



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

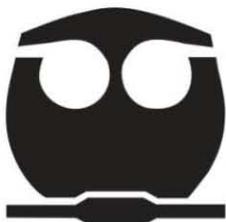
**NIVELES DE Akt Y p-Akt EN DIFERENTES TEJIDOS EN  
ETAPAS TEMPRANAS DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE  
CARCINOGENÉISIS RENAL Y EFECTO DE UN EXTRACTO DE  
SEMILLAS DE TAMARINDO.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**IGNACIO PACHECO BERNAL**



**MÉXICO, D.F.**

**2014**



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. J. Eleazar Martínez Barajas

SECRETARIO: Dra. María Elena Ibarra Rubio

1er. SUPLENTE: M. en C. Raquel Ortega Muñoz

2º SUPLENTE: Dr. José Pedraza Chaverrí

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio F-120, Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA: Dra. María Elena Ibarra Rubio \_\_\_\_\_

SUPERVISOR TÉCNICO: M. en C. José Dolores Solano Becerra \_\_\_\_\_

SUSTENTANTE: Ignacio Pacheco Bernal \_\_\_\_\_

## RECONOCIMIENTOS

Investigación realizada gracias al financiamiento por parte del programa UNAM-DGAPA-PAPIIT con el proyecto No. IN-221313, así como de la Facultad de Química bajo el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP) No. 5000-9109.

El Departamento de Superación Académica de la Facultad de Química también apoyó el desarrollo de la presente tesis bajo el subprograma 127 "Formación Básica en Investigación" durante el período 2012-2013.

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 supervisión técnica.

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

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

## ABREVIATURAS

Akt/PKB	Proteína cinasa B
CCR	Carcinoma de Células Renales
CCRcc	Carcinoma de Células Renales de células claras
DEN	<i>N</i> -Dietilnitrosamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EE	Error Estándar
EO	Estrés Oxidante
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
EST	Extracto de Semillas de Tamarindo
FeNTA	Nitrilotriacetato de Hierro
GSH	Glutati3n
GSK3 $\beta$	Cinasa 3 $\beta$ de la Gluc3geno Sintasa
IKK	Cinasa de I $\kappa$ B
IR	Receptor de Insulina
mTOR	Proteína blanco de Rapamicina en Mamíferos
mTORC1	Complejo 1 de mTOR
mTORC2	Complejo 2 de mTOR
NF $\kappa$ B	Factor Nuclear $\kappa$ B
p-Akt	Akt fosforilada en S473
PDK1	Cinasa Dependiente de 3'-Fosfoinos3tidos
PH	Dominio de Homolog3a a Plecstrina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Cinasa
PIs	Fosfatidilinositoles
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP3	Fosfatidilinositol 3,4, 5-trifosfato
PP2A	Proteína Fosfatasa 2A
RTKs	Receptores con actividad de Cinasa de Tirosinas
SFB	Suero Fetal Bovino
t-Akt	Akt total
TSC2	Complejo 2 de esclerosis tuberosa
URD	Unidades Relativas de Densitometría
VEGF	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
WB	Western Blot
$\gamma$ -GTP	$\gamma$ -Glutamyl Transpeptidasa

## ÍNDICE

1 RESUMEN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer y estrés oxidante.....	3
2.2 Carcinoma de células renales (CCR) .....	4
2.3 Nítrilotriacetato de hierro (FeNTA) como modelo de estudio del CCR .....	6
2.4 Polifenoles y cáncer .....	10
2.4.1 Extracto de semillas de tamarindo (EST).....	11
2.5 Generalidades de la proteína cinasa B (PKB) o Akt .....	11
2.6 Akt y cáncer .....	15
2.7 Akt y CCR .....	17
2.8 Akt y estrés oxidante .....	18
3 JUSTIFICACIÓN.....	20
4 HIPÓTESIS.....	22
5 OBJETIVOS.....	22
5.1 Objetivo general .....	22
5.2 Objetivos particulares.....	22
6 MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
6.1 Protocolo experimental.....	23
6.2 Administración del EST .....	25
6.3 Administración de N-dietilnitrosamina (DEN).....	25
6.4 Preparación y administración del nítrilotriacetato de hierro (FeNTA) .....	25
6.5 Sacrificio y toma de muestras.....	26
6.6 Métodos .....	26
6.7 Obtención y caracterización del EST .....	26

6.8 Extracción de proteínas del tejido renal, hepático y pulmonar .....	27
6.9 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	27
6.10 Niveles de Akt total y en su forma fosforilada mediante Western blot.....	27
6.11 Electroforesis y transferencia .....	28
6.12 Detección de la proteína de interés .....	28
6.13 Análisis estadístico .....	29
7 RESULTADOS .....	30
7.1 Protocolo de tratamiento con FeNTA.....	30
7.2 Niveles de t-Akt y p-Akt en riñón .....	31
7.3 Niveles de t-Akt y p-Akt en hígado y pulmón .....	33
8 DISCUSIÓN.....	36
9 CONCLUSIONES .....	41
10 PERSPECTIVAS .....	41
11 ANEXOS.....	42
12 BIBLIOGRAFÍA.....	48

## 1 RESUMEN

El carcinoma de células renales (CCR) es la neoplasia renal más común en adultos y es asintomática incluso en etapas avanzadas, por lo que su diagnóstico inicial se da frecuentemente cuando ya ha ocurrido metástasis, lo que lleva, entre otras razones, a una alta tasa de mortalidad, además de que hace prácticamente imposible estudiar las fases iniciales de su desarrollo, que es cuando es más factible controlar o detener un proceso carcinogénico. Por lo tanto, un modelo experimental puede ser una herramienta muy útil para estudiar esta enfermedad, como aquél iniciado con *N*-dietilnitrosamina (DEN) y promovido con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en roedores.

En nuestro laboratorio se ha implementado este modelo en ratas Wistar, logrando desarrollar tumores con un esquema de tratamiento con una administración única de DEN y 4 meses de exposición al carcinógeno. Las características histológicas de los tumores inducidos corresponden al CCR que se presenta en el humano. Cabe resaltar que no se observa el desarrollo de tumores primarios en otros tejidos (*e.g.* hígado y pulmón) bajo este esquema de tratamiento. Además, el estrés oxidante tiene un papel clave en el proceso de carcinogénesis inducido con FeNTA, y hemos observado que un extracto de semillas de tamarindo (EST), con gran capacidad antioxidante, disminuye la incidencia y retarda el grado de avance de los tumores. También, con base en evidencias previas como la presencia de displasia y otras alteraciones pro-carcinogénicas a 1 y 2 meses de exposición a FeNTA, hemos considerado estos tiempos de estudio como etapas tempranas del desarrollo de la neoplasia en el modelo.

Por otro lado, la cinasa Akt, también conocida como PKB, tiene un papel clave en supervivencia, crecimiento y proliferación celular por lo que su desregulación se ha vinculado con diferentes tipos de cáncer. En particular, en tumores de CCR humano se ha reportado un aumento en los niveles totales de esta proteína (t-Akt) así como de su forma activada (p-Akt), es decir, fosforilada en el residuo de serina 473 (S473), pero se desconoce su respuesta durante la oncogénesis renal. Interesantemente, en un trabajo previo de nuestro laboratorio se encontró un aumento en los niveles renales de t-Akt en ratas tratadas durante un mes con FeNTA.

Con base en lo anterior, en el presente estudio se analizó más a fondo el comportamiento de Akt en etapas tempranas del modelo de CCR inducido con FeNTA y se evaluó el efecto de la administración del EST. Para esto, se utilizaron ratas Wistar macho que se distribuyeron en un grupo control (C), y tratados con: DEN (D), FeNTA (F), DEN+FeNTA (DF) y EST+DEN+FeNTA (EDF). El EST se administró en el agua de beber desde dos semanas antes de la administración del DEN y durante todo el protocolo. Catorce días después de la administración del DEN, se comenzó el tratamiento con FeNTA dos veces por semana durante 1 y 2 meses. Las muestras de riñón, hígado y pulmón se obtuvieron 48 horas después de la última inyección de FeNTA.

Los resultados mostraron que, efectivamente, la cinasa presenta alteraciones en las etapas tempranas estudiadas del modelo de carcinogénesis. Los niveles renales tanto de t-Akt como de p-Akt aumentaron alrededor de 6 veces con respecto a los valores normales después de 1 mes de tratamiento con FeNTA, y este incremento se mantuvo después de 2 meses. En cambio, los niveles de la cinasa se mantuvieron normales tanto en hígado como en pulmón.

Por otra parte, los niveles renales de la cinasa tanto total como fosforilada fueron similares entre los grupos DF y EDF, lo cual significa que el EST no previno el incremento de Akt inducido por FeNTA en los tiempos analizados.

Hasta donde sabemos, este es el primer reporte que describe el comportamiento de Akt en etapas tempranas de la carcinogénesis renal, y es consistente con lo observado en los tumores de CCR humano. Esto, junto con el hecho de no haber encontrado alteraciones en los niveles de Akt en hígado y pulmón, donde no se desarrollan tumores primarios en nuestro modelo experimental, apoya fuertemente la hipótesis de la participación de esta cinasa en la carcinogénesis renal. Asimismo, nuestros resultados sugieren que Akt parece no ser uno de los mecanismos por los cuales el EST protege contra el desarrollo de CCR; sin embargo, no se puede descartar que el extracto pueda tener un efecto sobre la enzima en otras etapas de la carcinogénesis renal.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Cáncer y estrés oxidante

El cáncer es un término para denominar a un conjunto de enfermedades que se caracterizan por un trastorno de la proliferación, muerte y diferenciación de las células que conduce a la formación de masas tumorales capaces de diseminarse (King RJ *et al.*, 2006). El proceso que lleva a la generación de estas enfermedades se conoce como carcinogénesis, a través del cual una o más células adquieren capacidades que les confieren un potencial transformante que puede llevar a la generación de una neoplasia (figura 1) (Hanahan D *et al.*, 2011).



**Figura 1. Capacidades adquiridas en el proceso carcinogénico.** Se ha propuesto que las células adquieren diversas capacidades a lo largo del proceso carcinogénico, que les confieren un potencial transformante (Modificado de Hanahan D *et al.*, 2011).

Las etapas del proceso carcinogénico son: a) iniciación, cuando las células sufren mutaciones no letales y esta etapa puede ser reversible mediante sistemas de reparación del DNA; b) promoción, cuando las células iniciadas proliferan en respuesta a eventos de presión selectiva, dando como resultado una progenie de células en estado preneoplásico, que pueden ser controladas por eventos de senescencia o

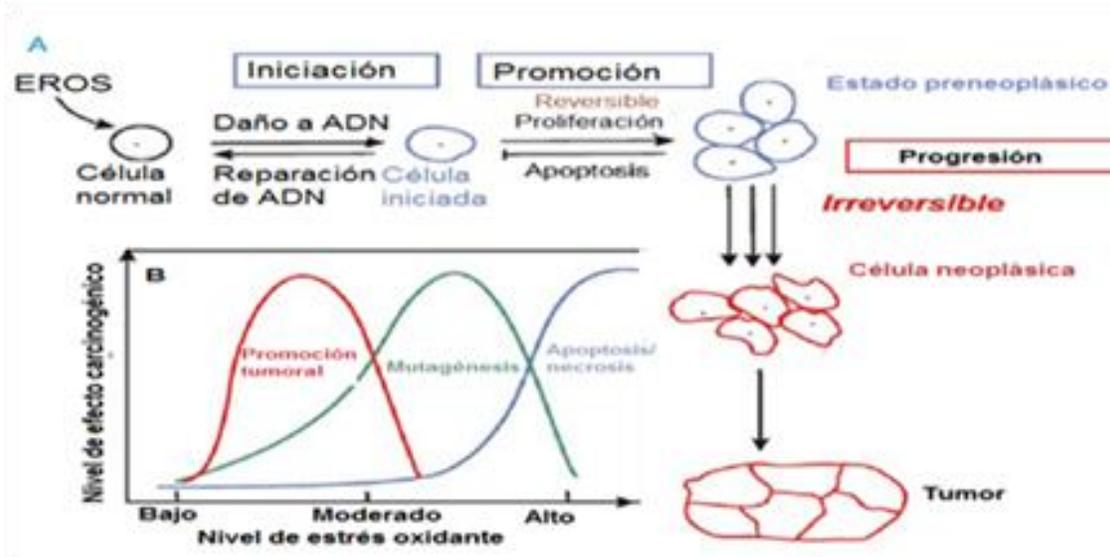
muerte celular, por lo que esta etapa ya no es reversible pero sí contenible; y c) progresión, cuando las células preneoplásicas sufren alteraciones que les permitirán convertirse en células neoplásicas, las cuales tendrán una proliferación anormal generando un tumor y posteriormente podrían diseminarse por un proceso llamado metástasis (Valko M *et al.*, 2006) (Figura 2A).

Las causas que pueden desencadenar el cáncer son diversas, y una de ellas es el estrés oxidante (EO). Se denomina estrés oxidante al aumento en la proporción de especies oxidantes con respecto a los niveles de las defensas antioxidantes de la célula (Zentella de Piña M *et al.*, 2005). Dentro de las especies oxidantes más comunes están las especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales son producto del metabolismo celular normal y juegan un papel importante en la regulación de vías de señalización en respuesta a cambios intra y extracelulares (Reuter S *et al.*, 2010). Sin embargo, bajo condiciones de estrés, las ERO son producidas durante tiempos prolongados, y pueden ocasionar daño en las funciones y estructuras celulares, pudiendo contribuir incluso a la transformación celular (Fang J *et al.*, 2009; Khandrika L *et al.*, 2009). Por ejemplo, se ha propuesto que diferentes niveles de estrés oxidante pueden tener efectos carcinogénicos diversos sobre las células (Valko M *et al.*, 2006). Como se observa en la figura 2B, niveles bajos a moderados de estrés oxidante pueden participar en la promoción tumoral, mientras que niveles moderados a altos pueden tener efectos mutagénicos, y niveles altos de estrés pueden inducir apoptosis y/o necrosis, lo cual es muy importante en los ciclos de muerte y regeneración celular que llevan a una proliferación sostenida y aumentan la probabilidad de seguir acumulando mutaciones (Valko M *et al.*, 2006).

## **2.2 Carcinoma de células renales (CCR)**

El CCR constituye del 2 al 3% de todos los tipos de cáncer en adulto, es la neoplasia renal más común en adultos y es uno de los tipos de cáncer urológico más letales (Nelson EC *et al.*, 2007; Rini B *et al.*, 2009; Siegel R *et al.*, 2013). Además, este cáncer es de los menos comprendidos, su incidencia continua en aumento y presenta problemas terapéuticos (Rini B *et al.*, 2009).

La incidencia a nivel mundial es de alrededor de 209000 casos nuevos y aproximadamente 102 000 muertes por año (Gupta K *et al.*, 2008). En un estudio reportado en 2013 en Estados Unidos se estimaron más de 65 000 nuevos casos de cáncer renal, con más de 13 000 casos resultando en muerte (Siegel R *et al.*, 2013). En México, en 2008 se reportó una incidencia de 3595 casos y un total de 1892 defunciones (GLOBOCAN, 2008), y desafortunadamente no hay estudios estadísticos más recientes.



**Figura 2. Etapas del proceso carcinogénico.** El desarrollo del cáncer se lleva a cabo en tres etapas, las cuales se han vinculado con diferentes niveles de estrés oxidante (Modificado de Valko *et al.*, 2006).

El diagnóstico del CCR es difícil ya que este tipo de cáncer es asintomático incluso en etapas avanzadas, y la clásica triada (dolor en un flanco abdominal, hematuria y palpación de una masa tumoral) se presenta en sólo un 6-10% de los casos (Rini B *et al.*, 2000; Corgna E *et al.*, 2007), y la metástasis se presenta hasta en un 30% de los casos como diagnóstico inicial (Dalgin GS *et al.*, 2007; Gupta K *et al.*, 2008).

Los principales factores de riesgo establecidos para el CCR son el tabaquismo con un riesgo relativo de 2-3 (Yuan JM *et al.*, 1998; Hunt JD *et al.*, 2005); la obesidad, específicamente el índice de masa corporal (Bjorge T *et al.*, 2004; van Dijk BA *et al.*,

2004), y la hipertensión (McLaughlin JK *et al.*, 1995). Estos factores en conjunto se han asociado con un 49% de los casos (Siegel R *et al.*, 2011).

Los tratamientos actuales para la enfermedad metastásica incluyen inhibidores de cinasas de tirosina, como el sunitinib o el pazopanib, inhibidores de mTOR, como el temsirolimus o el everolimus, o terapia inmunológica contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), pero sus efectos aún son limitados (Fisher R *et al.*, 2013).

El CCR se origina en las estructuras tubulares del riñón y se clasifica en cuatro subtipos histológicos principales. El carcinoma de células renales de células claras (CCRcc) es el tipo más común y representa del 75 al 80% de todos los casos de CCR (Stöhr CG *et al.*, 2013); los otros tipos son el papilar (10-15%), el cromóforo (5%) y el de ducto colector (1%). La ocurrencia del CCR en hombres y mujeres se da en una proporción 2:1, respectivamente (Lipworth L *et al.*, 2006). Asimismo, alrededor del 4% de los casos de CCR son hereditarios y el 96% son esporádicos (Banumathy P *et al.*, 2010).

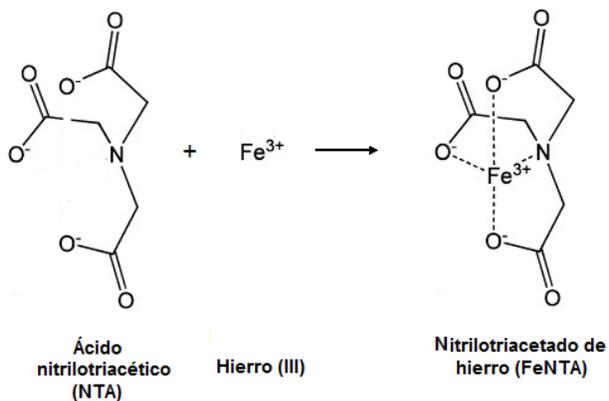
Existe evidencia de la presencia de estrés oxidante en el CCR; por ejemplo, se encontraron niveles elevados de ERO y óxido nítrico (NO) en sangre de pacientes con esta neoplasia, así como un incremento en la peroxidación lipídica en el tejido tumoral (Ganesamoni R *et al.*, 2012). Además, en algunos estudios se ha visto un efecto protector por el consumo de frutas y verduras, alimentos que contienen diversos compuestos antioxidantes (van Dijk BA *et al.*, 2005; Rashidkhani B *et al.*, 2005; Bravi F *et al.*, 2007; Lee JE *et al.*, 2007; Bosetti C *et al.*, 2007). Interesantemente, los principales factores de riesgo para el desarrollo de CCR están vinculados con niveles elevados de estrés oxidante (Gago-Dominguez M *et al.*, 2002 y 2006), por lo que el uso de compuestos antioxidantes podría ser una alternativa para combatir esta enfermedad.

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

Como se ha mencionado anteriormente, debido a las diversas complicaciones que presenta el diagnóstico del CCR humano, es prácticamente imposible detectar, y por lo tanto estudiar, etapas tempranas del desarrollo de esta neoplasia. Ante esto, es importante desarrollar modelos experimentales que asemejen esta patología. Uno de

estos modelos es aquél inducido en murinos por exposición al nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).

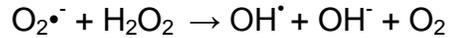
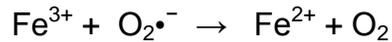
Como se muestra en la figura 3, el FeNTA es un complejo formado por la reacción del  $\text{Fe}^{3+}$  con el ácido nitrilotriacético, es de fácil absorción y se transporta eficientemente a las células del parénquima de varios órganos como el riñón y el páncreas (Awai M *et al.*, 1979).



**Figura 3. Reacción de formación y estructura química del complejo FeNTA.** El compuesto FeNTA se forma por la complejación del ácido nitrilotriacético y el hierro (III) (Modificado Schmidt SR *et al.*, 2007).

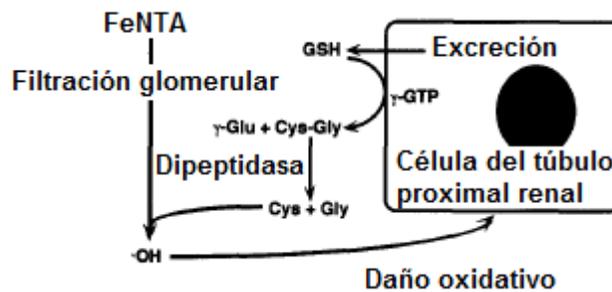
Este compuesto induce daño en los túbulos proximales renales (Toyokuni S *et al.*, 1994; Tanaka T *et al.*, 2000) y se ha sugerido que la nefrotoxicidad de dicho compuesto es consecuencia de la generación de especies reactivas de oxígeno producidas por la reacción de Fenton-Haber Weiss (Figura 4) (Toyokuni S *et al.*, 1994 y 1998; Tsuchiya K *et al.*, 2005).

Como hemos reportado, una de las ventajas que ofrece este modelo es que los tumores inducidos parecen ser la contraparte, al menos histológica, del CCR humano y los datos histopatológicos indican que se trata del tipo de CCR más común, el de células claras (Vargas-Olvera CY, 2009; Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012). Además, se ha observado que se inducen tumores renales hasta en un 80% de las ratas de los animales tratados durante 4 meses con FeNTA, utilizando dietilnitrosamina (DEN) como iniciador tumoral, y que en algunos casos puede presentarse metástasis en hígado y pulmón (Athar M *et al.*, 1998; Toyokuni S *et al.*, 1998; Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Generación de ERO mediante la reacción de Fenton-Haber Weiss.

Se ha reportado que después de la administración intraperitoneal (i.p) en ratas, el FeNTA es absorbido por el mesotelio hacia la vena porta y enviado a circulación previo paso por el hígado. Cuando el FeNTA se encuentra en circulación es filtrado en el riñón por el glomérulo para ser llevado hacia el túbulo proximal. Como se muestra en la figura 5, dentro del túbulo proximal el  $\text{Fe}^{3+}\text{NTA}$  es reducido, por acción del glutatión (GSH), a  $\text{Fe}^{2+}\text{NTA}$ , ocurriendo así la reacción de Fenton-Haber Weiss (Toyokuni S *et al.*, 1998).



**Figura 5. Metabolismo del FeNTA en riñón.** El FeNTA es filtrado hacia los túbulos proximales, en donde es reducido por acción del glutatión (GSH), desencadenando la reacción de Fenton-Haber Weiss. GSH: Glutatión, γ-GTP: γ-Glutamil transpeptidasa. (modificada de Toyokuni S *et al.*, 1998).

A pesar de que este modelo ya ha sido establecido para el estudio de la carcinogénesis renal, aún no están descritas las alteraciones moleculares que llevan a la malignización celular ni aquéllas presentes en los tumores. Esto es importante ya que el modelo bien caracterizado nos permitiría definir sus alcances como equivalente experimental del padecimiento en el humano, representando así una valiosa herramienta para la búsqueda de alteraciones específicas, la identificación de marcadores en etapas tempranas para su detección oportuna, o bien el desarrollo de agentes terapéuticos más eficaces, entre otras cosas. Más aún el hecho de que la carcinogenicidad del FeNTA esté relacionada con la generación de estrés oxidante, hace más interesante el

estudio de este modelo, ya que en muchos tipos de cáncer está involucrado el estrés oxidante, y por lo tanto los alcances de los hallazgos en el modelo van más allá del cáncer renal.

En nuestro laboratorio encontramos que la exposición a FeNTA durante uno y dos meses genera lesiones preneoplásicas como displasia, además de alteraciones moleculares procarcinogénicas en proteínas como c-Jun, HIF,  $\beta$ -catenina, NF $\kappa$ B, algunos miembros de la familia de las PKC's, ciclina D1, por mencionar algunas (Aguilar-Alonso FA, 2010; Rangel-Gómez AT, 2011; Curiel-Muñiz P, 2012; Pariente-Pérez TO, 2012; Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012; Navarro-García R, 2013). Sin embargo, aún falta mucho para identificar y comprender los mecanismos involucrados en el desarrollo del cáncer.

Aunque el FeNTA se ha manejado como un carcinógeno específico para el desarrollo de esta neoplasia, algunos autores han reportado que puede causar daño a otros tejidos. Por ejemplo, en ratones usando un esquema de tratamiento similar se inducen adenomas y adenocarcinomas de pulmón en un 30% de los animales estudiados (Kimoto T *et al.*, 2001). En el caso específico de hígado, se sabe que tras 12 horas de la administración de FeNTA se induce un incremento en los niveles de estrés oxidante, así como daños tisulares en dicho tejido y algunos eventos pro-proliferativos (Agarwal MK *et al.*, 2005). No obstante, no se han encontrado reportes que indiquen que el FeNTA es capaz de generar algún cáncer de origen hepático.

Con base en lo anterior, muy probablemente en el modelo de carcinogénesis renal por FeNTA se esté causando daño en hígado y pulmón, pero no es el tipo de daño que pueda llevar al desarrollo de tumores primarios en estos tejidos. Como parte de nuestra propuesta de estudio, se busca comparar en etapas tempranas el comportamiento de diversas proteínas de interés en riñón con su estatus en hígado y pulmón, para reforzar la idea de que las alteraciones moleculares encontradas y que persisten en tejido renal, más no en tejidos hepático y pulmonar, pueden ser partícipes en el desarrollo de CCR.

## 2.4 Polifenoles y cáncer

Los polifenoles son moléculas antioxidantes que protegen a las células contra los efectos dañinos de las ERO (Prior RL, 2003; Wu X *et al.*, 2004; Heo HJ *et al.*, 2007). Estos compuestos forman parte de frutas y verduras de la dieta del humano, siendo los flavonoides y ácidos fenólicos los polifenoles más comunes (Sporn MB *et al.*, 2002). Desde hace algunos años se han descrito los efectos de los polifenoles en la salud humana, incluyendo sus propiedades anti-cancerígenas (Link A *et al.*, 2010). Se sabe que el estrés oxidante puede tener un papel importante en el desarrollo del cáncer, mediante diversos mecanismos que incluyen la desregulación de vías de señalización, por lo que los compuestos fenólicos pueden combatir esta patología a través de su capacidad antioxidante (Bhooshen PK *et al.*, 2009). De hecho, se tiene bien documentado en muchos estudios en cultivos celulares, modelos animales o pacientes el papel protector de los polifenoles de la dieta contra diferentes tipos de cáncer (Yang CS *et al.*, 2001; Singh UP *et al.*, 2009; Cui X *et al.*, 2010), y se ha descrito que los efectos benéficos de los compuestos fenólicos están relacionados, por ejemplo, con la inhibición de la lipoperoxidación, efectos antiinflamatorios, inducción de apoptosis, inducción de arresto del ciclo celular, así como inhibición de la metástasis y la angiogénesis (Nichenametla SN *et al.*, 2006; Manson MM, 2003; Surh YJ, 2003; Agarwal MK *et al.*, 2005). A nivel molecular, algunas explicaciones para la eficacia quimiopreventiva de estos compuestos incluyen la inhibición de vías de señalización como PI3K/Akt, ERK, Ras/Raf/MAPK y/o activar moléculas como JNK, p53 y caspasas; esto lleva a la regulación de la expresión de genes como Waf-1, BAX, Bcl-2 y la supresión de factores de transcripción como AP-1 y NF- $\kappa$ B (Lee KN *et al.*, 2006; Nichenametla SN *et al.*, 2006).

Debido a los retos que presenta el tratamiento del cáncer, el uso de agentes naturales y sus derivados farmacológicos para impedir, arrestar o revertir la carcinogénesis en etapas tempranas se mantiene como un enfoque práctico y prometedor para el manejo de esta patología (Sporn MB *et al.*, 2002; Bhooshen PK *et al.*, 2009).

### 2.4.1 Extracto de semillas de tamarindo (EST)

El tamarindo, *Tamarindus indica L.*, presenta un alto contenido de compuestos fenólicos (Lamien-Meda A *et al.*, 2008), tanto en las semillas como en el pericarpio (Sudjaroen Y *et al.*, 2005), con actividad antioxidante (Povichit N *et al.*, 2010). La composición polifenólica que se ha reportado en las semillas de tamarindo es: epicatequina (4.8%), procianidina B2 (5.5%), trímero (18.1%), tetrámero (30.2%), pentámero (17.6%) y hexámero (23.8%) de procianidina (Sudjaroen Y *et al.*, 2005).

En estudios agudos realizados en nuestro laboratorio, se observó que la administración oral de un extracto de pulpa de tamarindo a una dosis de 25 mg<sub>fenoles totales</sub>/Kg<sub>peso</sub> disminuye significativamente los niveles de marcadores de estrés oxidante (lipoperoxidación medido como malondialdehído, proteínas oxidadas medidas como carbonilos, y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en riñón inducido una hora después de la administración de una dosis de 9 mg<sub>Fe</sub>/Kg<sub>peso</sub> de FeNTA (Torres-Martínez M, 2007; López-Ramos D, 2007).

De igual forma, en nuestro laboratorio se preparó un extracto de semillas de tamarindo (EST) con un alto contenido de compuestos fenólicos, una notable capacidad antioxidante *in vitro* y muy buena estabilidad a largo plazo. En un estudio de tratamiento agudo con FeNTA, en el que se observó un fuerte daño histológico e insuficiencia renal, una dosis de 100 mg<sub>FT</sub>/Kg<sub>peso</sub>/día de EST disminuyó significativamente estas alteraciones. Asimismo, la administración reduce la incidencia y retarda la progresión de los tumores inducidos por la exposición crónica (4 meses) a FeNTA (Vargas-Olvera CY, 2009; Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012).

### 2.5 Generalidades de la proteína cinasa B (PKB) o Akt

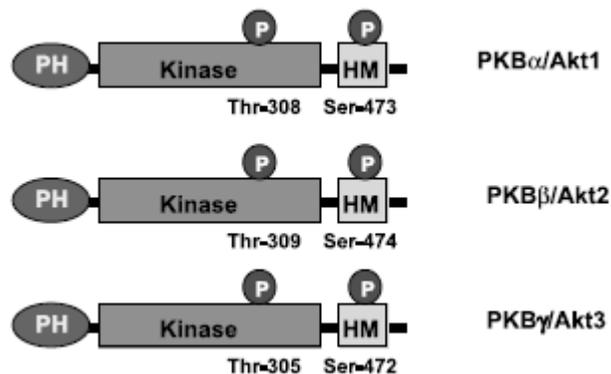
La proteína Akt, también conocida como PKB (por sus siglas en inglés Protein Kinase B), es una cinasa de serina/treonina que participa en la regulación de diversos procesos celulares como proliferación, supervivencia y rutas metabólicas (Hanada M *et al.*, 2004).

Esta cinasa se ha estudiado ampliamente y representa un nodo de señalización crítico en eucariotes, así como una de las cinasas de proteínas más importantes en cuanto a la fisiología y patología humanas (Manning BD *et al.*, 2007).

En mamíferos, Akt tiene tres homólogos estrechamente relacionados y altamente conservados (> 80% de identidad en secuencia de aminoácidos), denominados Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$ , Akt3/PKB $\gamma$  (Hanada M *et al.*, 2004).

Como se muestra en la figura 6, cada miembro de la familia Akt contiene un dominio de homología a plecstrina (PH) en la región del extremo amino terminal, un dominio central de cinasa y un dominio regulatorio en la región carboxilo terminal, que contiene un motivo hidrofóbico (HM).

Se ha demostrado que las isoformas de Akt pueden tener actividades tanto redundantes como particulares que participan en las funciones celulares normales, y que se ven desreguladas en el desarrollo de cáncer (González E *et al.*, 2009).

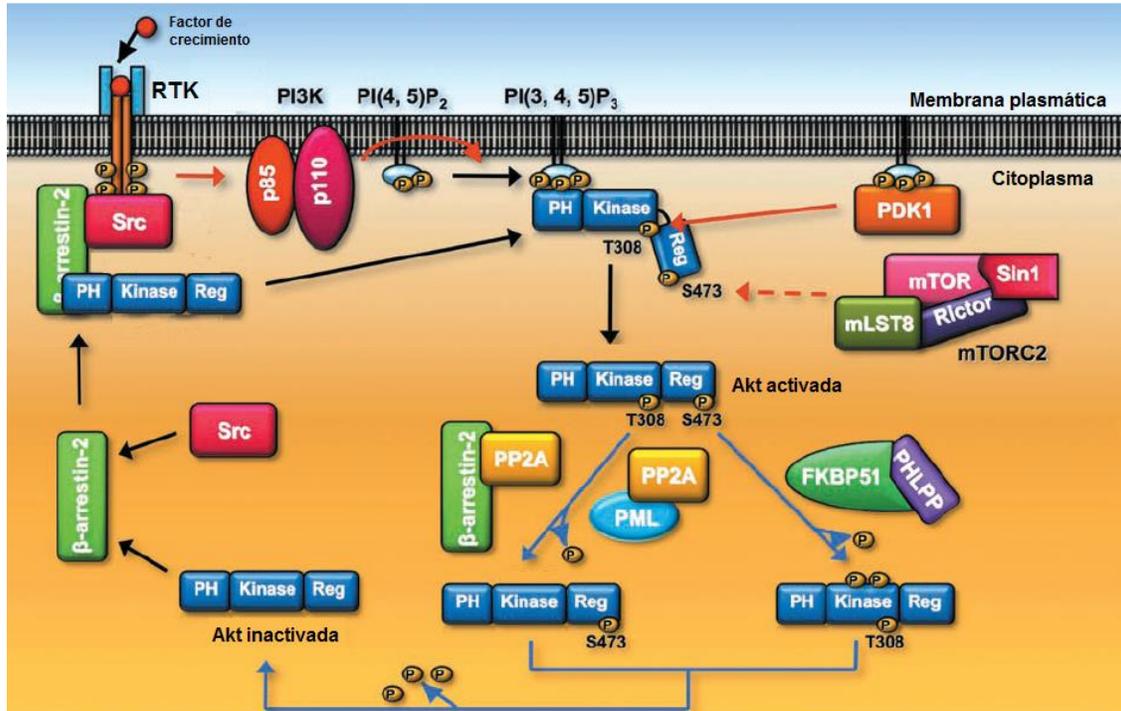


**Figura 6. Principales dominios conservados en la familia Akt.** Las tres isoformas de Akt contienen un dominio de homología a plecstrina (PH) en la región amino terminal, un dominio central de cinasa (kinase) y un dominio regulatorio en la región carboxilo terminal, que contiene un motivo hidrofóbico (HM). En las 3 isoformas se dan 2 fosforilaciones importantes para su activación. En el caso de Akt1 estas ocurren en la Thr-308 y Ser-473. (Modificado de Hanada M *et al.*, 2004).

Akt es activada vía estimulación de receptores de factores de crecimiento y hormonales con actividad de cinasas de tirosina (RTKs), como el receptor del factor de crecimiento

derivado de plaquetas (PDGF-R), el de insulina (IR), el de insulina tipo 1 (IGF1-R), el del factor de crecimiento epidermal (EGF-R) y el del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-R) (Chan TO *et al.*, 1999; Coffey PJ *et al.*, 1998; Blume-Jensen P *et al.*, 2001; Schlessinger J, 2000). Esta activación de Akt es dependiente de PI3K (Chan TO *et al.*, 1999; Coffey PJ *et al.*, 1998), la cual comprende una familia de cinasas de lípidos que fosforilan el grupo hidroxilo-3' de fosfatidilinositoles (PIs). Las PI3Ks están clasificadas en tres clases (1, 2 y 3), y éstas, a su vez, se dividen en subclases, siendo las de la subclase 1a las encargadas de responder a la señalización por factores de crecimiento (Cantley LC 2002; Yuan TL *et al.*, 2008; Engelman JA *et al.*, 2006). Cuando las PI3Ks de subclase 1a son activadas por RTKs, fosforilan el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) en la posición 3' de su anillo inositol y convierten el PIP2 a fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) en la membrana plasmática (Chan TO *et al.*, 1999; Coffey PJ *et al.*, 1998; Yuan TL *et al.*, 2008). Subsecuentemente, el PIP3 recluta a Akt y a la cinasa 1 dependiente de 3'-fosfoinositidos (PDK1), que poseen un dominio PH mediante el cual se unen al PIP3 (Figura 7) (Chan TO *et al.*, 1999; Vogt PK *et al.*, 2009; Coffey PJ *et al.*, 1998; Toker A *et al.*, 2000; Peifer C *et al.*, 2008; Mora A *et al.*, 2004). En el caso de Akt, la interacción de su dominio PH con PIP3 induce cambios conformacionales en la cinasa, exponiendo sus dos principales sitios de fosforilación en los dominios catalítico (T308 para Akt1) y regulatorio (S473 para Akt1). Se ha descrito que primero ocurre la fosforilación en T308 por PDK1, lo cual estabiliza el "loop" de activación en una conformación activa y permite la posterior fosforilación de Akt en S473 por mTORC2, resultando esto en la completa activación de la enzima (Peifer C *et al.*, 2008; Mora A *et al.*, 2004; Bellacosa A *et al.*, 1998; Alessi DR *et al.*, 2009). Se ha observado que la mutación puntual de estos sitios (T308A y S473A para Akt1) genera proteínas con escasa actividad, aún después de la estimulación con insulina o IGF-1, mientras que las mutantes que mimetizan las fosforilaciones (T308D y S473D) muestran una activación constitutiva de la cinasa, indicando que T308 y S473 son necesarias para la completa activación de Akt (Bellacosa A *et al.*, 1998; Alessi DR *et al.*, 2009; Kandel E *et al.*, 1999; Zhang X *et al.*, 2006; Yang J *et al.*, 2002; Scheid MP *et al.*, 2003).

Akt tiene diversas funciones celulares y es vasta la cantidad de blancos directos de esta cinasa. Puede fosforilar, y de esta manera inhibir, proteínas pro-apoptóticas como Bad y Foxo3a, previniendo así la apoptosis (Cantley LC, 2002; Datta SR *et al.*, 1999).



**Figura 7. Regulación de la activación de Akt inducida por factores de crecimiento.** En respuesta a factores de crecimiento los receptores con actividad de cinasa de tirosinas (RTK) activan a PI3K, la cual convierte PIP2 en PIP3, generando los sitios de reclutamiento de proteínas con dominio PH, como Akt y PDK1, a la membrana plasmática. Una vez translocada a la membrana, Akt es fosforilada por PDK1 en el dominio catalítico (T308) y por mTORC2 en el dominio regulatorio (S473), activándola. A su vez, estos residuos pueden ser desfosforilados por las fosfatasas PP2A/PML y PHLPP/FKBP51, respectivamente. Las proteínas arrestina 2 y Src funcionan como andamiaje para mediar algunos pasos de la activación de Akt, como se observa en la figura (Modificado de Yang WL *et al.*, 2010).

Además, fosforila y activa numerosas proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular (pro-oncogénicas), como HDM2, IKK y Skp2 (Ozes ON *et al.*, 1999; Ecker K *et al.*, 2009; Lin HK *et al.*, 2002; Zhou BP *et al.*, 2001). Asimismo, Akt regula el crecimiento celular y la traducción de proteínas por fosforilación e inactivación de TSC2, lo que resulta en la activación de la vía mTORC1 (Li Y *et al.*, 2004; Manning BD *et al.*, 2003).

Akt, además, regula el metabolismo de glucosa a través de la fosforilación e inactivación de GSK3 $\beta$  (Bondy CA *et al.*, 2004), por mencionar sólo algunos ejemplos.

## 2.6 Akt y cáncer

El cáncer está invariablemente acompañado por cambios en la transducción de señales. Alteraciones en proto-oncogenes y genes supresores de tumores llevan a una señalización celular desregulada que sustenta el potencial transformante de las células. Si bien todas las proteínas que participan en estas vías de señalización son importantes, algunas de ellas son actores clave en diversas redes de señalización y pueden servir como blancos terapéuticos (Banumathy P *et al.*, 2010) como es el caso de Akt. Los niveles de esta cinasa activada (p-Akt) se han reportado aumentados en muchos tipos de cáncer como se muestra en la tabla 1 (Bellacosa A *et al.*, 2005; Altamore DA *et al.*, 2005). Por otro lado, la amplificación del gen AKT2 es considerado un evento frecuente en varios tipos de cáncer humano, entre ellos el cáncer de ovario, pancreático, de mama, gástrico y de células escamosas de cabeza y cuello (Pedrero JM *et al.*, 2005; Bellacosa A *et al.*, 1995; Nakayama K *et al.*, 2006; Ruggeri BA *et al.*, 1998; Miwa W *et al.*, 1996). A diferencia de AKT2, la amplificación de AKT1 es poco frecuente, pero su sobre-expresión ha sido reportada en cáncer de mama y colon (Roy HK *et al.*, 2002; Stal O *et al.*, 2003). Esta sobre-expresión, además, ha sido detectada hasta en un 57% de adenomas de colon, siendo identificada como un evento temprano durante la tumorigénesis en este tejido (Xu X *et al.*, 2004). Más aún, el incremento en p-Akt (S473) se ha reportado en lesiones preneoplásicas tales como displasias bronquiales, sugiriendo que la activación de Akt puede ser un evento temprano en la promoción de la carcinogénesis, y puede representar un blanco importante para la quimioprevención en individuos con alto riesgo de cáncer de pulmón (Tsao AS *et al.*, 2003; Balsara BR *et al.*, 2004).

Además de las alteraciones sobre Akt, se pueden presentar otros cambios en distintas proteínas que regulan esta vía (Bugge J *et al.*, 2007). Por ejemplo, los genes que codifican para PI3K (Shayesteh L *et al.*, 1999) y RTKs como HER2 (Salomon DS *et al.*, 1987) y EGFR (Salomon DS *et al.*, 1995) se encuentran frecuentemente amplificados

en cáncer. En contraste, se ha reportado la pérdida de función de la fosfatasa PTEN, considerada supresor tumoral, por diversos mecanismos como mutaciones puntuales, deleciones, pérdida de heterocigosidad o metilación de su región promotora, en carcinomas como el hepatocelular, de pulmón y de células renales (CCR) (Sansal I *et al.*, 2004; Faivre S *et al.*, 2006; Hennessy BT *et al.*, 2005).

**Tabla 1. Neoplasias humanas donde se ha reportado un aumento de Akt activada.**

Tipo de tumor	% de tumores con Akt activada
Glioma	≈ 55
Carcinoma de tiroides	80-100
Carcinoma de mama	20-55
Carcinoma de pulmón de células pequeñas	≈60
Carcinoma de pulmón de células no pequeñas	30-75
Carcinoma gástrico	≈80
Tumores estromales gastrointestinales	≈30
Carcinoma pancreático	30-70
Carcinoma de ducto biliar	≈85
Carcinoma de ovario	40-70
Carcinoma endometrial	>35
Carcinoma de próstata	45-55
Carcinoma de células renales	≈40
Linfoma anaplásico de células grandes	100
Leucemia mieloide aguda	≈70
Mieloma múltiple	≈90
Mesotelioma maligno <sup>a</sup>	≈65
Melanoma maligno <sup>b</sup>	43-67
<sup>a</sup> Altamore DA <i>et al.</i> (2005); <sup>b</sup> revisado en Robertson GP (2005); los tipos de cáncer restantes se revisaron en Bellacosa A <i>et al.</i> (2005)	

## 2.7 Akt y CCR

Existe evidencia de la activación de Akt en el CCR humano. Hennenlotter J *et al.* (2012) analizaron mediante inmunohistoquímica los niveles proteicos de p-Akt (S473) en oncocitomas renales, los cuales se han designado como lesiones benignas del CCRcc, y se compararon con tejido tumoral y tejido adyacente al tumor, encontrando que los niveles de p-Akt en el tejido tumoral están aumentados con respecto al tejido renal adyacente y al oncocitoma. Además, Kim J *et al.* (2009) reportaron un aumento en t-Akt y p-Akt tanto en tumores primarios como en líneas celulares de CCR humano, determinado por Western blot e inmunocitoquímica, y observaron que, aunque los tumores exhibieron heterogeneidad en los niveles de p-Akt, en todas las muestras fueron mayores con respecto a sus contrapartes de tejido renal sano. Interesantemente, en otro estudio se observó mediante inmunohistoquímica la tinción contra p-Akt tanto en citosol como en núcleo (Pantuck AJ *et al.*, 2007). La tinción citosólica fue detectada en 93% de los tumores analizados, y la tinción fue mucho mayor en CCR de células claras (CCRcc) que en CCR que no es de células claras. Por su parte, la tinción nuclear fue positiva en 61% de los tumores y esto correlacionó con la enfermedad no metastásica en los pacientes, por lo cual la localización nuclear de p-Akt fue asociada con un pronóstico favorable, mientras que su localización citosólica fue asociada con un pronóstico desfavorable.

A pesar de la amplia evidencia del aumento en los niveles proteicos de t-Akt y p-Akt en el CCR humano, existe poca evidencia de mutaciones en los genes que la codifican. En un estudio realizado por Sato Y *et al.* (2013), se encontró mutado sólo el gen de AKT2 en el 2% de las muestras analizadas (2 de 106 tumores), sin embargo, en la mayoría de los tumores encontraron alguna alteración en al menos uno de los componentes de vía PI3K/Akt analizados (76%, 81 de 106 muestras), lo cual sugiere que las alteraciones observadas en los niveles de Akt y p-Akt por otros investigadores se pudiera deber a la desregulación río arriba.

No hay reportes en la literatura, hasta donde sabemos, en cuanto al estatus de t-Akt y p-Akt en etapas tempranas en el desarrollo del CCR humano evidentemente por las

dificultades que esto representa, pero tampoco en el modelo experimental inducido con FeNTA, en el cual, incluso, se desconoce el comportamiento de la cinasa en los tumores. El único directo es aquél encontrado en nuestro laboratorio, donde se observó un aumento en los niveles proteicos de t-Akt en cortezas renales de ratas expuestas durante un mes a FeNTA (resultados de una tesis previa que está en revisión).

## **2.8 Akt y estrés oxidante**

Similar a la regulación de la función proteica por fosforilación, la oxidación de residuos de cisteína resulta en cambios conformacionales, estructurales o directamente catalíticos de las proteínas (Cross JV *et al.*, 2006), y Akt presenta sitios sensibles a estrés oxidante. Varios estudios sugieren que se forma un enlace intramolecular entre las cisteínas 296 y 310 de Akt en células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Huang BX *et al.*, 2006; Martin D *et al.*, 2002) ó al anión superóxido (Luo L *et al.*, 2012). Si bien este cambio conformacional en Akt puede inducir su activación transitoria, esto es seguido por la desfosforilación de Akt mediante una mayor unión con la fosfatasa PP2A (Murata H *et al.*, 2003). Por su parte, Cao J *et al.* (2009) demostraron que la formación del enlace disulfuro entre estas cisteínas no afecta la actividad de cinasa de Akt *in vitro*, sino que genera cambios conformacionales que resultan en la desfosforilación de Akt de manera indirecta por la disminución de su unión a la proteína chaperona Hsp90 (que impide la desfosforilación de Akt) y aumento de la unión con PP2A (que desfosforila a Akt), ya que se sugiere que Hsp90 y PP2A se unen a la misma región de Akt (residuos de aminoácidos 229-309) (Sato S *et al.*, 2000).

En cambio, interesantemente se ha observado que con niveles bajos o moderados de estrés oxidante se puede inducir la fosforilación de Akt, así como “resistencia” a la desfosforilación, siendo esta una manera alternativa de activación de la cinasa (Wang X *et al.*, 2000; Dong-Yu S *et al.*, 2003; Uranga RM *et al.*, 2013). Esto es importante ya que se ha sugerido que en células cancerosas predominan niveles moderados de estrés oxidante (Valko M *et al.*, 2005), y probablemente una de las ventajas que le confiere este ambiente a las células malignizadas sea la activación de Akt.

Además de que la actividad de Akt puede ser regulada por estrés oxidante, y en particular por ERO, esta cinasa también influye en los niveles de estas especies reactivas en la célula mediante dos mecanismos: 1) capitaliza el papel conservado evolutivamente de Akt como un estimulador de la glucólisis y el metabolismo oxidativo (Plas DR *et al.*, 2005), y 2) la fosforilación directa y exclusión del núcleo de la familia de factores de transcripción Forkhead box O (FoxO), impidiendo así que induzcan la transcripción de genes que codifican para enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Nogueira V *et al.*, 2008).

Por último, las ERO afectan la señalización de Akt no sólo por la acción directa sobre esta cinasa, sino también por inactivar proteínas que funcionan como supresores de esta vía de señalización, tal es el caso de PP2A (Clerkin JS *et al.*, 2008) y PTEN (Lee SR *et al.*, 2002; Cho SH *et al.*, 2004).

### 3 JUSTIFICACIÓN

El carcinoma de células renales (CCR) es el cáncer renal más común en adultos y tiene un alto índice de mortalidad, ya que frecuentemente se diagnostica en etapas muy avanzadas por ser asintomático, entre otras razones. Uno de los escasos modelos experimentales que existen para el estudio del CCR, es aquél inducido con el carcinógeno FeNTA. En nuestro laboratorio se ha implementado este modelo en ratas Wistar, logrando desarrollar tumores con un esquema de tratamiento con una administración única del iniciador tumoral dietilnitrosamina (DEN) y 4 meses de exposición al carcinógeno. Las características histológicas de los tumores inducidos corresponden al CCR que se presenta en el humano. Además, el estrés oxidante tiene un papel clave en el proceso de carcinogénesis inducido con FeNTA, y hemos observado que un extracto de semillas de tamarindo (EST), con gran capacidad antioxidante, disminuye la incidencia y retarda el grado de avance de los tumores.

Actualmente se está analizando en este modelo animal el estatus de vías de señalización que se han vinculado con el desarrollo de cáncer en general y que se han visto alteradas en los tumores humanos de CCR, con la finalidad de caracterizar el modelo y establecer su equivalencia con la enfermedad en el humano. Parte de esta línea de investigación es determinar si se presentan alteraciones de estas vías de señalización en etapas tempranas del modelo, lo cual es importante ya que esto es prácticamente imposible estudiarlo en los pacientes, y que es cuando un proceso canceroso es más controlable.

Con base en evidencias previas, como la presencia de displasia y otras alteraciones pro-carcinogénicas a 1 y 2 meses de exposición a FeNTA, hemos considerado estos tiempos de estudio como etapas tempranas del proceso carcinogénico en el modelo.

Entre las vías de señalización de interés, se propuso estudiar el comportamiento de la cinasa Akt, ya que está involucrada en la supervivencia, crecimiento y proliferación celular, y existen reportes en la literatura de su sobreexpresión en varios tipos de cáncer, incluyendo el CCR humano. Particularmente, en nuestro laboratorio se encontró un aumento en los niveles de t-Akt en riñón de ratas expuestas durante 1 mes a

FeNTA, pero se desconoce si esta cinasa está fosforilada (S473), es decir activa. Por lo tanto, para caracterizar más a fondo el comportamiento de la cinasa en etapas tempranas, en el presente proyecto se propuso analizar los niveles totales de esta proteína y de su forma fosforilada, tanto en tejido renal como hepático y pulmonar de ratas expuestas al carcinógeno durante 1 y 2 meses. Estos últimos tejidos se analizaron con el fin de identificar si la respuesta de Akt ocurre particularmente en el riñón, donde se desarrolla el cáncer, o es más generalizada. Con esto se pretende caracterizar mejor el comportamiento de la enzima y su posible participación en el proceso de carcinogénesis por FeNTA. Además, se evaluó el efecto del EST sobre las posibles alteraciones en la cinasa, ya que este podría ser uno de los mecanismos mediante los cuales el EST protege contra el desarrollo de CCR en el modelo.

## **4 HIPÓTESIS**

En concordancia con el comportamiento previamente observado de t-Akt, los niveles renales de p-Akt estarán aumentados después de un mes de exposición a FeNTA, así como aquéllos de la cinasa tanto total como fosforilada después de dos meses, y el EST protegerá contra estas alteraciones.

Los niveles de la cinasa se mantendrán normales en hígado y pulmón.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Determinar el estatus de la cinasa Akt en su forma total y fosforilada (S473) en riñón, hígado y pulmón de ratas expuestas durante uno y dos meses a FeNTA.

### **5.2 Objetivos particulares**

- Desarrollar protocolos de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA en ratas Wistar macho.
- Determinar los niveles de t-Akt y p-Akt en tejidos renal, hepático y pulmonar mediante la técnica de Western blot.
- Evaluar el efecto del EST sobre las posibles alteraciones en los niveles de la cinasa debidas al tratamiento con FeNTA.

## 6 MATERIAL Y MÉTODOS

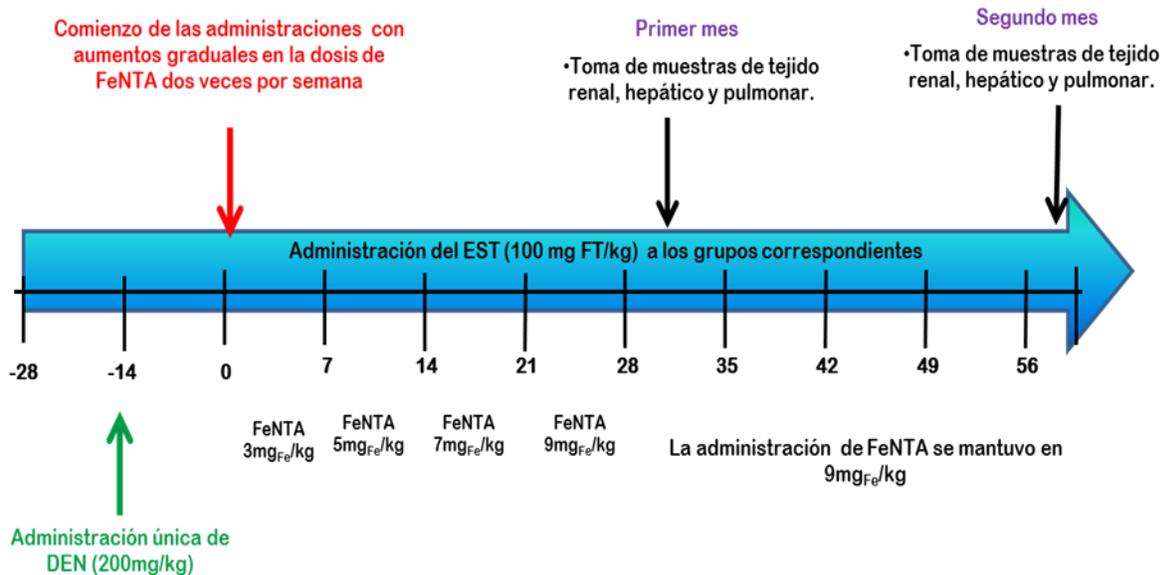
### 6.1 Protocolo experimental

Se utilizaron ratas macho Wistar (Harlan México-UNAM), cuyo peso inicial oscilaba entre 50 y 70 g, y se distribuyeron en 6 grupos: control (C), EST (E), DEN (D), FeNTA (F), DEN+FeNTA (DF) y EST+DEN+FeNTA (EDF). En la tabla 2 se describen las dosis y vías de administración de los diferentes grupos experimentales y en la figura 8 se resume el esquema de tratamiento seguido en el presente estudio.

Tabla 2. Grupos de estudio y esquema de tratamiento para cada uno.

Grupo	No. de animales	Esquema de tratamiento
<b>Control (C)</b>	10	Vehículos
<b>EST (E)</b>	6	Administración del EST (100 mg <sub>FT</sub> /Kg/día) en el agua de beber durante todo el protocolo a los grupos correspondientes.
<b>DEN (D)</b>	6	Administración i.p. única de DEN (200mg/kg) 15 días después del inicio de la administración del EST.
<b>FeNTA (F)</b>	10	Administración i.p. de FeNTA, 15 días después de la administración del DEN, dos veces por semana con aumentos semanales de la dosis (3, 5, 7, 9 mg <sub>Fe</sub> /kg).
<b>DF</b>	12	Administración del DEN+FeNTA como se describió en los grupos anteriores.
<b>EDF</b>	12	Administración del EST+DEN+FeNTA como se describió en los grupos anteriores.

i.p., intraperitoneal; FT, fenoles totales; EST, extracto de semillas de tamarindo; FeNTA, nitrilotriacetato de hierro; DEN, N-dietilnitrosamina.



**Figura 8. Esquema del desarrollo del protocolo experimental.** Se inició la administración del EST en el agua de beber a una dosis de 100 mg/kg/ día a los grupos correspondientes. Quince días después se administró el DEN a la dosis única de 200 mg/kg vía intraperitoneal (i.p.) y, a los quince días, se inició la administración de FeNTA con un esquema de dos inyecciones semanales aumentando gradualmente la dosis, como se muestra en la figura. Uno y dos meses después de la primera administración de FeNTA se sacrificaron los animales por decapitación a las 48 horas de la última administración del carcinógeno.

Este esquema de tratamiento se desarrolló con base en la literatura (Toyokuni S *et al.*, 1994; Eybl V *et al.*, 2008) y en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Vargas-Olvera CY, 2009; Aguilar-Alonso FA, 2010; Pariente-Pérez TO, 2012; Navarro-García R, 2013). El EST administrado se obtuvo y caracterizó anteriormente en nuestro laboratorio (Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012). La mitad de los animales se sacrificaron después de un mes de exposición al FeNTA y el resto a los dos meses. La inmolación de las ratas se llevó a cabo por decapitación 48 horas después de la última administración de FeNTA y se obtuvieron las cortezas renales, así como muestras de hígado y pulmón, que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido (192 °C) y almacenaron a -70 °C hasta su utilización. Cabe señalar que este procedimiento lleva a la formación de tumores de CCR cuando se extiende a 4 meses de tratamiento con FeNTA (Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012).

## **6.2 Administración del EST**

El EST se administró a los grupos correspondientes en el agua de beber a una dosis de 100 mg FT/Kg/día, la cual en estudios previos ha demostrado el mayor efecto antioxidante sin producir efectos adversos (Vargas-Olvera CY, 2009). La administración del EST se inició 15 días antes de la inyección del DEN y se mantuvo a lo largo del protocolo. Para calcular la cantidad de EST que debía añadirse al agua de beber para que cada rata recibiera la dosis diaria de fenoles totales, se determinó el volumen promedio de agua bebida por los animales, así como su peso corporal durante todo el estudio.

## **6.3 Administración de N-dietilnitrosamina (DEN)**

El DEN (Sigma Aldrich Inc., St. Louis MO, EUA) se administró una sola vez por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 200 mg/kg 15 días después de haber iniciado el tratamiento con el EST y 15 días antes de la primera administración de FeNTA (figura 9). La dosis se eligió de acuerdo con la literatura (Khan N *et al.*, 2005) y observaciones previas en nuestro laboratorio (Vargas-Olvera CY, 2009).

El DEN se preparó 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.

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

El FeNTA se preparó siguiendo el método de Awai M *et al.* (1979), con ligeras modificaciones (Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012). Se utilizó una solución de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  160 mM (Sigma Aldrich Inc., St. Louis MO, EUA) y otra de nitrilotriacetato de sodio 320mM (Sigma Aldrich Inc. (St. Louis MO, EUA), utilizando en ambos casos una solución de  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  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  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ . La concentración final de hierro es de 2.98  $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}$  (Ver anexo 11.1). El FeNTA se administró recién preparado vía i.p. dos veces por semana durante 1 mes con

aumentos graduales de la dosis, partiendo de 3 mg<sub>Fe</sub>/kg hasta alcanzar una dosis de 9 mg<sub>Fe</sub>/Kg en la cuarta semana, la cual se mantiene para el caso del protocolo de dos meses. El volumen de solución de FeNTA administrada se basó en la concentración de hierro y en el peso del animal, efectuando un cálculo como en el siguiente ejemplo:

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

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

## 6.5 Sacrificio y toma de muestras

Las ratas de todos los grupos de tratamiento se sacrificaron por decapitación 48 horas después de la última administración de FeNTA a los grupos correspondientes. De cada rata se obtuvieron ambos riñones y se separó la corteza de la médula. La corteza se dividió en fracciones, las cuales fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron posteriormente a -70 °C hasta el día en que fueron analizadas. Además, se obtuvieron muestras de tejido hepático y pulmonar, las cuales se almacenaron de la misma manera.

## 6.6 Métodos

A continuación se describen de manera general los métodos empleados en el presente trabajo experimental. En los anexos se describen las técnicas con detalle así como la preparación de las soluciones utilizadas.

## 6.7 Obtención y caracterización del EST

Se colocaron 25 g de cáscaras de semilla de tamarindo, obtenidas mediante fragmentación mecánica, en 500 ml de etanol anhidro y se maceraron durante 24 horas a temperatura ambiente (extracción etanólica). Después se separó el líquido de los restos de semillas mediante decantación y este líquido se concentró al vacío en un rota-

evaporador hasta la obtención de un polvo. A este polvo se le asignó el nombre de extracto de semillas de tamarindo (EST) (Vargas-Olvera CY, 2009).

### **6.8 Extracción de proteínas del tejido renal, hepático y pulmonar**

Para estudiar la proteína de interés en las muestras, se homogenizaron 100 mg de tejido en 650µL de amortiguador de lisis pH 7.4 en baño de hielo, cuya composición es: 1,4- ditioneitol (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 los homogenados se les determinó el contenido de proteínas totales mediante el método de Bradford que se describe a continuación.

### **6.9 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Este método se basa en la detección colorimétrica que involucra la unión del azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas, lo que causa un cambio en la absorción máxima del colorante de 465 a 595 nm. La absorbancia a esta última longitud de onda es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra (Bradford MM, 1976) (Ver anexo 11.2).

### **6.10 Niveles de Akt total y en su forma fosforilada mediante Western blot**

La técnica de Western blot (WB) consiste en la detección de proteínas de interés (en este caso Akt) mediante el uso de anticuerpos específicos. A continuación se describe el procedimiento de esta técnica que consiste de varios pasos, que son electroforesis, transferencia e inmunodetección.

## 6.11 Electroforesis y transferencia

Con base en la determinación de proteínas totales por el método de Bradford, se calculó el volumen de homogenado necesario para cargar en cada pozo de los geles de la electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) 60 µg de proteína, para el caso de las cortezas renales, y 40 µg para hígados y pulmones. La electroforesis se corrió durante 4 h a 80 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 2 horas a 250 mA (Ver Anexos 11.3 y 11.4).

## 6.12 Detección de la proteína de interés

Terminada la transferencia, se bloqueó la membrana durante 1 h con suero fetal bovino (SFB) al 10% para el caso de p-Akt, o con leche al 1% para t-Akt y  $\alpha$ -tubulina. Después se incubó durante toda la noche con el anticuerpo específico de la proteína de interés (tabla 3).

Tabla 3. Diluciones de anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunodetección.

Proteína	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
t-Akt	1:750	1:40 000
p-Akt (S473)	1:600	1:40 000
$\alpha$ -tubulina	1:10 000	1:30 000

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-conejo (o anti-ratón, según sea el caso) acoplado a la peroxidasa de rábano. Todos los anticuerpos utilizados se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, EUA. 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<sup>TM</sup>Western

Chemiluminescent HRP substrate, Millipore Corporation, MA, USA) (anexo 11.5) y se expusieron las membranas a una placa de rayos X (anexo 11.6). Las placas obtenidas se analizaron por densitometría utilizando el programa Image J (Broken Symmetry Soft). Se realizó esta determinación tanto para Akt como para p-Akt y se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. Posteriormente, en todos los grupos experimentales se obtuvo la relación entre t-Akt ó p-Akt y el control de carga para poder ajustarla con respecto al grupo control. Los datos se expresaron como unidades relativas de densitometría (URD) y se graficaron con el programa “Graphpad Prism” versión 5.

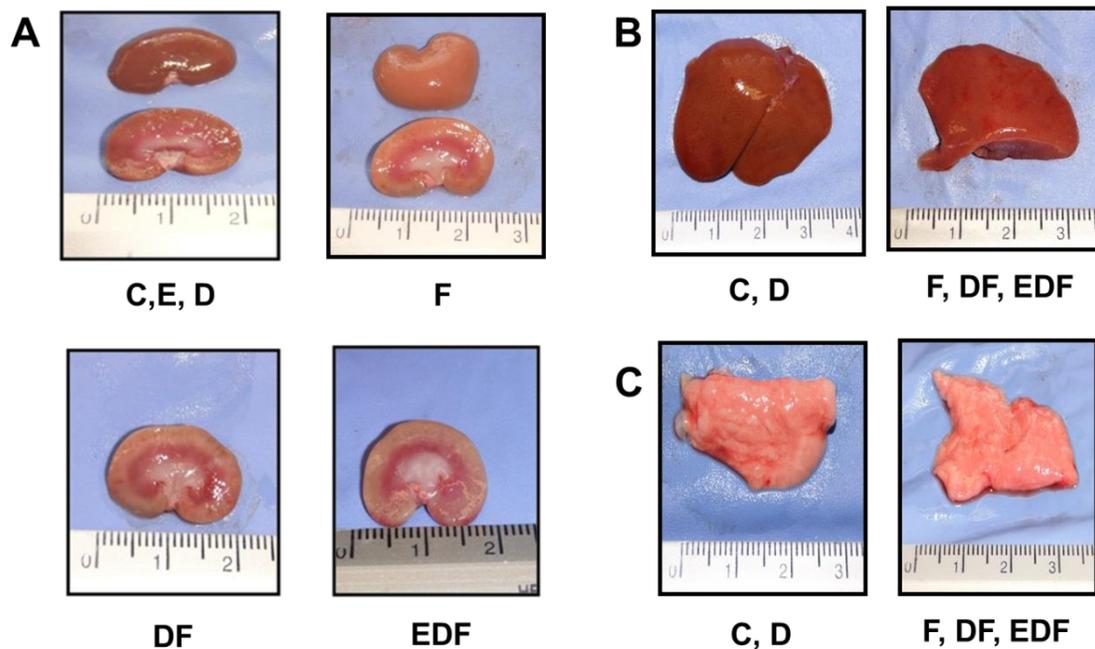
### **6.13 Análisis estadístico**

La significancia estadística se estableció por medio del análisis de varianza, ANOVA, y utilizando el método de comparación múltiple de Newman Keuls. Las diferencias estadísticamente significativas se tomaron a partir de un valor de  $p \leq 0.05$ .

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Protocolo de tratamiento con FeNTA

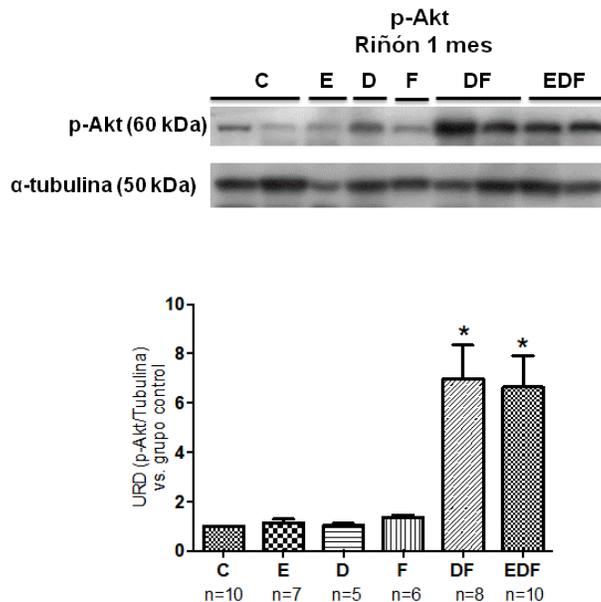
Al momento de la extirpación de los riñones, se realizó un análisis macroscópico para determinar si se presentaba algún cambio por el tratamiento con FeNTA. A un mes de exposición al carcinógeno los riñones de los grupos E y D presentaron características macroscópicas similares a las del grupo C, mientras que en los grupos F, DF y EDF se observó palidez de la corteza renal, así como enrojecimiento medular (Figura 9A). En cambio, los tejidos hepático y pulmonar no presentaron alteraciones visibles en su morfología en ninguno de los grupos analizados (Figura 9B y C). La apariencia de los tres tejidos estudiados después de dos meses de exposición a FeNTA se mantuvo igual que a un mes de tratamiento (imágenes no mostradas).



**Figura 9. Imágenes representativas de los tejidos obtenidos después de un mes de exposición a FeNTA.** (A) Los riñones correspondientes a las ratas de los grupos E y D presentaron una apariencia macroscópica similar al grupo C, mientras que los grupos tratados con el carcinógeno mostraron enrojecimiento medular y palidez en la corteza renal. En cambio, no se observaron alteraciones en la apariencia de hígado (B) ni de pulmón (C) en ninguno de los grupos estudiados.

## 7.2 Niveles de t-Akt y p-Akt en riñón

Como se mencionó anteriormente, en nuestro laboratorio ya se había observado un aumento en los niveles de t-Akt en los grupos tratados durante un mes con FeNTA (F, DF y EDF), por lo que para continuar con la caracterización del comportamiento de esta cinasa a este tiempo de estudio se analizaron los niveles de su forma fosforilada. En la figura 10 se muestra la imagen de un Western blot representativo de corteza renal, así como la gráfica de los análisis densitométricos de todas las autorradiografías. Cabe mencionar que en los resultados de tejido renal se incluyeron muestras tanto del protocolo realizado durante el desarrollo de la presente tesis así como de un protocolo realizado anteriormente.

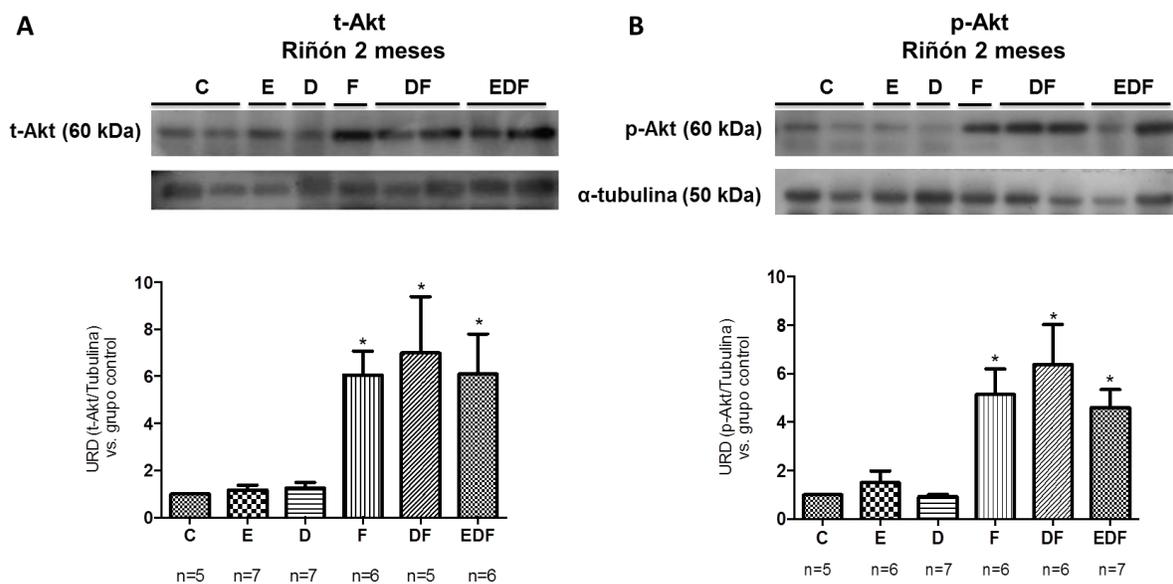


**Figura 10. Niveles renales de p-Akt después de un mes de exposición a FeNTA.**

En la parte superior se muestra la imagen de un Western blot representativo donde se observa la banda correspondiente a p-Akt así como aquella que corresponde a  $\alpha$ -tubulina, que se utilizó como control de carga. En la parte inferior está la gráfica de los análisis densitométricos de todas las determinaciones. Los grupos D, E y F no presentaron cambios con respecto al grupo control, en cambio, en los grupos DF y EDF se observó un aumento notorio. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar (EE). n= número de muestras analizadas obtenidas de diferentes animales. \*  $P \leq 0.05$  vs grupo Control. URD, unidades relativas de densitometría.

Como se puede ver, los grupos DF y EDF presentaron un aumento notorio con respecto al grupo control, sin presentar diferencia significativa entre ellos, lo cual implica que el extracto no protegió contra esta alteración. Los grupos tratados únicamente con E, D o F no mostraron cambios con respecto al grupo C. Estos resultados coinciden parcialmente con el antecedente de t-Akt, excepto con lo observado en el grupo F, ya que los niveles de Akt aumentan después de un mes de tratamiento, pero los niveles de p-Akt no cambiaron con respecto al grupo control.

Para caracterizar mejor el comportamiento de esta cinasa se decidió analizar el estatus de t-Akt y p-Akt después de dos meses de exposición al carcinógeno, ya que por hallazgos previos, este tiempo parece representar otra etapa temprana de la carcinogénesis inducida con FeNTA. En las figuras 11A y 11B se muestran los resultados obtenidos para t-Akt y p-Akt, respectivamente.



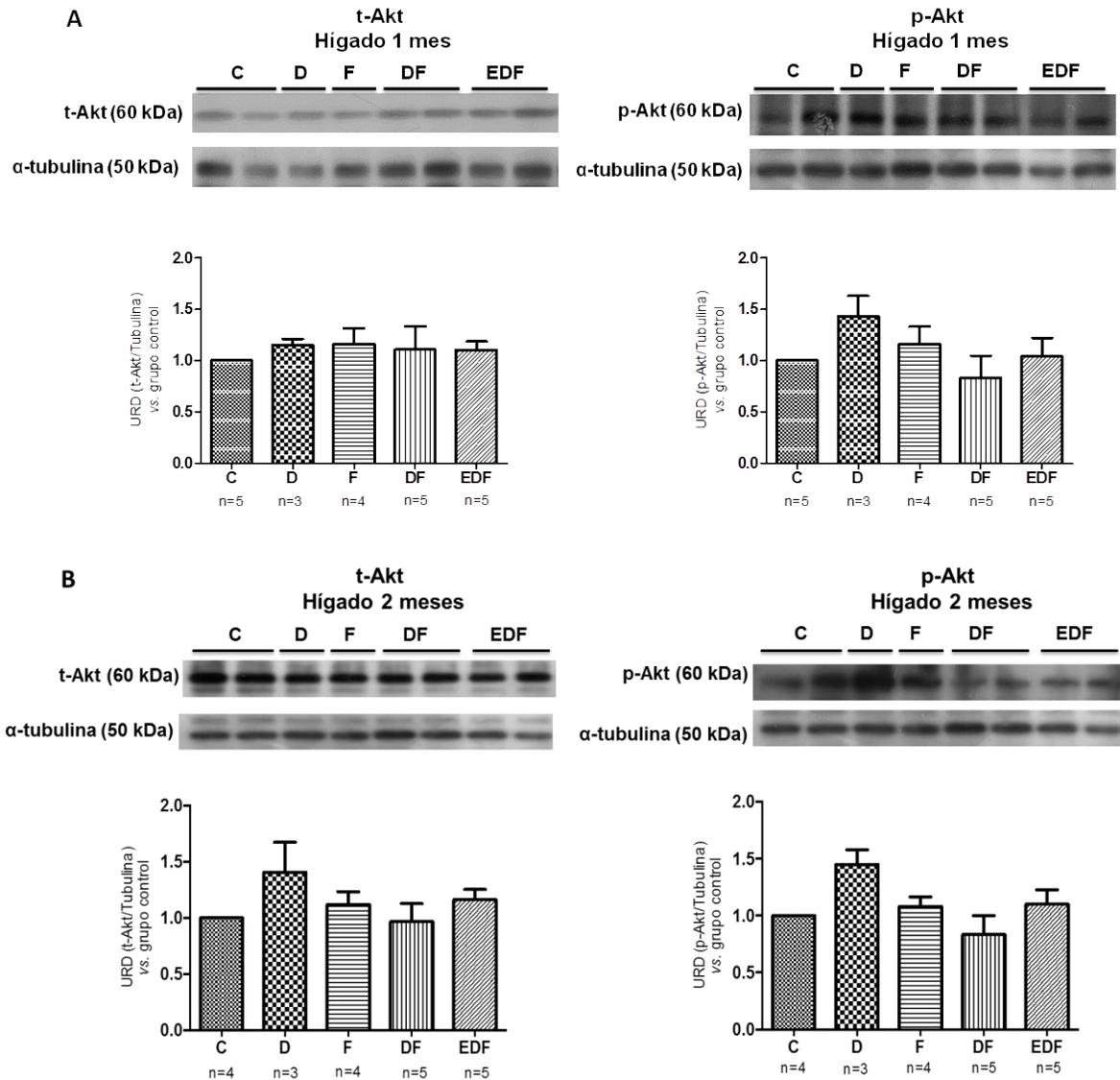
**Figura 11. Niveles renales de Akt y p-Akt después de dos meses de exposición a FeNTA.** En la parte superior se muestran las imágenes de un Western blots representativos donde se observan las bandas correspondientes a t-Akt (A) y p-Akt (B), así como aquellas correspondientes a  $\alpha$ -tubulina, que se utilizó como control de carga. En la parte inferior están las gráficas de los análisis densitométricos de todas las determinaciones de t-Akt (A) y p-Akt (B). Los grupos D, E y F no presentaron cambios, en cambio en los grupos DF y EDF se observó un aumento notorio. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar (EE). n= número de muestras analizadas obtenidas de diferentes animales.\*  $P \leq 0.05$  vs grupo Control. URD, unidades relativas de densitometría.

Como se puede observar tanto en las imágenes representativas como en las gráficas, los grupos tratados únicamente con E o D no mostraron cambios con respecto al grupo C. Los grupos F, DF y EDF presentaron un aumento notorio con respecto al grupo control. Asimismo, no hubo diferencia significativa entre los grupos DF y EDF, lo cual implica que el extracto no pudo proteger contra esta alteración. Estos resultados son concordantes tanto para t-Akt como para p-Akt a este tiempo de estudio, e interesantemente se observa para el grupo F un aumento en los niveles de p-Akt que no se había observado en este grupo después de un mes de tratamiento.

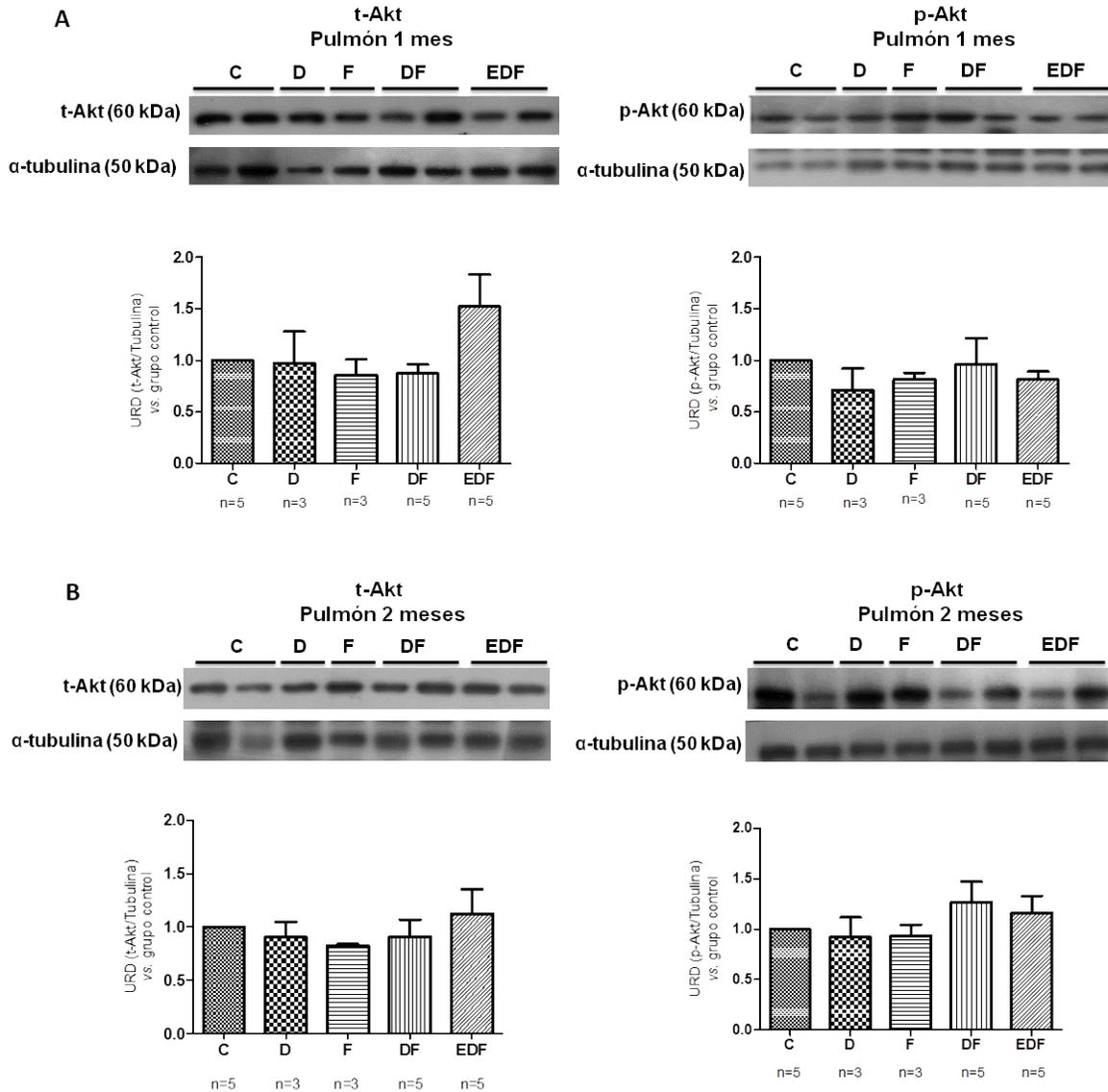
### **7.3 Niveles de t-Akt y p-Akt en hígado y pulmón**

En la figura 12 se muestran las imágenes de los Western blot representativos en hígado, así como las gráficas de los análisis densitométricos correspondientes de todas las autorradiografías, tanto para uno (figura 12A) como para dos meses (figura 12B). Como se puede ver, ninguno de los grupos de estudio mostró cambios con respecto al grupo C, tanto para t-Akt como p-Akt. Asimismo, en la figura 13 se muestran las imágenes y gráficas correspondientes de los niveles de t-Akt y p-Akt en pulmón después de uno y dos meses de tratamiento (figuras 13A y 13B, respectivamente), donde acorde a lo que esperábamos, tampoco se presentó alteración en los niveles de t-Akt ni de p-Akt en ninguno de los grupos con respecto al control, en ambos tiempos de estudio.

En estas determinaciones se excluyó el grupo E ya que hemos observado que el EST no altera el comportamiento de Akt, en cambio el grupo D sí se incluyó porque se sabe que la dietilnitrosamina puede tener efectos en el hígado; sin embargo en este grupo tampoco se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de t-Akt ni p-Akt.



**Figura 12. Niveles hepáticos de t-Akt y p-Akt después de uno y dos meses de exposición a FeNTA.** Se muestran imágenes de los Western blots representativos del comportamiento de Akt en tejido hepático después de uno (A) y dos meses (B) de tratamiento. En la parte superior de cada figura se observan las bandas correspondientes a t-Akt (izquierda) ó p-Akt (derecha), así como aquellas que corresponden a  $\alpha$ -tubulina, que se utilizó como control de carga. En la parte inferior están las gráficas de los análisis densitométricos de todos los experimentos. No se presentaron alteraciones en los niveles de t-Akt ni de p-Akt en ninguno de los grupos con respecto al control, en ambos tiempos de estudio. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar (EE). n= número de muestras analizadas obtenidas de diferentes animales. \*  $P \leq 0.05$  vs grupo Control. URD, unidades relativas de densitometría.



**Figura 13. Niveles pulmonares de t-Akt y p-Akt después de uno y dos meses de exposición a FeNTA.** Se muestran imágenes de los Western blots representativos del comportamiento de Akt en tejido pulmonar después de uno (A) y dos meses (B) de tratamiento. En la parte superior de cada figura se observan las bandas correspondientes a t-Akt (izquierda) ó p-Akt (derecha), así como aquellas que corresponden a  $\alpha$ -tubulina, que se utilizó como control de carga. En la parte inferior están las gráficas de los análisis densitométricos de todos los experimentos. No se presentaron alteraciones en los niveles de t-Akt ni de p-Akt en ninguno de los grupos con respecto al control, en ambos tiempos de estudio. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar (EE). n= número de muestras analizadas obtenidas de diferentes animales. \*  $P \leq 0.05$  vs grupo Control. URD, unidades relativas de densitometría.

## 8 DISCUSIÓN

Akt es una cinasa involucrada en múltiples eventos celulares que participan en el proceso carcinogénico cuando se desregulan como son supervivencia, crecimiento y proliferación (Hanada M *et al.*, 2004; Manning BD *et al.*, 2007), y se ha demostrado que los niveles proteicos tanto de la enzima total como de su forma fosforilada (S473) aumentan en los tumores de CCR humano (Hennenlotter J *et al.*, 2012). Más aún, hasta la fecha no había reportes del comportamiento de esta cinasa en etapas tempranas de la carcinogénesis renal, las cuales son prácticamente imposibles de estudiar en el humano, debido a que esta enfermedad frecuentemente se detecta cuando está muy avanzada, e incluso ya se desarrolló metástasis (Dalgin GS *et al.*, 2007; Gupta K *et al.*, 2008). Por lo tanto, se decidió analizar el comportamiento de esta cinasa en etapas tempranas de un modelo experimental de carcinogénesis renal por exposición a FeNTA, en el cual se desarrollan tumores que presentan características histológicas similares al CCR de células claras, que es el subtipo histológico más común en humano, por lo que el modelo puede ser una herramienta útil para comprender esta enfermedad (Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012). El hallazgo previo de nuestro laboratorio que constituyó el antecedente directo del presente trabajo fue el aumento de los niveles renales de la cinasa total después de un mes de tratamiento con FeNTA. De esta manera, para continuar el estudio del comportamiento de Akt se decidió analizar si la cinasa estaba activada midiendo los niveles de p-Akt (S473) a 1 mes, así como los niveles totales y de su forma fosforilada a 2 meses de tratamiento, tiempo que representa una etapa temprana diferente de la carcinogénesis renal en el modelo.

En este trabajo, además del grupo control (C) que recibió los vehículos de los tratamientos, se incluyeron los grupos tratados sólo con el antioxidante (E) o con el iniciador tumoral (D), y en ninguna de las determinaciones realizadas se encontraron alteraciones en estos grupos, lo cual indica que estos tratamientos por sí solos no tienen efecto en los niveles Akt total y fosforilada, y que las alteraciones observadas se deben al tratamiento con el carcinógeno.

Ahora bien, con el tratamiento DEN+FeNTA encontramos que aumentan los niveles renales de p-Akt después de un mes. Este resultado, aunado a nuestro antecedente del aumento en los niveles de t-Akt a este tiempo de estudio, indica que en este grupo no sólo se está dando la acumulación de Akt, sino que también está siendo fosforilada en la S473, la cual es aceptada en la literatura como una fosforilación indicativa de su completa activación (Alessi DR *et al.*, 2009). Más aún, encontramos que este aumento se mantiene después de dos meses de exposición al carcinógeno, y el hecho de que estas alteraciones persistan, sugiere fuertemente que Akt puede estar participando en el proceso de carcinogénesis por exposición a FeNTA. Además, estas evidencias nos hacen pensar que probablemente la activación de Akt podría persistir a lo largo del proceso carcinogénico e incluso mantenerse en el tejido tumoral como ocurre en el humano; entonces un paso a seguir en la caracterización del modelo experimental sería analizar el comportamiento de Akt en tumores de CCR inducidos con FeNTA.

Asimismo, el aumento observado en los niveles de t-Akt y p-Akt se puede interpretar como una evidencia más de que los tiempos de exposición a FeNTA estudiados representan etapas tempranas del desarrollo de la neoplasia ya que este sería una alteración pro-carcinogénica dadas las funciones biológicas de la cinasa (Manning BD *et al.*, 2007).

Por su parte, en el grupo EDF encontramos un aumento en los niveles renales tanto de t-Akt como de p-Akt similar al encontrado en el grupo DF en ambos tiempos de estudio, lo que indica que el extracto no protegió contra las alteraciones generadas por el tratamiento con DEN+FeNTA. La evaluación del efecto del EST sobre Akt en este estudio se fundamentó en que esta cinasa es sensible al estrés oxidante (Uranga RM *et al.*, 2013), y en que la participación de este estrés está bien establecida en este modelo (Toyokuni S *et al.*, 1994 y 1998; Tsuchiya K *et al.*, 2005). Además, interesantemente, los tres principales factores de riesgo para el desarrollo del CCR humano (tabaquismo, obesidad e hipertensión) están relacionados con la generación de estrés oxidante (Siegel R *et al.*, 2011). Asimismo, en trabajos anteriores se demostró que la administración del EST, el cual tiene gran capacidad antioxidante, disminuyó la incidencia y el grado de avance de los tumores de CCR en el modelo (Vargas-Olvera

CY *et al.*, 2012). Sin embargo, aunque en estos tiempos de estudio no se encontró una protección por parte del EST, no se puede descartar que el extracto pueda tener un efecto sobre Akt en otras etapas de la carcinogénesis renal.

Otro de los grupos incluidos en nuestro diseño experimental fue aquél en el que se trató a las ratas únicamente con el carcinógeno FeNTA, ya que se ha reportado en la literatura que por sí solo genera CCR, aunque con una baja incidencia (12-20%) y se necesita de un periodo mayor de tratamiento para que esto suceda (1 año) (Okada S *et al.*, 1982). Por tal motivo para disminuir el periodo de tiempo necesario para inducir los tumores y aumentar su incidencia se utilizó al DEN como iniciador y al FeNTA como promotor tumoral (Athar M *et al.*, 1998), obteniendo las neoplasias después de 6 meses de tratamiento (administración única de DEN + 4 meses de administración de FeNTA + 2 meses de reposo de los animales) (Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012). Como ya se mencionó, en un estudio previo en nuestro laboratorio se observó que los niveles de t-Akt aumentan después de un mes de tratamiento sólo con FeNTA, y en el presente proyecto encontramos que este aumento se mantiene después de dos meses. Sin embargo, los niveles de p-Akt no cambian después de un mes de tratamiento, y es hasta los dos meses cuando se observa el incremento en los niveles de la cinasa fosforilada. Debido a que la fosforilación analizada es indicativa de que Akt está activada, este resultado sugiere que la activación tardía de Akt podría ser una de las razones del desarrollo más lento de tumores cuando se trata a los animales sólo con FeNTA, en comparación con la activación de la cinasa desde el primer mes en el grupo tratado con DEN+FeNTA que lleva a la obtención de tumores de manera más rápida y eficiente.

El retardo en la activación de Akt en el grupo F podría deberse a la regulación de algún mecanismo involucrado en el control de la fosforilación de la cinasa. Por ejemplo, la fosforilación evaluada en el presente estudio (S473) es realizada por el complejo proteico mTORC2 (Alessi DR *et al.*, 2009), y la fosfatasa PP2A es quien la desfosforila en este residuo (Cho SH *et al.*, 2004), por lo que estos dos actores podrían ser objeto de estudio para explicar el comportamiento observado en la activación de Akt, ya que,

además, se ha descrito que son sensibles al estrés oxidante (Reiling JH *et al.*, 2006; Sato S *et al.*, 2000).

Como ya se mencionó, en estudios previos en nuestro laboratorio se observó que bajo el esquema de tratamiento carcinogénico las ratas desarrollaron tumores primarios en riñón, pero no en otros tejidos, como hígado y pulmón (Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012), lo que confirma la carcinogenicidad renal del FeNTA (Toyokuni S *et al.*, 1998). Sin embargo, otros autores han reportado que tanto hígado como pulmón pueden sufrir daño bajo otros esquemas de tratamiento con FeNTA, y en el caso del pulmón puede incluso generar tumores primarios en ratones (Ebina Y *et al.*, 1986; Toyokuni S *et al.*, 1998). Por lo tanto, con la finalidad de investigar si las alteraciones encontradas en riñón eran particulares de este tejido o eran una respuesta más generalizada por el tratamiento con FeNTA, se decidió analizar en estos tejidos el estatus de Akt en ambos tiempos de estudio. Otro resultado relevante del presente trabajo, y acorde con lo esperado, no se encontraron alteraciones estadísticamente significativas ni en hígado ni en pulmón en los niveles tanto de t-Akt como de p-Akt en ninguno de los tiempos de estudio, sugiriendo que, en efecto, las alteraciones observadas en Akt ocurren particularmente en el riñón, donde se desarrollará el CCR.

Por último, resulta importante analizar las probables consecuencias del aumento en los niveles de Akt y su activación, ya que en un momento dado pudieran ser los mecanismos mediante los cuales la cinasa participe en el proceso carcinogénico. Particularmente, el aumento de Akt coincide con algunos de nuestros hallazgos en vías de señalización relacionadas con esta cinasa. Por ejemplo, Akt fosforila a GSK3 $\beta$  (cinasa 3 de la glucógeno sintasa) en la S9, inactivándola. GSK3 $\beta$  se encarga de fosforilar a  $\beta$ -catenina, para que posteriormente esta última sea ubiquitinada y degradada. Si GSK3 $\beta$  está inactiva,  $\beta$ -catenina se acumula y se transloca al núcleo, donde cumple su función como co-factor transcripcional (Metcalf C *et al.*, 2011). La acumulación y translocación nuclear de  $\beta$ -catenina son eventos que se han vinculado con la tumorigénesis en diversos tejidos (Bienz M *et al.*, 2000). En etapas tempranas de la carcinogénesis por FeNTA hemos encontrado un aumento en los niveles de  $\beta$ -catenina y de GSK3 $\beta$  fosforilada en S9 (Aguilar-Alonso FA, tesis de doctorado en

progreso), lo que sugiere que Akt podría ser responsable de activar esta vía de señalización.

Asimismo, Akt fosforila y activa a IKK $\alpha$  (T23), cinasa que inactiva a I $\kappa$ B, que es el inhibidor del factor de transcripción NF $\kappa$ B (Hayden MS *et al.*, 2004). Por lo tanto, la activación IKK $\alpha$  mediada por Akt resultará en última instancia en la activación de NF $\kappa$ B, factor que regula la expresión de genes que participan en eventos de proliferación y supervivencia, entre otros, y el cual está alterado en distintos tipos de cáncer (Ozes ON *et al.*, 1999). En etapas tempranas de este modelo encontramos una disminución en los niveles de I $\kappa$ B, que correlaciona con un aumento de la actividad de NF $\kappa$ B en los grupos tratados con FeNTA (Pariante-Pérez TO, 2012). Por lo tanto Akt podría estar participando en la activación de esta vía de señalización.

Otro blanco de fosforilación por Akt de gran interés es TSC2 (Dibble CC *et al.*, 2010), ya que su inactivación por esta fosforilación (T1462) lleva a la activación del complejo mTORC1 (Inoki K *et al.*, 2002). Este complejo participa como inductor de eventos proliferativos y de crecimiento celular, y se ha visto alterado en el CCR humano, siendo incluso un blanco terapéutico para este tipo de cáncer (Battelli C *et al.*, 2011).

## 9 CONCLUSIONES

En concordancia con el comportamiento previamente observado de t-Akt, los niveles renales de p-Akt aumentan después de un mes de exposición a FeNTA, así como aquéllos de la cinasa tanto total como fosforilada después de dos meses, y el EST no protege contra estas alteraciones.

Los niveles de la cinasa se mantienen normales en hígado y pulmón.

Estos resultados en conjunto sugieren fuertemente que Akt puede ser uno de los mecanismos involucrados en la carcinogénesis renal por FeNTA.

## 10 PERSPECTIVAS

- Analizar el estatus de t-Akt y p-Akt en tumores de CCR inducidos con FeNTA.
- Para corroborar que Akt sea la responsable de fosforilar a GSK3 $\beta$ , se podría estudiar la interacción de estas cinasas mediante la técnica de co-inmunoprecipitación (CoIP).
- Asimismo, sería muy interesante analizar por Western Blot (WB) los niveles totales y de la forma fosforilada de IKK $\alpha$ , así como la CoIP Akt/IKK $\alpha$ , para determinar si la activación de Akt correlaciona con la activación de la vía NF $\kappa$ B.
- Medir mediante WB los niveles de la forma fosforilada de TSC2 (T1462), así como la CoIP Akt/TSC2, para investigar si Akt participa en la regulación de esta proteína, y evaluar la activación de mTORC1, midiendo los niveles de su forma fosforilada en S2448, que es indicativa de la activación de esta cinasa.

## 11 ANEXOS

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

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

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

**Nitrilotriacetato de sodio Na<sub>2</sub>NTA 320 mM.** Se disuelven 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.

### 11.2 Determinación de proteínas por el método de Bradford

#### Soluciones

**Reactivo de Bradford** Tomar 1 mL de la solución concentrada del reactivo de Bradford y diluirla con 4 mL de agua destilada.

#### Procedimiento

Tomar 10 µL de cada homogenado de las muestras y diluirlos con 90 µL de agua destilada. En una placa de 96 pozos ( Corning incorporated, Corning, NY, USA) se colocan 1.0 o 2.0 µL de cada dilución, y se añade el volumen de agua destilada necesario para alcanzar los 100 µL.

Se prepara una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB), a partir de un stock que contiene 10 mg/mL de ASB, colocando el volumen de muestra y agua que se muestra en la tabla 9.

Tabla 4. Preparación de la curva patrón de ASB para la determinación de proteínas totales mediante la técnica de Bradford.

<b>Tubo</b>	<b>Volumen de stock μL</b>	<b>Agua μL</b>	<b>Concentración final de ASB μg/ μL</b>
<b>0</b>	0	100	0
<b>1</b>	10	90	1.2
<b>2</b>	20	80	2.4
<b>3</b>	30	70	3.6
<b>4</b>	40	60	4.8
<b>5</b>	50	50	6.0
<b>6</b>	60	40	7.2
<b>7</b>	70	30	8.4
<b>8</b>	80	20	9.6
<b>9</b>	90	10	10.8
<b>10</b>	100	0	12.0

Posteriormente se agregan 150 μL del reactivo de Bradford (previamente diluido 1:4 con agua destilada) (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories inc., CA, USA) y se lee la absorbancia a 595 nm. Se interpolan los resultados de las lecturas de las muestras en la curva patrón y la concentración de proteínas se expresa en  $\mu\text{g}_{\text{proteína}}/\mu\text{L}$ .

### 11.3 Electroforesis

#### 11.3.1 Preparación de los geles para electroforesis

1. Se preparan geles SDS-poliacrilamida al 10% 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 se coloca sobre el gel de resolución hasta llegar al borde del molde.
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 se lava 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).

#### 11.3.2 Preparación de las muestras

1. Se coloca un volumen de muestra correspondiente a 60  $\mu$ g de proteína (para el caso de las cortezas renales) o bien 40  $\mu$ Lg (para tejido hepático y pulmonar) en un tubo eppendorff.
2. Se coloca el mismo volumen de buffer desnaturante (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 en hielo durante 2 min y después de una ligera centrifugación se cargan las muestras en el gel concentrador.
6. Se corren los geles a 100 mV por 10 min y posteriormente a 80 mV durante 4 h en una cámara de electroforesis (BIO-RAD)
7. Se desmontan los moldes y se retiran los geles con mucho cuidado.

8. Se elimina el gel concentrador y se coloca el gel de resolución en amortiguador de transferencia durante 10 min para su posterior transferencia de proteínas a membranas de PVDF.

#### **11.4 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.
2. 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 2h y media a 70 mA/gel.
3. Minutos antes de que termine la transferencia se prepara la solución de bloqueo con suero fetal bovino (SFB) al 10% en diluida 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).
4. Terminada la transferencia se retiran las membranas y se colocan en 5 mL de solución de bloqueo durante 1 h con agitación constante.

5. 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 tabla 3).
6. Terminado el tiempo de bloqueo se elimina la solución de bloqueo y se colocan 5 mL de anticuerpo primario y se deja en agitación constante durante 16 h a 4 °C.
7. Posteriormente se retira el anticuerpo primario y se hacen 3 lavados de 15 min c/u a las membranas con PBS-Tween.
8. 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).
9. 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.
10. Posteriormente se retira el anticuerpo secundario y las membranas se lavan 3 veces con PBS durante 15 min cada uno.

### **11.5 Detección de proteínas**

1. Se preparan 400 µL 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 µL del sustrato de detección (luminol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (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 cierto tiempo (este tiempo depende de la proteína a detectar).

### **11.6 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 analizan con el programa de Image J (Broken Symmetry Soft).

## 12 BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal MK, Iqbal M, Athar M. (2005) Vitamin E inhibits hepatic oxidative stress, toxicity and hyperproliferation in rats treated with the renal carcinogen ferric nitrilotriacetate. *Redox Report: Communications in free Radical Research*. 10 (2): 62-70.
- Aguilar-Alonso FA (2010) Alteraciones en AP-1, MAPKs y ciclina D1 inducidas por la exposición subcrónica al carcinógeno renal FeNTA y efecto de un extracto de semillas de tamarindo (EST). Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- Alessi DR, Pearce LR and Garcia-Martinez JM (2009) New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Science Signaling*. 2 (67): pe27.
- Altomare DA, Testa JR (2005) Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. 24 (50): 7455-64.
- Athar M, Iqbal M (1998) Ferric nitrilotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis*. 19 (6): 1133-9.
- Awai M, Narasaki M, Yamanoi Y *et al.* (1979) Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *American Journal of Pathology*. 95 (3): 663-73.
- Balsara BR, Pei J, Testa JR *et al.* (2004) Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. *Carcinogenesis*. 25 (11): 2053-9.
- Banumathy P, Cairns P (2010) Signaling pathways in renal cell carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*. 10 (7): 658-64.
- Battelli C and Cho DC (2011) mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Therapy*. 8(4): 359-67.
- Bellacosa A, Chan, TO, Tschile, P *et al.* (1998) Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene*. 17 (3): 313-25.
- Bellacosa A, Kumar C, Testa R *et al.* (2005) Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Advances in Cancer Research*. 94: 29-86.
- Bhooshen PK, Ibrahim RS (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2 (5): 270-78.
- Bienz M and Clevers H (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*. 103 (2): 311-20.
- Bird VG, Bird VY (2011) Imaging of renal masses. En *Renal cell carcinoma*. Ed. por van Poppel H. InTech, Croacia. pp. 1-36.
- Bjorge T, Tretli S, Engeland A (2004) Relation of height and body mass index to renal cell carcinoma in two million Norwegian men and women. *American Journal of Epidemiology*. 160 (12): 1168-76.
- Blume-Jensen P, Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 411 (6835): 355-65.
- Bondy CA, Cheng CM (2004) Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *European Journal of Pharmacology*. 490 (1-3): 25-31.
- Bosetti C, Rossi M, LaVecchia C *et al.* (2007) Flavonoids and the risk of renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 16 (1): 98-101.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-54.
- Bravi F, Bosetti C, Scotti L *et al.* (2007) Food groups and renal cell carcinoma: A case-control study from Italy. *International Journal of Cancer*. 120 (3): 681-5.
- Brugge J, Hung MC, Mills GB (2007) A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell*. 12 (2): 104–7
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 296 (5573): 1655-57.
- Cao J, Xu D, Yang B *et al.* (2009) ROS-driven Akt dephosphorylation at Ser-473 is involved in 4-HPR-mediated apoptosis in NB4 cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 47 (5): 536–47.
- Chan TO, Rittenhouse SE and Tsichlis PN (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositideregulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annual Reviews in Biochemistry*. 68: 965-1014.
- Cho SH, Lee CH, Lee SR *et al.* Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated cell signaling. *FEBS Letters*. 560 (1-3): 7–13.
- Clerkin JS, Naughton R, Cotter TG *et al.* Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Letters*. 266 (1): 30-6.
- Coffer PJ, Jin J and Woodgett JR (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Biochemical Journal*. 335 ( Pt 1): 1-13.
- Corgna E, Betti M, Gatta G *et al.* (2007) Renal Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 64 (3): 247-62.
- Cross JV, Templeton DJ (2006) Regulation of signal transduction through protein cysteine oxidation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8 (9-10): 1819–27.
- Cui X, Jin Y, Hofseth LJ *et al.* (2010) Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa)*. 3 (4): 549–59.
- Curiel-Muñiz P (2012) Comportamiento de la proteína cinasa C z en etapas tempranas de un modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA. Tesis de licenciatura en Química Farmacéutico Biológica, Facultad de Química, UNAM.
- Dalgin GS, Holloway DT, Liou LS *et al.* (2007) Identification and characterization of renal cell carcinoma gene markers. *Cancer Informatics*. 3, 65-92.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development*. 13 (22): 2905-27.
- Dibble CC and Manning BD (2010) The TSC1-TSC2 complex: A key signal-interacting node upstream of TOR. *Enzymes*. 28: 21-48.
- Dong-Yun S, Yu-Ru D, Lian W *et al.* Redox stress regulates cell proliferation and apoptosis of human hepatoma through Akt protein phosphorylation. *FEBS Letters*. 542 (1-3): 60-4.
- Ebina Y, Okada S, Midorikawa O *et al.* (1986) Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of iron- and aluminum-nitritriacetate complexes in rats. *Journal of the National Cancer Institute*. 76 (1): 107-13.

- Ecker K, Hengst L (2009) Skp2: caught in the Akt. *Nature Cell Biology*. 11 (4): 377-9.
- Engelman JA, Luo J and Cantley LC (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews. Genetics*. 7 (8): 606-19.
- Eybl V, Kotyzová D, Koutensky J *et al.* (2008) Effect of melatonin, curcumin, quercetin and resveratrol on acute ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced renal oxidative damage in rats. *Human & Experimental Toxicology*. 27 (4): 347-53.
- Faivre S, Kroemer G, Raymond E (2006) Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 5 (8): 671-88.
- Fang J, Seki T, Maeda H (2009) Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61 (4): 290–302.
- Fisher R, Gore M, Larkin J (2013) Current and future systemic treatments for renal cell carcinoma. *Seminars in Cancer Biology*. 23 (1): 38-45.
- Gago-Domínguez M, Castelao JE, Yuan JM *et al.* (2002) Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States). *Cancer Causes Control*. 13 (3): 287-93.
- Gago-Domínguez M, Castelao JE (2006) Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radical Biology & Medicine*. 40 (4): 721-33.
- Ganesamoni R, Bhattacharyya S, Kumar S *et al.* (2012) Status of oxidative stress in patients with renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*. 187 (4): 1172-6.
- Gonzalez E and McGraw TE (2009) The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle*. 8 (16): 2502–8.
- Gupta K, Miller JD, Li JZ, *et al.* (2008) Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer Treatment Reviews*. 34 (3): 193–205.
- Hanada M, Feng J, Hemmings BA. (2004) Structure, regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1697 (1-2): 3-16.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144 (5): 646-74.
- Hayden MS and Ghosh S (2004) Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes & Development*. 18 (18): 2195-224.
- Hennenlotter J, Amend B, Bedke J *et al.* (2012) Akt signalling parameters are different in oncocytomas compared to renal cell carcinoma. *World Journal of Urology*. 30 (3):353–9.
- Hennessy BT, Smith DL, Mills GB *et al.* (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 4 (12): 988-1004.
- Heo HJ, Kim YJ, Kim DO *et al.* (2007) Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*. 104 (1): 87-92.
- Huang BX, Kim HY (2006) Interdomain conformational changes in Akt activation revealed by chemical cross-linking and tandem mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*. 5 (6):1045–53.
- Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP *et al.* (2005) Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *International Journal of Cancer*. 114 (1): 101–8.

- Inoki K, Li Y, Guan KL *et al.* (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*. 4 (9): 648-57.
- Kandel E and Hay N (1999) The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKA. *Experimental Cell Research*. 253 (1): 210-29.
- Khandrika L, Kumar B, Koul S *et al.* (2009) Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Letters*. 282 (2):125–136.
- Khan N, Sultana S (2005) Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sciences*. 77 (11): 1194-210.
- Kim J, Jonasch E, Walker CL *et al.* (2009) Cytoplasmic sequestration of p27 via AKT phosphorylation in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 15 (1): 81–90.
- Kimoto T, Koya-Miyata S, Hino K *et al.* (2001) Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. *Virchows Archive: An International Journal of Pathology*. 438 (3): 259-70.
- King RJ, Robins MW (2006) What is cancer? *En Cancer Biology*. Pearson Prentice Hall Education, USA. pp. 1-8, 2006.
- Lamien-Meda A, Lamien CR, Nacoulma OG *et al.* (2008) Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*. 13 (3): 581-94.
- Lee JE, Hunter DJ, Spiegelman D, *et al.* (2007) Intakes of coffee, tea, milk, soda and juice and renal cell cancer in a pooled analysis of 13 prospective studies. *International Journal of Cancer*. 121 (10): 2246–53.
- Lee KN and Lee HJ (2006) The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors*. 26 (2): 105-21.
- Lee SR, Yang KS, Rhee SG *et al.* (2002) Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (23): 20336–42.
- Lin HK, Wang L, Chang C *et al.* (2002) Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *The EMBO Journal*. 21 (15):4037-48.
- Link A, Balaguer F, Goel A (2010) Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*. 80 (12): 1771-92.
- Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin K (2006) The epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Journal of Urology*. 176: 2353-8.
- Li Y, Inoki K, Guan KL *et al.* (2004) TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends in Biochemical Sciences*. 29 (1): 32-8.
- López-Ramos D (2007) Efecto del carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro y de un antioxidante polifenólico sobre la expresión del gen ciclina D1. Tesis de licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, Facultad de Química, UNAM.
- Luo L, Kumar JK, Clément MV (2012) Redox control of cytosolic Akt phosphorylation in PTEN null cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 53 (9): 1697–707.
- Manning BD and Cantley LC (2007) AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 129 (7): 1261-74.
- Manning BD and Cantley LC (2003) Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochemical Sciences*. 28 (11): 573-6.

- Manson MM (2003) Cancer prevention – the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends in Molecular Medicine*. 9 (1): 11–8.
- Martin D, Salinas M, Cuadrado A *et al.* (2002) Ceramide and reactive oxygen species generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce caspase-3-independent degradation of Akt/protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (45):42943–52.
- McLaughlin JK, Chow WH, Mandel JS *et al.* (1995) International renal-cell cancer study. VIII. Role of diuretics, other anti-hypertensive medications and hypertension. *International Journal of Cancer*. 63 (2): 216–21.
- Metcalf C and Bienz M (2011) Inhibition of GSK3 by Wnt signalling – two contrasting Models. *Journal of Cell Science*. 124 (Pt 21): 3537–44.
- Miwa W, Yasuda J, Sekiya T *et al.* Isolation of DNA sequences amplified at chromosome 19q13.1-q13.2 including the AKT2 locus in human pancreatic cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 225 (3): 968-74.
- Mora A, Komander D, Alessi DR *et al.* (2004) PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Seminars in Cell & Development Biology*. 15 (2): 161-70.
- Murata H, Ihara Y, Kondo T *et al.* (2003) Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (50):50226–33.
- Nakayama K, Nakayama, N, Shih IeM *et al.* (2006) Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms. *Cancer Biology & Therapy*. 5 (7): 779-85.
- Navarro-García R (2013) Funcionalidad de la ciclina D1 en etapas tempranas de un modelo de carcinogénesis renal y efecto de un compuesto antioxidante. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- Nichenametla SN, Taruscio TG, Exon JH *et al.* (2006) A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46 (2): 161-183.
- Nogueira V, Park Y, Hay N *et al.* (2008) Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell*. 14 (6): 458-70.
- Okada S, Midorikawa O (1982) Induction of the rat renal adenocarcinoma by ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA). *Japan Archives of Internal Medicine*. 29 (8): 485-91.
- Ozes ON, Mayo LD, Donner DB *et al.* (1999) NFκB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 401 (6748): 82-5.
- Pantuck AJ, Seligson DB, Figlin RA *et al.* (2007) Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer*. 109 (11): 2257-67.
- Pariente-Pérez TO (2012) Participación de NF-κB en la carcinogenicidad del nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) y efecto de un extracto de tamarindo (EST). Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- Pedrero JM, Carracedo DG, Gonzalez MV *et al.* (2005) Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*. 114 (2): 242-8.
- Peifer C and Alessi DR (2008) Small-molecule inhibitors of PDK1. *ChemMedChem*. 3 (12):1810-38.

- Plas DR, Thompson CB (2005) Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene*. 24 (50): 7435-42.
- Povichit N, Phrutivorapongkul A, Leelapornpisid P *et al.* (2010) Phenolic content and in vitro inhibitory effects on oxidation and protein glycation of some Thai medical plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*. 23 (4): 403-8.
- Prior RL (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*. 78 (3 Suppl): 570S-78S.
- Rangel-Gómez AT (2011) Comportamiento de la proteína cinasa C E (PKCE) en una etapa temprana del modelo de carcinogénesis renal por FeNTA. Tesis de licenciatura en Química Farmacéutico Biológica, Facultad de Química, UNAM.
- Rashidkhani B, Lindblad P, Wolk A (2005) Fruits, vegetables and risk of renal cell carcinoma: a prospective study of Swedish women. *International Journal of Cancer*. 113 (3): 451-5.
- Reiling JH, Sabatini DM (2006) Stress and mTOR signaling. *Oncogene*. 25 (48): 6373-83.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM *et al.* (2010) Oxidative stress, inflammation and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*. 49 (11): 1603-16.
- Rini B, Campbell S, Escudier B (2009) Renal Cell Carcinoma. *The Lancet*. 373 (9699): 1119-32.
- Rini B, Vogelzang NJ (2000) Prognostic factors in renal carcinoma. *Seminars in Oncology*. 27 (2): 213-20.
- Robertson GP (2005) Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Reviews*. 24 (2): 373-85.
- Roy HK, Olusola BF, Smyrk TC *et al.* (2002) AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 23 (1): 201-5.
- Ruggeri BA, Huang L, Testa JR *et al.* (1998) Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Molecular Carcinogenesis*. 21 (2): 81-6.
- Salomon DS, Brandt R, Normanno N *et al.* (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 19 (3): 183-232.
- Salomon DS, Perroteau I, Derynck R *et al.* (1987) Loss of growth responsiveness to epidermal growth factor and enhanced production of alpha-transforming growth factors in ras-transformed mouse mammary epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*. 130 (3): 397-409.
- Sansal I, Sellers WR (2004) The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *Journal of Clinical Oncology*. 22 (14): 2954-63.
- Sato S, Fujita N, Tsuruo T (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 97 (20):10832-7.
- Sato Y, Yoshizato T, Ogawa S *et al.* (2013) Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nature Genetics*. 45 (8): 860-7.
- Scheid MP and Woodgett JR (2003) Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Letters* 546 81): 108-12.
- Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 103 (2): 211-25.

- Schmidt SR, Schweikart F, Andersson ME (2007) Current methods for phosphoprotein isolation and enrichment. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and life Sciences.* 849 (1-2): 154-62.
- Shayesteh, L, Lu Y, Gray JW *et al.* (1999) PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nature Genetics.* 21 (1): 99-102.
- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A (2011) Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA: A Cancer Journal of Clinicians.* 61(4):212-236.
- Siegel R, Ward E, Naishadham D, Jemal A (2013) Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal of Clinicians.* 63(1): 11-30.
- Singh UP, Singh N, Nagarkatti PS *et al.* (2010) Resveratrol (trans-3, 5, 40-trihydroxystilbene) induces SIRT1 and down-regulates NF-  $\kappa$ B activation to abrogate DSS-induced colitis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 332(3): 829-39.
- Sporn MB, Suh N (2002). Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nature Reviews. Cancer.* 2 (7):537-43.
- Stal O, Perez-Tenorio G, Rutqvist LE *et al.* Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy. *Breast Cancer Research.* 5 (2): R37-44.
- Stöhr CG, Amann K, Hartmann A (2013) Histopatology of renal cell carcinoma. *Der Urologue.* 52 (7): 942-8.
- Sudjaroen Y, Haubner R, Owen RW *et al.* (2005) Isolation and structure elucidation of polyphenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food and Chemical Toxicology.* 43 (11): 1673-82.
- Surh YJ (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews in Cancer.* 3 (10): 768-80.
- Tanaka T, Kondo S, Toyokuni S *et al.* (2000) Expression of stress-response and cell proliferation genes in renal cell carcinoma induced by oxidative stress. *American Journal of Pathology* 156 (6): 2149-57.
- Toker A, Newton AC (2000) Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell.* 103 (2): 185-8.
- Torres-Martínez M. (2007). Efecto del tratamiento con un extracto de *Tamarindus indica* sobre el daño inducido por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). Tesis de licenciatura en Química Farmacéutico Biológica, Facultad de Química, UNAM.
- Toyokuni S (1998) Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation. *Biotherapy.* 11 (2-3): 147-54.
- Toyokuni S, Uchida K, Okamoto K *et al.* (1994) Formation of 4-Hydroxy-2-nonenal modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 91 (7): 2616-20.
- Tsao AS, McDonnell T, Kurie JM *et al.* (2003) Increased phosphor-AKT (Ser(473)) expression in bronchial dysplasia: implications for lung cancer prevention studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 12 (7): 660-64.
- Tsuchiya K, Akai K, Tokumura A *et al.* (2005) Oxygen radicals photo-induced by ferric nitrilotriacetate complex. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1725 (1):111-19.
- Uranga RM, Katz S, Salvador GA (2013) Enhanced phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling has pleiotropic targets in hippocampal neurons exposed to iron-induced oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry.* 288 (27): 19773-84.

- Valko M, Morris H, Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 12 (10): 1161-208.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J *et al.* (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160 (1): 1-40.
- van Dijk BA, Schouten LJ, Kiemeneij LA *et al.* (2004) Relation of height, body mass, energy intake, and physical activity to risk of renal cell carcinoma: results from the Netherlands Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*. 160 (12): 1159–67.
- van Dijk BA, Schouten LJ, Kiemeneij LA *et al.* (2005) Vegetable and fruit consumption and risk of renal cell carcinoma: Results from the Netherlands cohort study. *International Journal of Cancer*. 117 (4): 648–54.
- Vargas-Olvera CY (2009) Efecto de un Extracto de Semillas de Tamarindo (EST) sobre el Desarrollo de Cáncer Renal Inducido por Nitrilotriacetato de Hierro (FeNTA). Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- Vargas-Olvera CY, Solano JD, Ibarra-Rubio ME *et al.* (2012) Characterization of N-diethylnitrosamine-initiated and ferric nitrilotriacetate-promoted renal cell carcinoma experimental model and effect of a tamarind seed extract against acute nephrotoxicity and carcinogenesis. *Molecular Cellular Biochemistry*. 369 (1-2): 105-17.
- Vogt PK, Gymnopoulos M and Hart JR (2009) PI 3-kinase and cancer: changing accents. *Current Opinion in Genetics & Development*. 19 (1): 12-17.
- Wang X, McCullugh KD, Holbrook NJ *et al.* (2000) Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *Journal of Biological Chemistry*. 275 (19): 14624-31.
- Wu X, Beecher GR, Prior RL *et al.* (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (12): 4026-37.
- Xu X, Sakon M, Monden M *et al.* (2004) Akt expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*. 11 (1): 25–32.
- Yang CS, Landau JM, Newmark HL *et al.* (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*. 21: 381–406.
- Yang WL, Wu CY, Lin HK *et al.* (2010) Regulation of Akt signaling activation by ubiquitination. *Cell Cycle*. 9(3): 487-97.
- Yang J, Cron P, Bardford D *et al.* (2002) Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Molecular Cell*. 9 (6): 1227-40.
- Yuan JM, Castelao JE, Gago-Dominguez M *et al.* (1998) Tobacco use in relation to renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 7 (5): 429–33.
- Yuan TL and Cantley LC (2008) PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 27 (41): 5497-10.
- Zentella de Piña M, *et al.* (1995) Papel fisiológico de los radicales libres. *Boletín de Educación Bioquímica*. 15:152-161.
- Zhang X, Zhang S, Kendall RL *et al.* (2006) Kinetic mechanism of AKT/PKB enzyme family. *Journal of Biological Chemistry*. 281 (20): 13949-56.
- Zhou BP, Liao Y, Hung MC *et al.* (2001) HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt mediated MDM2 phosphorylation. *Nature Cell Biology*. 3 (11): 973-82.