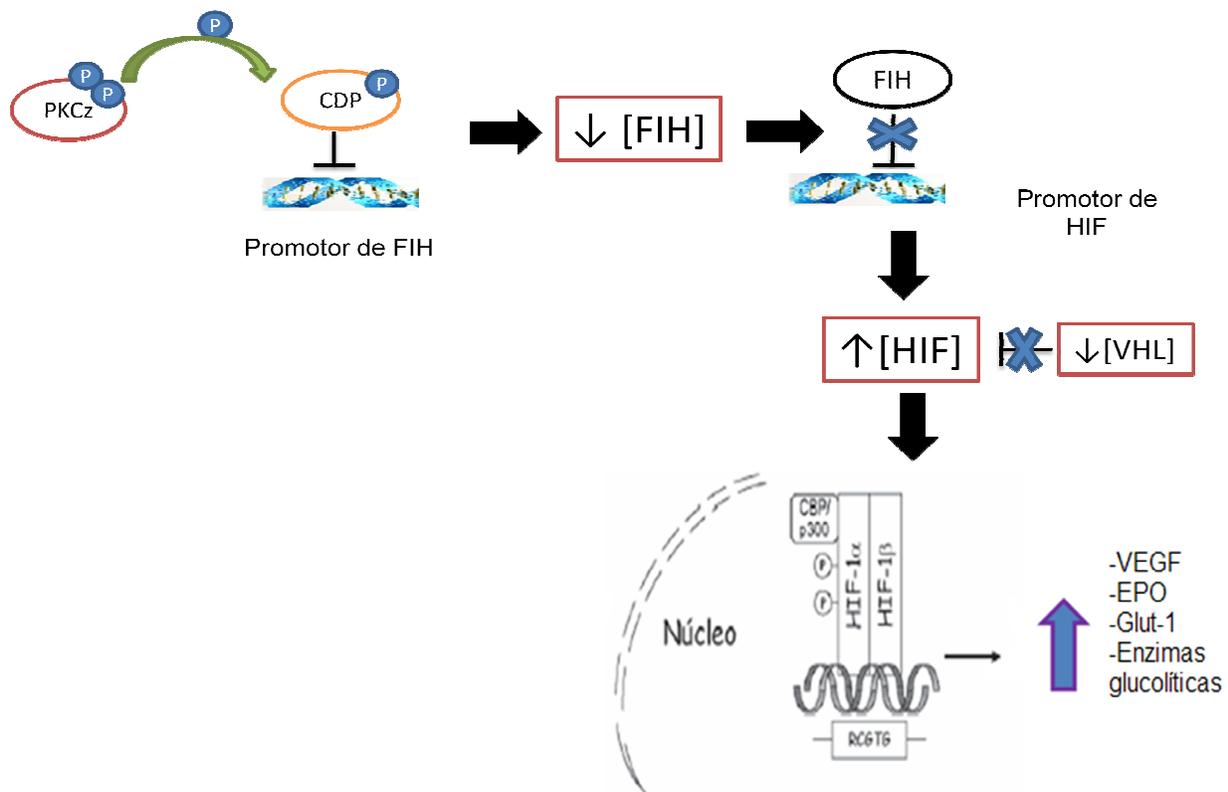
Una vez que la enzima está en la membrana plasmática es necesario que sea fosforilada en dos residuos de aminoácido que se encuentran dentro de la región catalítica de la enzima. La primera fosforilación es desencadenada por la cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1) y ocurre en el residuo Thr<sup>410</sup> dentro del bucle de activación (A-loop); esto desencadena la autofosforilación del residuo Ser<sup>510</sup> dentro del motivo de giro (TM). Además, la enzima posee un tercer motivo llamado motivo hidrofóbico que contiene un residuo de glutamato, que mimetiza la carga negativa que podría aportar un grupo fosfato (Keranen *et al.*, 1995; Hirai *et al.*, 2003). Cualquier alteración en alguno de esos eventos regulatorios daña la señalización por la enzima (Li *et al.*, 2006). Se ha reportado que la unión de fosfatidilserina o ceramida y la

fosforilación ordenada de los residuos Thr<sup>410</sup> y Ser<sup>510</sup> le proporcionan a la enzima una actividad catalítica completa (Keranen *et al.*, 1995; Chou *et al.*, 1998; Good *et al.*, 2004).

## **2.9 La PKCz en CCR**

La PKCz está involucrada en muchos procesos fisiológicos que están relacionados con la carcinogénesis, por ejemplo mitogénesis, supervivencia celular y angiogénesis (Pal *et al.*, 2001).

Frecuentemente se ha encontrado un incremento en los niveles del factor inducible por hipoxia (HIF) en los tumores de CCR humano, y esto se ha atribuido generalmente a alteraciones funcionales de VHL, proteína encargada de ubiquitinar y mandar a degradación a HIF, sin embargo, más recientemente se ha descrito que en líneas celulares de CCR, el aumento en los niveles de PKCz fosforilada está involucrado en la fosforilación del supresor tumoral CDP, desencadenando su unión al promotor del factor inhibidor de HIF (FIH) lo que evita su transcripción, y por lo tanto los niveles de HIF se incrementan. Como consecuencia de esto, se expresan los genes blanco de HIF, entre los que se encuentra VEGF lo que podría estar relacionado con la alta vascularización observada en los tumores de CCR (Datta *et al.*, 2004; Mukhopadhyay y Datta, 2004; Basu *et al.*, 2008. Esto sugiere una nueva vía de señalización para el estudio del aumento de los niveles de HIF en este cáncer (Pal *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2007) (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de regulación de HIF a través de PKCz. HIF: factor inducible por hipoxia, VHL: Von Hippel-Lindau, FIH-1: factor inhibidor de HIF, VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, EPO: eritropoyetina, Glut-1: transportador de glucosa, CDP: supresor transcripcional.

### 3 JUSTIFICACIÓN

El cáncer renal es uno de los tipos de cáncer menos comprendidos, es de difícil diagnóstico, es asintomático en etapas tempranas (cuando el cáncer, en general, es más controlable o, incluso, curable) y presenta una alta tasa de mortalidad.

Se ha demostrado la participación del estrés oxidante en el desarrollo del cáncer lo que ha llevado a proponer el uso de compuestos antioxidantes para controlar o prevenir dicha patología. Entre estos compuestos se encuentran los polifenoles que se presentan en diversas frutas y verduras; tal es el caso del tamarindo y, en especial, la cáscara de su semilla.

En nuestro laboratorio se ha estado trabajando con un modelo de carcinogénesis renal inducida por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en el cual está involucrado el estrés oxidante, sin embargo aún se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en la

malignización celular. Se ha observado que con un tratamiento agudo con una sola exposición a FeNTA y a 1-24 h se desarrolla necrosis e insuficiencia renal, con un protocolo de 1 mes de tratamiento con FeNTA, se obtienen lesiones premalignas así como algunas alteraciones moleculares procarcinogénicas; y, por último, el tratamiento crónico con inyecciones repetidas de FeNTA durante 4 meses lleva al desarrollo de CCR.

Por otra parte, en líneas celulares de CCR humano se ha observado que los niveles de PKCz se encuentran elevados y esto está ligado a vías de señalización que activan la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la angiogénesis.

Por lo anterior se consideró de gran interés averiguar si la enzima PKCz se encuentra alterada en etapas tempranas de la carcinogénesis renal inducida por FeNTA, pudiendo ser uno de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de dicha patología, por lo cual se estudió su comportamiento en tejido renal de ratas expuestas al carcinógeno FeNTA durante 1 mes y el posible efecto de un extracto de semillas de tamarindo.

#### **4 HIPÓTESIS**

Los niveles de PKCz total se encontrarán elevados en etapas tempranas del modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA y la administración de un extracto de semilla de tamarindo disminuirá estos niveles.

#### **5 OBJETIVOS**

##### GENERAL

- Estudiar el comportamiento de la PKCz total en etapas tempranas de un modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA y el efecto de un extracto de semillas de tamarindo.

##### PARTICULARES

- Desarrollar un protocolo de 1 mes de tratamiento con FeNTA en ratas Wistar macho.
- Montar un ensayo de Western blot específico para PKCz total.
- Determinar los niveles de PKCz total por Western blot en corteza renal de los grupos experimentales.
- Investigar el efecto de un extracto de semilla de tamarindo sobre los niveles renales de PKCz.

## 6 METODOLOGÍA

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

Se obtuvo la cáscara de la semilla mediante fragmentación mecánica, posteriormente se colocaron 25 g de ésta en 500 ml de etanol anhidro. Se maceraron durante 24 h a temperatura ambiente (extracción etanólica). Después, se separó por decantación el extracto resultante de las semillas y se concentró al vacío en un rotaevaporador hasta la obtención de un polvo seco. A este polvo se le asignó el nombre de extracto de semillas de tamarindo (EST) (Vargas-Olvera, 2009).

### 6.2 Caracterización del extracto

- Cuantificación de fenoles totales

Se determinó el contenido de fenoles totales del EST mediante la técnica de Folin-Ciocalteu. En esa técnica, los fenoles se oxidan por el reactivo de Folin (ver anexo 10.1), el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, los cuales se reducen por acción de los fenoles, formando una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno. Para la cuantificación se realiza una curva patrón de ácido gálico en la que se interpolan las soluciones con diferentes concentraciones del EST. Los resultados se expresan en  $\mu\text{g eq. de ácido gálico/mL}$  de extracto.

- Evaluación de la capacidad de inactivación del radical superóxido

La inactivación del radical superóxido se midió indirectamente gracias a la capacidad del EST de evitar la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por los radicales superóxido

generados *in vitro* en el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Figura 5). 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) (Ver anexo 10.2). Los resultados se expresan en  $Cl_{50}$  que es la cantidad de EST necesario para atrapar el 50 del  $O_2^{\cdot -}$  formado en el sistema xantina/xantina oxidasa.

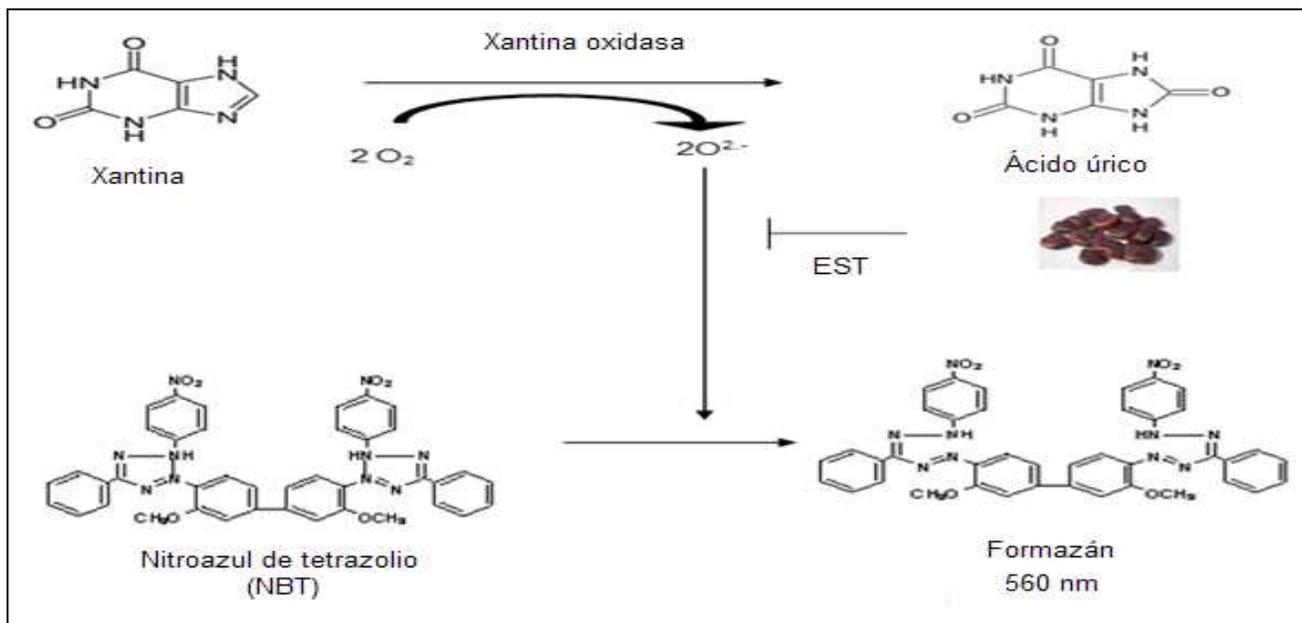


Figura 5. Fundamento para la determinación de la capacidad de inactivación del radical superóxido por el EST.

### 6.3 Desarrollo del modelo subcrónico de tratamiento con el carcinógeno FeNTA en ratas Wistar macho.

Para el desarrollo del protocolo de tratamiento subcrónico con FeNTA se utilizaron un total de 40 ratas Wistar macho (Harlan México-UNAM) que se dividieron en 6 grupos: Control (C), EST (E), DEN (D) (iniciador tumoral), FeNTA (F) (promotor tumoral), DEN+FeNTA (D+F) y EST+DEN+FeNTA (E+D+F). La distribución y tratamiento de las ratas en los diferentes grupos se detalla en la tabla 1, y en la figura 6 se resume el esquema de tratamiento seguido en el presente estudio. Los animales se sacrificaron 48 horas después de la última administración de FeNTA por decapitación. Se extrajeron los riñones y se obtuvieron las cortezas renales, las cuales se congelaron en nitrógeno líquido ( $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y se almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. También se extrajo una muestra de sangre que se utilizó para la evaluación de la función renal.

Tabla 1. Distribución y tratamiento de las ratas Wistar macho en los 6 grupos de estudio.

Grupo	No. de animales	Esquema de tratamiento
Control (C)	7	Vehículos
EST (E)	7	Administración del extracto de semilla de Tamarindus indica (EST) (100 mg FT/Kg/día) en el agua de beber.
DEN (D)	7	Administración i.p. única de N-dietilnitrosamina (DEN) (200mg/kg)
FeNTA (F)	7	Administración i.p. de nitrilotiacetato de hierro (FeNTA) dos veces por semana con aumentos semanales de la dosis (3, 5, 7, 9 mgFe/kg).
D+F	10	Administración del 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.

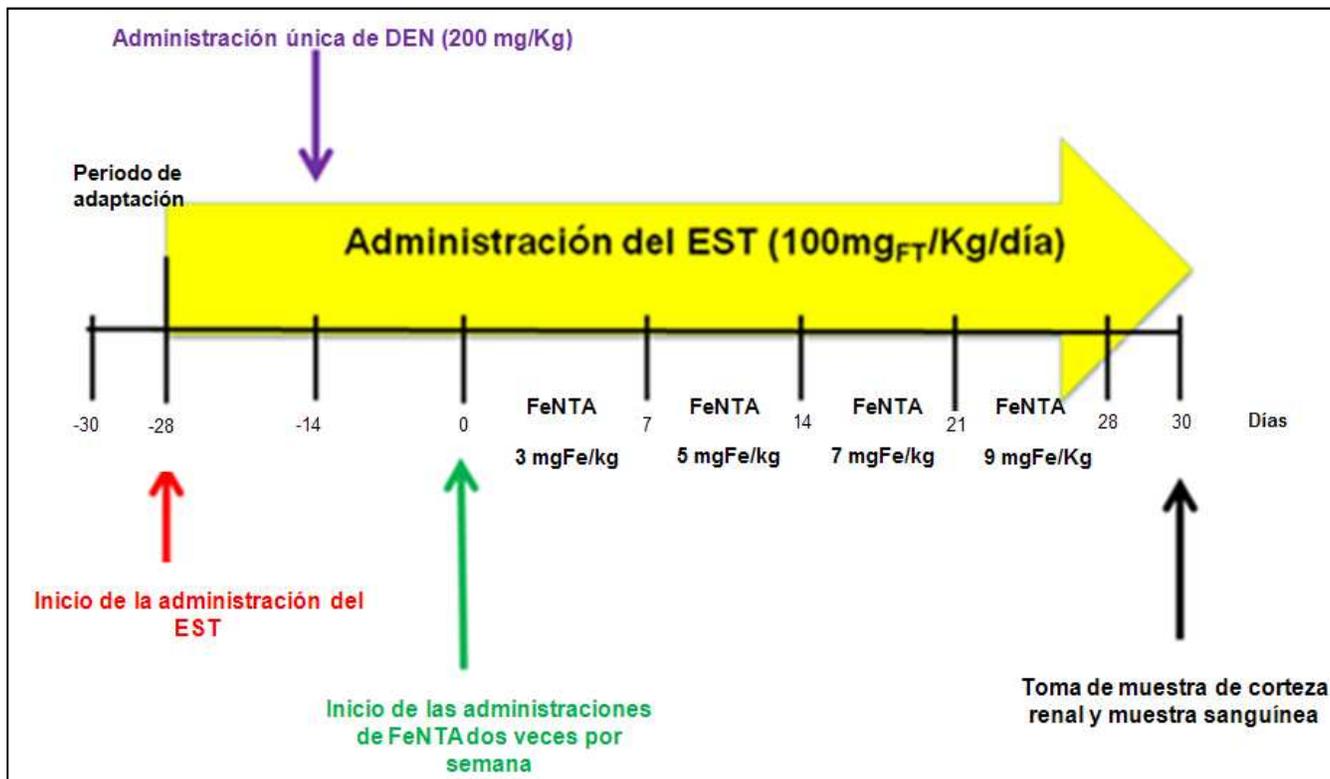


Figura 6. Esquema de tratamiento del protocolo subcrónico con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).

### 6.3.1 Administración del EST

El extracto de semilla de tamarindo se administró a lo largo del protocolo a los grupos correspondientes en el agua de beber en una dosis de 100 mg<sub>FT</sub>/Kg/día, dosis que se ha demostrado en estudios previos que presenta el mayor efecto antioxidante sin producir efectos adversos (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, así como también determinar el peso de los mismos. Dichas mediciones se realizaron a lo largo de todo el protocolo a fin de ir ajustando la cantidad de EST añadido al agua de beber de los grupos correspondientes. El EST se administró 14 días antes de la administración de DEN y durante todo el protocolo.

### 6.3.2 Preparación y administración de N-dietilnitrosamina (DEN)

El DEN se obtuvo de Sigma Aldrich (EUA). La preparación se llevó a cabo diluyendo el contenido del frasco (1 mL de 990-999 mg/mL) en 11 mL de solución salina y ajustando el volumen a administrar dependiendo del peso de cada rata. Su administración fue vía intraperitoneal 15 días antes de la primera administración de FeNTA en una dosis única de 200 mg/Kg. La dosis se eligió de acuerdo a la literatura (Khan y Sultana, 2005) y observaciones previas en nuestro laboratorio (Vargas-Olvera, 2009).

### 6.3.3 Preparación y administración del nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)

Primero se preparó una solución de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 160 mM (Sigma Aldrich,EUA) y otra de nitrilotriacetato de sodio 320mM, utilizando en ambos casos una solución de Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 120 mM como disolvente. Se mezclaron ambas soluciones en una proporción 1:2 v/v y se ajustó el pH a 7.4 con la solución de Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>. La concentración final de hierro es de 2.98 mg<sub>Fe</sub>/mL (Ver anexo 10.3). El FeNTA se administró recién preparado vía intraperitoneal dos veces por semana durante 4 semanas con un aumento gradual de la dosis, partiendo de 3 mg<sub>Fe</sub>/kg hasta alcanzar una dosis de 9 mg<sub>Fe</sub>/Kg, siguiendo el método de Awai (1979), con ligeras modificaciones. La cantidad de solución de FeNTA administrada se basó en la concentración

de hierro y en el peso del animal. Para conocer la cantidad de la solución de FeNTA a administrar se efectuó un cálculo como en el siguiente ejemplo:

Administrar una dosis de 3 mg<sub>Fe</sub>/Kg a una rata cuyo peso es de 0.260 Kg

$$0.260 \text{ Kg} \left[ \frac{1 \text{ mL solución de FeNTA}}{2.98 \text{ mg}_{\text{Fe}}} \right] \left[ \frac{3 \text{ mg}_{\text{Fe}}}{\text{Kg}} \right] = 0.261 \text{ mL de solución de FeNTA}$$

#### 6.4 Evaluación de la función renal

Los riñones están involucrados en diversas funciones críticas del organismo como son la regulación del volumen de fluidos, electrolitos y estado ácido-base, así como la eliminación de productos de desecho. Una de las consecuencias más comunes en la alteración en la función renal es la excreción inadecuada de diversos metabolitos, así como la pérdida de proteínas. La urea es un producto de desecho que se sintetiza a partir de amonio, el cual se produce por la desaminación oxidante de los aminoácidos. Como marcador de función renal se utilizó la determinación del nitrógeno ureico sanguíneo (BUN por sus siglas en inglés) en muestras de suero sanguíneo. La urea presente en la muestra reacciona con el o-ftalaldehído en medio ácido originando isoindolina, un compuesto colorido que puede cuantificarse espectrofotométricamente a 510 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de la urea en la muestra (Figura 7) (Anexo 10.4).

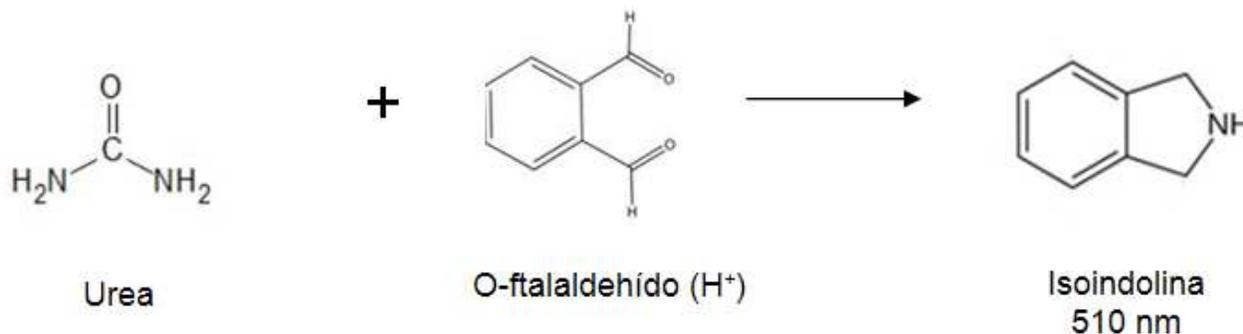


Figura 7. Fundamento para la determinación de los niveles de nitrógeno ureico sanguíneo.

## 6.5 Extracción de proteínas del tejido renal

Para estudiar las proteínas de interés en las muestras, se homogenizaron 100 mg de corteza renal en 650 $\mu$ L de amortiguador de lisis pH 7.4 en baño de hielo, cuya composición es: 1,4-ditiotreitol (DTT) 1 mM, TRIS HCl 10 mM, glicerol 30%, EDTA 1 mM, triton X-100 al 1%, ortovanadato 1 mM, fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 1 mM y azida de sodio 15 mM con inhibidores de proteasas y de fosfatasas. Los homogenados obtenidos se centrifugaron a 13,500 rpm (centrífuga Thermo Scientific Legend RT+, Alemania) a 4°C durante 30 min, y posteriormente el sobrenadante se recuperó y almacenó a -20°C hasta el día de su análisis. A cada homogenado se le determinó el contenido de proteínas totales mediante el método de Lowry que se describe a continuación.

## 6.6 Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry

El método de Lowry se basa en la formación de un complejo entre iones  $\text{Cu}^{2+}$  con el nitrógeno de los aminoácidos en condiciones alcalinas. Este complejo reacciona con el reactivo Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotungsteno) para formar un compuesto colorido que puede medirse espectrofotométricamente a 660 nm. Los resultados se expresan como  $\mu\text{g}_{\text{proteína}}/\mu\text{L}$  (Anexo 10.5).

## 6.7 Determinación de la proteína PKC $\alpha$ total por Western blot

La evaluación de los niveles de PKC $\alpha$  total se realizó mediante la técnica de Western blot. El Western blot, o inmunoblot, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, como un extracto tisular. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Posteriormente son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilo (PVDF)) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella (Towbin *et al.*, 1979).

Con base en la determinación de proteínas totales por el método de Lowry, se calculó el volumen de homogenado de corteza renal necesario para cargar 50  $\mu\text{g}$  de proteína en cada

pozo de los geles de la electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). La electroforesis se corrió de 3 h a 90 mV. Posteriormente se realizó la transferencia semiseca (Transblot SD semidry Transfer Cell, BioRad) de las proteínas a una membrana de PVDF (Immobilion-P, Millipore Corporation, MA, USA) durante 1 h y media a 300 mA (Anexo 10.7). Una vez terminada la transferencia, se bloqueó la membrana con leche descremada al 1% durante 1 h. Después se hibridó durante toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal específico de ratón anti PKCz (H-1 Santa Cruz Biotechnology). Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.1%, durante 15 min cada vez. Posteriormente, se incubaron una hora con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a la peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, EUA). En la tabla 2 se muestran algunas condiciones probadas para la detección de PKCz total. Transcurrido ese tiempo se eliminó el anticuerpo secundario y se realizaron tres lavados con PBS de 15 min cada uno. Por último, se adicionaron los sustratos de la peroxidasa (luminol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Millipore Immobion™ Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore Corporation, MA, USA) (anexo 10.8) y se expusieron las membranas a una placa de rayos X (anexo 10.9). Las placas obtenidas se analizaron por densitometría utilizando el programa Image J (Broken Symmetry Soft). Se realizó esta determinación con PKCz y el control de carga. Posteriormente, en todos los grupos experimentales se obtuvo la relación entre PKCz y el control de carga para poder ajustarla con respecto al promedio de la relación PKCz/ control de carga del grupo control. Los datos se expresaron como unidades relativas de densitometría (URD) y se graficaron con el programa “Graphpad Prism” versión 5.

Tabla 2. Condiciones probadas inicialmente para el Western blot (WB) de PKCz total.

	WB1	WB2	WB3	WB4	WB5
<b>Proteínas totales cargadas en el gel (µg)</b>	50	50	50	50	50
<b>Anticuerpo anti PKCz</b>	1:200	1:500	1: 1500	1:1000	1: 1250
<b>Anticuerpo secundario</b>	1:60 000	1:40 000	1:60 000	1: 50 000	1: 60000
<b>Gel de poliacrilamida al 8%</b>					
<b>Tiempo de electroforesis: 3 h</b>					
<b>Bloqueo: Leche descremada 1%</b>					

Finalmente, las condiciones ideales para la detección de PKCz total se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones para la detección de PKCz total.

Proteína	Proteínas totales cargadas en el gel ( $\mu\text{g}$ )	Anticuerpo Primario	Anticuerpo secundario	Gel de poliacrilamida al 8% Tiempo de electroforesis: 3h Bloqueo: Leche descremada 1%
PKCz total	50	1:1250	1:60 000	

### 6.8 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media  $\pm$  error estándar. Los datos se analizaron por un análisis de varianza (ANOVA) de comparaciones múltiples con el programa PRISM<sup>®</sup> 4.00 (GraphPad) y una prueba post-ANOVA de Newman-Keuls para identificar las diferencias significativas utilizando un valor de  $p \leq 0.05$ .

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Caracterización del EST

#### Fenoles totales e inactivación del radical superóxido

Los valores de absorbancia de cada una de las diluciones del EST se interpolaron en una curva patrón de ácido gálico. El EST presentó 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 inactivación del radical superóxido usando el sistema generador xantina-xantina oxidasa y su acoplamiento para generar formazán a partir de nitroazul de tetrazolio (Figura 8). Se obtuvo una  $CI_{50}$  de 30.7  $\mu\text{g/mL}$ , lo que demuestra una buena capacidad antioxidante si lo comparamos con otros antioxidantes comúnmente utilizados como el ácido ascórbico cuya  $CI_{50}$  es de 66  $\mu\text{g/mL}$  (Cruz-White, 2007).

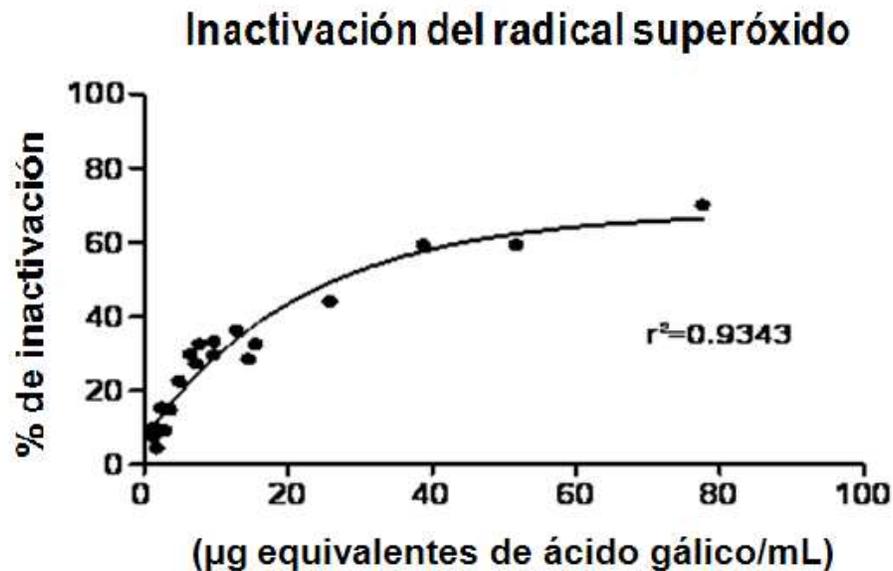


Figura 8. Curva de inactivación del radical superóxido a diferentes concentraciones del EST.  $CI_{50}=30.70$  µg de eq. de ácido gálico/ml.

## 7.2 Curva de peso corporal

A lo largo del protocolo se registró el peso corporal como indicador de la condición física de los animales (Figura 9). El grupo control presentó un crecimiento normal característico de una rata sana, al igual que el grupo E, lo que nos indica que no hubo efectos antinutricionales por parte del extracto en las ratas. En el grupo D se observó una disminución del peso corporal después de la administración de este iniciador tumoral; sin embargo, el crecimiento se recupera pocos días después siendo similar al del grupo control, aunque el valor del peso al final del estudio siguió siendo menor. En cambio, los grupos F, D+F y E+D+F presentaron un crecimiento menor que el grupo control, lo que refleja un detrimento en la salud de las ratas.

### Gráfica de crecimiento

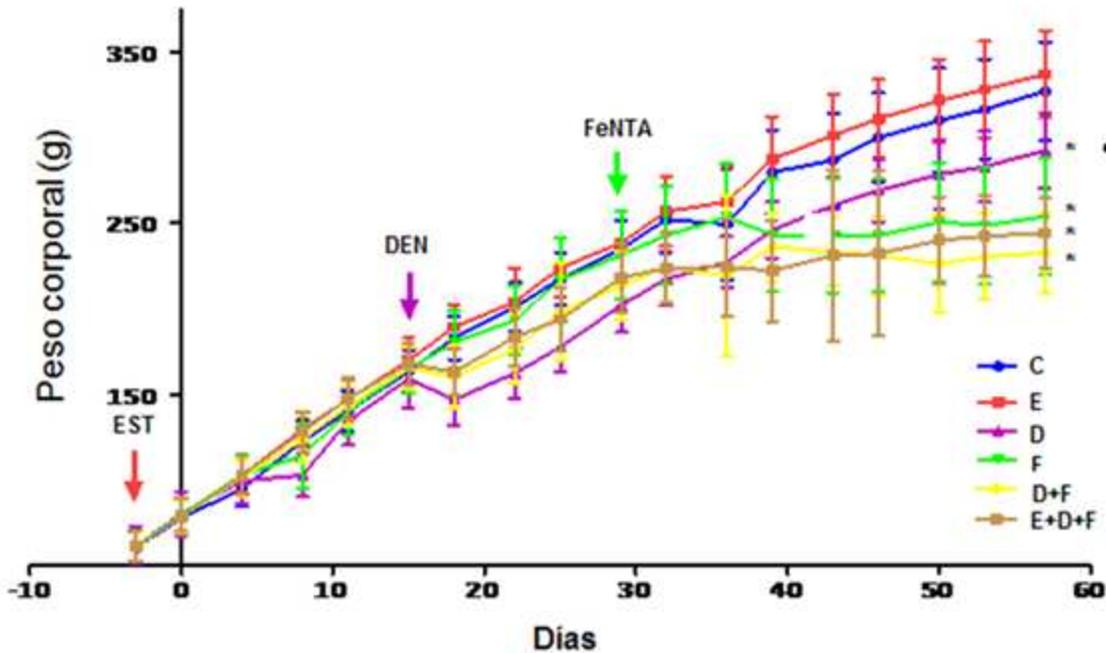


Figura 9. Gráfica de peso corporal a lo largo del protocolo. El tratamiento con el iniciador DEN ocasiona una disminución en el peso de las ratas, sin embargo, el crecimiento se recupera pocos días después aunque el valor del peso al final del estudio siguió siendo menor al del grupo control. En cambio, los animales de los grupos tratados con el carcinógeno FeNTA retardaron su crecimiento y el extracto no fue capaz de proteger. \* diferencias significativas vs grupo control y • diferencias del grupo D respecto a los otros grupos. Cada punto representa la media  $\pm$  EE ( $p < 0.05$ )

### 7.3 Observaciones macroscópicas de los riñones

En la figura 10 se presentan imágenes representativas de la apariencia macroscópica de los riñones extraídos al final del protocolo. Como se puede observar, en los riñones representativos del grupo C hay una apariencia sana y tamaño normal, esta apariencia también se observó en los grupos E y D. En cambio, los riñones de los grupos F, D+F y E+D+F presentan una coloración pálida en la corteza y una médula irritada, así como la presencia de un proceso inflamatorio.

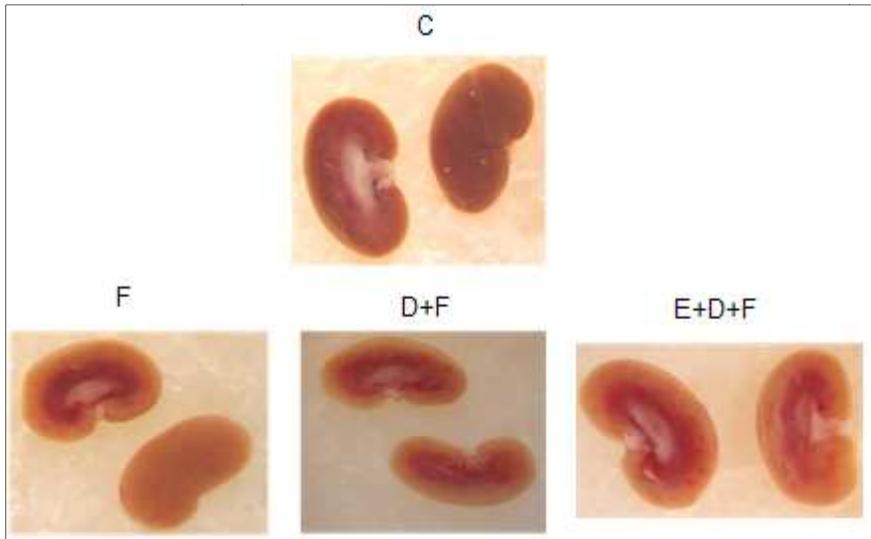


Figura 10. Fotografías representativas de la apariencia macroscópica de los riñones del grupo control y grupos tratados con FeNTA obtenidos al final del protocolo de un mes de tratamiento con FeNTA. El riñón del grupo control muestra un tamaño y apariencia sana, en cambio, los riñones de los grupos tratados con FeNTA muestran una corteza pálida y la médula irritada, así como un proceso inflamatorio. Los riñones de los grupos D y E presentaron una apariencia similar a la del grupo control (imágenes no mostradas).

#### 7.4 Función renal

Con la finalidad de determinar si los tratamientos aplicados inducían alteraciones en la función renal, se analizaron los valores de BUN. Como se observa en la figura 11, no se presentó falla en la función renal en ninguno de los grupos de estudio.

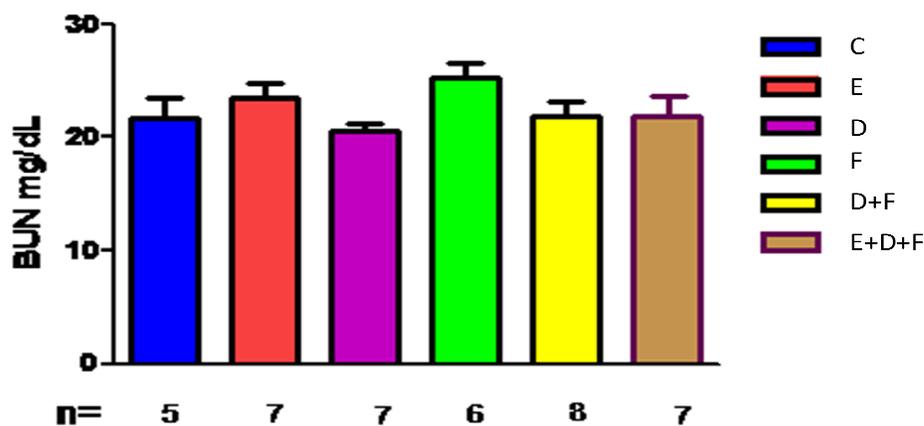


Figura 11. Niveles de BUN como marcador de la función renal. Ningún grupo presentó alteraciones. Las barras representan la media  $\pm$  EE.

#### 7.5 Niveles de expresión de PKCz total.

- **PKCz total**

Con la finalidad de conocer el estatus de PKCz total, se montó la técnica de Western blot para la detección de esta proteína. En el panel A de la figura 12 se observa una autorradiografía representativa de la banda de correspondiente a PKCz total, en donde se nota claramente un aumento en sus niveles en los grupos F, D+F y E+D+F. En la parte inferior del panel se muestra la banda inespecífica que se utilizó como control de carga para la corrección de los valores de PKCz. En el panel B se presentan los valores del análisis densitométrico para la detección de PKCz total. Como se puede observar, hay un aumento en los niveles de PKCz en los grupos F, D+F y E+D+F, sin embargo, sólo los grupos D+F y E+D+F presentan diferencia significativa respecto al grupo control. Entre estos dos grupos no hay diferencia significativa, lo que sugiere que el EST, con el esquema de tratamiento utilizado, no fue capaz de proteger contra este aumento. En el caso del grupo F, que no se presentó diferencia estadística con el grupo control, tampoco fue significativamente diferente de los grupos D+F y E+D+F, lo que indica que sí hay un aumento en los niveles de PKCz, pero que este aumento es menor que en esos grupos.

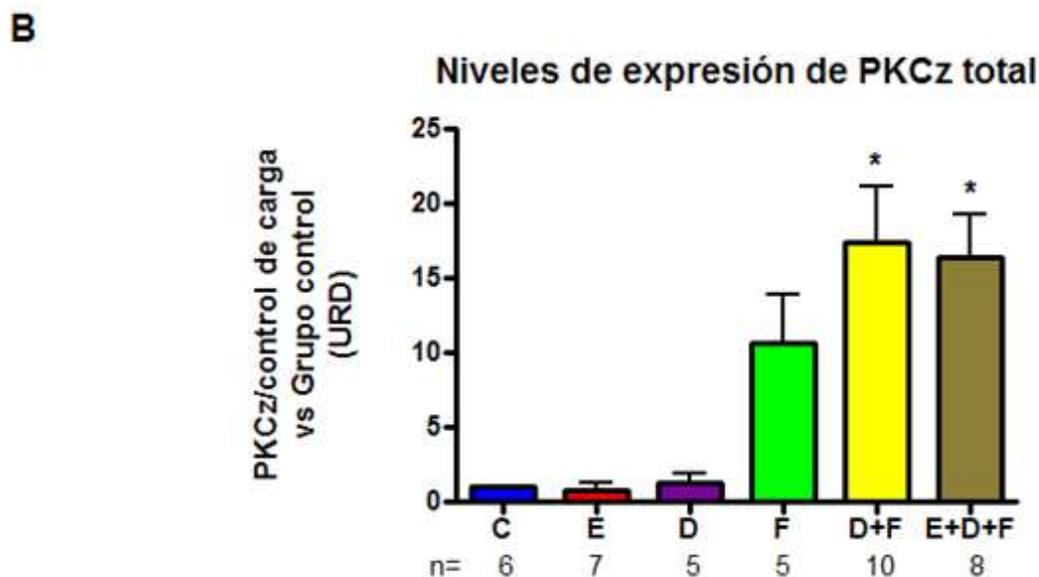
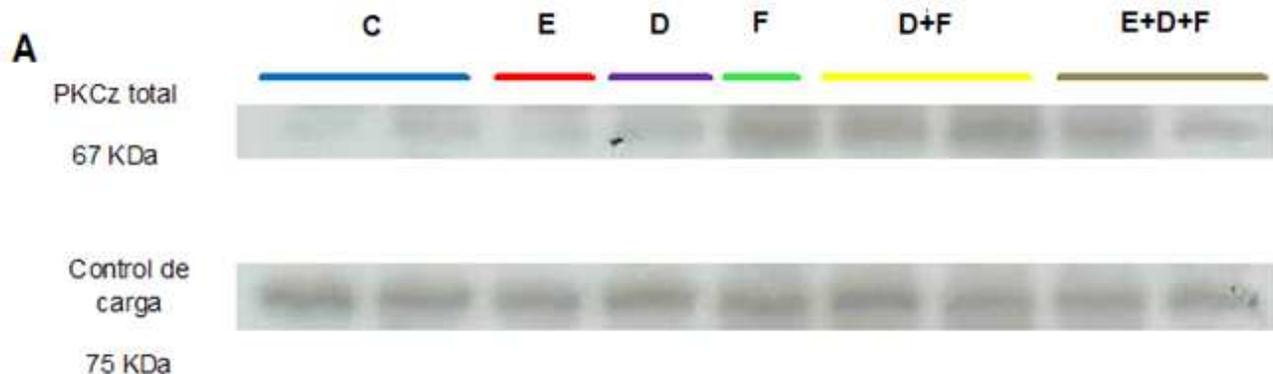


Figura 12. (A) Imagen representativa de un Western blot para la detección de PKCz y control de carga. (B) Análisis densitométrico del Western blot para la detección de PKCz ajustado contra el control de carga y comparado contra el grupo control. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de n muestras. (\*) Diferencia estadísticamente significativa respecto a los grupos C, E y D con un valor de  $p \leq 0.01$ . En los grupos F, D+F y E+D+F se observa un incremento en la expresión de PKCz total. Los grupos D+F y E+D+F presentan diferencia significativa respecto a los grupos control. En cambio, no existe diferencia significativa entre el grupo D+F y E+D+F, lo que sugiere que el extracto no fue capaz de disminuir esa sobreexpresión. URD: unidades relativas de densitometría.

## 8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se obtuvo un EST con un alto contenido de polifenoles ( $1.2 \pm 0.027$  mg<sub>eq. Ác. Gálico</sub>/mg<sub>EST</sub>) además de una buena capacidad de inactivación del radical superóxido *in vitro* (CI<sub>50</sub> de 30.70 µg<sub>eq de ác. Gálico</sub>/mL). Esta capacidad antioxidante es incluso mayor que, por ejemplo, la de la vitamina C que presenta una CI<sub>50</sub>= 120 µg/mL determinada en las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio (Cruz-White, 2006). El EST no mostró un efecto antinutricional ya que las ratas del grupo E presentaron un crecimiento similar al del grupo control y no se observaron alteraciones en la apariencia general de la salud de los roedores a lo largo del protocolo con la dosis administrada (100mg<sub>FT</sub>/kg/día). Esto es importante, ya que existen reportes de que la administración de dosis altas de algunos extractos polifenólicos pueden tener efectos prooxidantes y antinutricionales (Zhang *et al.*, 1997, Galati *et al.*, 2004; Cruz-White, 2006). En cambio, el DEN sí ejerce un efecto negativo sobre el crecimiento de los animales, pero ese efecto no se mantiene a lo largo del protocolo, sino que poco después de su administración, los animales ya muestran un crecimiento normal, aunque no alcanzan el peso del grupo control al final del estudio. Por otra parte, el FeNTA provocó un retraso en el crecimiento de los animales que se mantuvo a lo largo del protocolo, lo que nos indica que el carcinógeno repercute en la salud de los animales.

En cuanto a la apariencia macroscópica de los riñones, se observó que tanto el grupo control, como los grupos E y D presentan una apariencia general normal. En cambio, los riñones de todos los grupos tratados con FeNTA muestran corteza pálida, médula irritada e inflamación. A pesar de este daño macroscópico evidente, no se observaron alteraciones en la función renal expresada como BUN. Esto difiere a lo observado en estudios de tratamiento agudo con FeNTA, donde se induce necrosis renal y un daño notorio en la función renal en las primeras 48 horas después de su administración (Cruz-White, 2006; Dávalos-Salas, 2006; Torres-Martínez, 2007; Tanaka *et al.*, 2008). La ausencia de alteraciones en los niveles de BUN coincide con lo que se ha observado en el CCR humano, en el cual no se presenta insuficiencia renal durante su desarrollo, lo que dificulta su diagnóstico oportuno (Nelson *et al.*, 2007). Lo anterior, junto con la presencia de alteraciones moleculares y displasia observadas previamente en nuestro laboratorio, sugieren que el esquema de tratamiento presentado en el este trabajo podría representar una etapa temprana del desarrollo de CCR.

El incremento en los niveles de PKCz total es una alteración molecular que se ha relacionado con varios procesos alterados en CCR humano que incluyen: mitogénesis, supervivencia celular y angiogénesis (Berra *et al.*, 1993; Pal *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 1998). Nuestros resultados muestran un aumento de los niveles de PKCz en el grupo D+F, lo que sugiere la posible participación de esta enzima en el proceso de carcinogénesis renal. Este aumento en los niveles de PKC coincide con lo reportado en líneas celulares de CCR humano, en las cuales se vincula a PKCz con la sobreexpresión de VEGF, el cual podría estar relacionado con la alta vascularización de estos tumores (Pal *et al.*, 2001).

Además, en el grupo D+F de un tratamiento crónico se observó que el DEN disminuye el tiempo para la formación de tumores así como un aumento en su incidencia (Athar *et al.*, 1998; Vargas-Olvera, 2009). Tomando en cuenta nuestros resultados, en el grupo D+F el DEN tiene un comportamiento similar al observado en un tratamiento crónico, ya que exagera el efecto del FeNTA solo, lo que sugiere que el DEN disminuye el tiempo para la aparición de la alteración en los niveles de PKCz total.

Con respecto a los demás grupos, los roedores tratados solamente con EST y DEN no presentaron alteraciones en los niveles de PKCz respecto al grupo control.

En el grupo F se observa un aumento en los niveles de PKCz; sin embargo, no presenta diferencia significativa respecto al grupo control, pero tampoco contra el grupo D+F, esto sugiere un aumento parcial en los niveles de la enzima. Se ha reportado que en un tratamiento crónico con FeNTA, los riñones del grupo F presentan la formación de tumores (Toyokuni *et al.*, 1994), lo cual nos lleva a pensar que si se continúa el tratamiento con FeNTA podría haber un aumento significativo en los niveles de PKCz en este grupo.

El grupo E+D+F presenta un aumento significativo de los niveles de PKCz total respecto al grupo control. Además, entre este grupo y el grupo D+F no existe diferencia significativa, lo que sugiere que el EST no es capaz de contrarrestar el incremento en los niveles de PKCz con el esquema de tratamiento utilizado. Como se mencionó anteriormente, en un tratamiento crónico con FeNTA se desarrolla CCR, y el EST, con el mismo esquema de tratamiento utilizado en la presente tesis, es capaz de disminuir la incidencia y retardar el grado de avance de los tumores (Vargas-Olvera, 2009). Esto sugiere que el efecto observado por el EST en un tratamiento crónico no es a través de la modulación de los niveles de PKCz total o a menos que module estos niveles a otro tiempo.

En el presente trabajo se demuestra por primera vez el aumento en los niveles de PKCz total en una etapa preneoplásica. Este hallazgo es importante, ya que en etapas tempranas el cáncer puede ser contenido e incluso curable, por lo que en un futuro PKCz podría ser un buen candidato como blanco terapéutico y/o de diagnóstico.

## 9 CONCLUSIONES

- Se montó un protocolo de tratamiento subcrónico con FeNTA, que podría representar una etapa temprana en el desarrollo de CCR por FeNTA, en el que se observa un aumento en los niveles de PKCz total, el cual podría estar vinculado con la malignización de células renales.
- El EST no es capaz de proteger contra las alteraciones observadas con el esquema de tratamiento utilizado.

## 10 ANEXOS

### 10.1 Cuantificación de fenoles totales

#### - Soluciones

**Carbonato de sodio 1 M (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).** Se pesaron 26.5 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, disolver en agua destilada y aforar a 250 ml.

**Estándar de ácido gálico para la curva patrón [10 mg/ml].** Se pesaron 50 mg de ácido gálico y disolver en metanol al 50% en agua destilada.

**Folin 2N.** Hacer una dilución 1:10 v/v de Folin 2N en agua destilada.

#### - Preparación de las muestras

Para la determinación de fenoles totales del EST, las diluciones se realizan a partir de una solución stock de concentración baja (3 mg/mL) (solución stock 1) y otra con concentración alta ( /mL) (solución stock 2). La preparación de estas dos soluciones abarca un rango más amplio de concentraciones, lo que permite cuantificar de manera confiable la concentración de los fenoles en el EST.

#### - Solución stock 1 de EST

0.015 g de polvo de extracto se disuelven en 5 ml de agua y se realizan las diluciones de la tabla 4.

Tabla 4. Diluciones de la solución stock 1 de EST.

Dilución	EST (µL)	Agua (µL)
1:20	50	950
1:50	20	980
1:100	10	990

#### - Solución stock 2 de EST

0.08g de polvo de extracto se disuelven en 5 ml de agua y se realizan las diluciones de la tabla 5.

Tabla 5. Diluciones de la solución stock 2 de EST.

Dilución	EST (µL)	Agua (µL)
1:100	10	990
1:200	5	995
1:250	4	996

- Procedimiento

A 50 µL de estándar de ácido gálico (10 mg/mL), agua (blanco), o diluciones de EST preparadas de acuerdo a las tablas 4 ó 5 se les agregan 400µL de carbonato de sodio 1M y 500 µL de reactivo de Folin-Ciocalteau 2N (1:10). Las lecturas se realizan en un espectrofotómetro a 765 nm 15 minutos después de adicionar el Folin. La concentración de los fenoles totales del extracto se calcula interpolando la absorbancia obtenida de cada dilución en la curva patrón de ácido gálico que se describe en la tabla 6 y los resultados se expresan en µg eq. de ácido gálico/mL de extracto.

Tabla 6. Concentraciones de ácido gálico en la curva patrón para la cuantificación de fenoles totales.

Ácido gálico [µg/mL]	µL de estándar	mL de agua destilada
50	5	995
100	10	990
150	15	985
200	20	980
250	25	975

## 10.2 Inactivación del radical superóxido

- Soluciones

**Xantina 0.3 mM.** Se pesaron 0.0228g de xantina, se agregaron 5 ml de bicarbonato de sodio 400 mM y se aforaron a 500ml con agua destilada.

**EDTA 0.4 mM.** Se pesaron 0.1117 g de EDTA y se disolvieron en 500 ml de agua destilada.

**Nitro azul de tetrazolio (NBT) 150 µM.** Se pesaron 0.0368 de NBT y se disolvieron en 300 mL de agua destilada.

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 400 mM.** Se pesaron 21.2 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se disolvieron en 500 mL de agua destilada.

**Albúmina sérica bovina 0.1% (ASB).** Se pesaron 0.25 g de albúmina y se disolvieron en 500 mL de agua destilada.

**Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4.** Se pesaron 1.0524g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.6745g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y se disolvieron en 250 mL de agua destilada.

**Sulfato de amonio 2M.** Se pesaron 66 g de sulfato de amonio y se aforaron a 250 mL con agua destilada.

**Xantina oxidasa 168 U/l.** Se parte de un lote de 0.09 U/mg de sólido. Se pesaron 1.75 mg de xantina oxidasa y se disolvieron en 1 mL de sulfato de amonio 2 M.

**Cloruro de cobre 0.8mM.** Se pesaron 0.07g de CuCl<sub>2</sub> •2H<sub>2</sub>O y se disolvieron en 500 mL de agua destilada.

- Preparación de muestras

Las diluciones del extracto polifenólico se realizan como se indica en la tabla 7 a partir de las soluciones stock mencionadas en la sección 10.1. La preparación de estas dos soluciones stock permite cubrir todo el rango para expresar el porcentaje de inactivación del radical superóxido en función de concentración de fenoles totales presentes en el extracto.

Tabla 7. Diluciones del extracto polifenólico a partir de las soluciones stock 1 y 2 para la determinación de la inactivación del radical superóxido.

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

- Procedimiento

Para cada determinación se agregan 815  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción descrita en la tabla 8 y se añaden los reactivos como se indica en la tabla 9, preparando un C-100%, un blanco problema y un problema por cada dilución de extracto polifenólico. Los tubos se incuban 15 minutos en un baño a  $27^{\circ}\text{C}$  (el tiempo de incubación se contabiliza desde que se agregan los reactivos de manera simultánea en el primer tubo). Se detiene la reacción con 330  $\mu\text{L}$  de cloruro de cobre, y finalmente se realiza la cuantificación a 560 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de inactivación del radical superóxido en función de la cantidad de fenoles totales presentes en 165 $\mu\text{L}$  de muestra para cada una de las diluciones utilizadas.

Tabla 8. Mezcla de reacción.

Reactivo	Volumen
Xantina 0.3 mM	30 mL
EDTA 0.4 mM	15mL
NBT	15 mL
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ 400 mM	9 mL
Albúmina sérica bovina 0.1%	4.5 mL
<b>Total</b>	<b>73 mL</b>

Tabla 9. Reactivos adicionados para cada dilución de extracto polifenólico en la determinación de la capacidad de inactivación del radical superóxido.

C-100%*	165 $\mu\text{L}$ de amortiguador de fosfatos	20 $\mu\text{L}$ de Xantina Oxidasa
<b>Blanco problema</b>	165 $\mu\text{L}$ de dilución de EST	20 $\mu\text{L}$ de amortiguador de fosfatos
<b>Problema</b>	165 $\mu\text{L}$ de dilución de EST	20 $\mu\text{L}$ de Xantina Oxidasa

\*C-100%= cantidad máxima de radical superóxido generada por el sistema xantina-xantina oxidasa.

### 10.3 Preparación de nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)

**NaHCO<sub>3</sub> 120 mM.** Se disolvieron 0.504 g de NaHCO<sub>3</sub> en 40 mL de agua desionizada y se aforaron a 50 mL.

**Nitrato de hierro Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>• 9H<sub>2</sub>O 160 mM.** Se disolvieron 0.646 g de nitrato de hierro y se aforaron a 10mL con NaHCO<sub>3</sub> 120 mM.

**Nitrilotriacetato de sodio Na<sub>2</sub>NTA 320 mM.** Se disolvieron 1.88 g de Na<sub>2</sub>NTA en 25 mL de solución de NaHCO<sub>3</sub> 120 mM.

Para preparar 30 mL de solución de FeNTA se mezclan 10 ml de nitrato de hierro 160 mM con 20 mL de nitrilotriacetato de sodio 320 mM, con agitación constante y suave. Con la finalidad de ajustar el pH a 7.4 se agregan 0.2 g de bicarbonato de sodio. Durante el desarrollo del ensayo se debe de ajustar el pH de la solución. Esta solución debe protegerse de la luz.

### 10.4 Evaluación de la función renal.

La determinación de la urea se realizó mediante un estuche comercial Urea-37 de la marca SPINREACT (Girona, España), el cual se basa en la reacción de la urea con el o-ftaldehído en medio ácido para formar un compuesto colorido que absorbe a 510 nm. Los resultados se expresan como mg BUN/dL de suero.

### 10.5 Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry

- a) Preparación de soluciones para el método de Lowry
  - **Ácido tricloroacético 10% (TCA).** Se pesaron 10g de TCA y se disolvieron en 100 ml de agua destilada.
  - **NaOH 0.1M.** Se pesaron 0.4 g de NaOH y se aforaron a 100 ml con agua destilada.
  - **Albúmina sérica bovina 0.05% (ASB).** Se disolvieron 50 mg en 100 mL de agua desionizada
- b) Solución A
  - **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2%.** Se disolvieron 20 g en 1000 mL de agua destilada.
  - **NaOH al 0.4%.** Se disolvieron 4g en 1000 mL de agua destilada.
  - **Tartrato de sodio al 0.02%.** Se disolvieron 0.2 g en 1000 mL de agua destilada.
- c) Solución B
  - **CuSO<sub>4</sub> al 0.5%.** Se disolvieron 0.5g en 100 mL de agua.

d) Solución C

Se prepara al momento del ensayo y se obtiene mezclando la solución A y solución B en una proporción 50:1

e) Solución D

Se prepara al momento del ensayo y se obtiene diluyendo el reactivo de Folin – Ciocalteau (Sigma F-9252) en agua destilada en una proporción 1:2.

- Procedimiento

Antes de llevar a cabo la cuantificación de proteínas se realizaron diluciones de los sobrenadantes obtenidos de los homogenizados de los tejidos. La dilución utilizada fue 1:150, usando agua destilada como diluyente.

Para el ensayo se colocan 200  $\mu$ L del homogenizado diluido o estándar de ASB al 0.05% en tubos de ensayo 12 x 75 mm; posteriormente se les añade 1 mL de la solución C y se agitan e incuban durante 10 min. Transcurrido ese tiempo se agregan 100  $\mu$ L de solución D con agitación simultánea y se incuban durante 30 min. Se determinan las absorbancias en el espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda Bio 10) a 660nm. La concentración de las proteínas se calcula interpolando la absorbancia obtenida en la curva patrón de la ASB (Tabla 10) y los resultados se expresan en mg de proteína/mL.

Tabla 10. Curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) al 0.05%

Tubo	ASB al 0.05% ( $\mu$ L)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	[ASB] final ( $\mu$ g/0.2 mL)
1	0	200	Blanco
2	10	190	5
3	20	180	10
10.6 4	30	170	15
10.7 5	50	150	25
10.8 6	70	130	35
7	100	100	50

## 10.6 Electroforesis

### 10.6.1 Preparación de los geles para electroforesis

1. Se preparan geles SDS-poliacrilamida al 8% a partir de una solución de acrilamida al 30% con agitación suave.
2. Se vacían 5 mL de la mezcla en los moldes, llenando hasta 1.5 cm del tope, éste gel será llamado gel de resolución.
3. Se añaden 150  $\mu$ L de isopropanol para eliminar las burbujas de la superficie del gel de resolución y se deja polimerizar durante 20 min.
4. Se elimina el isopropanol por decantación y se realizan 3 lavados con agua desionizada para eliminar la acrilamida no polimerizada.
5. Se elimina el exceso de humedad con papel filtro Whatman.
6. Se prepara una segunda mezcla de acrilamida al 5% y colocarla sobre el gel de resolución.
7. Se coloca el peine evitando hacer burbujas.
8. Se dejan polimerizar 15 minutos (éste gel será llamado gel concentrador).
9. Se quitan con cuidado los peines y lavar con agua para eliminar la acrilamida no polimerizada.
10. Se colocan cuidadosamente los geles en una cámara de electroforesis con amortiguador de electroforesis (Tris 25mM, glicina 250 mM, SDS 0.1%, pH=8.3).

### 10.6.2 Preparación de las muestras

1. Se coloca un volumen de muestra correspondiente a 50  $\mu$ g de proteína en un tubo eppendorff.
2. Se coloca el mismo volumen de buffer desnaturalizante (Tris HCl 50 mM pH=6.8,  $\beta$ -mercaptoetanol 1%, SDS 1%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%)
3. Se mezcla suavemente.
4. Se colocan los tubos en agua hirviendo durante 4 min.
5. Se colocan las muestras de hielo durante 2 min y después cargar las muestras en el gel concentrador.
6. Se corren los geles a 90 mV durante 3 h en una cámara de electroforesis (BIO-RAD)
7. Se desmontan los moldes y retirar los geles con mucho cuidado.
8. Se elimina el gel concentrador y colocar el gel de resolución en amortiguador de transferencia durante 10 min para su preparación para la transferencia a membranas de PVDF.

## 10.7 Transferencia a membrana de fluoruro de polivinilo (PVDF)

1. Se recortan las membranas (IMMOBILON, Millipore) con dimensiones de 9x8 cm.
2. Minutos antes de terminada la electroforesis se acondicionan las membranas para la transferencia como se indica en seguida:
  - Se sumergen 5 min en metanol.
  - Posteriormente y evitando que las membranas se sequen, se elimina el metanol sumergiendo las membranas en agua durante 2 min.
  - Se retiran las membranas del agua y se colocan en amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, metanol 10%, pH=8.3) durante 10min.
3. La transferencia semi seca se realiza en el equipo (Transblot SD Semidry transfer cell, BioRad) y se monta de la siguiente manera:
  - Se coloca un papel filtro Whatman (previamente humedecido en amortiguador de transferencia) sobre el ánodo del equipo.
  - Se coloca la membrana sobre el papel filtro cuidando que la membrana no se seque y evitando la formación de burbujas.
  - Se coloca el gel sobre la membrana.
  - Se coloca un segundo papel filtro y se eliminan las burbujas.
  - Se coloca el cátodo del equipo cuidando que el sistema haya cerrado bien.
  - La transferencia se corre durante 1h y media a 70 mA/gel.
4. Minutos antes de que termine la transferencia se prepara el amortiguador de bloqueo con leche descremada al 1% en PBS-Tween (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM; Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM, KH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 mM, Tween 0.1%, pH=7.4).
5. Terminada la transferencia se retiran las membranas y se colocan en 5 mL de amortiguador de bloqueo durante 1 h con agitación constante.
6. Minutos antes de que termine el bloqueo se preparan 5 mL de la dilución del anticuerpo primario en PBS-Tween para cada membrana (la dilución depende de la proteína a detectar) (ver tablas 2 y 3).
7. Terminado el tiempo de bloqueo se elimina el amortiguador de bloqueo y se colocan 5 mL de anticuerpo primario y se deja en agitación constante durante 16 h a 4 °C.
8. Posteriormente se retira el anticuerpo primario y se hacen 3 lavados de 15 min c/u a las membranas con PBS-Tween.

9. Antes de terminar el último lavado se prepara la dilución del anticuerpo secundario con PBS-Tween (el tipo de anticuerpo y la dilución depende de la proteína a detectar).
10. Una vez terminado el último lavado, se retira el PBS-Tween y se coloca el anticuerpo secundario. Se deja incubando durante 1 h con agitación constante.
11. Posteriormente se retira el anticuerpo secundario y las membranas se lavan 3 veces con PBS durante 15 min cada uno.

### **10.8 Detección de proteínas**

1. Se preparan 400  $\mu$ L del sustrato de detección para cada membrana (IMMOBILON, Millipore) evitando su exposición a la luz y se deja a temperatura ambiente durante 30 min.
2. En la oscuridad se recortan las placas de rayos X del mismo tamaño que las membranas.
3. En la oscuridad se colocan las membranas en el cassette de detección.
4. Se colocan 400  $\mu$ L del sustrato de detección (luminol y  $H_2O_2$ ) (Millipore Immobilon<sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore Corporation, MA, USA) sobre la membrana (lado que contiene las proteínas), posteriormente se coloca un acetato para distribuir uniformemente el sustrato de detección (eliminando las burbujas que se formen).
5. Posteriormente, se expone una placa de rayos X encima de la membrana durante 30 segundos (este tiempo depende de la proteína a detectar)

### **10.9 Revelado de las placas de rayos X**

1. Transcurrido el tiempo de exposición se retira la placa de rayos X (Kodak Biomax Light film) y se coloca en la solución reveladora con agitación constante hasta la aparición de la banda.
2. Se retira la placa de la solución reveladora (Kodak GBX). Se enjuaga suavemente con agua corriente y se coloca en solución fijadora (Kodak GBX ).
3. Se agita suavemente durante 3 minutos y se pasa a un recipiente con agua corriente.
4. Se dejan secar las placas a temperatura ambiente. Posteriormente se digitalizan y se analizan con el programa de Image J (Broken Symmetry Soft).

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal C, Veluri R, Kaur M, Chou SC, Thompson JA, Agarwal R. Fractionation of high molecular weight tannins in grape seed extract and identification of procyanidin B2-3,3'-di-O-gallate as a major active constituent causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2007;28(7):1478-1484.
- Aguilar-Alonso F. 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 para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Bioquímicas), México, Facultad de Química, UNAM, 2010.
- Ansar S, Iqbal M, Athar M. Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitritotriacetate mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. *Carcinogenesis* 1999;20(4):599-606.
- Athar M, Iqbal M. Ferric nitritotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis* 1998;19(6):1133-1139.
- Atkins M B, George D J, Jonasch E. Renal neoplasia. En Brenner & Rector's the kidney. Vol 2, 6<sup>th</sup> edition, WB Saunder's Company 2000; 1844-1862.
- Awai M, Narasaki M, Yamanoi Y, Seno S. Induction of Diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitritotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Am J Pathol* 1979;95(3):663-673.
- Bahnemann, R, Leibold E, Kittel B, Mellert W, Jackh R. Different Patterns of kidney Toxicity after subacute administration of Na- nitritotriacetic acid and Fe-nitritotriacetic acid to wistar rats, *Toxicol Sci* 1998;46(1):166-175.
- Bareggi R, Grill V, Zweyer M, Narducci P and Martelli AM. Distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes in fetal organs of mice: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 1995;280(3):617-625.
- Basu A, Contreras A, Datta D, Flynn E, Zeng L, Cohen H, Briscoe D, Pal S. Overexpression of vascular endothelial growth factor and the development of post-transplantation cancer. *Cancer Res* 2008;68(14):5689-5698.

- Berra E, Díaz-Meco M, Domínguez I, Municio M, Sanz L, Lozano J, Chapkin R, Moscat J. Protein Kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* 1993;74(3):555-563.
- Blobe GC, Obeid LM and Hannun YA. Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13(3-4):411–431.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56(11):317-333.
- Burcham PC. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 1998;13(3):287-305.
- Brenner W, Benzing F, Gudejko-Thiel J, Fischer R, Farber G, Hengstler JG, Seliger B, Thuroff JW. Regulation of  $\beta$ 1 integrin expression by PKC $\epsilon$  in renal cancer cells. *Int J Oncol* 2004;25(4):1157-1163.
- Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* 1998; 8(19):1069-1077.
- Cruz-White. Efecto del pretratamiento con un extracto de semillas de uva sobre el daño oxidante y otras alteraciones inducidas por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en un estudio *in vivo*. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Bioquímicas), México, Facultad de Química, UNAM. 2007.
- Dávalos-Salas MI. Efecto en el tratamiento con un concentrado de arándano sobre alteraciones inducidas por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) tanto *in vivo* como *in vitro*. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Bioquímicas), México, Facultad de Química, UNAM. 2006.
- Datta K, Li J, Bhattacharya R, Gasparian L, Wang E, Mukhopadhyay D. Protein kinase C zeta transactivates hypoxia-inducible factor alfa by promoting its association with p300 in renal cancer. *Cancer Res* 2004;64(2):456-462.
- Dutil E, Gao T, Newton A. the phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide 3-Kinase. *J Biol Chem* 2001;276(48):45289–45297.
- Engers R, Mrzyk S, Springer E, Fabbro D, Weissgerber G, Gerharz CD, Gabbert HE. Protein kinase C in human renal cell carcinomas: role in invasión and differential isoenzyme expression. *Br J Cancer* 2000;82(5):1063–1069.

- Fields AP, Gustafson WC. Protein kinase C in disease: cancer. *Methods Mol Biol* 2003;233:519–537.
- Freeley M, Kelleher D, Long A. Regulation of protein kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cell Signal* 2011;23(5):753–762.
- Gago-Domínguez M, Castelao J. Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: Further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radic Biol Med* 2006;40(4):721-733.
- Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 2002;177(1):91-104.
- Galvez A, Duran A, Linares J, Pathrose p; Castilla E, Abu-Baker S, Leitges M, Díaz-Meco M, Moscat J. Protein Kinase C $\zeta$  represses the interleukin-6 promoter and impairs tumorigenesis in vivo, *Mol Cell Biol* 2009;29(1):104-115.
- Gallegos LL, Newton AC. Spatiotemporal dynamics of lipid signalin: protein kinase C as paradigm. *IUBMB Life* 2008;60(12):782–789.
- Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants. *Cell Signal* 2007;19(9):1807-1819.
- Giorgi C, Agnoletto C, Baldini C, Bononi C, Bonora M, BMarchi S, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Zavan, Pinton P. Redox control of Protein Kinase C: Cell and Disease-Specific aspects. *Antioxid Redox Signal* 2010;13(7):1051-1083.
- Gopalakrishna R. Modification of cysteine-rich regions in protein kinase C induced by oxidant tumor promoters and the enzyme specific inhibitors. *Methods Enzymol* 1995;252:132-146.
- Gopalakrishna R, Jaken S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000;28(9):1349–1361.
- Gopalakrishna R, Gundimeda U. Antioxidant regulation of protein kinase C in cancer prevention. *J Nutr* 2002;132(12):3819S-3823S.
- Good A, Brindley D. Molecular mechanism regulating protein kinase Czeta turnover and celular transformation. *Biochem J* 2004;378(Pt 1):83–92.

- Halder B, Pramanick S, Mukhopadhyay S, Giri AK. Anticlastogenic effects of black tea polyphenols theaflavins and thearubigins in human lymphocytes in vitro. *Toxicol In Vitro* 2006;20(5):608-613.
- Hirai T, Chida K. Protein kinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ): activation Mechanisms and Cellular Functions. *J. Biochem* 2003;133(1):1-7.
- House C, Kemp BE. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* 1987;238(4834):1726-1728.
- Hurley JH, Newton AC, Parker PJ, Blumberg PM, Nishizuka Y. Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci* 1997;6(2):477-480.
- Jaken S. Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8(2):168–173.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, *CA Cancer J Clin* 2007;57(1):43-66.
- Johnson J, Giorgione J, Newton AC. The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry* 2000;39(37):11360-11369.
- Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 2002;32(9):822-832.
- Khan N, Sultana S. Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sci* 2005;77(11):1194-1210.
- Khan N, Sultana S. Induction of renal oxidative stress and cell proliferation response by ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA): diminution by soy isoflavones. *Chem Biol Interact.* 2004;149(1):23-35.
- Keranen LM, Dutil EM, Newton AC. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* 1995;5(12):1394–1403.
- Komutarin T, Azadi S, Butterworth L, Keil D, Chitsomboon B, Suttajit M, Meade BJ. Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 2004;42(4):649-658.
- Lee KW, Lee HJ. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors* 2006;26(2):105-121.

- Li J, Gobe G. Protein kinase C activation and its role in kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2006;11(5):428-434.
- Li J, Wang E, Dutta S, Lau J, Jiang S, Datta K, Mukhopadhyay D. Protein kinase C mediated modulation of FIH-1 expression by the homeodomain protein CDP/Cut/Cux. *Mol Cell Biol* 2007;27(20):7345–7353.
- Liu JP. Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 116: 1–29.
- Loo, G. Redox-sensitive mechanism of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *J Nutr Biochem* 2003;14(2):64-73.
- López-Ramos D. Efecto del carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro y de un antioxidante polifenólico sobre la expresión del gen de ciclina D1. Tesis para obtener el título de Química-Farmacéutica Bióloga, México, Facultad de Química, UNAM. 2007.
- Maiti R, Jana D, Das UK, Ghosh D. Antidiabetic effect of aqueous extract of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2004;92(1):85-91.
- Mancini, V, Battaglia M, Ditinno P, Palazzo S, Lastilla G, Montironi R, Bettocchi C, Cavalcanti E, Ranieri E, Selvaggi FP. Current insights in renal cell cancer pathology, *Urol Oncol* 2008;26(3):225-238.
- Marengo B, De Ciucis C, Ricciaelli R, Pronzanto M, Marinari U, Domenicotti C. Protein kinase C: An attractive target for cancer therapy. *Cancers* 2011; 3(1):531-567.
- Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. Anticancer antioxidant regulatory functions of Phytochemicals. *Curr Med Chem* 2011;18(15):2315-38.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32(8):595-603.
- Matos H., Mascio P, Medeiros MH. Protective effect of lycopene on lipid peroxydation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch Biochem Biophys* 2000;383(1):56-59.
- Mizote A, Hida AI, Hosako M, Fujisawa M, Kamekawa M, Okada S. Effects of phlebotomy on the growth of ferric nitrilotriacetate-induced renal cell carcinoma. *Acta Med Okayama* 2002;56(4):199-204.
- Mukhopadhyay D, Datta K. Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. *Semin Cancer Biol* 2004;14(2):123–130.

- Nelson, EC, Evans CP, Lara PN. Renal cell carcinoma: current status and merging therapies. *Cancer Treat Rev* 2007;33(3):299-313.
- Newton AC. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev* 2001; 101(8):2353-2364.
- Newton AC. Protein kinase C: poised to signal, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298(3):E395–E402.
- Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL, Exon JH. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006;46(2):161-183.
- Oberley TD, Toyokuni S, Szweda LI. Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free Radic Biol Med* 1999;27(5-6):695-703.
- Okada S., Induction of rat renal adenocarcinoma by ferric-nitriloacetate (FeNTA). *Jpn Arch Intern Med* 1982;29:485-491.
- Okamoto K, Toyokuni S, Kim WJ, Ogawa O, Kakehi Y, Arao S, Hiai H, Yoshida O. Overexpression of human mut T homologue gene messenger RNA in renal cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. *Int J Cancer* 1996; 65(4):437-441.
- Okazaki Y, Iqbal M, Okada S. Suppressive effects of dietary curcumin on the increased activity of renal ornithine decarboxylase in mice treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740(3):357-366.
- Pal S, Claffey K, Dvorak H. The von Hippel-Lindau gene product inhibits vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathways. *J Biol Chem* 1997;272(44):27509–27512.
- Pal S, Claffey K, Cohen H, Mukhopadhyay D. Activation of Sp1-mediated Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Transcription requires specific interaction with protein kinase C $\zeta$ . *J Biol Chem* 1998;273(41):26277-26280.
- Pal S, Claffey K, Cohen H, Khosravi-Far R, Mukhopadhyay D. Role of protein Kinase C $\zeta$  in Ras-mediated transcriptional activation of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor expression. *J Biol Chem* 2001;276(4):2395-2403.

- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, Codina C. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem* 2002;50(23):6882-6890.
- Parrota J. Healing plants of peninsular India, Wallingford, UK, CAB International 2001, ISBN 0857899:501- 502.
- Pumthong G. Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from seed coat of *Tamaindus indica* Linn. PhD Thesis, Chiang Mai University, Thailand. 1999.
- Preece NE., Hall DE., Howarth JA., King LJ., Parke DV., Effects of acute and subchronic administration of iron nitrilotriacetate in the rat. *Toxicology* 1989;59(1):37-58.
- Ramos A, Visozo A, Piloto J, García A, Rodríguez CA, Rivero R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2003;87(2-3):241-246.
- Rangel-Gómez A. Comportamiento de la proteína cinasa Cε (PKCε) en una etapa temprana del modelo de carcinogénesis renal por FeNTA, Tesis de licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico-Biólogo, México, Facultad de Química, UNAM, 2011.
- Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 2001;8(7):797-807.
- Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron A, Boeckeler K, Parker P. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(2):103-112.
- Sakano K, Mizutani M, Murata M, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S. Procyanidin B2 has anti- and pro oxidant effects on metal-mediated DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2005;39(8):1041-1049.
- Sonnenburg ED, Gao T, Newton AC. The phosphoinositide dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide-3-kinase. *J Biol Chem* 2001;276(48):45289–45297.
- Stabel S. Protein kinase C—an enzyme and its relatives. *Semin Cancer Bio* 1994;15(4):227–284.
- Stadler, W. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2005;104(11):2323-2333.

- Sudjaroen Y, Haubner R, Würtele G, Hull WE, Erben G, Spiegelhalder B, Changbumrung S, Bartsch H, Owen RW. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food Chem Toxicol* 2005;43(11):1673-1682.
- Tanaka Y, Aleksunes LM, Goedken Mj, Chen C, Reisman SA, Manautou JE, Klaseen CD. Coordinated induction of Nrf2 target genes protects against iron nitrilotriacetate (FeNTA)-induced nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;231(3):364-373.
- Torres-Martínez. Efecto del tratamiento con un extracto de *Tamarindus indica* sobre el daño inducido por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA), Tesis de licenciatura para obtener el título de Química Farmacéutica Biólogo, México, Facultad de Química, UNAM. 2007.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76(9):4350–4354.
- Toyokuni S, Mori T, Dizdaroglu M. DNA base modifications in renal chromatin of Wistar ras treated with renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Int J Cancer* 1994;57(1):123-128.
- Toyokuni S. Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation. *Biotherapy* 1998;11(2-3):147-154.
- Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Yamamoto A, Kawakishi S, Osawa T. Antioxidative components isolated from the seed of Tamarind (*Tamarindus indica* L.). *J Agric Food Chem* 1994;42(12):2671-2674.
- Umemura T, Sai K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y. Oxidative DNA damage, lipid peroxidation and nephrotoxicity induced in the rat kidney after ferric nitrilotriacetate administration. *Cancer Lett* 1990;54(1-2):95-100.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40.
- Vargas-Olvera CY. Efecto de un extracto de semillas de tamarindo (EST) sobre el desarrollo de cáncer renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Bioquímicas), México, Facultad de Química, UNAM. 2009.

- Webb B, Hirst S, Gienbyez M. Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol* 2000;130:1433-1452.
- Zhang J, Okada S, Yu Y, Zheng P, Yamaguchi R, Kasai H. Vitamin E inhibits apoptosis, DNA modification and cancer incidence induced by iron-mediated peroxidation in Wistar rat kidney. *Cancer Res* 1997;52(12):2410-2414.
- Zhang J, Stanley RA, Adaim A, Melton LD, Skinner MA. Free radical scavenging and cytoprotective activities of phenolic antioxidants. *Mol Nutr Food Res* 2006;50(11):996-1005.