



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EVOLUCIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE c-Jun Y MOLÉCULAS
RELACIONADAS EN DISTINTAS ETAPAS DE LA CARCINOGENÉISIS
RENAL INDUCIDA CON NITRILOTRIACETATO DE HIERRO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

FRANCISCO ANTONIO AGUILAR ALONSO

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

Dr. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO

Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán

MÉXICO, D. F. Junio, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio 120 del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. María Elena Ibarra Rubio.

El comité tutor que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo formado por:

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán

Dra. María Elena Ibarra Rubio, Facultad de Química-UNAM

Se reconoce:

La colaboración, asesoría técnica y discusión de resultados del M. en C. José Dolores Solano Becerra, Técnico Académico del laboratorio 120. También a la M.V.Z Lucía Macías Robles por su asesoría en el manejo de animales de laboratorio.

El proyecto fue apoyado por el programa UNAM-DGAPA-PAPIIT con los proyectos IN221313 e IN227010-2, así como, por la Facultad de Química mediante el PAIP 5000-9109, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) número 81026 y al Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP) por el financiamiento para un congreso internacional y uno nacional (Oaxaca 2012 y Rusia 2013).

Durante la duración de mi estancia doctoral gocé de una Beca de doctorado Nacional otorgada por el CONACyT, con número de CVU 252642, por el periodo de Febrero 2011 a Enero 2015.

El jurado del examen de Doctorado estuvo constituido por:

Presidente

Dr. José Pedraza Chaverri

Vocal

Dra. Marcela Lizano Soberón

Vocal

Dra. Ana María Salazar Martínez

Vocal

Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz

Secretario

Dra. Norma Bobadilla Sandoval

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios, por acogerme en ella, brindándome la oportunidad de alcanzar mis objetivos académicos, brindándome además la oportunidad de crecer cultural y socialmente. A la Facultad de Química por que a lo largo de estos años, en ella obtuve los conocimientos que me permitieron obtener este logro.

A la Dra. María Elena Ibarra, por la dirección de esta tesis, por su confianza, su paciencia y sus charlas.

A mi Comité Tutor, al Dr. Alejandro García Carrancá y Dr. Amando Roberto Tova Palacio, por su valiosa crítica, consejos y comentarios acerca de esta tesis y el apoyo brindado durante todo el proceso de revisión.

A mi Jurado de tesis, los Dres. José Pedraza Chaverrí, Marcela Lizano Soberón, Ana María Salazar Martínez, Rolando Efraín Hernández Muñoz y la Dra. Norma Bobadilla Sandoval, por su tiempo para enriquecer este trabajo.

A Leticia García, por su paciencia, su gran trabajo, por el tiempo dedicado y apoyo a lo largo de todos estos años.

A todo el personal del Conjunto F de la Facultad de Química, que que facilitaron mi estancia y trabajo a lo largo de todos mis estudios de postgrado.

DEDICATORIAS

Esta tesis va con especial dedicatoria a mi mamá, a mi tía Chepis y a mi tío Memo, que aunque no estén sé que aún me acompañan en cada uno de mis logros.

A mi padre, porque sigue cuidando de mis pasos.

A mi hermana Rotz, yo creo que sin tu compañía este proyecto no hubiera llegado tan lejos.

A mi Chks hermosa (Silvia), por toda tu paciencia, siempre de los siempre has estado conmigo y me has ayudado a sacar este proyecto adelante. Te amo monona.

A mis tías Cata, Mokoken y Macuka por su interés, guía, apoyo y compañía. Sin ustedes no sería el que soy hoy.

A mis primos Sirno, Rebe, Vítor, Karla, Hétor y Chich por darme tan bonitos momentos en el cotorreo y seriedad. Los quiero mucho.

A mis amigos Aarón, Roberto, Marco y Daniel, por brindarme momentos tan gratos y su incondicional apoyo.

A la Doc. María Elena Ibarra, por su paciencia, guía y confianza, que sin ella el proyecto no hubiera avanzado exitosamente.

A los compañeros de laboratorio José, Telma, Nacho, Chío, Paty, ya que de una u otra forma participaron en la elaboración de este proyecto. Gracias

Tabla de contenidos

1. RESUMEN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Cáncer.....	4
2.2 Carcinoma de células renales (CCR).....	4
2.3 Carcinogénesis renal inducida con FeNTA.....	5
2.4 Generalidades de AP-1	7
2.5 c-Jun	8
2.6 Cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs).....	10
2.6.1 Cinasas de amino terminal de c-Jun (JNK).....	11
2.6.2 p38.....	12
2.6.3 Cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK).....	13
2.6 β -Catenina.....	13
2.8 GSK-3 β	16
2.9 APC.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
6.1 Diseño experimental.....	20
6.1.1 Preparación y administración de DEN.....	22
6.1.2 Preparación y administración de FeNTA.....	22
6.1.3 Sacrificio y toma de muestras.....	22
6.2 Métodos.....	23
6.2.1 Inmunodetección de p-c-Jun por IHQ	23
6.2.2 Niveles de expresión y fosforilación de distintas proteínas específicas por Western blot.....	24
6.2.3 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) para AP-1	26
6.2.4 Cuantificación de ARNm de la ciclina D1 (RT-PCR).....	26
6.2.5 Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	27
6.2.6 Co-Inmunoprecipitación (Co-IP)	28
6.3 Análisis estadístico	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
8. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS Y LA INFORMACIÓN EXISTENTE EN LA LITERATURA	48
9. CONCLUSIONES.....	50
10. PERSPECTIVAS	51
11. ANEXOS.....	52
10.1 Figuras suplementarias.....	52
10.2 Artículo publicado.....	55
12. REFERENCIAS... ..	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1: Proteína activadora 1.

APC: Proteína de los polipolos adenomatosos del colón.

ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina.

CCR: Carcinoma de células renales.

CCRcc: Carcinoma de células renales de células claras.

Co-IP: Coinmunoprecipitación.

DNA: Ácido desoxirribonucleíco.

DEN: N-N-Dietil nitrosamina.

EMSA: Ensayo de cambio en la movilidad electroforética.

ERK: Cinasa regulada por señales extracelulares.

EROs: Especies reactivas de oxígeno.

FeNTA: Nitrilotriacetato de hierro.

GAPDH: Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa.

GSK-3 β : Cinasa de la glucógeno sintasa 3 β .

IHQ: Inmunohistoquímica.

JNK: Cinasa del amino terminal de c-Jun

MAPKs: Cinasas activadas por mitógenos.

MMP9: Metaloproteína de matriz 9.

mRNA: Acido ribonucleico mensajero.

PBS: Amortiguador salino de fosfatos.

SFB: Suero fetal bovino.

ABSTRACT

Renal cell carcinoma (RCC) represents almost 90% of cancer arising from adult kidney. This cancer is asymptomatic, and initial diagnosis generally occurs in advanced or even in metastatic stages. Early stages detection or studies are almost impossible in patients. Ferric nitrilotriacetate (FeNTA) induced RCC is a useful model to analyze early events on RCC development. Chronic intraperitoneal FeNTA injections give rise to RCC in rats, and its administration along 1 or 2 months leads to renal dysplasia. c-Jun, MAPKs, Cyclin D1 and β -catenin has been proposed to participate in RCC development. In the present work we found that less advanced FeNTA-induced tumours showed high nuclear p-c-Jun levels, compared to normal tissues, and this alteration diminishes or disappear in more advanced tumours, suggesting that c-Jun may participate in early developmental stages of FeNTA-induced RCC. To test this hypothesis we analyze c-Jun status after 1 and 2 months of FeNTA-treatment. At both times FeNTA administration induced renal overexpression and phosphorylation of c-Jun, an increase of AP-1 activity and its recruitment to cyclin D1 and MMP9 gene promoters, and also high levels of cyclin D1 mRNA and protein. These changes were more severe at 2 months compared to 1 month.

It was considered important to analyze MAPKs behavior as possible upstream mechanisms of AP-1 activation. Specifically, it was found that at 1 month of FeNTA treatment p38 α/β and p38 α/β levels were increased, and while this increase was decreasing along carcinogenesis, overexpression of p38 γ isoform rises. Moreover, at early stages, but not in tumors, increased levels of p-JNK1 were detected, effect which was greater at 2 months than at 1 month. Instead, p-JNK2 levels were increased only at two months of treatment and in tumors. Furthermore, in all stages analyzed increased levels of p-ERK were detected.

We also determine β -catenin status, protein which interact with c-Jun enhancing its transcription factor activity. One and two months of FeNTA-treatment induced an elevation of β -catenin and p-GSK-3 β (inactive form) and a decrease in APC levels, that inactivation of p-GSK3 and reduction of APC levels seem to be, at least in part, causes of the β -catenin accumulation.

Interestingly, at 1 and 2 months of FeNTA treatment, alterations in none of the analyzed molecules were observed in liver or lung, tissues where no primary tumor are induced with the scheme of FeNTA administration followed in the present work.

In conclusion, kidney behaviour of c-Jun, cyclin D1 and MAPKs evolved differentially as renal carcinogenesis advanced. All this strongly suggests a role of these molecules in FeNTA-induced RCC tumor development .

1. RESUMEN

El carcinoma de células renales (CCR) presenta una alta mortalidad debido, en parte, a la dificultad en su diagnóstico y tratamiento. Ésta es una de las neoplasias menos comprendidas y se desconoce lo que sucede en etapas tempranas de su desarrollo. Algunos autores han encontrado que en tumores de CCR en estadios menos avanzados existe un incremento en fosfo-c-Jun (p-c-Jun), forma activa de uno de los monómeros que constituyen al factor de transcripción AP-1, y que esta alteración disminuye o desaparece en tumores en estadios más avanzados, lo que sugiere que c-Jun podría jugar un papel importante en etapas tempranas del desarrollo de este tipo de cáncer. Además, en tumores de CCR es frecuente encontrar un aumento en las formas activas de las MAPKs, ERK y p38, así como de la ciclina D1, moléculas involucradas en la activación y efectos río abajo de AP-1 respectivamente. Así mismo, la sobre-expresión de β -catenina, proteína que al interaccionar con c-Jun potencia su actividad como factor transcripcional, se da entre el 27 y el 92% de las muestras de CCR analizadas, según distintos autores. Lo anterior, se ha vinculado con la disminución en los niveles del supresor tumoral, y regulador negativo de β -catenina, APC, evento que se ha reportado hasta en el 39% de los casos de CCR.

Debido a que esta patología es asintomática, su detección y estudio en etapas tempranas es casi imposible, lo que justifica implantar modelos experimentales bien caracterizados que reproduzcan el desarrollo de esta enfermedad para analizar eventos celulares en distintas etapas de la carcinogénesis y que sirvan como herramienta para la búsqueda de agentes preventivos y/o terapéuticos, así como de marcadores que permitan un diagnóstico oportuno. Uno de los modelos utilizados para el estudio del CCR es el que se induce por la administración de nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). En nuestro laboratorio se ha logrado reproducir dicho modelo para la inducción de tumores de CCR en ratas, con un tratamiento durante 4 meses con FeNTA, los cuales son histológicamente muy similares a la neoplasia humana y que actualmente estamos caracterizando molecularmente.

En el presente trabajo se muestra que en los tumores experimentales el comportamiento de p-c-Jun es similar a lo descrito en los pacientes, es decir su sobreexpresión disminuye conforme avanza el estadio del tumor. Interesantemente, el tratamiento durante 1 y 2 meses con FeNTA (etapas tempranas de la carcinogénesis) indujo un incremento en los niveles de c-Jun y p-c-Jun, así como en la actividad de AP-1 y el reclutamiento de c-Jun al promotor de los genes *ciclina D1* y *mmp9*, alteraciones que fueron mayores al segundo mes

que al primer mes de tratamiento. Lo anterior, correlacionó con un incremento a nivel mRNA y proteína de ciclina D1. Estos resultados sugieren una participación importante de c-Jun en etapas tempranas de la carcinogénesis, la cual se va perdiendo conforme avanza el proceso de desarrollo tumoral, de tal forma que el mantenimiento y crecimiento de los tumores más desarrollados sean independientes de la actividad de c-Jun.

También se analizó el comportamiento de las MAPKs, las cuales son moléculas que pueden mediar la activación de c-Jun. Específicamente, se determinó que los niveles de p38 α / β y p-p38 α / β aumentaron en el primer mes de tratamiento, y que mientras este incremento fue disminuyendo a lo largo de la carcinogénesis, los niveles de la isoforma p38 γ se fueron elevando. Además, en etapas tempranas, pero no en tumores, encontramos un aumento en los niveles de p-JNK1, lo que fue mayor al segundo mes que al primer mes. En cambio, aquéllos de p-JNK2 sólo se vieron aumentados al segundo mes de tratamiento y en los tumores inducidos. Por otra parte, se observó un incremento en los niveles de p-ERK en todas las etapas analizadas. El comportamiento de las isoformas de p38 y JNK en distintas etapas de la carcinogénesis sugiere papeles diferenciales de estas cinasas en la formación y desarrollo tumoral inducida con FeNTA. Se presentó una correlación entre el estatus de p-JNK1 y p-c-Jun, sugiriendo que esta cinasa podría participar en la activación de c-Jun. El comportamiento de p-p38 y p-ERK en los tumores experimentales coincide con lo reportado en el CCR humano.

La β -catenina es una proteína que al unirse a c-Jun potencia la actividad como factor transcripcional de AP-1. En el presente trabajo se encontró que el tratamiento durante 1 y 2 meses con FeNTA indujo la interacción entre c-Jun y β -catenina, una elevación de β -catenina y p-GSK3 β (forma inactiva), así como una disminución en los del supresor tumoral APC, lo que sugiere que β -catenina podría estar potenciando la actividad de AP-1 y que las alteraciones en p-GSK3 β y APC parecen la causa, al menos en parte, de la acumulación de β -catenina.

Por otra parte, el tratamiento con FeNTA durante 1 y 2 meses no indujo alteraciones en los niveles hepáticos, ni pulmonares de p-c-Jun, ciclina D1, MAPKs y β -catenina, reforzando la idea de la participación de estas proteínas en la carcinogenicidad renal inducida con FeNTA. En conjunto, los resultados presentados en este trabajo indican que el comportamiento de las moléculas estudiadas evoluciona a lo largo de la carcinogénesis, sugiriendo papeles específicos de cada una de ellas en distintas etapas del desarrollo del CCR en el modelo experimental de tratamiento con FeNTA. Además, las alteraciones en p-c-Jun, ciclina D1, p-

p38 α/β , p-ERK y β -catenina en los tumores obtenidos es similar a lo observado en el CCR humano, lo que representa una evidencia mas de las similitudes entre ellos, por lo que este modelo puede ser una herramienta útil para analizar el potencial preventivo y/o curativo de agentes que tengan como blanco a AP-1, ciclina D1, MAPKs y/o β -catenina.

ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en México [INEGI. Defunciones generales. En: www.inegi.org.mx (8 de enero de 2015+)], y es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por la formación de una masa tumoral (o neoplasia), la cual está constituida por un grupo de células con las propiedades heredables de reproducirse independientemente a señales de crecimiento, división y/o muerte, así como invadir y colonizar espacios destinados para otras células (metástasis) (Alberts y cols., 2008).

Cualquier célula es susceptible a desarrollar cáncer y éste puede clasificarse de acuerdo al tipo de células que dió origen al tumor (Arbiser, 2004). Por ejemplo, si la primera célula que desarrolló una anomalía funcional fue epitelial se le conoce con el nombre de carcinoma, mientras que si la célula progenitora fue del tejido conectivo o muscular se le conoce como sarcoma; además, existen otro tipo de neoplasias fuera de esta clasificación, como serían las leucemias y las del sistema nervioso (Alberts y cols., 2008).

El desarrollo de una neoplasia es un proceso muy complejo donde deben combinarse y acumularse una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que le permita saltar todos los procesos de reparación genética y de control del ciclo celular, lo cual puede favorecerse por exposiciones a diversos factores. Entre estos factores destacan: a) compuestos químicos, que pueden ocasionar daño en el DNA (carcinógenos); b) radiaciones ionizantes que causan rupturas y translocaciones cromosomales; y c) alteraciones por virus, los cuales pueden insertar su DNA al material genético del hospedero, con información que permita la transformación de células (Alberts y cols., 2008).

2.2 Carcinoma de células renales (CCR)

El CCR es el tipo de cáncer nefrológico más frecuente (Vasudev y cols., 2012). Este tipo de cáncer abarca 15 subtipos histológicos, siendo el de células claras (CCRcc) el más común (Such y cols., 2015). Si este tipo de cáncer es detectado en estadios menos avanzados, la supervivencia de hasta cinco años es del 90% de los casos (Cojocarú y cols., 2015). No obstante, el CCRcc es asintomático, y aunque el uso de estudios imageneológicos ha favorecido el diagnóstico temprano de este tipo de tumores, el 30% de los casos se detectan cuando ya se ha presentado metástasis (Haddad y cols., 2015), haciendo, en

parte, que esta neoplasia presente una tasa alta de mortalidad (81.7 % en México) (Dirección General de Epidemiología, 2001).

De los factores de riesgo para el desarrollo de este tipo de neoplasia se incluyen el tabaquismo, alcoholismo y obesidad, los cuales tiene en común la generación de estrés oxidante (Gago-Domínguez y Castelao, 2006; Harris, 2015). Se ha observado que el estrés oxidante juega un papel en el mantenimiento de diversas líneas celulares de CCR (Jung y cols., 2005) y que las personas que tienen un consumo regular de productos naturales ricos en antioxidantes, tienen una menor tendencia a desarrollar cáncer renal que aquellos que no lo hacen (Bosetti y cols., 2007), lo que sugiere que el estrés oxidante podría estar vinculado con el desarrollo y mantenimiento de CCR.

Cada subtipo de CCR presenta alteraciones moleculares distintas y responde de manera diferente a las terapias, lo que ha hecho aún más complicado su tratamiento (Such y cols., 2015). Aunque la caracterización molecular del CCR ha avanzado rápidamente en los últimos años, aún se está lejos de tener un panorama que permita comprender los mecanismos que llevan a la formación, desarrollo y manutención de este tipo de neoplasia, lo cual es importante para poder establecer terapias dirigidas y/o para establecer marcadores de diagnóstico oportuno (Haddad y cols., 2015; Ediriwickrema; 2015).

Además, el CCR es resistente a la quimio y radioterapia convencionales, por lo que se han probado inmunoterapias con interferón e interleucina-2. Sin embargo, la respuesta a este tipo de tratamientos se da solo en el 7-8% de los pacientes y su alta toxicidad ha limitado su uso (Haddad y cols., 2015). Con la llegada de la era de las terapias dirigidas, se aprobaron diversos fármacos como el Bevacizumab, un anticuerpo contra el factor de crecimiento vascular epidérmico (VEFG) (Sun y cols., 2014); el temsirolimus, inhibidor de blanco de rapamicina (mTOR) (Sun y cols., 2014); así como los inhibidores de cinasas Sorafenib y Sinutinib (Larkin y cols. 2006; Nelson y cols., 2007). Sin embargo, la respuesta a estas terapias sigue siendo limitada para el control de CCR, por lo que nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del esta patología son necesarios (Haddad y cols., 2015).

Por todo lo anterior se consideró que tener un modelo experimental de inducción de CCR bien caracterizado, que asemeje el desarrollo de esta enfermedad en pacientes, podría ser de mucha utilidad para comprender el proceso carcinogénico, así como para establecer marcadores de diagnóstico y para probar agentes preventivos y/o terapéuticos para el control de este tipo de neoplasia.

2.3 Carcinogénesis renal inducida con FeNTA

Uno de los modelos más usados para el estudio de carcinogénesis renal es el inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). Se sabe que una sola administración intraperitoneal de FeNTA produce necrosis tubular renal, pero que el tratamiento crónico durante 7 meses lleva a la formación de adenocarcinoma de células renales en ratas y ratones (Preece y cols., 1989). Además, en 1998 Athar y colaboradores reportaron que una sola administración de dietilnitrosamina (DEN), como iniciador tumoral, reduce el tiempo de tratamiento necesario para la formación de tumores a solo 4 meses (Athar y cols. 1998), a diferencia de otros modelos que tardan hasta 2 años en que se desarrolle la patología (Umemura y cols., 1995; Lash y cols., 2000).

El nitrilotriacetato (NTA) es un ácido monocarboxílico quelante de cationes bi y trivalentes como Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} . Es una molécula pequeña que, formando complejos con metales como hierro, puede inducir daño oxidante a proteínas, lípidos y DNA (Leibold y cols., 2002). De hecho, se sabe que el estrés oxidante es uno de los mecanismos de carcinogenicidad renal de este compuesto (Zhao y cols., 1997; Bahnemann y cols., 1998; Toyokuni y cols., 1996; Fukuda y cols., 1996; Athar y cols., 1998; Kimoto y cols., 2000; Ichihashi y cols., 2001; Torres-Martínez, 2007; López-Ramos, 2007; Eybl y cols., 2008; Vargas-Olvera y cols., 2012), lo que es una similitud con los factores de riesgo para el desarrollo de CCR en humanos.

En nuestro laboratorio ya hemos reportado que con una sola inyección de DEN y administraciones repetidas de FeNTA durante 4 meses logramos inducir CCR en ratas (Vargas-Olvera., 2012). En este trabajo, también, se determinó que los tumores inducidos son histopatológicamente muy similares al CCR de células claras de humano y se identificó que después de 1 ó 2 meses de tratamiento con el carcinógeno se provoca la formación de lesiones preneoplásicas (Vargas-Olvera y cols., 2012). De igual forma, algunos autores han descrito que el tratamiento con FeNTA durante 3, 4 u 8 semanas induce alteraciones moleculares pro-carcinogénicas, tales como la delección homocigótica de *INK4*, gen del inhibidor del ciclo celular, p16 (Hiroyasu y cols., 2002), la sobreexpresión de algunos marcadores de ciclo celular (Bahnemann y cols., 1998; Taniai y cols., 2012), en otras moléculas de señalización (Montalvo-Muñoz, 2008; Rangel-Gómez, 2011; Pariente-Pérez, 2012; Curiel-Muñíz 2012; Navarro-García, 2013; Curiel-Muñíz, 2014; Pacheco-Bernal 2014), lo que sugiere que estos periodos de tratamiento podrían representar etapas tempranas de la carcinogénesis.

Se ha reportado que 1 hora después de la administración de FeNTA, no se presentan alteraciones en la expresión del gen de ciclina D1 (López-Ramos, 2007), ni en los niveles

de I κ B- α (Torres-Martínez, 2007). No obstante después de uno y dos meses de tratamiento con FeNTA hemos encontrado alteraciones potencialmente oncogénicas en estas moléculas (Aguilar-Alonso, 2010; Pariente-Pérez, tesis de Doctorado en elaboración), lo que sugiere que, el esquema de tratamiento agudo y después de 1 y/o 2 meses de tratamiento, representan etapas distintas en la carcinogénesis renal inducida con este compuesto.

Resulta importante mencionar que con el esquema de tratamiento que seguimos en nuestro laboratorio no se inducen tumores primarios en otros tejidos como hígado y/o pulmón (Vargas-Olvera y cols., 2012), lo que sugiere una mayor especificidad de FeNTA como carcinógeno renal.

2.4 Generalidades de AP-1

El factor de transcripción AP-1 regula la expresión de genes vinculados con diferentes procesos celulares como proliferación (Shaulian y cols., 2001), invasión (Eferl y Warner, 2003), apoptosis (Shaulian y Karin, 2001), síntesis de enzimas de defensa antioxidante (Cheng y cols., 2006) y angiogénesis (Eferl y Wagner, 2003), entre otros. Es una proteína dimérica que puede estar formada por homodímeros de las proteínas de la familia JUN (c-Jun, JUNB y JUND) y ATF (ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ATF5, ATF6a, ATF6b ATF7, B-ATF; ATFa0), o por heterodímeros de éstas con las proteínas de las familias FOS (c-Fos, FOSB, Fra-1 y Fra-2) (Kappelmann y cols., 2014). Las modificaciones postraduccionales que llevan a la formación y activación de este complejo son principalmente fosforilaciones de las proteínas JUN, FOS y ATF mediadas por diversas cinasas, incluyendo las MAPKs JNK, ERK (Young y cols., 2006) y, en un menor grado, p38 (Kayahara y cols., 2005). Al no encontrarse fosforilada en su Ser 63 ó 73, c-Jun además de ser inactiva, tiene una vida media de entre 20 min a 2h en la mayoría de los tipos celulares (Kayahara y cols. 2005; Dunn y cols., 2002). También, se ha informado que la fosforilación en la serina 63 es suficiente para proteger a c-Jun de ser degradada (Fuchs y cols., 1997; Dunn y cols., 2002; Kayahara y cols., 2005; Raivich G., 2008).

Se sabe que tras la activación de las proteínas JUN, FOS ó ATF, los cuales, al dimerizarse, forman el complejo AP-1, se induce la expresión de genes para promover distintas respuestas celulares dependiendo de los monómeros que lo conformen (Hess y cols., 2004). Por ejemplo, se ha observado que cuando AP-1 se encuentra constituido por lo menos por una molécula de c-Jun se promueve la expresión de la ciclina D1 y la metaloproteinasa de

matriz (MMP9 por sus siglas en inglés) (Eferl y Wagner, 2003; Mathews y cols., 2007) y se induce una disminución de inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), p21 y p16 (Hess y Schorpp-Kistner, 2004), lo que resulta en un incremento en la proliferación celular (Behrens y cols., 2003; Zenz y cols., 2003). Asimismo, la presencia de c-Jun en AP-1 puede disminuir la expresión de algunas proteínas antiapoptóticas como Bcl 3, y regular negativamente la expresión de p53, lo que resulta en una estimulación de la proliferación e inhibición de apoptosis (Eferl y Wagner, 2003; Stepniak y cols., 2006). Por otra parte, se ha descrito que JUNB y JUND son reguladores negativos de ciclo celular (Meixner y cols., 2004), y que si este factor de transcripción se encuentra conformado por c-Fos puede inducir enzimas de defensa antioxidante, como es el caso particular de la hemoxygenasa (Cheng y cols., 2006) o inducir la expresión de la proteína proapoptótica FASL (Eferl y Wagner, 2003). De esta forma, y como se esquematiza en forma resumida en la Figura 1, AP-1 regulará distintos procesos celulares dependiendo de las proteínas que lo conformen.

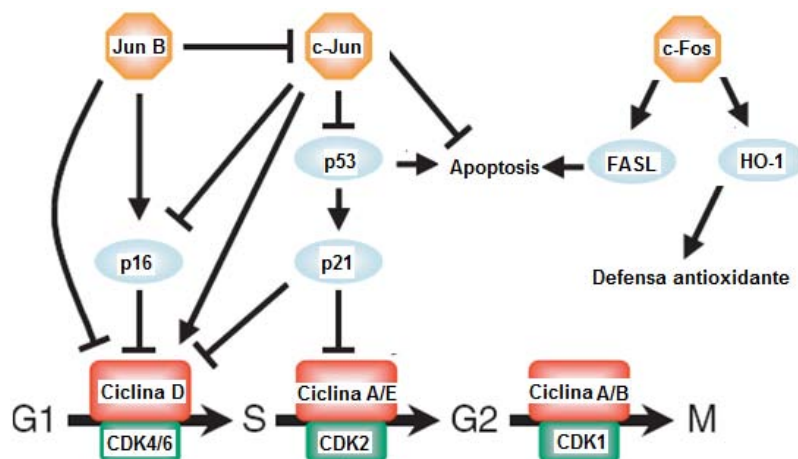


Figura 1. El factor de transcripción AP-1 puede regular diversos procesos celulares dependiendo de las proteínas que lo conformen. Jun B reprime el avance del ciclo celular, mientras que c-Jun favorece el avance del ciclo y reprime apoptosis. Por otra parte c-Fos puede inducir apoptosis y la síntesis de la hemo-oxigenasa 1 (HO-1), como parte de la defensa antioxidante. (Modificado de Hess y Schorpp-Kistner, 2004).

Por otra parte, se ha observado que el promotor de *c-jun* y *c-fos* poseen sitios de reconocimiento de AP-1, lo que nos dice que este factor puede autoinducir la expresión de algunos de sus componentes (Shaulian y Karin, 2001).

2.5 c-Jun

De todos los componentes que pueden conformar a AP-1, se ha identificado a c-Jun como altamente oncogénico (Eferl Warner, 2003). Se identificó a esta proteína se identificó como

la contraparte celular del oncogen *v-jun* contenida en el genoma del virus del sarcoma aviar (Eferl y Wagner, 2003). c-Jun es una proteína de 37 kDa activada por fosforilaciones en su Ser63/73 mediadas principalmente por la cinasa del domino amino terminal de Jun (JNK) y en su Ser247 por la cinasa activada por señales extracelulares (ERK) (Figura 2). Al contrario, al ser fosforilada en su S253 por la caseín cinasa 2 (CkII), c-Jun es inactivada (Raivich 2008) (Figura 2). Por otra parte, también cuenta con un dominio de anclaje a proteínas, denominado domino δ (Figura 2), el cual es necesario para su correcta activación y/o degradación mediada por JNK, ERK y CkII.



Figura 2. La proteína c-Jun posee un dominio de unión a JNK (δ) y un dominio de transactivación (TA) que puede ser fosforilado por diversas cinasas, como JNK, ERK y la caseín cinasa II (CKII). Además, posee un dominio de unión a DNA (DBD) y un motivo de zipper de leucina (LZ) necesario para la dimerización. (Modificado de Eferl y Wagner, 2003)

El estrés oxidante puede mediar la activación de AP-1, ya sea por su efecto sobre las MAPKs responsables de la fosforilación de los monómeros que la conforman, o bien, por el estado redox que puede afectar directamente a la cys-172 en JUN y cys-154 en FOS permitiendo la activación de dichas proteínas sin necesidad de ser fosforiladas (Hsu y cols., 2000).

En cuanto a la expresión de c-Jun en el tejido renal se ha observado que en riñones normales existen niveles bajos de esta proteína, mientras que, bajo ciertas condiciones patológicas se incrementan sus niveles, lo que correlaciona con la gravedad de procesos inflamatorios y el incremento en la proliferación celular (De Borst, 2007). Esto sugiere que c-Jun no juega un papel principal en la fisiología normal del riñón, pero que se induce en respuesta a diversos procesos patológicos (De Borst, 2007), efecto que se ha observado también en otros organismos, como es la rata (Kanellis y cols., 2010).

Se ha observado que los niveles de c-Jun varían en el desarrollo de los tumores de CCR. Por ejemplo, se ha encontrado que en tumores de menor grado de avance se presentan niveles elevados de esta proteína, los cuales, disminuyen en aquellos que se encuentran en etapas tardías, por lo que se ha sugerido que c-Jun podría jugar un papel clave en el desarrollo de CCR (Koo y cols., 1992; Oya y cols., 2005). De igual forma, en los tumores de CCR inducidos con FeNTA, se ha encontrado un incremento en los niveles del RNAm de c-

Jun (Liu y cols., 2007); sin embargo, en este estudio no se reporta el tamaño, ni el grado de avance de los tumores y si existe una correlación entre estos factores y la cantidad de transcrito de c-Jun. Interesantemente, en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se encontró que en muestras de tejido renal obtenidas después de un mes de tratamiento con FeNTA existe un incremento en los niveles de c-Jun y p-c-Jun, así como, un aumento en la actividad de AP-1. Estas alteraciones correlacionan con un incremento en los niveles proteicos de la ciclina D1. Esto nos llevó a sugerir la posible participación de este factor transcripcional en la carcinogenicidad renal del FeNTA (Aguilar-Alonso, 2010).

2.6 Cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs)

Las MAPKs son cinasas de residuos de serina y treonina, altamente conservadas en células eucariontes (Krishna y cols., 2008). Se han identificado 6 distintas familias de MAPKs en mamíferos: las cinasas del dominio amino terminal de c-Jun (JNK 1, 2 y 3), la p38s (isoformas α , β , δ y γ), las cinasas activadas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1 y 2 ó p44 y p42 respectivamente), ERKs 3 y 4, ERK 5 (ó BMK1) y ERKs 7 y 8 (Yoon y cols., 2006). De éstas últimas, aún no se ha identificado si ERK 3/4 y 7/8 son activadas por cascadas de fosforilación similares a las de las otras MAPKs (Yoon y cols., 2006).

Aunque cada una de las familias de las MAPKs (JNK, p38 y ERK) tienen características propias, comparten ciertas similitudes. Por ejemplo, todas se activan en respuesta a estímulos mitogénicos por cascadas de fosforilación (mediadas por sus cinasas correspondientes) y todas poseen sitios de anclaje para unirse a sus sustratos (Yoon y cols., 2006).

Estas enzimas son parte de los mecanismos de activación de diversos factores de transcripción que regulan distintos procesos celulares, incluyendo a los componentes de AP-1, entre ellos a c-Jun (Fuchs y cols., 1997; Yoon, 2006; Krishna y cols., 2008; Stepniak y cols., 2008; Raivich, 2008) y como se presenta en la Figura 3, su actividad puede conducir a diversos eventos pro-carcinogénicos.

Se conoce que bajo ciertos estímulos, como la presencia de EROs, algunas cinasas activadoras de MAPK (MEK) se activan y por lo tanto fosforilan a las MAPKs JNK, p38s y ERKs (Nelson y cols., 2007, lo que se ha vinculado con transformaciones malignas y la progresión de tumores, incluyendo carcinomas de seno, riñón, colon y pulmón (Huang, 2008).

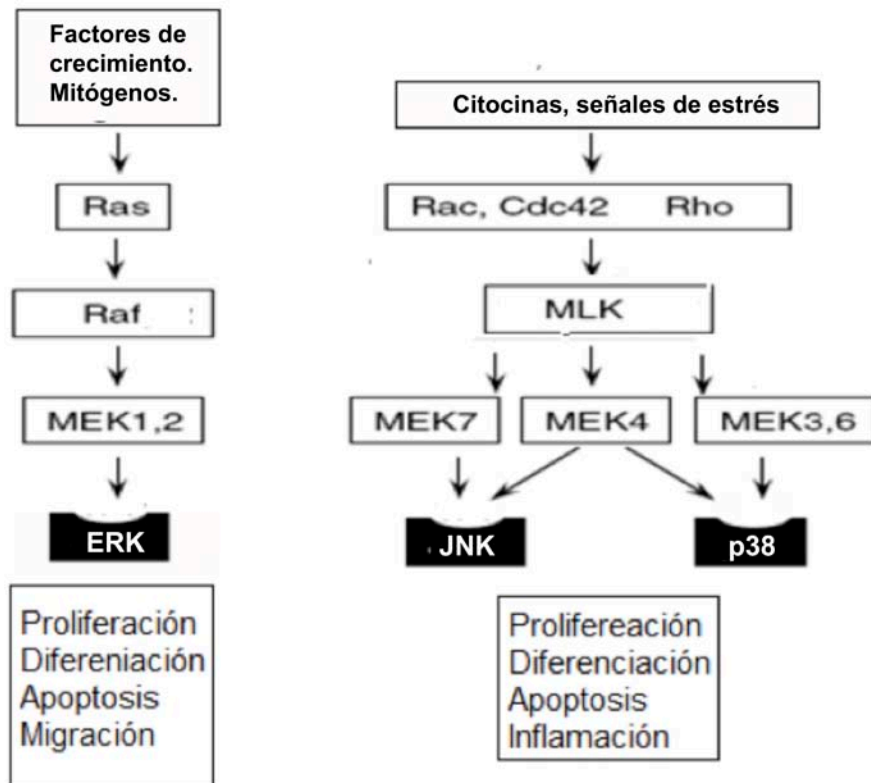


Figura 3. Algunas de las vías de las MAPK. Estas cascadas de señalización responden a ciertos estímulos y regulan procesos relacionados con el cáncer, como proliferación, diferenciación, apoptosis e inflamación. (Adaptado de Dhillon y cols., 2007).

En 2 líneas celulares de CCR de células claras, Caki I y Caki II, se han identificado las vías de JNK, p38 y ERK como blancos para inhibir su proliferación. Específicamente, estos autores usaron una toxina antrácica que indujo una disminución en la fosforilación de estas proteínas, lo que se relacionó con una disminución en la proliferación celular. Sin embargo, la restricción en la fosforilación de estas proteínas no indujo una disminución en la supervivencia de dichas células (Huang y cols. 2008).

2.5.1 Cinasa del dominio amino terminal de c-Jun (JNK)

En mamíferos se han descrito 3 isoformas de JNK, 1, 2 y 3. JNK 1 y 2 se expresan de forma ubicua, mientras que JNK 3 se encuentra casi exclusivamente en cerebro (Bubici y cols., 2014). En células normales, JNK se activa por las MEK 4 y 7 y terminado el estímulo se inactivan por fosfatasa de serina y tirosina (Bubici y cols., 2014). Una vez activada JNK puede, dependiendo del estímulo, fosforilar ciertos factores de transcripción como p53, c-Jun, ATF2, Elk-1 y c-Myc (Saadeddin y cols., 2009), así como algunas proteínas pro y anti apoptóticas como BAD y Bcl-2, respectivamente. Por otro lado, al inactivarse JNK puede unirse a las proteínas que activó para inducir su degradación (Bode y cols., 2007). Un

ejemplo específico de esto, es que cuando c-Jun ya no es necesario, JNK se une a su dominio δ para exportarlo al citosol y presentarlo al proteosoma (Fuchs y cols., 1997). De hecho, se ha observado que una depleción de JNK, o la carencia del dominio δ , incrementa los niveles y la capacidad oncogénica de Jun (Fuchs y cols., 1997).

Por otra parte, se ha reportado que uno de los mecanismos de regulación de JNK es mediante la inactivación de las MEK 4 y 7 por p38 (Wagner y cols., 2009) y ERK (Yoon y cols., 2006), lo que induce la degradación de JNK (Laine y cols., 2005). Lo anterior se ha vinculado con diversos procesos pro-carcinogénicos, como una disminución en la apoptosis y un incremento en la proliferación celular (Wagner y cols., 2009).

2.5.2 p38

p38 es una cinasa activada por las MEK 3, 4 y 6. En vertebrados se han encontrado cuatro isoformas denominadas α , β , δ y γ (Han y cols., 2007) y se ha descrito que en células de tejido renal normal sólo están presentes α , β y γ (Polzer y cols., 2008). Esta proteína da el nombre a una vía relacionada con procesos de inflamación, progresión del ciclo celular, crecimiento, regulación de apoptosis, diferenciación y senescencia oncogénica (Han y cols., 2007).

Uno de los mecanismos propuestos mediante el cual se explica cómo p38 se activa para producir apoptosis y senescencia es por incrementos en los niveles de estrés oxidante. Se ha reportado que cuando existe una sobreactivación de ERK se activan ciertos factores de transcripción, que inducen la expresión de diversas enzimas prooxidantes, como la NADPH oxidasa (NOX), lo que produce un incremento en el estrés oxidante, lo cual puede activar a MEK 6 (cinasa activadora de p38) (Dolado y cols. 2007). Una vez activada, p38 induce la actividad de ciertos supresores de tumores, como p53, para inducir apoptosis (Lijian y cols., 2007). De hecho, se ha observado que en células transformadas e incapaces de expresar p38 α , las EROs aumentan facilitando la expresión del genotipo transformado (Dolado y cols. 2007; Han y cols., 2007). Por otra parte, se ha encontrado que en células de túbulo renal, el H₂O₂ induce una activación de p38 con una cinética variable y se ha sugerido que este efecto se debe a que el estrés oxidante produce una activación diferencial de las distintas isoformas de p38 en los tiempos estudiados (Cui y cols., 2006).

Por otra parte, se ha encontrado que mientras p38 α puede inhibir la actividad oncogénica de Ras, la isoforma p38 γ es inducida por Ras promoviendo el desarrollo de distintos tipos de cáncer (Qi y cols., 2007). Asimismo, se ha encontrado que en líneas celulares de CCR, específicamente en células 786-0, se encuentran presentes las isoformas α , β y γ

(Ambrose y cols., 2006), y que la actividad de p38 γ correlaciona con la hiperactivación de ERK; sin embargo, no se ha encontrado evidencia que señale que la actividad de ambas proteínas puede interregularse (Ambrose y cols., 2006).

2.5.3 Cinasa regulada por señales extracelulares (ERK)

La cascada de señalización de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK por sus siglas en inglés) se encuentra presente en todos los organismos eucariotes (Pearson y cols., 2001). En mamíferos se han identificado 8 isoformas de ERK, de las cuales las más estudiadas y vinculadas con procesos carcinogénicos, han sido ERK 1 y 2. Éstas son proteínas con una alta homología entre sí (85% de identidad) (Ramos, 2008) y son activadas por la cascada de fosforilación de Ras/Raf, la cual activa a las cinasas de MAPK 1 y 2 (MEK 1 y 2) (Meloche y cols., 2007), siendo éstas últimas las activadoras directas de ERK (Yoon y cols., 2006). Se ha descrito que la forma en que ERK puede regular distintos procesos celulares depende del estímulo y duración del mismo, su localización celular y de las interacciones que pueda tener con otras proteínas (Meloche y cols., 2007; Ramos, 2008). De hecho, se ha identificado que una activación sostenida de ERK puede inducir la activación de ciertos factores transcripcionales, como c-Jun, para inducir la expresión de algunas ciclinas, como la D1, lo que lleva a la transición de G1/S y posteriormente a la proliferación celular (Meloche y cols., 2007). Sin embargo, también se ha descrito que una activación intermitente de ERK es necesaria para una exitosa transición G2/M (Yamamoto y cols., 2006). Esto sugiere que una activación sostenida de ERK es necesaria en la transición G1/S, pero que este efecto debe apagarse para proseguir con el ciclo celular.

En diversos tipos de cáncer se ha observado un incremento en la expresión y activación de ERK (Lee y cols., 2009). Asimismo, su actividad se ha vinculado con la supervivencia y capacidad de desarrollar metástasis de algunas líneas celulares de CCR humano (Hong y cols., 2005; Ambrose y cols., 2006; Lee y cols., 2009), y se ha relacionado una hiperfosforilación de ERK con el grado de avance del tumor y la recurrencia del mismo después de la nefrectomía en pacientes con CCRcc (Campbell y cols., 2009).

2.6 β -catenina

La β -catenina es una proteína que al interactuar con E-cadherina y α -catenina, participa en la adhesión célula-célula. No obstante, esta proteína es un componente de una vía de señalización vinculada con proliferación celular, Wnt. Como se observa en la Figura 4A, en

ausencia de un estímulo que active al receptor de Wnt, la β -catenina, que se encuentre en el citosol, es secuestrada por un complejo proteínico compuesto principalmente por la axina, la proteína de los polípos adenomatosos del colón (APC), la caseína cinasa I (CKI) y la caseína de la sintasa de glucógeno-3 β (GSK-3 β), entre otras (Ji y cols., 2009). De ellas se sabe que CKI y GSK-3 β son responsables de la fosforilación en la región amino terminal de la β -catenina, lo que conduce a su ubiquitinación, mediada en parte por las ubiquitin E3 ligasas β -Trcp (MacDonald y cols., 2009) y/o la proteína de von Hippel-Lindau (pVHL) (Peruzzi y cols., 2006; Chitalia y cols., 2008; Berndt y cols., 2009; Linehan y cols., 2009), entre otras (Tauriello y cols., 2010), para su posterior degradación. En la figura 4B, se esquematiza que la activación de los receptores de Wnt, LRP y Frizzled (FZD), lleva al reclutamiento de Dishevelled (Dsh\Dvl) a la membrana, lo que promueve el desensamble de complejo de destrucción y la posterior inhibición de GSK-3 β , lo que resulta en la liberación y translocación nuclear de la β -catenina (Ji y cols., 2009), donde interacciona con los factores de transcripción AP-1 y el factor de células T-4 (TCF-4) formando un “loop” que facilita la transcripción de algunos proto-oncogenes como *c-jun*, *c-myc* y *ciclina D1* (Saadeddin y cols., 2009). Por otro lado, se han reportado varias vías de activación de la β -catenina independientes de Wnt, una de las cuales se presenta en células con hiperactivación de ERK, lo que favorece la translocación nuclear de la β -catenina y activación de c-Jun con todas sus consecuencias (Ji y cols., 2009).

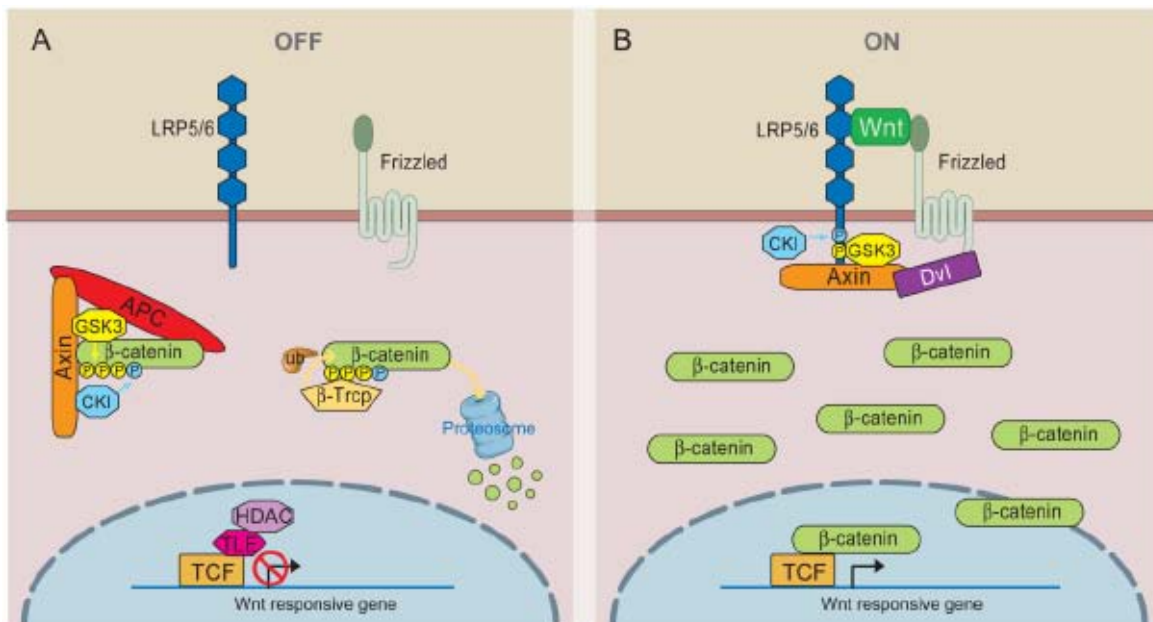


Figura 4. Esquema general de la vía Wnt β -cateninaTCF. (A) En ausencia de Wnt la β -catenina es secuestrada y marcada para su degradación. (B) En presencia de Wnt, el complejo de destrucción se recluta vía DVI, por lo que la β -catenina se acumula, y se transloca al núcleo donde activa al factor de transcripción TCF4. *MacDonald y cols. 2009.*

Aunque inicialmente las alteraciones en esta vía se identificaron como comunes en el cáncer de colon, en la última década se ha acumulado evidencia que vinculan a la β -catenina con el CCR. En este tipo de cáncer, las mutaciones o deleciones en APC, proteína frecuentemente alterada en cáncer colorectal (Suzuki y cols., 1997), y/o la misma β -catenina son poco frecuentes (Bilim y cols., 2000; Kim y cols., 2000). Sin embargo, en este último trabajo se encontró que existe una acumulación de la β -catenina en el 22.7% de los tumores de CCR analizados, e inclusive otros autores han encontrado que esta acumulación se da en el 44% (Ronkainen y cols., 2010) y hasta en el 92% (Zang y cols., 2000) de los casos analizados. Por otra parte, el estatus de esta proteína como factor pronóstico es motivo de debate, ya que mientras algunos autores solo describen la acumulación de β -catenina como un evento común en el CCR (Togashi y cols., 2005), otros han tratado de relacionar a esta proteína con el grado de avance del CCR, resultados que han sido contradictorios, ya que algunos estudios indican que el incremento en los niveles de β -catenina correlaciona directamente con el grado de avance del tumor (Zang y cols., 2000), otros señalan que la correlación es inversa (Bilim y cols., 2000), y algunos indican que esta proteína no puede usarse como factor de pronóstico (Ronkainen y cols., 2010). Lo que parece ser un hecho es que la β -catenina participa, al menos en parte, en el desarrollo de CCR y que las alteraciones que llevan a su acumulación son distintas a las observadas en otros tipos de cáncer (Bilim y cols., 2000; Kim y cols., 2000). Con respecto a lo anterior, se ha identificado que en el 30% de los tumores de CCR analizados existe una sobreexpresión de Fzd5, y que esto correlaciona con la acumulación de β -catenina y la sobreexpresión de algunos genes regulados por esta vía, como sería la ciclina D1 (Janssens y cols., 2004). Además, en esta neoplasia se ha identificado el silenciamiento epigenético de diversos antagonistas de Wnt como: sFRP1,2, 4, 5; Wif1, Dkk1-4 (Urakami y cols., 2006; Dahl y cols., 2007; Hirata y cols., 2009; Kawakami y cols., 2009; Saini y cols., 2009; Hirata y cols., 2011), así como la deleción homocigótica de Idax, un inhibidor de Dsh (Kojima y cols., 2009). Así mismo, se ha reportado que una alteración común en el CCR es la disminución en los niveles de E-cadherina, lo que se ha vinculado con la acumulación citosólica y nuclear de la β -catenina (Russel y cols., 2007; Ronkainen y cols. 2010). Estos eventos se han sugerido como otros posibles mecanismos que llevan a la desregulación de la actividad de la β -catenina en el CCR humano. De igual forma Peruzzi y colaboradores (2006) sugirieron un mecanismo independiente de Wnt por el cual algunas líneas celulares de CCR poseen una desregulación en los niveles de β -catenina; estos autores postularon que la acumulación de esta proteína se debe su no asociación con la E-cadherina y a la

frecuente disminución en los niveles de VHL (Nelson y cols., 2007; Linehan y cols., 2009). En 2007 Liu y colaboradores utilizando el modelo de inducción de CCR con FeNTA, describieron un incremento de la fosfatasa de proteínas en tirosina ζ , la cual promueve la desfosforilación en la región amino terminal de la β -catenina, alteración que se observó tanto a las 3 semanas de tratamiento con FeNTA, como en los tumores inducidos con este carcinógeno. Además, en este mismo estudio se reportó una acumulación de la β -catenina en los tumores y que esto correlaciona con el incremento de algunos de los genes blancos regulados por ésta vía, como son c-myc y ciclina D1, ésta última encontrada sobreexpresada a las 4 semanas de tratamiento con el carcinógeno (Aguilar-Alonso, 2010).

2.7 Cinasa de la glucógeno sintasa 3 β (GSK-3 β)

GSK-3 β es una cinasa constitutivamente activa, de la cual se ha descrito que existen dos isoformas, 1 y 2, siendo esta última el resultado de un procesamiento alternativo de su mRNA que genera una inserción de 13 aminoácidos, lo que provoca un cambio en el corrimiento electroforético de 47 kDa (GSK-3 β 1) a 49 kDa (GSK-3 β 2) (Saeki y cols., 2011). Su actividad es regulada negativamente por fosforilaciones, principalmente en los residuos Ser9 y Thr390 (Rayasam y cols., 2009), las cuales se pueden llevar a cabo por cinasas como Akt, p70/RSK y p90/RSK para la Ser9 (Sutherland y cols., 2011) y por p38 α para la Thr390 (Thornton y cols., 2008; Bikkavilli y cols., 2008). Originalmente, esta se identificó como parte del metabolismo del glucógeno, sin embargo, posee múltiples moléculas blanco como la ciclina D1 (Thr 286) (Diehl y cols., 1998; Liang y cols., 2003) y β -catenina (Ser33, Ser37 y Thr 41), las cuales, al ser fosforiladas por esta cinasa, se marcan para su posterior ubiquitinación y degradación vía proteosoma. De esta forma, GSK-3 β regula negativamente algunas vías pro-proliferativas (Mishra, 2010).

Con respecto al CCR, se ha observado que en líneas celulares, así como en tumores, existe un incremento en los niveles de GSK-3 β nuclear y que la inhibición de su actividad lleva a una disminución de la proliferación celular por abatimiento de la actividad de NF-kB (Billim y cols., 2009).

2.8 APC

El gen *adenomatous poliposis coli (apc)* codifica una proteína de 2843 amino ácidos con un peso aproximado de 310 kDa llamada APC, sin embargo, los productos de splicing alternativo del mRNA dan como resultado proteínas con pesos moleculares de 90-300 kDa

(Morin y cols., 2003). APC, es una proteína con múltiples funciones, participando por ejemplo en adhesión y señalización celular. Se sabe que funciona como sostén de axina y β -catenina, permitiendo, así, que esta última sea fosforilada por CKII y GSK-3 β , lo que conduce a su posterior degradación vía proteosoma. Una de las isoformas más comunes de APC es aquella cuyo peso es de 150 kDa, la cual es el resultado de un splicing alternativo, pero que también puede interaccionar y participar en la regulación negativa de β -catenina (Pyles y cols., 1998).

En el 80% de los casos de carcinoma colorectal se presentan deleciones o mutaciones en *apc*, lo que conlleva a que en este tipo de cáncer se dé una alta actividad del co-activador transcripcional β -catenina (Morin y cols., 2003). Se ha descrito que las alteraciones en *apc* son un evento temprano en el desarrollo de cáncer colorectal, y que se requiere de otro tipo de alteraciones oncogénicas, como ganancia de k-Ras o pérdida de p53, para el desarrollo de carcinomas colorectales malignos (Morin y cols., 2003).

Como ya se mencionó en el CCR se ha descrito que mutaciones en *apc* son eventos muy poco frecuentes (Suzuki y cols., 1997), lo que llevó a sugerir que el incremento en los niveles de β -catenina en este cáncer se da independiente de APC. No obstante, en 1999 Pécina y colaboradores, demostraron que en el 36% de tumores de CCR humano estudiados no se detectó la proteína APC y en 2004 este mismo grupo encontró que en el 37% de los casos de CCR se presentó heterocigocidad en *apc*, sugiriendo que estas alteraciones podrían ser parte de los mecanismos que llevan al desarrollo de CCR (Pécina y cols., 1999; Pécina y cols., 2004). De hecho, se sabe que ratones con pérdidas condicionales de *apc*, tienden a desarrollar CCR de forma espontánea, lo que se potencia por la pérdida de p53 (Sansom y cols., 2005). Esto sugiere que APC podría estar involucrados con la formación y progresión de CCR en ambas especies.

3. JUSTIFICACIÓN

El CCR es el tipo de cáncer nefrológico más común en adultos, y es generalmente asintomático por lo que el diagnóstico inicial, frecuentemente, ocurre cuando ya se ha presentado metástasis, lo que dificulta el estudio de esta neoplasia en etapas tempranas, las cuales son claves para el control de esta patología. Por lo anterior, un modelo experimental de inducción de CCR bien caracterizado podría ser útil para analizar posibles mecanismos involucrados en la carcinogénesis renal, identificar marcadores de diagnóstico oportuno y para la búsqueda de blancos preventivos y/o terapéuticos.

En nuestro laboratorio se ha logrado la inducción de CCR en ratas utilizando un protocolo de 4 meses de tratamiento con FeNTA, en el que los tumores obtenidos presentan las características histológicas del subtipo de células claras de la versión humana y no se forman neoplasias de origen hepático y/o pulmonar. De manera importante, también hemos identificado que después de 1 y/o 2 meses de tratamiento con el carcinógeno se presentan lesiones pre-neoplásicas renales y alteraciones moleculares pro-carcinogénicas. Esto nos ha llevado a proponer estos tiempos de exposición al FeNTA como etapas tempranas de la carcinogénesis renal.

Aunque se sabe que el estrés oxidante es uno de los mecanismos que participan el desarrollo tumoral inducido con FeNTA, se desconocen los eventos moleculares que podrían estar vinculados con la formación y manutención tumoral en este modelo experimental. Por esta razón, consideramos importante determinar en distintas etapas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA, el estatus de c-Jun y algunas moléculas relacionadas con su actividad, tales como las MAPKs y β -catenina, las cuales están alteradas en el CCR humano.

4. HIPÓTESIS

- En distintas etapas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA se presentarán alteraciones pro-oncogénicas en el comportamiento de c-Jun y algunas moléculas relacionadas con su actividad, modificaciones que irán evolucionando conforme avance el proceso neoplásico, y que no se presentarán en otros tejidos como hígado y/o pulmón.

5. OBJETIVOS

- **OBJETIVO GENERAL:**

- Caracterizar en etapas tempranas de la carcinogénesis renal y en tumores inducidos con FeNTA el comportamiento de c-Jun y algunas moléculas relacionadas con su actividad.

- **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Analizar en distintas etapas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA el estatus de:
 - ✓ c-Jun, p-c-Jun, actividad de AP-1 y de su reclutamiento al promotor de algunos de sus genes blanco, como serían el de la ciclina D1 y el de la metaloproteinasas de matriz 9 (MMP9).
 - ✓ Las formas totales y fosforiladas de las MAPKs JNK1/2, p38 α/β , p38 γ y ERK1/2.
 - ✓ β -catenina, su interacción con c-Jun y de algunas moléculas relacionadas con su regulación.
- Determinar si el comportamiento de p-c-Jun, ciclina D1, MAPKs y β -catenina observado en riñón se presenta en otros tejidos, en los que nos se desarrollan tumores primarios con el esquema de tratamiento utilizado, tales como hígado y pulmón de ratas tratadas durante 1 y 2 meses con FeNTA.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

En las Figuras 5 y 6 se presenta de manera general el diseño experimental que se siguió, el cual se eligió con base en la literatura (Toyokuni y cols., 1994; Liu y cols., 2007; Eybl y cols., 2008) y en observaciones en nuestro laboratorio (Dávalos-Salas, 2006; Torres-Martínez, 2007; Cruz-White, 2007; Vargas-Olvera, 2009). Para llevar a cabo los protocolos de 1 ó 2 meses de tratamiento, así como el de inducción de CCR se utilizaron 70 ratas Wistar macho con un peso inicial de 60-90 g y se agruparon de la manera en que se describe en las Tablas 1 y 2.

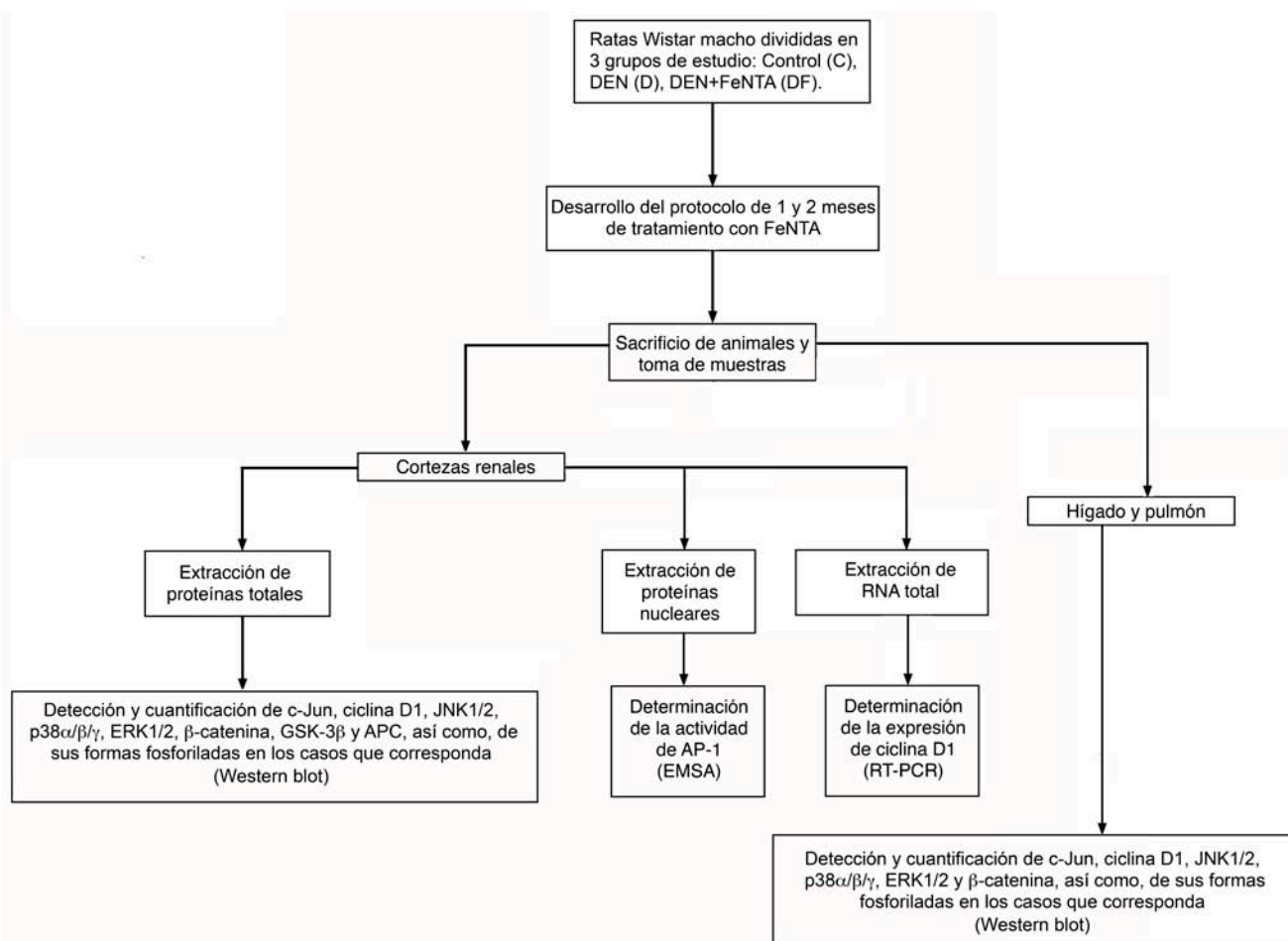


Figura 5. Resumen del diseño experimental para el análisis del estatus de c-Jun y moléculas relacionadas con su actividad en etapas tempranas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA

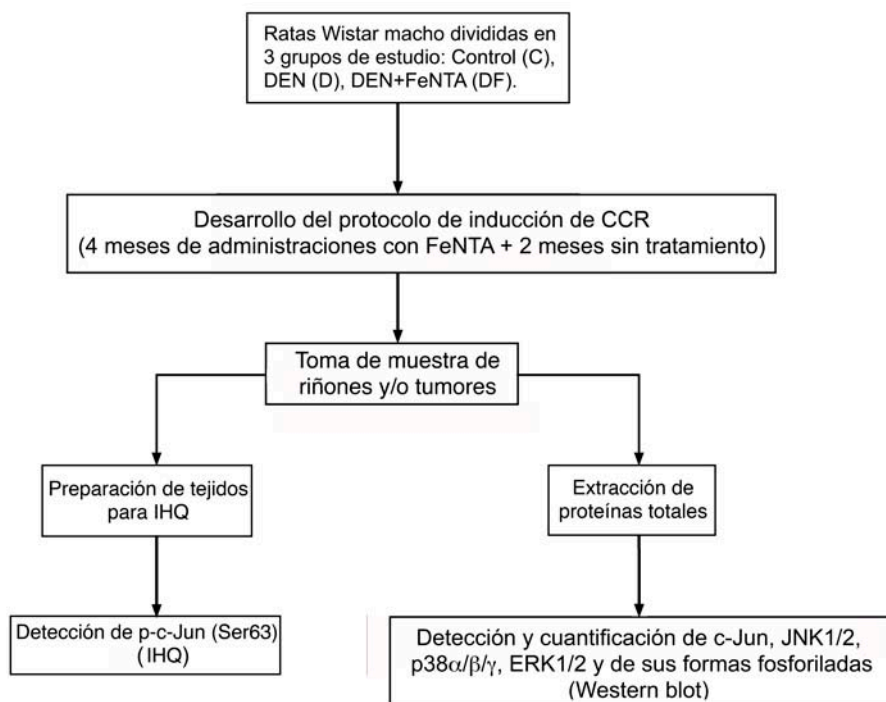


Figura 6. Resumen del diseño experimental para el análisis del estatus de c-Jun y moléculas relacionadas con su actividad en los tumores inducidos con FeNTA

Tabla 1. Esquema de distribución de animales y tratamiento de los diferentes grupos estudiados

Grupo	No. de Animales		Esquema de tratamiento
	1 ó 2 meses	Inducción de CCR	
Control (C)	4	6	Vehículos
DEN	6	NA	Administración i.p. única de DEN (200 mg/Kg) 15 días antes del inicio del estudio
DEN + FeNTA (DF)	7	30	Administración i.p. única de DEN (200 mg/Kg) 15 días antes de la primera administración de FeNTA + Administración i.p de FeNTA 2 veces a la semana durante uno, dos ó cuatro meses respectivamente. Durante el primer mes las administraciones se dieron con incrementos graduales en la dosis cada semana (3, 5, 7 y 9 mg _{Fe} /Kg) *Para el caso del protocolo de 2 meses de tratamiento y para la inducción de tumores con FeNTA: se prosigue con 2 administraciones semanales de FeNTA con dosis de 9 mg _{Fe} /Kg durante 1 mes más.

i.p.: Intraperitoneal; DEN: 2,4-N,N-Dietilnitrosmina; FeNTA: Nitrilotriacetato de hierro

6.1.1 Preparación y administración de DEN

El DEN se obtuvo de Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis MO, EUA) y a los grupos correspondientes se les administró una sola ocasión, por vía intraperitoneal, una dosis de $200 \text{ mg}_{\text{DEN}}/\text{Kg}_{\text{PC}}$, la cual se seleccionó con base en la literatura y observaciones de nuestro laboratorio (Kahn y cols., 2005). La administración se llevó a cabo diluyendo el contenido del vial (1 mL de 990-999 $\text{mg}_{\text{DEN}}/\text{mL}$) en 11 mL de solución salina y se ajustó el volumen a administrar dependiendo del peso de cada animal.

6.1.2 Preparación y administración de FeNTA

El FeNTA se preparó siguiendo el método de Awai (1986) con ligeras modificaciones. Se preparó una solución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ [Sigma Aldrich, inc. (St. Louis MO, EUA)] 160 mM y una solución de nitrilotriacetato de sodio [Sigma Aldrich, inc. (St. Louis MO, EUA)] 320 mM, utilizando en ambos casos una solución de Na_2HCO_3 120 mM como disolvente. Se mezcló un volumen de la solución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ con 2 volúmenes de la solución de nitrilotriacetato de sodio. En agitación constante se ajustó el pH con Na_2HCO_3 hasta llegar a 7.4. Esta solución tiene una concentración final de hierro de $2.98 \text{ mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}$.

La administración de FeNTA se realizó dos veces por semana durante 1, 2 ó 4 meses, por vía intraperitoneal. Durante el primer mes las dosis de FeNTA se aplicaron con incrementos graduales de 3, 5, 7 y $9 \text{ mg}_{\text{Fe}}/\text{Kg}_{\text{PC}}$ cada semana, posteriormente se mantuvo en $9 \text{ mg}_{\text{Fe}}/\text{Kg}_{\text{rata}}$ hasta el final del protocolo respectivo. El volumen de solución de FeNTA se basó en la cantidad de hierro contenido en la solución y no la del complejo FeNTA. Es decir, si se deseaba administrar una dosis de $9 \text{ mg}_{\text{Fe}}/\text{Kg}_{\text{rata}}$ a una rata de 250 g: $(1 \text{ mL solución de FeNTA}/2.98 \text{ mg}_{\text{Fe}}) (9 \text{ mg}_{\text{Fe}}/\text{Kg}_{\text{rata}}) = (3.02 \text{ mL de solución de FeNTA}/\text{Kg}) * (0.25 \text{ Kg}_{\text{rata}}) = 755 \text{ }\mu\text{L de solución de FeNTA}$.

6.1.3 Sacrificio y toma de muestras

Para el estudio de etapas tempranas de la carcinogénesis, 48 h después de la última administración de FeNTA se sacrificaron por decapitación 4, 6 y 6 animales de los grupos C, D y DF, respectivamente. Se obtuvieron los 2 riñones y se separó la corteza de la médula, también se recolectaron muestras de hígado y pulmón, todos los tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta el día de su análisis.

Para el estudio de inducción de CCR, 2 meses después de la última administración de FeNTA, 3 y 8 animales de los grupos C y DF correspondientemente se sacrificaron por decapitación, y los riñones se procesaron como se describió para el estudio de etapas tempranas. Por otra parte, 3 y 6 animales de los grupos C y DF respectivamente se les perfundi6 con formalina uno de los riñones, los cuales se usaron para los análisis de inmunohistoquímica (IHQ).

En la Figura 7 se resume el esquema de tratamiento seguido en el presente estudio.

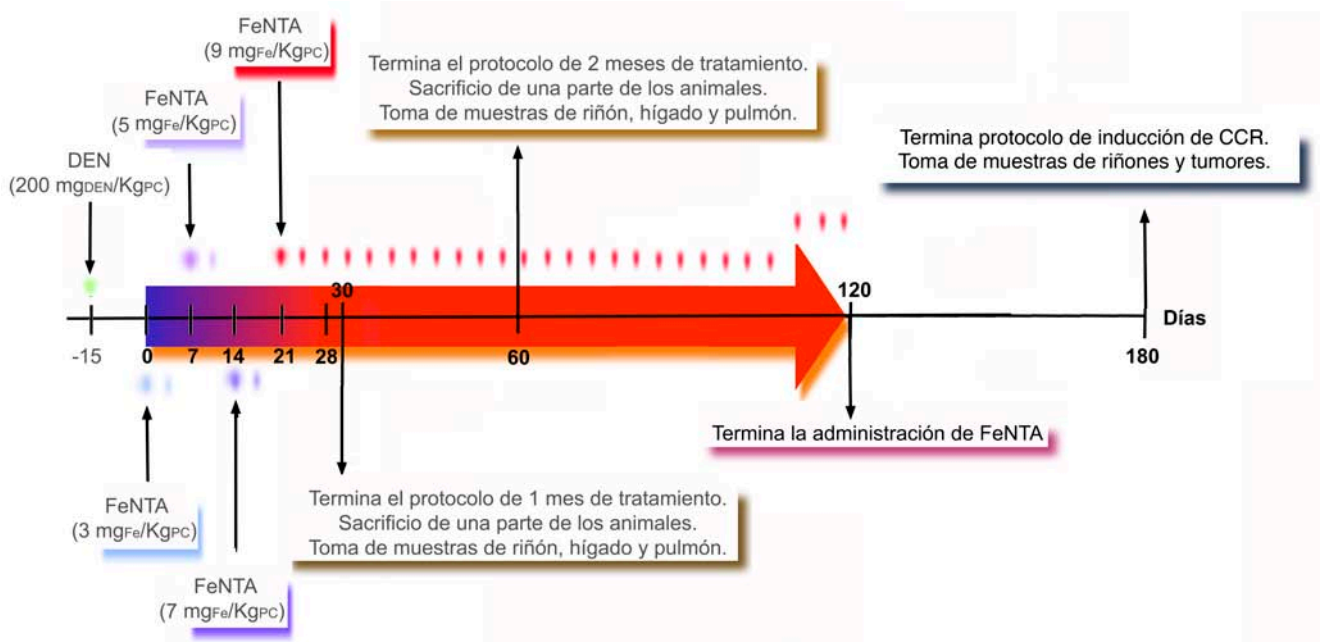


Figura 7. Esquema de desarrollo del protocolo subcr6nico a trav6s del tiempo de estudio.

6.2 M6todos

6.2.1 Inmunodetecci6n de p-c-Jun por IHQ

Los riñones perfundidos y fijados con formalina se deshidrataron, se embebieron en parafina y cortados en secciones de 0.5 μm de espesor. Los cortes histol6gicos, se desparafinaron y rehidrataron utilizando procedimientos est6ndar. La exposici6n de ant6geno inducida por calor se realiz6 en soluci6n de citrato de sodio a un pH de 6. Despu6s de este procedimiento, se utiliz6 per6xido de hidr6geno para extinguir la actividad peroxidasa end6gena. A continuaci6n se realiz6 el bloqueo con alb6mina libre de IgGs durante 30 min, para posteriormente ser incubadas con el anticuerpo anti p-c-Jun (diluido 1:50) (Santa Cruz Biotech inc, Santa Cruz, CA, USA) por una noche a 4°C.

Después de remover el anticuerpo primario y de 3 lavados con amortiguador salino de fosfatos (PBS), se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a biotina. La unión de los anticuerpos se detectó por medio del un complejo avidin-biotin-peroxidase ABC-kit Vecstatin (Vector laboratories, Orton Southgate, Peterborough, UK) usando diaminobencidina (DAB) como cromógeno [DAKO Corporation (Carpinteria, CA, USA)]. Se contrastó con la tinción con hematoxilina [DAKO Corporation (Carpinteria, CA, USA)]. Como control negativo se utilizó suero preinmune de ratón en lugar del anticuerpo primario. Los especímenes se analizaron con un microscopio de campo claro Leica 4D95 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland), en por lo menos 10 campos de cada corte histológico.

6.2.2 Niveles de expresión y fosforilación (activación) de distintas proteínas específicas por Western blot

Las cortezas renales se obtuvieron y se homogenizaron como se ha descrito anteriormente (Aguilar-Alonso, 2010), se les determinó el contenido de proteína usando un el kit comercial de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Posteriormente, los volúmenes de homogenado de corteza renal equivalente a 80 µg de proteína, a menos que otro valor sea especificado, se cargó en geles SDS-PAGE y se realizó la electroforesis como se ha detallado previamente (Aguilar-Alonso, 2010). Después de la separación de proteínas, éstas se transfirieron a una membrana de PVDF y se prepararon para la inmunodetección. Todos los anticuerpos utilizados fueron de Santa Cruz Biotech inc (Santa Cruz, CA, USA), y la detección de cada proteína se realizó tal y como se describe en el anexo 1 (11.1.1), utilizando las condiciones descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones experimentales para la detección de las proteínas estudiadas por Western Blot.

Proteína	Bloqueo	Dilución usada del anticuerpo 1 ^{ario}	Dilución Usada del anticuerpo 2 ^{ario}	Clona y # de catálogo
c-Jun	Suero fetal bovino al 10% (SFB)	1:1000	1:40000	c-Jun (D) # cat: sc-44
p-c-Jun (Ser 63)	SFB al 10%	1:1000	1:30000	p-c-Jun (KM-1) # cat: sc-822
JNK	SFB al 10 %	1:1500	1:60000	JNK 1 (K-23) # cat: sc-094

p-JNK (Thr183/Tyr 185)	Leche descremada 1%	1:1500	1:55000	p-JNK (G-7) # cat: sc-6254
p38 α/β	SFB 10%	1:1250	1:50000	p38 α/β (H-147) # cat: sc-71149
p-p38 (Thr180/Tyr 182)	SFB 10%	1:1000	1:50000	p-p38 (Thr 180/Tyr 182)-R # cat: sc-17852-R
p38 γ	Leche descremada 1%	1:1000	1:50000	p38 γ (G5F3) # cat: sc-33690
ERK	SFB al 10%	1:1500	1:40000	ERK 1 (FL) # cat: sc-571
p-ERK (Tyr 204)	SFB al 10%	1:1500	1:60000	p-ERK (E4) # cat: sc-7383
Ciclina D1	SFB al 10%	1:250	1:40000	Cyclin D1 (H-295) # cat: sc-753
β -catenina	Leche descremada 1%	1:1000	1:4000	β -catenin (H-102) # cat: sc-7199
p- β -catenina	SFB 10%	1:250	1:30000	p- β -catenin (Ser41/Thr 45) # cat: sc-101652
GSK-3 β	Leche descremada 1%	1:1500	1:40000	GSK-3 β (H-76) # cat: sc-9166
p-GSK-3 β (Ser9)	SFB 10%	1:1000	1:40000	p-GSK-3 β (Ser9)-R # cat: sc-11757-R
APC (C-terminal)	Leche descremada 1%	1:1000	1:40000	APC (C-20) #cat: sc-896
APC (N-terminal)	Leche descremada 1%	1:500	1:40000	APC (H-290) #cat: sc-7930
Tubulina	Leche descremada 1%	1:10000	1:30000	α -Tubulina (B-7) # cat: sc-5286
GAPDH	Leche descremada 1%	1:1000	1:40000	GAPDH (L-18) # cat: sc-48167

6.2.3 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) para AP-1

En los extractos nucleares obtenidos como se describe en el anexo 1 (11.2) se les determinó la actividad de unión de AP-1 a su secuencia consenso mediante el ensayo de EMSA (descrito en Aguilar-Alonso, 2010). Se utilizó la secuencia consenso de doble cadena reconocida por AP-1 cuando está conformado por c-Jun 5'-TGACTCA-3' (Efferl y cols., 2003). El oligonucleótido de doble cadena se marcó con digoxigenina y se llevó a cabo el EMSA usando el kit comercial DIG Gel Shift Kit, 2nd generation (Roche applied Science, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En los casos correspondientes se utilizaron: 2 ng de oligo marcado, un volumen de fracción nuclear correspondiente a 15 µg de proteína. Asimismo, se realizaron experimentos de súper retardo utilizando los anticuerpos anti c-Jun, p-c-Jun ó β-catenina, mismos que se utilizaron en los ensayos de Western blot.

6.2.4 Cuantificación de mRNA de la ciclina D1 (RT-PCR)

Se realizó una extracción de RNA total del tejido de cortezas renales de los protocolos de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA con TRIzol™ (Invitrogen Life Technologies, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante y a la metodología reportada por López-Ramos (2007).

La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente a 260 nm. Los volúmenes equivalentes a 1 µg de RNA se utilizaron para la reacción de RT-PCR siguiendo las instrucciones del fabricante (Titan One Tube RT-PCR Kit. Roche Applied Science, USA). El programa para la síntesis de cDNA y amplificación de los templados fue la siguiente: 1 ciclo de 55°C (30 min), 94°C (2 min) y 94°C (30s); 10 ciclos de 94°C (30s), 60°C (30s), 72°C (45s); 20 ciclos de 94°C (30s), 60°C (30s), 72°C (45s con un incremento de 5s cada ciclo); 1 ciclo de 94°C (30s), 60°C (30s), 72°C (7 min). Con este protocolo se determinó semicuantitativamente la cantidad de mRNA de la ciclina D1 y de GAPDH, este último utilizado como control de carga.

Las sondas utilizadas para la PCR fueron:

Ciclina D1 (Hur, 2000; Uto y cols., 2001; Cai y cols., 2006):

F: 5'-TGGAGCCCCTGAAGAAGAG-3'

R: 5'-AAGTGCGTTGTGCGGTAGC-3'

GAPDH (Cai y cols., 2006):

F: 5'-GGCTGAGAATGGGAAGCTGGTCAT-3'

R: 5'-CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA-3'

Los oligo utilizados se encuentran en una concentración de 5 mM.

6.2.5 Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Se realizó el entrecruzamiento de la interacción proteína/DNA con formaldehído al 2%. Se obtuvieron núcleos, los cuales se lisaron con amortiguador NLB (Anexo 1). La fragmentación de DNA se llevó a cabo con 18 pulsos de sonicación de 30s, con descansos de 1:30 min entre cada pulso, para que la mayoría de los fragmentos de DNA se encontraran entre 200 y 400 pb. Posteriormente, estos fragmentos de cromatina se utilizaron para llevar a cabo la inmunoprecipitación contra c-Jun. Los inmunoprecipitados se lavaron 2 veces con amortiguador bajo salino (BBS) (Anexo 1), una vez mas con amortiguador alto salino (BAS) (Anexo 1) y posteriormente un lavado con buffer de lavado de complejo inmune (BLCI) (Anexo 1). Posteriormente los inmunoprecipitados fueron colocados en 200 µL de solución de elución (Anexo 1) con 2 µL de RNAsa (20 ng/µL), se incubó durante 1 h a 37°C, posteriormente se agregaron 2 µL de proteinasa K y se incubó durante toda la noche a 45°C, en este paso también se logra la ruptura del entrecruzamiento de proteína/DNA. La purificación del DNA se realizó siguiendo el protocolo de extracción fenol/cloroformo/alcohol isoamílico desglosado en el anexo 1. Los productos de purificación de DNA se les determinó la concentración de ácidos nucleicos a 260 nm, y se les ajustó la concentración de DNA a 60 ng/µL. Un equivalente de 60 ng de DNA se usó como templado para las reacciones de PCR, realizadas para determinar si en estos fragmentos de cromatina inmunoprecipitada contra c-Jun se encontraba presente la región del promotor de la ciclina D1 (-10 a -245), en la cual se encuentran dos regiones de reconocimiento de AP-1 (Liu y cols., 2010). De igual forma, se realizó la PCR para detectar la región del promotor de la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9) (-557 a -247) que posee un sitio de reconocimiento de AP-1 (Wu y cols., 2009), esta se utilizó como control positivo, ya que el *mmp9* es un gen que se induce su expresión al activarse c-Jun.

Los oligos utilizados para las PCR fueron los siguientes:

Promotor ciclina D1 (-10 a -245) (Liu y cols., 2010):

F: 5'-CGCTCTTTCCCAGCTTAGA-3'

R: 5'-CAACTTCAACAAAACCTCCCCT-3'

Promotor MMP9 (-547 a -247) (Wu y cols., 2009):

F: 5'-AGAGCCTGCTCCCAGAGGG-3'

R: 5'GCCAAGGTCAGGCAGGAGGGG-3'

6.2.6 Co-Immunoprecipitación

Alícuotas de 30 μ L del conjugado proteína A-agarosa (Roche Applied Science, USA) se bloquearon con una solución al 3% de albúmina sérica bovina (ABS), durante 30 hrs. Los volúmenes equivalente a 200 μ g de proteína fueron "preaclarados" incubándose con 30 μ L de proteína A-agarosa durante 2 h (Fracción 1). A la par de lo anterior, se colocaron 0.5 μ g del anticuerpo primario y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente (Fracción 2). Después, ambas fracciones se centrifugaron a 800 xg, 1 min y el sobrenadante de la fracción 1 se agregó a la fracción 2, se ajustó a un volumen final de 1 mL con PBS y se incubó toda la noche. Posteriormente, los inmunoprecipitados se lavaron con 500 μ L de PBS frío, desnaturalizados con el mismo amortiguador de carga descrito en el anexo 1 (sección electroforesis) a 98°C durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 800 xg, 1 min, los sobrenadantes fueron cargados en SDS-PAGE, y la identificación de las proteínas se realizó por la técnica de Western Blot.

6.3 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm error estándar. La significancia estadística se estableció por análisis de varianza (ANOVA) de una vía con el método post-ANOVA de Newman Keuls para la comparación de los grupos de un mismo protocolo. Para establecer si la significancia estadística entre los grupos de los protocolos de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA se realizaron ANOVAs de dos vías con el método de comparación múltiple de Bonferroni. En ambos casos se consideró como diferencias estadísticamente significativas si $p < 0.05$. Los análisis se realizaron utilizando el programa GraphPad Prisma Ver. 5.0.0.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las alteraciones que se han descrito en el CCR humano es el aumento en los niveles de p-c-Jun (Ser63) (Oya y cols. 2005), y aunque en los tumores renales inducidos con FeNTA se ha reportado incremento en los niveles de su mRNA (Liu y cols., 2007), se desconocía el estatus de su forma activa, por lo que en el presente trabajo se realizaron ensayos de IHQ para la detección de p-c-Jun en muestras de tejido renal del protocolo de

inducción de CCR con FeNTA. Los resultados obtenidos indican que, comparado con lo observado en muestras renales del grupo control (Fig 8A), en las zonas de displasia (Fig 8B), así como tumores de menor tamaño (Fig 8C & D), se presenta una fuerte tinción de p-c-Jun nuclear, lo que disminuye o desaparece en tumores con mayor grado de avance y/o tamaño (Fig 8E & F). Este mismo comportamiento se ha observado en adenocarcinomas de pulmón (Szabo y cols., 1996) y en muestras de CCR humano (Oya y cols. 2005), trabajos en los que se sugirió que la actividad de c-Jun podría participar en etapas tempranas del desarrollo tumoral, por lo que consideramos importante analizar el comportamiento de c-Jun y su posible papel en etapas tempranas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA. Además, cabe mencionar que coincide con lo observado por Kanellis y colaboradores (2010), donde se reportó riñones normales existen niveles bajos de p-c-Jun.

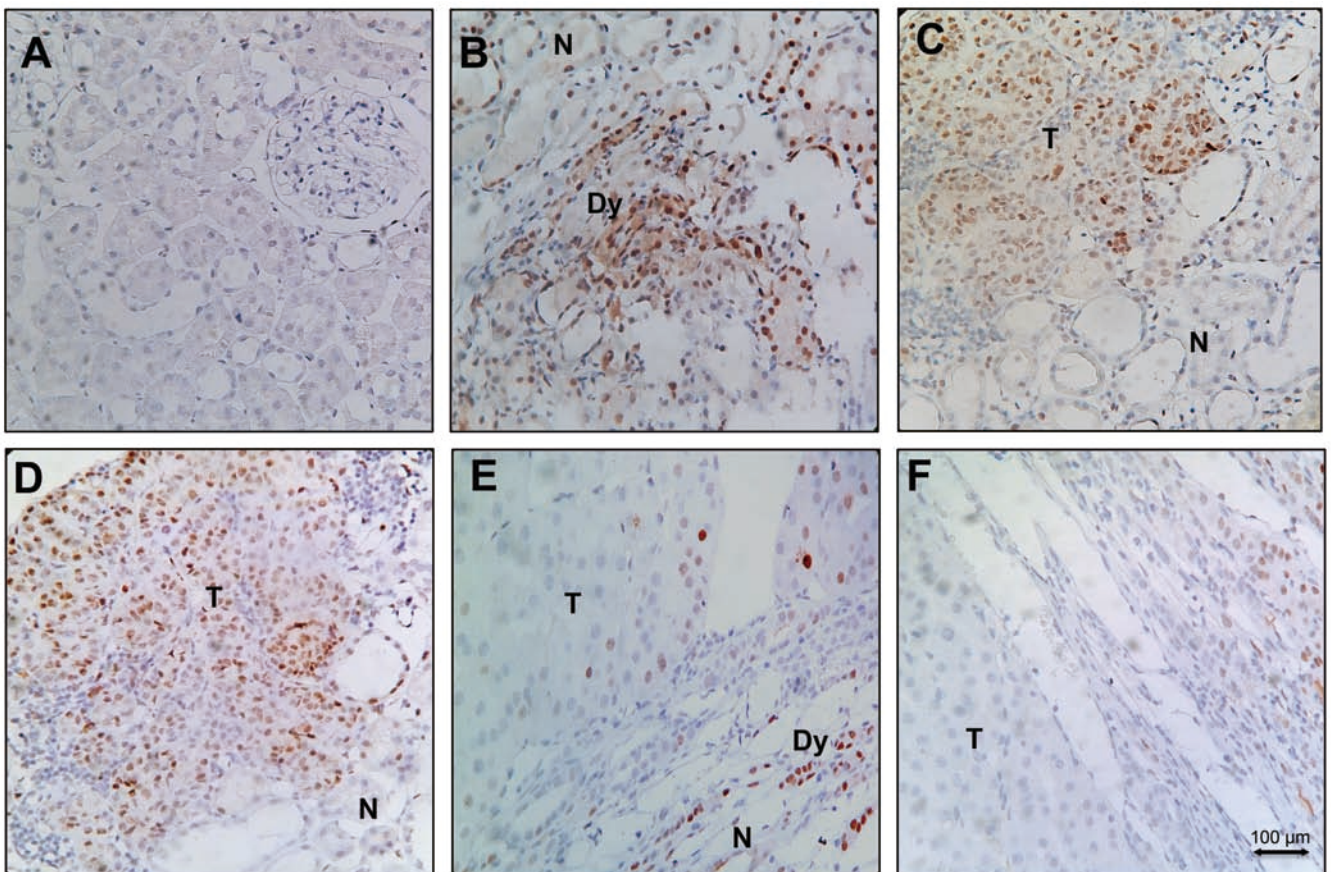


Figura 8. En áreas de displasia y tumores de menor tamaño se presenta una fuerte tinción de p-c-Jun nuclear, lo que disminuye o desaparece en tumores de mayor tamaño. Microfotografías representativas de las IHQ de: (A) Muestra del grupo control; (B) Área de displasia renal; (C-F) Muestra de tumores: (C) Tamaño 1(T1); (D) Tamaño 3 (T3); (E) Tamaño 4 (T4); (F) Tamaño 5 (T5). x400. (Dy) Displasia, (T) Tejido tumoral, N (Tejido normal).

Previamente, hemos descrito que 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA podrían representar etapas tempranas del desarrollo de CCR (Vargas-Overa y cols., 2012), por lo que se analizó, mediante Western blot, el estatus de c-Jun en tejido renal después de estos

tiempos de exposición al carcinógeno. Para estos ensayos se utilizaron 150 μg de proteína de las muestras de 1 mes, ya que con cantidades menores no se detectaba la banda correspondiente a c-Jun, en cambio, para las muestras de 2 meses de tratamiento con FeNTA la detección se logró utilizando 80 μg de proteína, esta diferencia en las cantidades de proteína utilizada puede evidenciarse en la imagen representativa para la inmunodetección de tubulina (Figura 9A panel inferior). Los resultados observados en la Figura 9 indican que el tratamiento durante 1 y 2 meses con FeNTA indujo un incremento significativo en los niveles de c-Jun y p-c-Jun, y que este aumento fue mayor a 2 meses comparado con lo que sucede a 1 mes (Figura 9B).

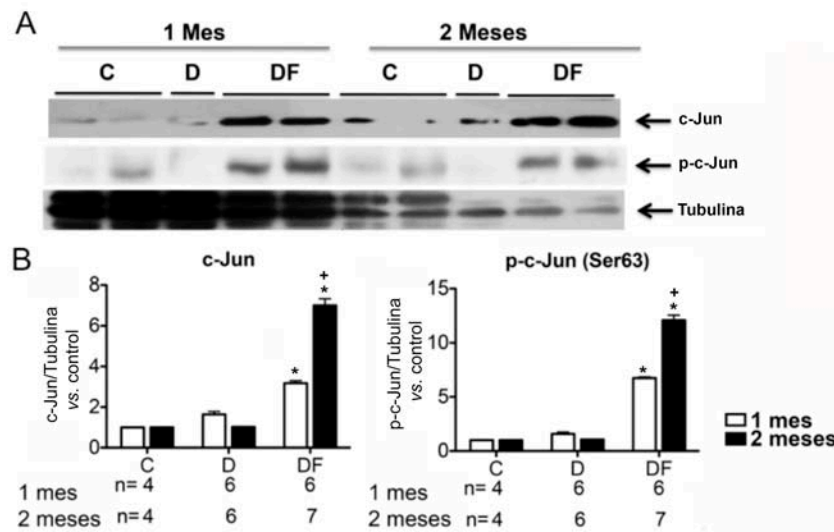


Figura 9. El tratamiento con FeNTA durante 1 y 2 meses induce un incremento en los niveles renales de proteína total y fosforilada (Ser63) de c-Jun, siendo mayor el aumento después de 2 meses. (A) Western blots representativo para la detección en corteza renal de c-Jun, p-c-Jun y α -tubulina como patrón de carga en los grupos control (C) y tratados con DEN (D) y con DEN+FeNTA (DF). (B) Histogramas obtenidos del análisis densitométrico de las radiografías ajustado contra tubulina y con respecto al grupo control. Cada barra representa la media \pm EE de n muestras. (*) $p < 0.001$ vs. Control; (+) $p < 0.05$ vs. 1 mes. Las bandas analizadas corresponden a aquellas de 37 kDa para c-Jun y p-c-Jun y de 50 kDa para aquella de Tubulina.

Para determinar si las alteraciones en c-Jun se reflejaban en la actividad de AP-1 se realizaron EMSA's, para lo que se usó un oligonucleótido que tiene la secuencia consenso de unión a DNA de AP-1 cuando éste está formado por lo menos por una molécula de c-Jun. En los carriles 1 y 10 de la Figura 10 representan los controles negativos utilizados para confirmar que la banda de retardo observada en los otros carriles realmente representara al oligo marcado unido a AP-1. El carril 1 corresponde a una muestra sin oligonucleótido y en el carril 10 se presenta la reacción de competencia con un exceso de oligonucleótido no marcado. En el carril 8 se presenta el súper retardo con el anticuerpo

anti c-Jun, en el que si bien no se observa un súper retardo, sí se genera una disminución en la intensidad de la banda, lo que nos confirma que el AP-1 detectado está formado por lo menos por una molécula de c-Jun. Mas relevante aún es que, como se observa en la figura 9, el tratamiento con DEN+FeNTA, efectivamente, induce la actividad de AP-1 y, como ocurrió en los niveles de c-Jun y p-c-Jun, este efecto es mayor a los 2 meses de tratamiento comparado con lo que sucede a 1 mes (Figura 10B). La β -catenina es una proteína que puede interaccionar con c-Jun para potenciar la actividad del factor transcripcional AP-1, por lo que se decidió realizar ensayos de súper retardo utilizando un anticuerpo anti β -catenina, con lo que también se observó una disminución en la intensidad de la banda, lo que sugiere una posible interacción entre este factor transcripcional y β -catenina. Asimismo, para descartar un probable falso positivo en los ensayos de súper retrardo se realizó un experimento similar pero utilizando un anticuerpo que reconoce GAPDH, con lo que no se detectó una disminución en la intensidad de la banda (Figura suplementaria 1, anexo 1), lo que valida las observaciones realizadas en los ensayos de súper retardo.

En conjunto, los resultados presentados refuerzan la idea de que c-Jun podría ser parte de los mecanismos de la carcinogénesis renal inducida por FeNTA, posiblemente promoviendo la expresión de proto-oncogenes como el de la ciclina D1 y el de la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9), los cuales son genes blanco de AP-1 y que su sobre expresión ha sido descrita en el CCR humano (Eferl y cols., 2003; Bhuvaramurthy y cols., 2006; Lima y cols., 2014). Para comprobar si c-Jun está siendo reclutado a la región promotora de estos genes, se realizaron ensayos de CHIP.

Primero se analizó el posible papel de c-Jun en la activación del gen de la ciclina D1. Esta última es una proteína de ciclo celular que regula la transición de G1/S y cuya sobre-expresión ha sido vinculada con la malignización celular en distintos tipos de cáncer (Tashiro y cols., 2007). El promotor del su gen posee dos sitios de unión de AP-1 en la región de -10 y -245 nt (Liu y cols., 2010). En el presente trabajo y como se observa en la Figura 11A, encontramos que el tratamiento durante 1 y 2 meses con FeNTA indujo el reclutamiento de c-Jun a esta región del promotor del gen de esta ciclina, lo que esto correlacionó con un incremento en los niveles de su mRNA a los dos tiempos estudiados (Figuras 11B). En conjunto, estas observaciones sugieren que c-Jun, como parte de AP-1, participa en la inducción de la expresión esta ciclina en etapas tempranas de la carcinogénesis renal por FeNTA.

Para confirmar si la alteración en el incremento en los niveles de mRNA de la ciclina D1 se presentaba también a nivel proteínico, se decidió realizar un análisis de Western blot. En la Figura 12 puede observarse que en los grupos DF hay un marcado incremento en los niveles proteícos de esta ciclina, efecto que fue mayor a los dos meses de tratamiento comparado con lo que sucede a un mes. Estos resultados sugieren que, probablemente, esta proteína participa también a lo largo del desarrollo del CCR inducido en el modelo experimental, lo que es reforzado por el hecho de que en los tumores inducidos con FeNTA también se ha observado un incremento en los niveles de proteína de la ciclina D1 (Liu y cols., 2007).

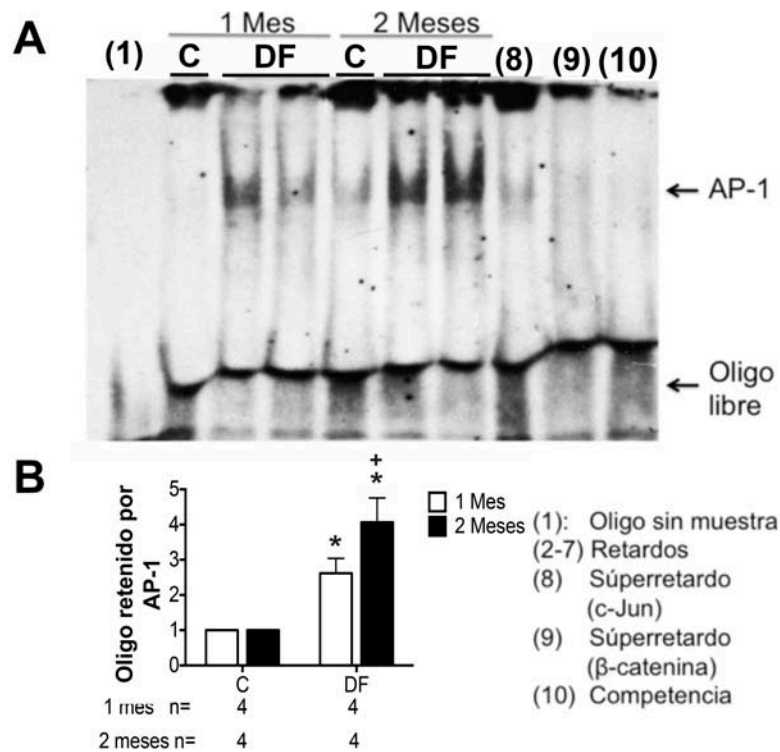


Figura 10. El tratamiento con FeNTA induce un incremento en la actividad de AP-1, siendo mayor este aumento a los 2 meses comparado con lo que sucede a 1 mes de tratamiento. (A) Imagen representativa del EMSA para AP-1. Carriles: 1) Oligo sin muestra; 2-4) muestras de tejido renal obtenidas de protocolo de 1 mes de tratamiento con FeNTA; 5-7) muestras de tejido renal del protocolo de 2 meses de tratamiento con FeNTA; 8) súper retardo (muestra del grupo DF + oligo + anticuerpo anti c-Jun); 9) súper retardo (Muestra del grupo DF + oligo + oligo frío + anti β-catenina); (10) competencia (exceso de oligo frío). (B) Histogramas obtenidos del análisis densitométrico de las radiografías de los EMSA de AP-1. Cada barra representa la media ± EE de n muestras. (*) p<0.001 vs. Control; (+) p<0.05 vs. 1 mes. URD: Unidades relativas de densitometría.

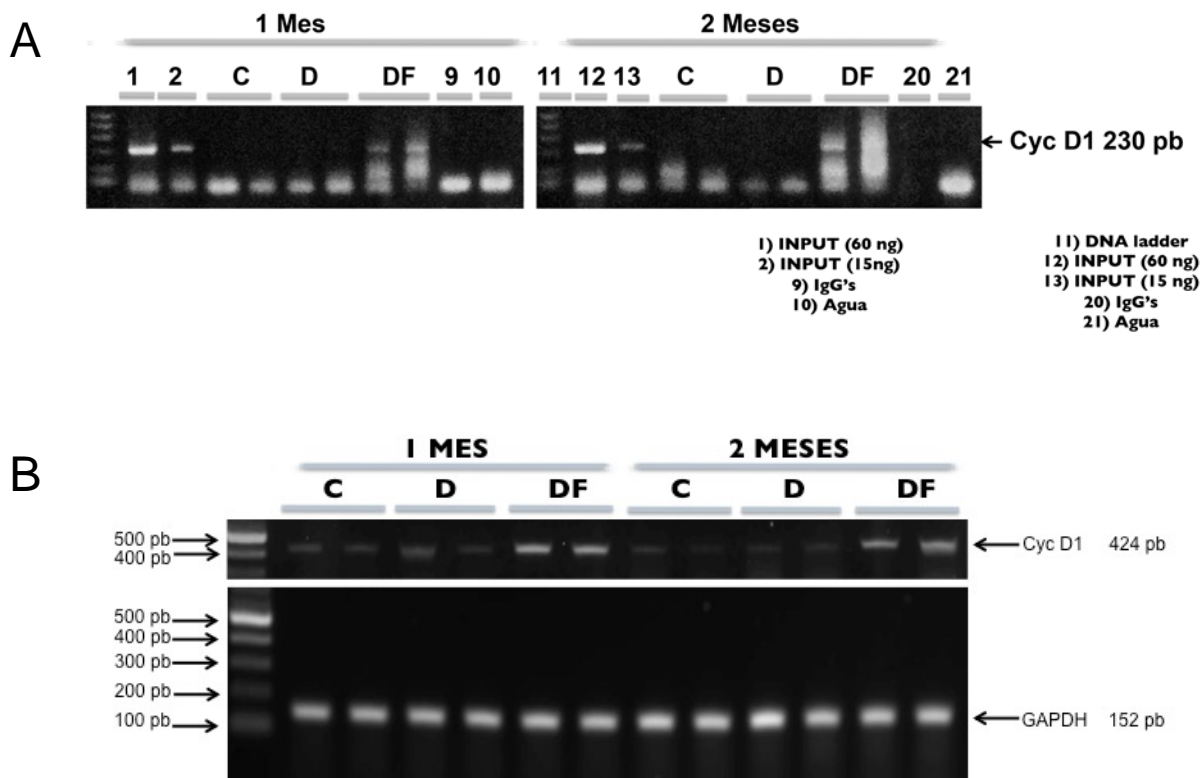


Figura 11. La actividad de c-Jun podría ser uno de los mecanismos que llevan a la inducción de la expresión del proto-oncogen ciclina D1. A) Imagen representativa de los productos de PCR de la región -10 a -245 del promotor del gen de la ciclina D1 de los ensayos de ChIP contra c-Jun. Los amplicones se corrieron y separaron en un gel de agarosa al 2.0%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. La imagen mostrada es representativa del análisis de muestras de los grupos: C (n=4), D (n=4), DF (n=6). (B) Imagen respresentativa de un gel para la detección de los productos de la RT-PCR del RNAm de la ciclina D1, así como GAPDH como patrón de carga.

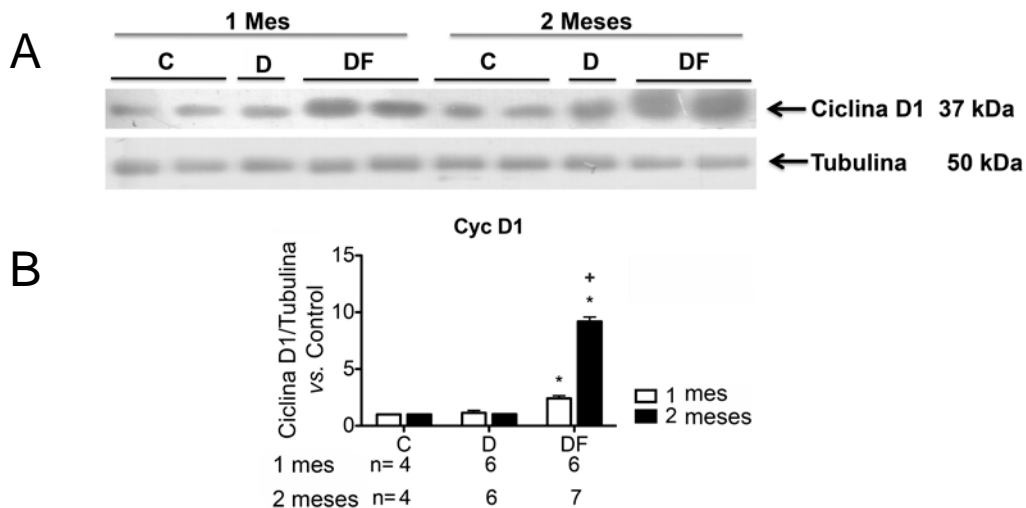


Figura 12. El tratamiento con FeNTA induce un incremento en los niveles proteicos de la ciclina D1. (A) Western blot representativo para la inmunodetección de la ciclina D1, así como α -tubulina como patrón de carga en los grupos control (C) y tratados con DEN (D) y con DEN+FeNTA (DF). (B) Histograma obtenido del análisis densitométrico de las bandas correspondientes a la ciclina D1 ajustados contra GAPDH y con respecto al grupo control. Cada barra representa la media \pm EE de n muestras. (*) $p < 0.001$ vs. Control; (+) $p < 0.05$ vs. 1 mes. La masa molecular de las proteínas analizadas corresponden a 37 y 50 kDa para la ciclina D1 y tubulina, respectivamente.

En cuanto al reclutamiento de c-Jun al promotor de la MMP9, se sabe que en la rata el promotor de este gen posee 2 sitios de reconocimiento de AP-1, de los cuales el que se encuentra en la posición entre los nucleótidos -557 y -247 es el de mayor relevancia para inducir la expresión de la MMP9 (Wu y cols., 2009). En la Figura 13 se observa que al primer mes de tratamiento con FeNTA se indujo un ligero incremento en la cantidad de c-Jun unido al promotor de *mmp9*, sin embargo, al segundo mes este efecto es notoriamente mayor. Por lo tanto, la inducción de la expresión de la MMP9 puede ser otra consecuencia del aumento en los niveles de c-Jun y la activación de AP-1 y que probablemente también participe en la carcinogenicidad renal del FeNTA; sin embargo, se requiere profundizar en el estatus tanto de los niveles y en la actividad de esta enzima para determinar su posible papel en la este modelo experimental.

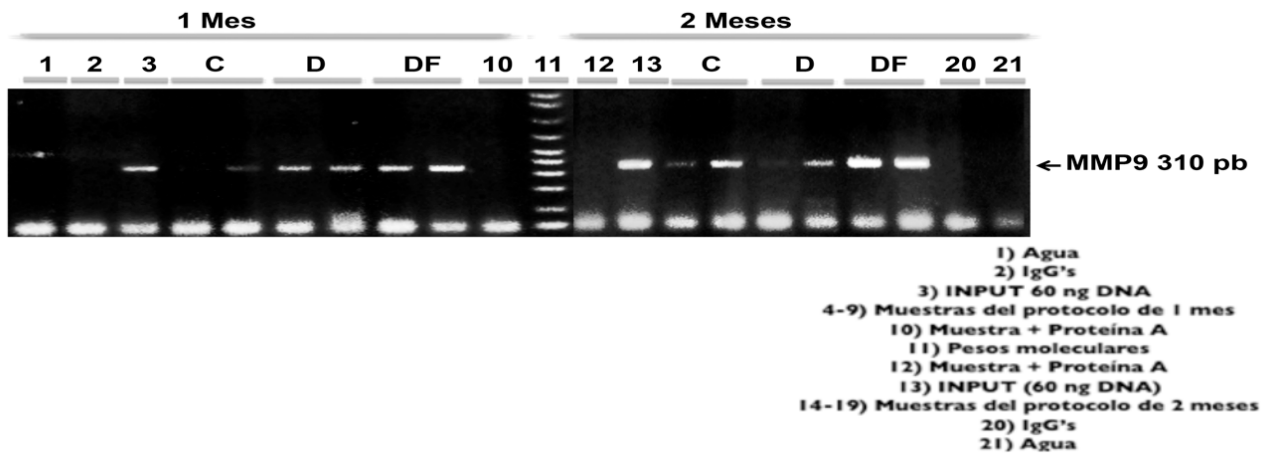


Figura 13. El tratamiento con FeNTA a 1 y 2 meses induce el reclutamiento de c-Jun a la región promotora de *mmp9*, este efecto es mayor a 2 meses comparado con lo que se observa a 1 mes. A) Los ensayos de CHIP fueron realizados usando un anticuerpo anti c-Jun. La región promotora de *mmp9* (-557 a -247) fue amplificada mediante PCR. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 2.0%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. La imagen mostrada es representativa del análisis de muestras de los grupos: C (n=4), D (n=4), DF (n=6).

En resumen, AP-1 es una familia de factores transcripcionales que pueden mediar procesos de motilidad, proliferación e inclusive apoptosis (Eferl y Wagner, 2003). Como se mencionó en la introducción, en términos generales cuando AP-1 está constituido por al menos una molécula de c-Jun, media procesos pro-oncogénicos, mientras que al estar formado por otros componentes, como JUNB, promueve la supresión tumoral; no obstante, esto es tejido específico (Kappelmann y cols., 2014). En células de CCR humano, se ha demostrado que la inhibición de AP-1, específicamente de c-Jun, lleva a una disminución en los niveles de la ciclina D1, en su tasa proliferativa y en su capacidad para desarrollar tumores al ser injertadas en ratones inmunocomprometidos (Chu y cols., 2014). Nuestros resultados muestran que la actividad de AP-1, conformado por c-Jun, es uno de los posibles mecanismos pro-oncogénicos que podrían participar en etapas tempranas del desarrollo de tumores renales inducidos con FeNTA, muy probablemente mediante la inducción de la ciclina D1 y de la MMP9. En conjunto, estas observaciones sugieren que este modelo de inducción de CCR podría utilizarse para estudiar el efecto de terapias preventivas para el desarrollo de este tipo de neoplasia que tengan como blanco a c-Jun, tales como: oligonucleótidos “señuelos”, aptámeros, poliamidas y/o péptidos que eviten la dimerización de AP-1.

Con la finalidad de extender la caracterización de posibles mecanismos moleculares asociados con la carcinogenicidad del FeNTA y que estén vinculados con la activación de c-Jun, se decidió determinar el estatus de las MAPKs.

Las JNKs son MAPKs que pueden regular tanto la activación (fosforilación), así como, la degradación de c-Jun (Karin y cols., 2005). Aunque, se ha encontrado que la desregulación de la actividad de estas cinasas participa en el desarrollo de distintos tipos de cáncer, su estatus en tumores de CCR aún se desconoce. En el presente trabajo se analizó el comportamiento de las isoformas JNK1 y 2 después de 1 y 2 meses de tratamiento, así como en los tumores inducidos con FeNTA. Nuestros resultados indican que en todos los tiempos estudiados se presentó una disminución en los niveles de proteína total de JNK2, mientras que los de su forma fosforilada se mantuvieron sin cambios después de un mes, pero se incrementaron al segundo mes de tratamiento, así como en los tumores inducidos (Figura 14 A & B), lo que parece ser mayor en el tejido tumoral comparado con la respuesta observada a los dos meses. Con respecto al comportamiento de JNK1 en etapas tempranas, los niveles tanto de proteína total como fosforilada, aumentaron más al segundo mes que al primero (Figura 14A), y en el caso de los tejidos tumorales se observó un incremento de la forma total de JKN1 (Figura 14B). El comportamiento de la forma fosforliada fue heterogéneo en los tumores estudiados, es decir, mientras algunos presentaron una disminución, otros mostraron un aumento y otros se vieron sin cambios, tal y como puede apreciarse en la imagen representativa de la Figura 14B, lo que dió como resultado que no se encontraran diferencias significativas entre los niveles de ésta fosfo-proteína en tumores con respecto al grupo control (Histograma de la figura 14B).

La respuesta de JNK2 al tratamiento con FeNTA se asemeja a la disminución reportada en los niveles de esta cinasa en displasias renales (Omori y cols., 2002), lo que sustenta la hipótesis de que esta alteración esté relacionada con el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y posiblemente la posterior la formación tumoral en este modelo de inducción de CCR. No obstante, en el mencionado trabajo de Omori y cols., no se hace distinción entre ambas isoformas de esta cinasa, lo que impide comparar el comportamiento individual de las isoformas en el modelo experimental y lo que sucede en el humano, lo cual sería muy interesante. Por otra parte, los resultados obtenidos indican que en etapas tempranas de la carcinogénesis se presenta una correlación entre el estatus de p-JNK1, pero no de p-JNK2, y c-Jun. Se ha informado que JNK1 es más eficiente para activar a c-Jun que JNK2 (Sabapathy y cols., 2004), por lo que la correlación observada sugiere a la isoforma 1 de

esta cinasa como responsable, al menos en parte, de la activación de c-Jun y la consecuente sobreexpresión de la ciclina D1, lo cual podría ser uno de los mecanismos que lleven a una proliferación descontrolada en etapas tempranas. Otro hallazgo interesante es el hecho de que la actividad de ambas isoformas parece intercambiarse en distintas etapas de la carcinogénesis, incluso en la mayoría de los tumores analizados se observó que cuando p-JNK1 está elevada, p-JNK2 disminuye y viceversa. Por lo tanto, es posible que las isoformas de JNK regulen procesos celulares distintos a lo largo del desarrollo tumoral, e inclusive su actividad específica podría estar relacionada con el estado de cada tumor, como por ejemplo, JNK1 podría participar en la inducción de procesos proliferativos, mientras que JNK2 promueva procesos relacionados con la motilidad celular, tal y como se ha sugerido en otros modelos de tumorigénesis (Hui y cols., 2008; Mitra y cols., 2011).

El papel de JNK en CCR humano es controversial, mientras algunos autores encontraron que en líneas celulares de CCR la inhibición química de esta cinasa lleva a apoptosis (Ishizawa y cols., 2004; Mizuno y cols., 2004; Ou, 2007; Takano y cols., 2010; Xu y cols., 2013; Liang y cols., 2014), en el 2013 An y colaboradores demostraron que el silenciamiento por RNAs de interferencia de JNK lleva a una disminución en los niveles de p-c-Jun con la concomitante reducción de la tasa proliferativa de células de este tipo de neoplasia (An y cols., 2007). Cabe recalcar que en ninguno de estos trabajos se analizó de forma independiente las isoformas de esta cinasa, lo que hace mas interesante los resultados obtenidos en nuestro modelo de carcinogénesis renal y vuelve relevante el hecho de estudiar el papel específico de cada una de las isoformas de esta cinasa a lo largo del desarrollo tumoral, lo que sería de relevancia para posteriormente estudiar algunos fármacos que tengan como blanco a estas JNKs, ya sea con fines preventivos y/o terapéuticos.

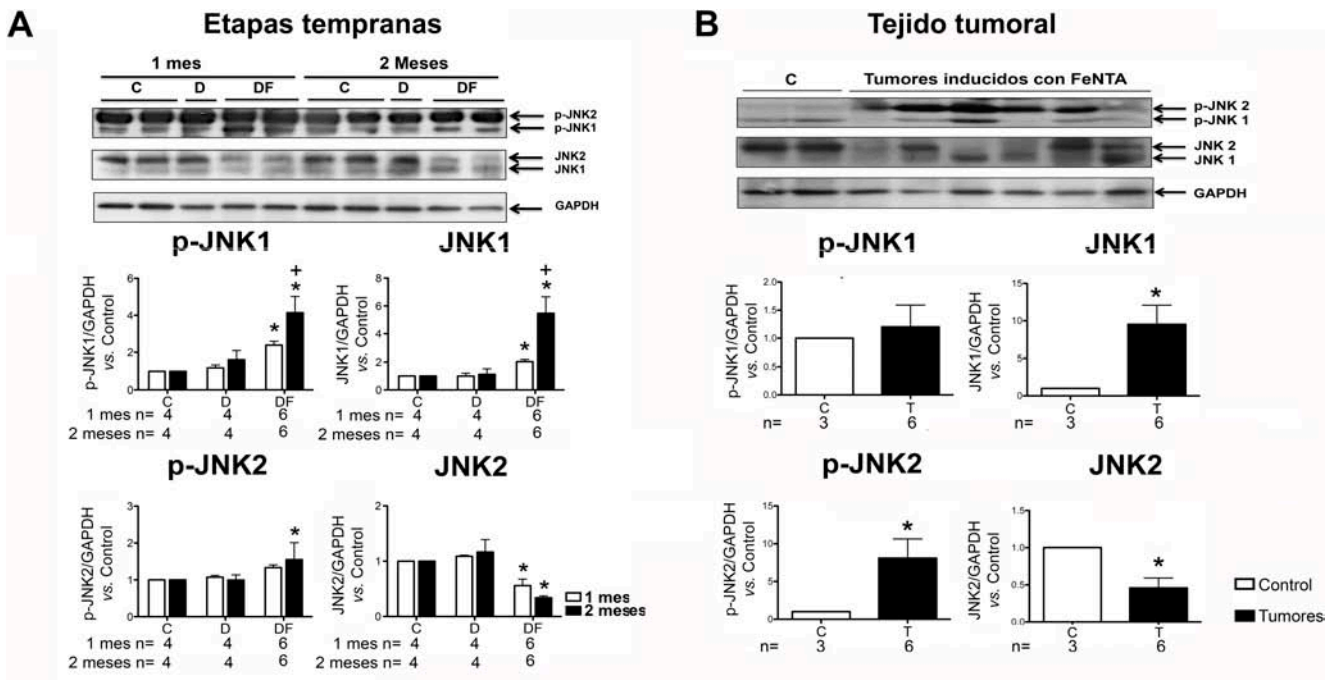


Figura 14. Comportamiento diferencia en los niveles de JNK y p-JNK en diferentes etapas del modelo experimental de carcinogénesis renal. Imágenes representativas de los ensayos de Western blots e histogramas del análisis densitométrico de JNK1/2, p-JNK1/2 y GAPDH de las muestras de (A) 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA y (B) los tumores inducidos con FeNTA. Cada barra representa la media \pm EE de n muestras. (*) $p < 0.001$ vs. Control. (+) $p < 0.001$ vs. 1 mes. La masa molecular de las proteínas analizadas corresponden a 46, 54 y 37 kDa para JNK1, JNK2 y GAPDH, respectivamente.

Otras MAPKs que pueden mediar la activación de c-Jun son las isoformas de p38 (Pramanik y cols., 2003). En relación a esta cinasa, se reportó que en líneas celulares de CCR sólo se expresan las isoformas de p38 α/β y γ (Ambrose y cols. 2006) y Ozbek y cols., (2012) encontraron que en los tumores de humano están aumentados los niveles de p38 (Ozbek y cols., 2012), sugiriendo su participación en el CCR. En el presente trabajo se encontró que el tratamiento con FeNTA induce un incremento en los niveles de proteína total y fosforilada de las isoformas p38 α/β , el cual disminuye conforme avanza el proceso carcinogénico; es decir, al primer mes el aumento es mayor que al segundo y éste es mayor que lo observado en los tumores (Figuras 15A & B). Incluso se observó una disminución en los niveles totales de p38 α/β en los tejidos tumorales (Figura 15B). Debido a que las isoformas de p38 α/β están más relacionadas con procesos de contención tumoral que con malignización celular (Hui y cols., 2007) podríamos pensar que en el primer mes de tratamiento estas cinasas son inducidas para tratar de contener la malignización celular, pero conforme el tiempo de tratamiento avanza la inducción disminuye permitiendo que los procesos pro-carcinogénicos predominen. Por otra parte, estas cinasas puede tener

también actividad oncogénica (Koul y cols., 2013) mediante la inducción del factor de crecimiento tumoral- β (TGF- β por sus siglas en inglés) y de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Koul y cols., 2013), así como la estabilización de β -catenina (Thornton y cols., 2008). De hecho, ya se ha descrito el incremento en los niveles de COX-2 y β -catenina en tumores de CCR inducidos por la exposición a FeNTA (Liu y cols., 2007; Rehman y cols., 2013), lo que indica que posiblemente p38 α/β podría tener un papel pro-oncogénico en este modelo experimental. Cabe aclarar que si bien, la elevación en los niveles de p-p38 α/β es menor en los tumores con respecto a las etapas tempranas, estas fosfo-proteínas siguen incrementadas, y esto coincide con lo reportado en el CCR humano (Ozbek y cols., 2012); sin embargo, no es posible saber si en pacientes el comportamiento de estas proteínas evoluciona de una forma similar a lo observado en el presente trabajo, lo cual es una de las grandes ventajas de este modelo experimental. Por todo lo anterior, sería relevante caracterizar el papel que juegan estas isoformas de p38 en las distintas etapas de la tumorigénesis inducida con este modelo experimental, ya que estas cinasas poseen actividad dual en distintos tipos de neoplasia (Hui y cols., 2007). Inclusive en un modelo de carcinogénesis colorectal se ha demostrado que p38 α/β tiene actividad supresora de tumores en etapas tempranas, pero actúa una oncoproteína en los tumores ya formados (Gupta y cols., 2014).

Con respecto a la isoforma p38 γ , el tratamiento con FeNTA durante 1 y 2 meses indujo un aumento significativo en sus niveles renales. Interesantemente, en este caso el grado de la alteración se exagera conforme avanza la carcinogénesis renal (Figura 15), a diferencia del comportamiento observado de las isoformas α/β . La sobreexpresión de p38 γ se ha vinculado con la malignización inducida por k-Ras, eventos que son independientes a su estado de fosforilación; y a procesos de motilidad celular, induciendo, por ejemplo, la expresión de MMP9 vía c-Jun, y con (Tang y cols., 2005; Qi y cols., 2007; Loesch y cols., 2010). Lo anterior apunta a que uno de los posibles papeles de esta isoforma de p38 en el desarrollo y mantenimiento tumoral en el presente modelo experimental podría ser la activación del gen de la MMP9 mediante la activación de c-Jun. Además, sería interesante evaluar el estatus de p38 γ en tumores de CCR humano, ya que este podría ser uno de los mecanismos relacionados con su alta capacidad metastática.

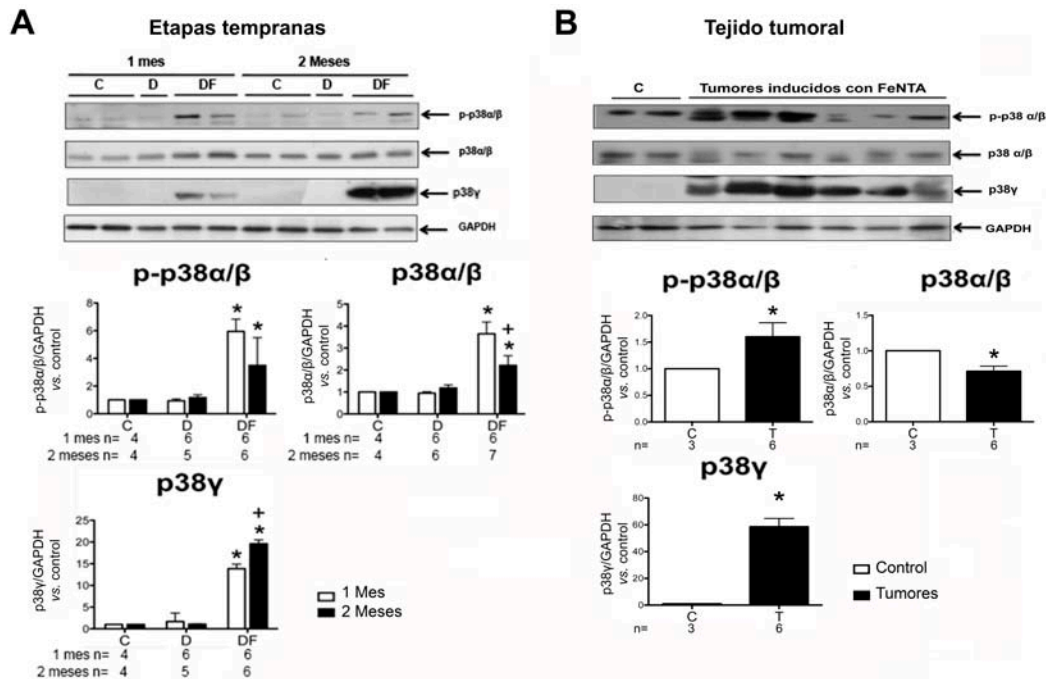


Figura 15. A 1 mes de tratamiento con FeNTA se induce un marcado incremento en los niveles de p38α/β y p- p38α/β, este incremento es menor a los dos meses, y aún menor en los tumores, donde inclusive se encontró una disminución en los niveles de p38α /β total; el tratamiento con FeNTA también indujo un incremento en los niveles de p38γ, pero en este caso el grado de la alteración se incrementó conforme avanzó el proceso carcinogénico. Imágenes representativas de los ensayos de Western blots e histogramas del análisis densitométrico de p38α/β, p- p38α/β, p38γ y GAPDH de las muestras de (A) 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA y (B) los tumores inducidos con FeNTA. Cada barra representa la media ± EE de n muestras. (*) p<0.001 vs. Control. (+) p<0.001 vs. 1 mes. URD: Unidades relativas de densitometría (p38α/β, p- p38α/β ó p38γ /GAPDH vs. Control). La masa molecular de las proteínas analizadas corresponden a 38, 49 y 37 kDa para p38α/β, p38γ y GAPDH, respectivamente.

Otras de las MAPKs que pueden inducir la activación del factor de transcripción AP-1 son las ERK1 y 2 (Roskoski y cols., 2012). El incremento en los niveles de las formas activas (fosforiladas) de estas cinasas fue de las primeras alteraciones descritas como comunes en los tumores de CCR humano (Oka y cols., 1995) y en los inducidos usando modelos experimentales en roedores (Yoon y cols., 2002; Marin y cols., 2007). Sin embargo, el estatus de estas proteínas era desconocido en el modelo de CCR inducido con FeNTA.

En la Figura 15 puede observarse que en todas las etapas de la carcinogénesis renal analizadas se indujo un aumento en los niveles totales de ERK1 y en los de fosforilación de ambas isoformas de ERK. Por su parte, los niveles totales de EKR2 no presentaron cambios en los tiempos estudiados (Figura 16). La actividad de estas cinasas se ha sugerido como un evento importante para la proliferación celular durante el desarrollo y la reparación renal (Omori y cols., 2000; Vaidya, 2003), por lo que es posible que esta cinasa

inicialmente podría participar en eventos para la reparación del daño renal generado por FeNTA, no obstante, la continua exposición a este carcinógeno provoca su activación constante, conllevando a un estado de proliferación persistente, posiblemente inducido por la activación de AP-1 y posteriormente la inducción de la cilina D1. Otro hallazgo importante es que el incremento en los niveles de p-ERK 1 y 2 es similar a lo que sucede en el humano y en otros modelos animales de inducción de CCR, por lo que probablemente la actividad de estas proteínas podría ser un factor importante para el desarrollo y mantenimiento tumoral de CCR en diversos modelos y especies.

En nuestro laboratorio mostramos que el tratamiento con FeNTA durante 1 y 2 meses induce un incremento en los niveles del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR por sus siglas en inglés) (Pariente-Pérez, 2012), lo que apunta a esta proteína podría ser uno de los mecanismos río arriba de la sobreactivación de ERK en este modelo de inducción de CCR.

Integrando los resultados obtenidos del comportamiento de las MAPKs ERK1/2 y las p38 α/β durante el desarrollo de CCR inducido con FeNTA, encontramos que a un mes de tratamiento con FeNTA existe una fuerte activación de p38 α/β y ERK combinatoria que, durante la reparación renal, se ha sugerido como importante para la transición epitelio-mesenquimal (EMT por sus siglas en inglés) (Awazu, 2002; Omori, 2002; Omori, 2006; Omori, 2008), proceso que se ha propuesto como un evento temprano en la malignización celular (Puisieux y cols., 2014). Por otra parte, en el presente trabajo también se muestra que conforme se avanza en la carcinogénesis renal el incremento en los niveles de p-p38 α/β disminuye, mientras que los niveles de p-ERK se mantienen. Lo anterior cobra relevancia en base a las observaciones de Aguirre y cols., (2003) quienes describieron que distintos tipos de células con un bajo valor del cociente p-p38 α/β /p-ERK poseen un fenotipo más maligno que aquellas con valores mayores. En conjunto, estas observaciones apuntan a que después de 1 mes de tratamiento p38 α/β y ERK1/2 posiblemente participan en la reparación tisular por la necrosis aguda inducida por FeNTA; sin embargo, conforme el tratamiento con FeNTA continúa la cantidad de p-p38 α/β se reduce, lo que posiblemente facilita la malignización de las células renales y finalmente el desarrollo y el mantenimiento tumoral.

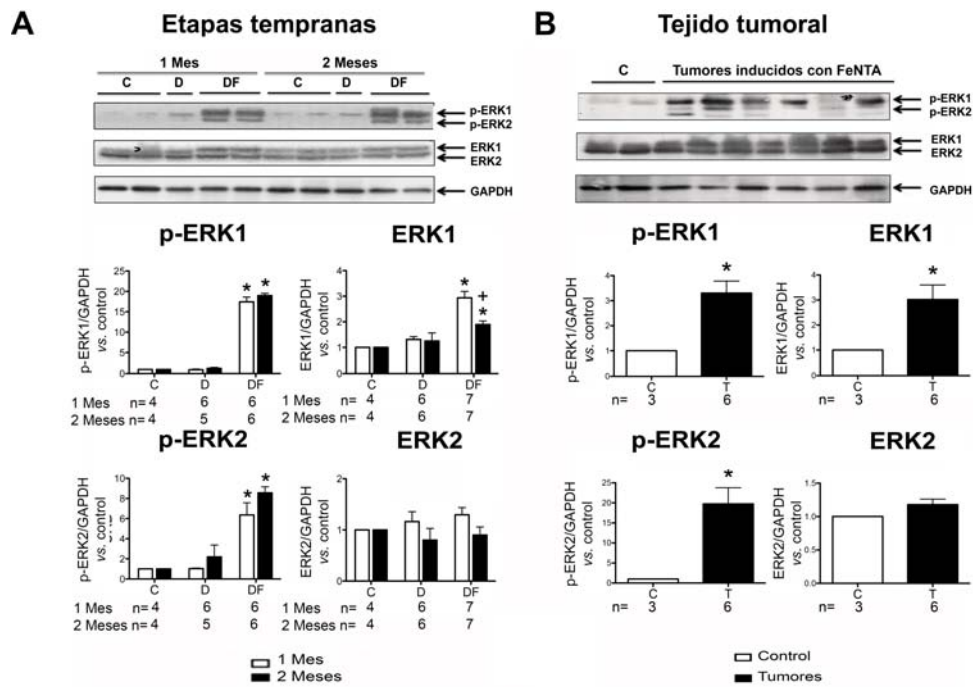


Figura 16. En todos los tiempos estudiados de la carcinogénesis inducida con FeNTA se indujo un incremento en los niveles de ERK1 total y p-ERK1/2. Imágenes representativas de los ensayos de Western blots e histogramas del análisis densitométrico de ERK1/2, p-ERK1/2 y GAPDH de las muestras de (A) 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA y (B) los tumores inducidos con FeNTA. Cada barra representa la media \pm EE de n muestras. (*) $p < 0.001$ vs. Control. (+) $p < 0.001$ vs. 1 mes. URD: Unidades relativas de densitometría (p38 α / β , p- p38 α / β ó p38 γ /GAPDH vs. Control). La masa molecular de las proteínas analizadas corresponden a 44, 42 y 37 kDa para ERK1, ERK2 y GAPDH, respectivamente.

La β -catenina es un co-activador transcripcional que regula la expresión de genes como el de la ciclina D1, y ésta es una proteína que al interactuar con AP-1 puede potenciar la actividad de dicho factor transcripcional (Saadeddin y cols., 2009). Los ensayos de súper retardo que se muestran en la Figura 10, sugieren que β -catenina se encuentra interaccionado con AP-1, lo que indica que probablemente el tratamiento con FeNTA induce la activación de β -catenina. Para profundizar acerca del comportamiento de β -catenina en este modelo experimental, se determinaron sus niveles de proteína total y fosforilada. El incremento en los niveles de esta proteína, debido a una disminución su fosforilación, es uno de los eventos que conducen a su actividad como coactivador transcripcional (Cruciat, 2014). En el presente trabajo, y como se muestra en la Figura 17, identificamos que el tratamiento durante 1 y 2 meses con FeNTA provoca un marcado incremento, de la misma magnitud en ambos tiempos, en los niveles de esta proteína comparados con aquéllos del grupo control, mientras que los niveles de su forma fosforilada disminuyeron (Figura 17). Lo anterior indica que los posibles mecanismos de acumulación de β -catenina están

relacionados con la inactivación de sus algunas cinasas, como GSK-3 β o la activación de fosfatasa, como la fosfatasa de proteínas en residuos de tirosina ζ (PTPRZ1) (Liu y cols., 2007; Cruciat, 2014).

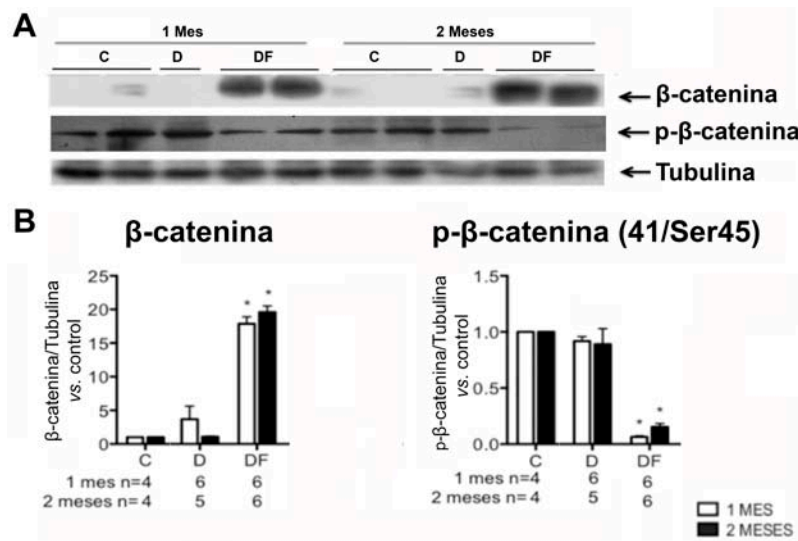


Figura 17. El tratamiento con FeNTA durante 1 y 2 meses induce un incremento en los niveles de β -catenina y una disminución en aquéllos de su forma fosforilada (Thr41/Ser45). Imágenes representativas de los ensayos de (A) Western blots e (B) histogramas del análisis densitométrico de β -catenina, p- β -catenina, y tubulina de las muestras de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA. Cada barra representa la media \pm EE de n muestras. (*) $p < 0.001$ vs. Control. (+) $p < 0.001$ vs. 1 mes. URD: Unidades relativas de densitometría (β -catenina ó p- β -catenina/tubulina vs. Control). La masa molecular de las proteínas analizadas corresponden a 92 y 50 kDa para β -catenina y tubulina, respectivamente.

Como se ha mencionado previamente una de las cinasas responsables de fosforilar a β -catenina para su posterior degradación es GSK-3 β (Cruciat, 2014). Esta es una cinasa constitutivamente activa, pero al ser fosforilada en el amino terminal (Ser 9) por Akt se inactiva, lo que conlleva, entre otros múltiples eventos, a la acumulación de β -catenina (Rayasam y cols., 2009). Como puede observarse en la Figura 18, no se presentaron cambios significativos en los niveles totales de esta proteína. Sin embargo se detectó un ligero desplazamiento en el corrimiento electroforético de esta proteína en las muestras de los grupos DF, lo que puede explicarse por la presencia de fosforilaciones. Al analizar el estatus de la forma fosforilada de GSK-3 β (Ser9) se encontró que el tratamiento con FeNTA, generó un incremento en sus niveles (Figura 18), lo que explica, al menos en parte, la disminución en los niveles de p- β -catenina y el aumento de β -catenina. Interesantemente, el comportamiento de p-GSK-3 β correlaciona con el aumento previamente reportado de p-Akt en nuestro modelo experimental (Pacheco-Bernal, 2014), sugiriendo que Akt podría estar

vinculada con la acumulación de β -catenina mediante la inactivación de GSK-3 β en estas etapas del presente modelo de carcinogénesis renal.

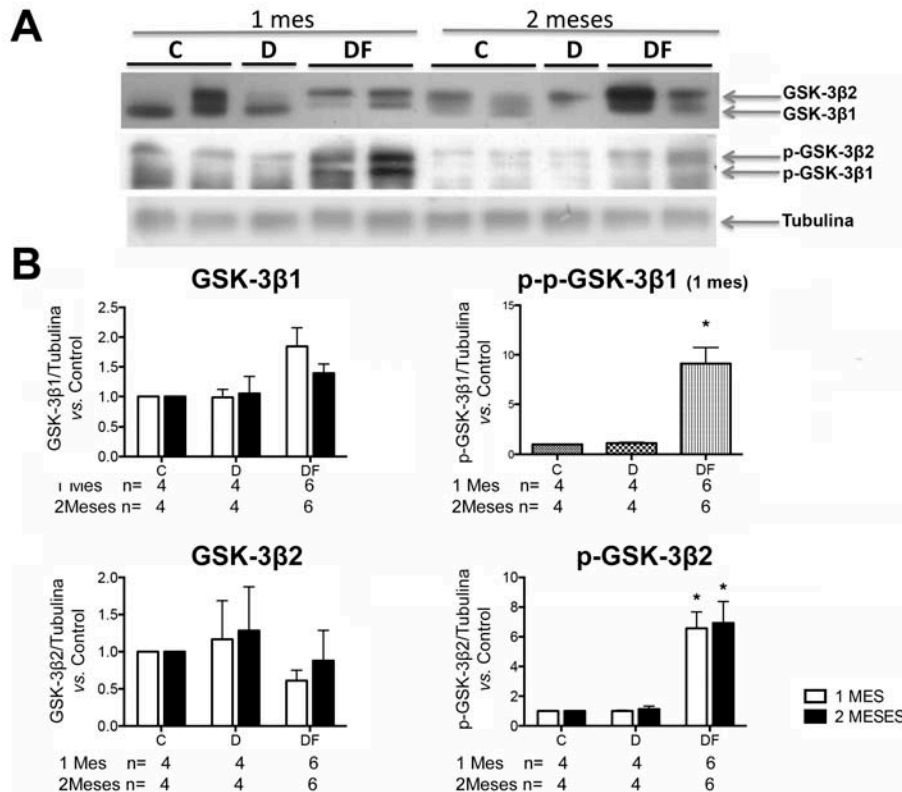


Figura 18. El tratamiento con FeNTA durante 1 y 2 meses no indujo alteraciones en los niveles de GSK-3 β , sin embargo, generó un incremento en los de p-GSK-3 β (Ser9). Imágenes representativas de los ensayos de (A) Western blots e (B) histogramas del análisis densitométrico de GSK-3 β , p-GSK-3 β y tubulina de las muestras de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA. Cada barra representa la media \pm EE de n muestras. (*) $p < 0.001$ vs. Control. (+) $p < 0.001$ vs. 1 mes. URD: Unidades relativas de densitometría (GSK-3 β ó p-GSK-3 β /tubulina vs. Control). La masa molecular de las proteínas analizadas corresponden a 47, 49 y 50 kDa para GSK-3 β 1, GSK-3 β 2 y tubulina, respectivamente.

La proteína APC es otro de los consituyentes del complejo de destrucción de β -catenina, la cual funciona como andamiaje para facilitar la fosforilación de ésta última por CKI y GSK-3 β (Näthke, 2004). En los análisis por Western blot no se detectó la proteína de 310 kDa (masa molecular de APC en rata), sin embargo, se observó una banda de 150 kDa, la que correspondería a una isoforma de APC descrita por Pyles y cols. (1998), la cual prácticamente desaparece por el tratamiento durante 1 y 2 meses con FeNTA (Figura 19). Para corroborar que esta proteína de 150 kDa fuera una isoforma de APC, se realizó la detección con otro anticuerpo que reconociera una región distinta de la proteína. Realizando la inmunodetección del amino terminal de APC identificó una banda de 150 kDa, la cual, también disminuye notoriamente en los grupos DF a ambos tiempos estudiados

(Figura suplementaria 2, anexo 1), tal y como sucedió utilizando el anticuerpo que reconocía la región carboxilo terminal de esta proteína.

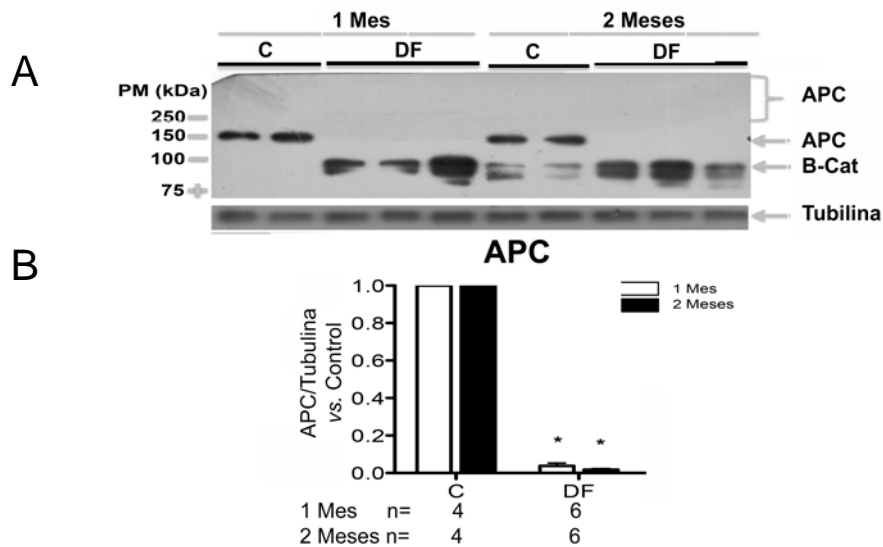


Figura 19. El tratamiento con FeNTA durante 1 y 2 meses induce una disminución en los niveles de APC de 150 kDa. Imágenes representativas de los ensayos de (A) Western blots e (B) histogramas del análisis densitométrico de APC y tubulina de las muestras de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA. Cada barra representa la media \pm EE de n muestras. (*) $p < 0.001$ vs. Control. URD: Unidades relativas de densitometría (APC/tubulina vs. Control). La masa molecular de las proteínas analizadas corresponden a 150 y 50 kDa para APC y tubulina, respectivamente.

Para determinar si el APC de 150 kDa interaccionaba con β -catenina, se decidió realizar ensayos de co-IP. Como se presenta en la figura 20A de los inmunoprecipitados contra β -catenina se logró la detección de APC sólo en las muestras del grupo control y en una del grupo DF de 1 mes con tratamiento. Cabe recalcar que esta muestra del grupo DF fue una que presentó una mayor cantidad de APC comparada con las demás de este mismo grupo, pero menor a la que presentaban las del grupo control (Figura suplementaria 3, anexo 1). Estos resultados indican que el APC de 150 kDa es capaz de interaccionar con β -catenina y que el tratamiento con FeNTA no solo provoca una disminución en los niveles de APC, sino que también en la cantidad de APC que interacciona con β -catenina, por lo que las alteraciones en APC podrían también ser eventos que participen en el incremento de ésta.



Figura 20. APC de 150 kDa interacciona con β -catenina en las muestras del grupo control. En las muestras de los grupos DF existe una menor cantidad de APC acomplejada con β -catenina. Ensayos de colP β -catenina/APC (A) Imagen representativa de los Western blots de los Inmunoprecipitados contra β -catenina. (DF s/I.P) Control (+) (Muestra DF sin inmunoprecipitar); (P.A+A.C) Control negativo: proteína A (PA) + anticuerpo; P.A+ D+F) Control negativo: PA + Muestra DF; (carriles 4-6) Inmunoprecipitados de muestras del protocolo de 1 mes de tratamiento; (Carriles 7-9) Inmunoprecipitados de muestras del protocolo de 2 meses de tratamiento. A) Blot contra APC, β -catenina, actina (usado como control negativo) y Control de IgG's. La masa molecular de las proteínas analizadas corresponden a 150, 92, 42 y 50 kDa para APC, β -catenina, actina e IgG's, respectivamente.

Interesantemente, en tumores de CCR humano se ha descrito que los niveles de APC se encuentran disminuidos en un 36% de los casos estudiados (Pecina y cols., 1999). Más aún, en ratones transgénicos cuyo promotor del gen de APC se cambió por el promotor AhCRE, condicionando su expresión a la presencia de algunos agentes xenobióticos, el silenciamiento de dicho gen lleva al desarrollo de CCR (Sansom y cols., 2005; Cole y cols., 2010), esto sugiere que APC es un supresor tumoral necesario para el mantenimiento de la homeostasis renal, por lo que posiblemente la disminución observada en los niveles de esta proteína esté vinculada también con el desarrollo de CCR inducido por FeNTA.

Por otra parte, y como otro mecanismo vinculado con la acumulación de β -catenina, Liu y colaboradores reportaron en el 2007 que desde las tres semanas de exposición al carcinógeno y en los tumores inducidos con FeNTA se presenta un aumento en los niveles de PTPRZ1, la cual es capaz de desforilar a la β -catenina (Liu y cols., 2007), permitiendo de esta forma su acumulación. En conjunto nuestros resultados y las observaciones de Liu y cols. (2007), sugieren que el tratamiento con FeNTA induce la acumulación de β -catenina mediante múltiples mecanismos, que incluyen la inactivación de GSK-3 β , la disminución en los niveles de APC y el incremento en los niveles de PTPRZ1, por lo que si se pretende el

utilizar agentes que prevengan la acumulación de β -catenina durante el desarrollo de CCR inducido con FeNTA múltiples factores se deberán tomar en cuenta.

Finalmente, para investigar si los efectos del tratamiento con FeNTA sobre las moléculas estudiadas en el presente trabajo eran específicos del riñón se estudió el estado de estas moléculas en hígado y pulmón, tejidos en los que, siguiendo el esquema de tratamiento utilizado para el presente trabajo, no se desarrollan tumores primarios (Vargas-Olvera y cols., 2012). En estos tejidos, el tratamiento con FeNTA durante 1 (Figura 21) ó 2 meses (Figura 22) no induce alteraciones en los niveles de los marcadores moleculares mencionados (Figura suplementaria 4). Estos resultados, refuerzan la hipótesis de que las alteraciones encontradas en riñón están vinculadas con el desarrollo de CCR inducido por FeNTA.

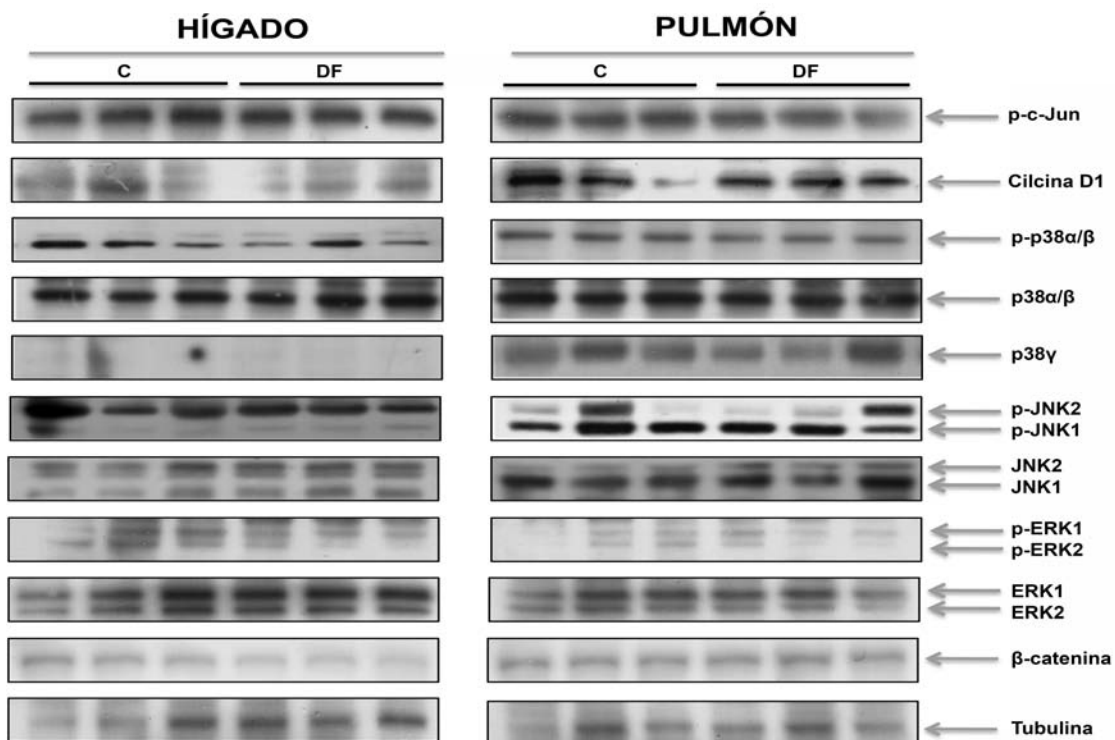


Figura 21. En tejidos hepáticos y pulmonares el tratamiento subcrónico con FeNTA durante 1 mes no induce alteraciones en los niveles de p-c-Jun, p-p38 α/β , p38 α/β , p38 γ , p-JNK1/2, JNK1/2, p-ERK1/2, ERK1/2 β -catenina, ciclina D1, p-ERK1/2, ERK1/2. Imágenes representativas de los Western blots para la detección en hígado y pulmón del protocolo de 1 mes de tratamiento con FeNTA de los marcadores moleculares mencionados.

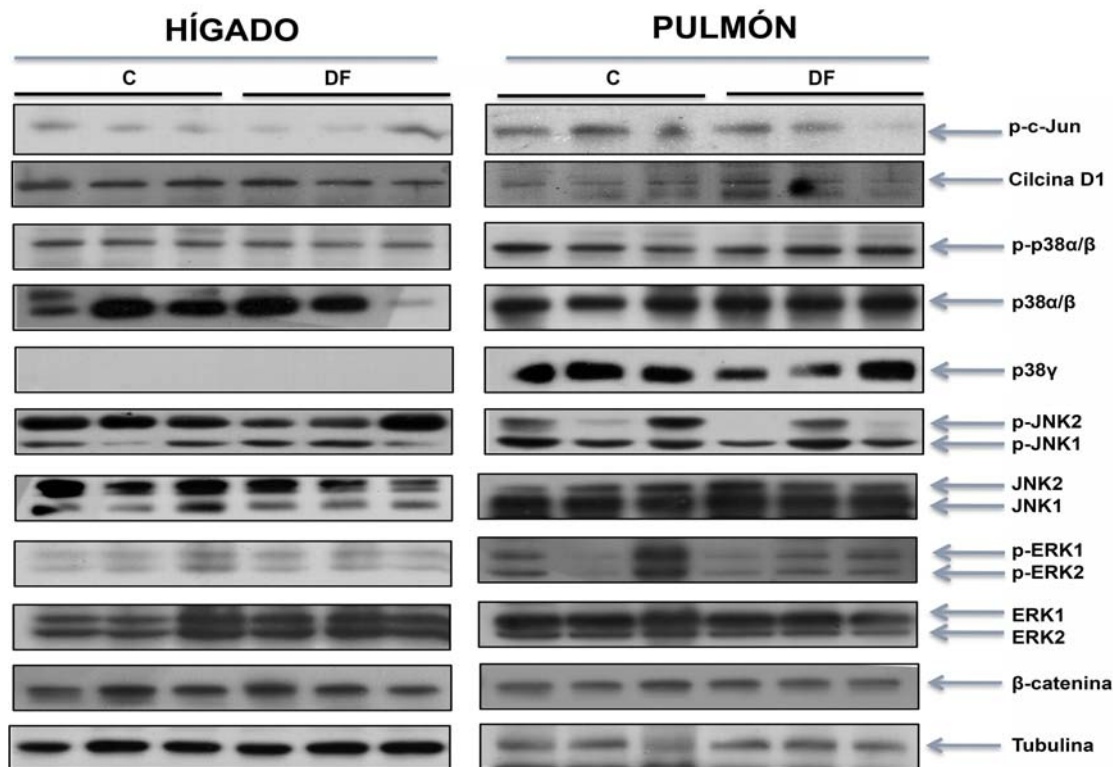


Figura 22. En tejidos hepáticos y pulmonares el tratamiento subcrónico con FeNTA durante 2 meses no induce alteraciones en los niveles de p-c-Jun, p-p38 α/β , p38 α/β , p38 γ , p-JNK1/2, JNK1/2, p-ERK1/2, ERK1/2 β -catenina, ciclina D1, p-ERK1/2, ERK1/2. Imágenes representativas de los Western blots para la detección en hígado y pulmón del protocolo de 2 meses de tratamiento con FeNTA de los marcadores moleculares mencionados.

8. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS Y LA INFORMACIÓN EXISTENTE EN LA LITERATURA

En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos en el presente trabajo y se compara con los hallazgos informados en la literatura tanto en el modelo experimental como en el CCR humano. Como puede observarse, algunas de las alteraciones descritas en el presente trabajo, como las de c-Jun, p38 α/β y p-ERK, junto a las de ciclina D1 y β -catenina por Liu y colaboradores en 2007, presentan un comportamiento similar a lo que se ha descrito en tumores de CCR humano (Zang y cols., 200; Oya y cols., 2005; Campell y cols., 2009; Lee y cols., 2009; Ronkainen y cols., 2010; Ozbek y cols., 2012; Lima y cols., 2014), esto apoya la hipótesis de que los tumores de CCR inducidos con FeNTA podrían ser la contraparte de aquéllos del humano, como fue sugerido por Vargas-Olvera y colaboradores en 2012. Por otra parte, el incremento en los niveles de ciclina D1 y β -catenina después de 1 y 2 meses de tratamiento ya se han descrito en tumores de CCR inducidos con FeNTA (Liu y cols.,

2007), sugiriendo la participación de estas moléculas durante el desarrollo tumoral en este modelo experimental. De forma importante, consideramos que este modelo de tumorigénesis podría ser utilizado para el estudio de fármacos, dirigidos contra algunas moléculas de las cascadas MAPKs/AP-1 y APC/GSK-3 β / β -catenina, para el tratamiento y/o control de este tipo de neoplasia.

Tabla 3. Comparación del estatus de algunas proteínas en tumores de CCR humano con tumores inducidos con FeNTA, así como en tejido renal de ratas expuestas a 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA. El estado de la alteración está comparado contra lo observado en riñones de sujetos normales. Los textos marcados en cursivas inducan hallazgos del presente trabajo.

Molécula	Etapas tempranas de la carcinogénesis por FeNTA	CCR inducido con FeNTA	CCR humano
c-Jun	<i>Aumento</i>	Aumento del mRNA (Liu, 2007)	Aumento (An, 2013)
p-c-Jun	<i>Aumento</i>	<i>Aumento en tumores de menor tamaño</i>	Aumento en tumores de menor tamaño y/o grado de avance (Oya, 2005)
JNK2	<i>Disminución</i>	<i>Disminución</i>	Desconocido
JNK1	<i>Aumento</i>	<i>Aumento</i>	Desconocido
p-JNK2	<i>Aumento sólo a 2 meses</i>	<i>Aumento</i>	Desconocido
p-JNK1	<i>Aumento</i>	<i>Sin cambios</i>	Desconocido
p-p38α/β	<i>Aumento</i>	<i>Aumento</i>	Aumento (Ozbek, 2012)
p38γ	<i>Aumento</i>	<i>Aumento</i>	Desconocido
ERK1	<i>Aumento</i>	<i>Aumento</i>	Desconocido
ERK2	<i>Sin cambios</i>	<i>Sin cambio</i>	Desconocido

Molécula	Etapas tempranas de la carcinogénesis por FeNTA	CCR inducido con FeNTA	CCR humano
β-catenina	<i>Aumento</i>	Aumento (Liu y cols., 2007)	Aumento (Zang, 2000; Ronkainen, 2010)
GSK-3β	<i>Sin cambios</i>	Desconocido	Desconocido
p-GSK-3β	<i>Aumento</i>	Desconocido	Desconocido
APC	<i>Disminución</i>	Desconocido	Disminuida (Pećina, 1999).

9. CONCLUSIONES

En tumores de menor tamaño existe una fuerte activación de c-Jun, lo que no sucede en aquéllos de mayor tamaño.

En etapas tempranas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA, la activación de c-Jun es uno de los mecanismos que participan en la inducción de la expresión de la ciclina D1 y posiblemente de MMP9.

El comportamiento de las MAPKs evoluciona y muestra combinatorias con un creciente potencial carcinogénico a lo largo de la carcinogénesis renal mediada por FeNTA.

El tratamiento durante 1 y 2 meses con FeNTA induce la activación de β -catenina, lo que posiblemente es debido a la inactivación de GSK-3 β y la disminución en la expresión de APC.

El estatus de c-Jun, p-p38 α/β y p-ERK1/2 en los tumores de CCR obtenidos experimentalmente es similar a lo encontrado en el humano, lo que representa una evidencia más de su equivalencia.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que las proteínas estudiadas participan en la tumorigénesis inducida con FeNTA, por lo que podrían ser utilizadas como blanco para la búsqueda de agentes preventivos y/o curativos. No obstante, aún queda por determinar el papel específico que juega cada una.

10. PERSPECTIVAS

Para continuar con la caracterización de este modelo de inducción de CCR sería interesante analizar el comportamiento de eventos río arriba y abajo de las cascadas de señalización estudiadas en este trabajo, como por ejemplo EGFR y la MMP9 respectivamente, lo cual daría información acerca de otras posibles causas y consecuencias de la activación de AP-1 en la carcinogénesis inducida con FeNTA.

Es necesario determinar los efectos de la inhibición y/o activación de las moléculas estudiadas en distintos tiempos de la carcinogénesis mediada por FeNTA, lo cual podría ayudar a elucidar el papel preciso que juegan durante el desarrollo y manutención tumoral en este modelo experimental. Lo anterior sería necesario para establecer posibles terapias que tengan como blanco una o más de estas moléculas para la prevención y/o tratamiento del CCR.

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1. Figuras suplementarias

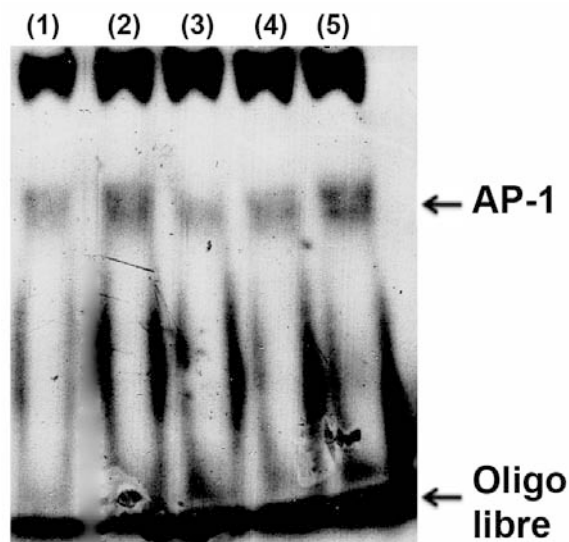


Figura suplementaria 1. Controles negativos para el súper retardo del EMSA para AP-1. Carriles (1) Exceso de oligo frío (competencia); (2) EMSA AP-1; (3) Súper retardo c-Jun; (4) Súper retardo anti β -catenina; (5) Súper retardo anti GAPDH.

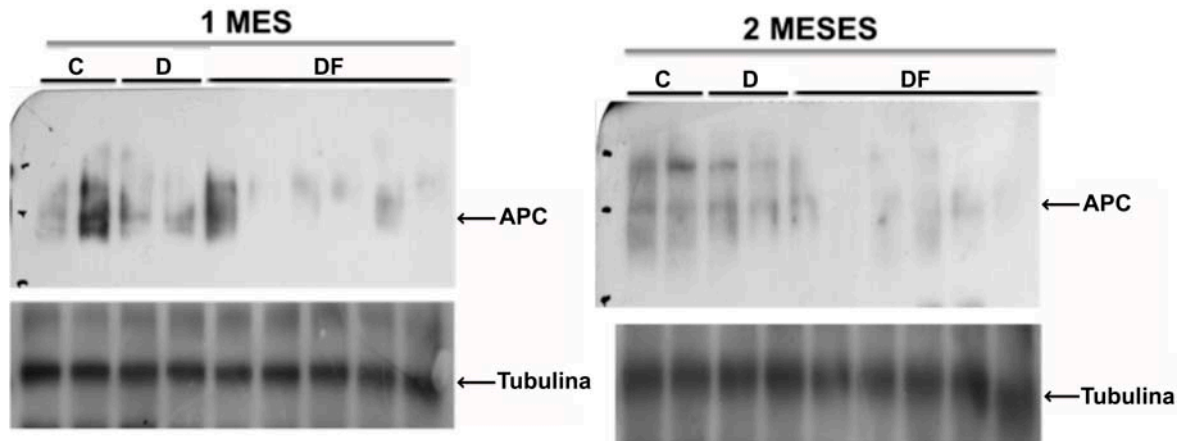


Figura suplementaria 2. Imagen representativa de los Western blots para la detección de APC en corteza renal de los protocolos de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA. Usando un anticuerpo que reconoce el amino terminal de APC, no se detectó la isoforma de APC de 300 kDa, sólo la de 150 kDa, la cual se disminuye por el tratamiento durante 1 y 2 meses con FeNTA. APC (panel superior) y α -tubulina (panel inferior) usado como patrón de carga.

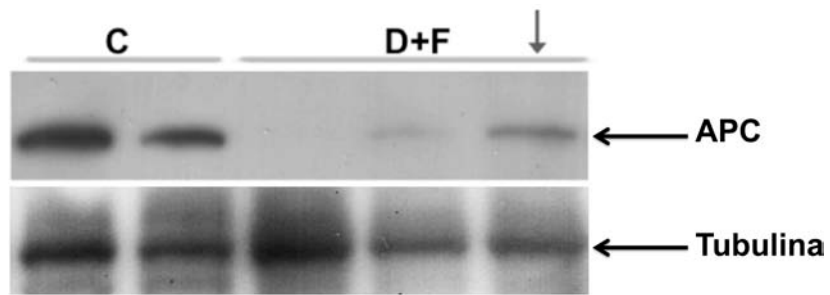


Figura suplementaria 3. El tratamiento DEN+FeNTA induce una disminución en los niveles de APC, en algunas muestras, como la marcada con la fleche vertical, los niveles de APC fueron menores que el control, pero mayores que las otras muestras muestras del grupo DF.

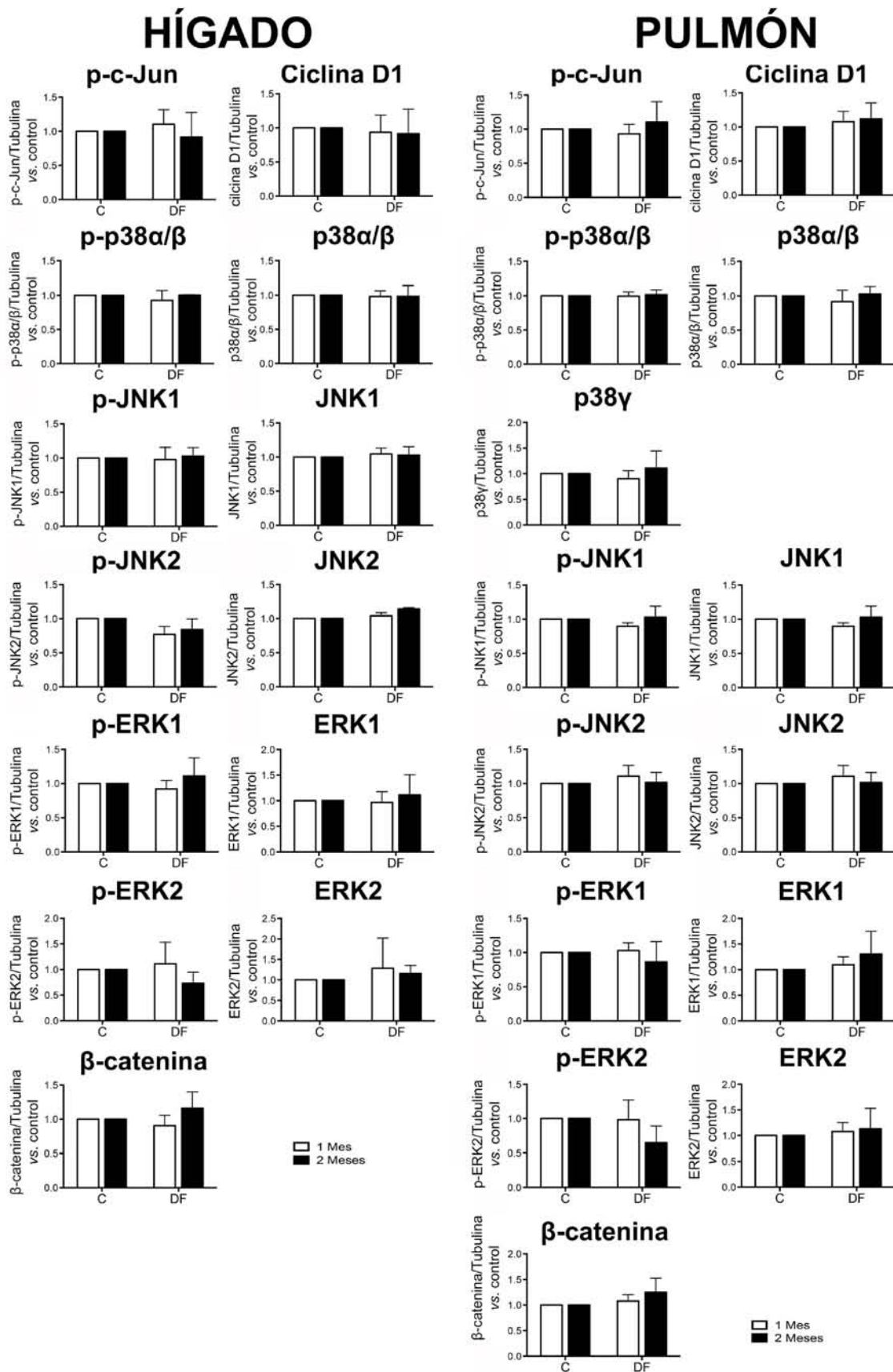


Figura suplementaria 4. Histogramas del análisis densitométrico de los western blots de algunas de moléculas representativas del presente estudio en hígado y pulmón de las muestras de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA. Cada barra representa la media \pm EE de n muestras. (*) $p > 0.001$ vs. Control.

11.2 Anexo 2. Artículo publicado

MAPKs' status at early stages of renal carcinogenesis and tumors induced by ferric nitrilotriacetate

Francisco A. Aguilar-Alonso · José D. Solano ·
Chabetty Y. Vargas-Olvera · Ignacio Pacheco-Bernal ·
Telma O. Pariente-Pérez · María Elena Ibarra-Rubio

Received: 26 November 2014 / Accepted: 23 February 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Renal cell carcinoma (RCC) is asymptomatic at early stages, and thus, initial diagnosis frequently occurs at advanced or even metastatic stages, leading to a high rate of mortality. Ferric nitrilotriacetate (FeNTA)-induced RCC model is a useful tool to analyze molecular events at different stages of the carcinogenesis process *in vivo*. MAPKs' alterations seem to play an important role in the development and maintenance of human RCC tumors. Based on the above, p38 α / β / γ , JNK1/2, and ERK1/2 statuses were studied at early stages of FeNTA-induced renal carcinogenesis (1 and 2 months of carcinogen treatment) as well as in tumor tissue. MAPKs showed distinct response along carcinogenesis process, either as total proteins and/or as their phosphorylated forms. While the increase in total and phospho-p38 α / β levels became lower as carcinogenesis progressed, p38 γ overexpression grew. Instead, total JNK2 diminished, but JNK1 was elevated at all studied times, and p-JNK1 levels increased at early stages, but not in tumors. In contrast, p-JNK2 rose at 2 months of treatment and in tumor tissue. Increased levels of p-ERK1/2 were observed at all stages analyzed. Very interestingly, at 1 and 2 months of FeNTA treatment, no alterations in MAPKs were found in liver or lung, where no primary tumors are induced with the scheme of FeNTA administration followed here. In conclusion, MAPKs' behavior evolved differentially as renal carcinogenesis advanced, even among isoforms of the same family, but it did not change in other tissues. All this

strongly suggests a role of these kinases in FeNTA-induced RCC tumor development and maintenance.

Keywords Renal cell carcinoma · Ferric nitrilotriacetate · MAPK · Carcinogenesis

Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common malignancy of the adult kidney and it is generally asymptomatic, so initial diagnosis frequently occurs when metastasis is already present [1]. Therefore, the study of early stages of this cancer becomes very difficult in patients, and hence, a well-characterized RCC experimental model may be useful to analyze possible mechanisms involved in renal carcinogenesis and to identify markers that permit an opportune diagnosis. Repeated ferric nitrilotriacetate (FeNTA) administrations lead to RCC development in rodents [2–6], and a single administration of diethylnitrosamine (DEN) prior FeNTA increases the incidence and reduces the time needed for neoplasms formation [5, 7]. We have identified FeNTA-induced RCC tumors as clear cell histological subtype, and showed that after 1 and 2 months of FeNTA treatment, some preneoplastic lesions, such as multifocal dysplasia, are already present in kidneys [7]. Likewise, other authors described some pro-carcinogenic molecular events after around 1 month of exposition to this carcinogen [8–10]. Together, these observations indicate that 1 and 2 months of FeNTA treatment may represent early stages of renal carcinogenesis [7]. On the other hand, oxidative stress plays a pivotal role in FeNTA-induced carcinogenesis [7, 11–14], and is one of the risk factors for human RCC [14–16], pointing to this imbalance as a common event in both human and chemically induced RCCs [14].

F. A. Aguilar-Alonso · J. D. Solano · C. Y. Vargas-Olvera ·
I. Pacheco-Bernal · T. O. Pariente-Pérez ·
M. E. Ibarra-Rubio (✉)
Laboratorio F-120, Departamento de Biología, Facultad de
Química, Universidad Nacional Autónoma de México,
04510 Mexico, DF, Mexico
e-mail: meir@unam.mx

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are serine/threonine kinases which regulate several biological processes such as proliferation, differentiation, and apoptosis [17]. They are activated via phosphorylation of threonine and tyrosine residues by upstream kinases (MAPK kinases, MKKs), and inactivated by dephosphorylation by their respective MAPK phosphatases (MKPs) [18, 19]. Deregulated MAPKs' activity is related to several pathologies including cancer [17]. There are three major families of MAPKs, namely p38, c-Jun N-terminal kinases (JNK), and extracellular signal-regulated kinases (ERK) [17–19]. p38 family is a group of four distinct proteins, α , β , δ , and γ [20], each one with different targets and, therefore, they regulate different cellular processes [21]. p38 α and β isoforms are suggested as tumor suppressors in some kinds of cancer [21–23], but as tumorigenic in others [23]. On the other hand, p38 γ overexpression is proposed to be an oncogenic event in k-ras-mediated transformation in different cell lines [24]. Particularly, in human RCC tumor tissue, augmented p38 and p-p38 levels positively correlate with tumor grade [25, 26]; however, specific isoforms were not distinguished in those works. Nevertheless, Ambrose et al. [27] reported that a RCC cell line expresses p38 α , β , and γ , but not δ .

With respect to JNK, there are three isoforms (1, 2, and 3), and while JNK1 and 2 are ubiquitously expressed, JNK3 expression is almost exclusive to brain cells [28]. As for p38 α/β , JNK1/2 also has been identified as tumor suppressor proteins in some cancers, but with tumorigenic activity in others [28, 29], and these opposite effects are cell-type specific [29]. Although, to date, the status of JNK in RCC tumors is unknown, it has been reported that in human RCC cell lines, activation of JNK leads to apoptosis, cell cycle arrest, or increased sensitivity to the anti-tumor agent vinblastine [30–32]. On the other hand, An et al. described that the blockade of JNK activation provokes reduced growth and motility of RCC cells in vitro and in vivo [33]. These differential results may be due to dissimilarities among the RCC cell lines studied.

Regarding to ERK, several isoforms have been described [34]. ERK1 and 2 are related to proliferative and prevention of cell death processes, and are involved in several kinds of human cancers [35]. Specifically, increased p-ERK1/2 levels is a common alteration in human RCC [35–38], and, even, Campbell et al. suggested that these kinases may be an independent prognosis factor for this malignancy [38]. Interestingly, in different models of renal cancer induction other than the FeNTA one, increased p-ERK1/2 levels have also been described at early stages of tumor development [39], as well as in tumors [39, 40]. All these observations indicate that activated ERK may play an important role in RCC development in humans and in experimental models.

Finally, Salinas et al. proposed that MAPKs might be specific therapeutic targets for the treatment of RCC [41]; however, the status of each isoform of each MAPK family in tumors is still unclear, and their precise role remains to be elucidated.

Based on the above information, in the present work, it was considered of interest to analyze MAPKs' behavior at early carcinogenesis stages and in tumors induced by FeNTA exposition.

Materials and methods

Reagents and antibodies

Chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) or J.T Baker (Mexico City, Mexico) unless otherwise indicated. Anti p38 α/β (H-147), p-p38 (Thr 180/Tyr 182)-R, p38 γ (G5F3), JNK1 (K-23), p-JNK (G-7) (Thr 183/Tyr 185), ERK1 (FL), p-ERK (E4) (Tyr 204), and GAPDH (L-18) primary antibodies as well as anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies were from Santa Cruz Biotech Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

FeNTA solution

Ferric nitrilotriacetate solution was prepared as previously described [7].

Experimental protocol

Experimental protocols were followed according to NOM-062-ZOO-1999 for the use and care of laboratory animals, and were carried out as previously described [7] as an adaptation of those from other authors [3, 5, 6]. Briefly, 56 male Wistar rats weighing 70–80 g were randomly distributed in 3 groups: 11 animals for control group (C), which were treated with vehicles; 6 rats for DEN group (D), which received a single i.p. dose of *N*-diethylnitrosamine (200 mg_{DEN}/kg_{bw}); and 39 animals for DEN+FeNTA group (DF), injected with DEN and, weekly increasing i.p. doses of FeNTA (3–9 mg_{Fe}/kg_{bw}) twice a week, maintaining a dose of 9 mg_{Fe}/kg_{bw} from 4th to 16th week. To study early stages of carcinogenesis, rats were euthanized by decapitation after 1 or 2 months of FeNTA treatment (4, 3, and 6 animals from C, D, and DF groups, respectively, at each time of study), and in both cases, sacrifice was executed 48 h after last FeNTA injection to avoid its acute effects. For the carcinogenesis protocol, only C and DF groups were included, with 3 and 18 animals, respectively, excluding D group since in previous protocols, we have observed that the scheme of DEN treatment followed does not induce renal tumors [7]. In this

case, rats were euthanized 2 months after last FeNTA injection. RCC incidence was of 67 % and mortality around 20–21 % as observed previously [7], reflecting the procol's reproducibility. Renal cortexes and/or tumors were carefully dissected, frozen in liquid nitrogen, and kept at -70°C until analysis.

Tissue homogenates and Western blot

150 mg of renal cortex or tumor tissue was homogenized using a Brinkman Polytron (PT 10/35 GT) in cold lysis buffer (1 mM DTT, 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 15 mM sodium azide, 1.0 % triton X-100, and 30 % glicerol) added with commercial protease and phosphatase inhibitors (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Homogenates were centrifuged at $19,000\times g$ for 30 min at 4°C , and supernatants were recovered. Total protein was quantified using a commercial Bradford kit (Bio-Rad Laboratories, USA). Equal protein amounts were electrophoresed on a 10 % SDS-PAGE, and transferred to an Immobilon PVDF membrane (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked with 10 % bovine fetal serum in saline phosphate buffer (PBS) and hybridized with primary antibody overnight. Then, they were washed and hybridized with the respective secondary antibody. For specific band visualization, Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) was used, and signals were recorded on X-ray films.

Densitometric and statistical analysis

Densitometric analysis was performed utilizing the ImageJ 1.49 g, program of the National Institutes of Health, USA. Relative densitometric units (RDU) were calculated by dividing the densitometric band value of the protein of interest by the GAPDH one obtained for the same sample in the same membrane, and this result, in turn, was divided by that obtained for the control group. Results were analyzed by one-way ANOVA with Newman Keuls post ANOVA test. To determine the differences between results obtained for 1 and 2 months of treatment, 2-way ANOVA with Bonferroni post ANOVA test was applied. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism ver. 5.0b for Mac OSX, GraphPad Software, San Diego California, USA, www.graphpad.com. p values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

In order to study possible alterations in MAPKs at different stages of renal FeNTA-induced carcinogenesis, their status

was analyzed in renal cortex from rats treated during 1 and 2 months with the carcinogen, as well as in the tumors obtained.

Renal MAPKs' behavior at early stages of FeNTA-induced RCC

Figure 1 shows images of representative Western blots as well as bar graphs of the densitometric analysis calculated as described in materials and methods for all MAPKs studied after 1 and 2 months of carcinogenic treatment. An increase in p-p38 α/β levels was observed, and this alteration apparently was lower at 2 months compared with 1 month of FeNTA treatment (about threefold and sixfold vs. control, respectively), although this difference did not reach statistical significance. Total p38 α/β showed the same behavior, but in this case, the rise was statistically lower at 2 months than at 1. For its part, p38 γ was also overexpressed at both times, but in contrast to p38 α/β , this effect was higher after 2 months of FeNTA treatment compared to 1 month.

With respect to JNK, augmented levels of total and phosphorylated JNK1 isoform were detected in DF group at both times studied, and these alterations were significantly higher at the second month. In the case of JNK2, 1 month of FeNTA administration induced no changes in p-JNK2 levels, but at 2 months, they were significantly increased, while JNK2 total protein levels were diminished at both times studied. Also, it was identified that in rat normal kidney, total and phosphorylated JNK2 is expressed at higher levels than JNK1 and p-JNK1.

In regard to ERK, total and phosphorylated forms of ERK1, as well as p-ERK2, were elevated in DF group at both times studied, whereas total ERK2 levels did not change.

MAPKs' status in FeNTA-induced kidney tumors

Figure 2 displays both images of representative Western blots and histograms of the densitometric analysis for all MAPKs studied in FeNTA-induced tumors. p-p38 α/β levels were high in tumors (about 1.5-fold vs. control), although less than at early carcinogenesis stages (about 6- and 4-fold after 1 and 2 months of FeNTA treatment, respectively), while total kinase diminished. These results show that the response of both total and phosphorylated p38 α/β decreases as carcinogenesis progresses. Conversely, p38 γ was considerably overexpressed in renal tumors, and this rise was even higher than that monitored at 1 and 2 months of FeNTA treatment. On the other hand, p-JNK1 levels varied widely among samples; that is, whereas some tumors exhibited an increase, others presented a reduction or had no changes, and this behavior led to no statistical

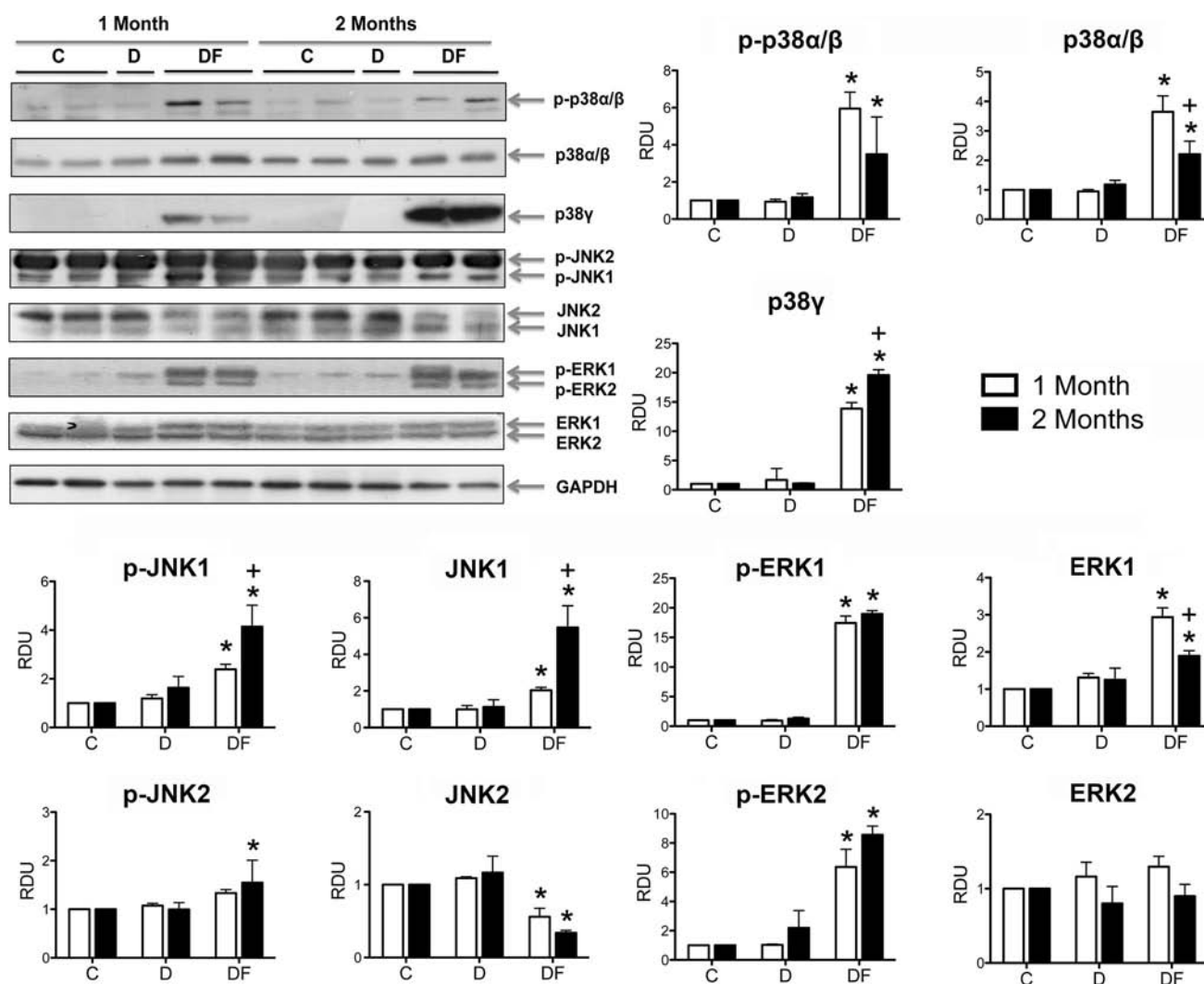


Fig. 1 Renal MAPKs' levels after 1 and 2 months of FeNTA treatment. Images of representative Western blots and histograms are shown. At one month, both p-p38α/β and total p38α/β levels increased, and this rise was less prominent at 2 months, although the difference between both times studied was statistically significant only for the levels of total p38α/β. Likewise, the levels of p38γ isoform augmented after 1 and 2 months of FeNTA treatment, but in this case, the rise was higher at the second month. Regarding to JNK, the levels of p-JNK1 as well as those of total JNK1 raised after 1 month and even more after 2, while total JNK2 isoform levels

decreased at both times but its phosphorylated form increased at 2 months though it did not after one. For its part, phosphorylated ERK1 and 2 isoforms increased similarly at both times analyzed. Total ERK1 levels were augmented at 1 month, and this rise was lower at 2 months, whereas total ERK2 did not change at any time. DEN treatment alone had no effects in any MAPK at any time studied. RDU relative densitometric units. GAPDH was used as loading control. Bars represent the mean ± SEM. $n = 4$ for C group, $n = 3$ for D group, and $n = 6$ for DF group. * $p \leq 0.05$ versus C, + $p \leq 0.05$ versus 1 month

difference between p-JNK1 levels in tumor and normal tissues. On the contrary, total JNK1 had a more uniform response augmenting in most tumors, and this was more noticeable than that detected at 2 months of FeNTA treatment, which, in turn, was higher than that found at the first month. In the case of JNK2, its phosphorylated version was markedly elevated in the majority of renal tumors, but total levels of this kinase were reduced, a similar behavior to that identified within 2 months of FeNTA treatment. It seems that p-JNK2 levels tend to increase as carcinogenesis moves forward, contrary to that observed for p38α/

β. Lastly, in regard to ERK, both analyzed versions of ERK1, phosphorylated and total, augmented in tumor tissue, while p-ERK2 rose but total levels of this isoform did not change, similar to what happened at early stages of carcinogenesis. It was also noticed that phosphorylated versions of ERK 1 and 2 displayed more variability among tumor samples than the total proteins.

In general, MAPKs' behavior was more fluctuant among FeNTA-induced tumors than in kidney samples from early stages of carcinogenesis, and this may be due to the different phases of tumor evolution; nevertheless, no

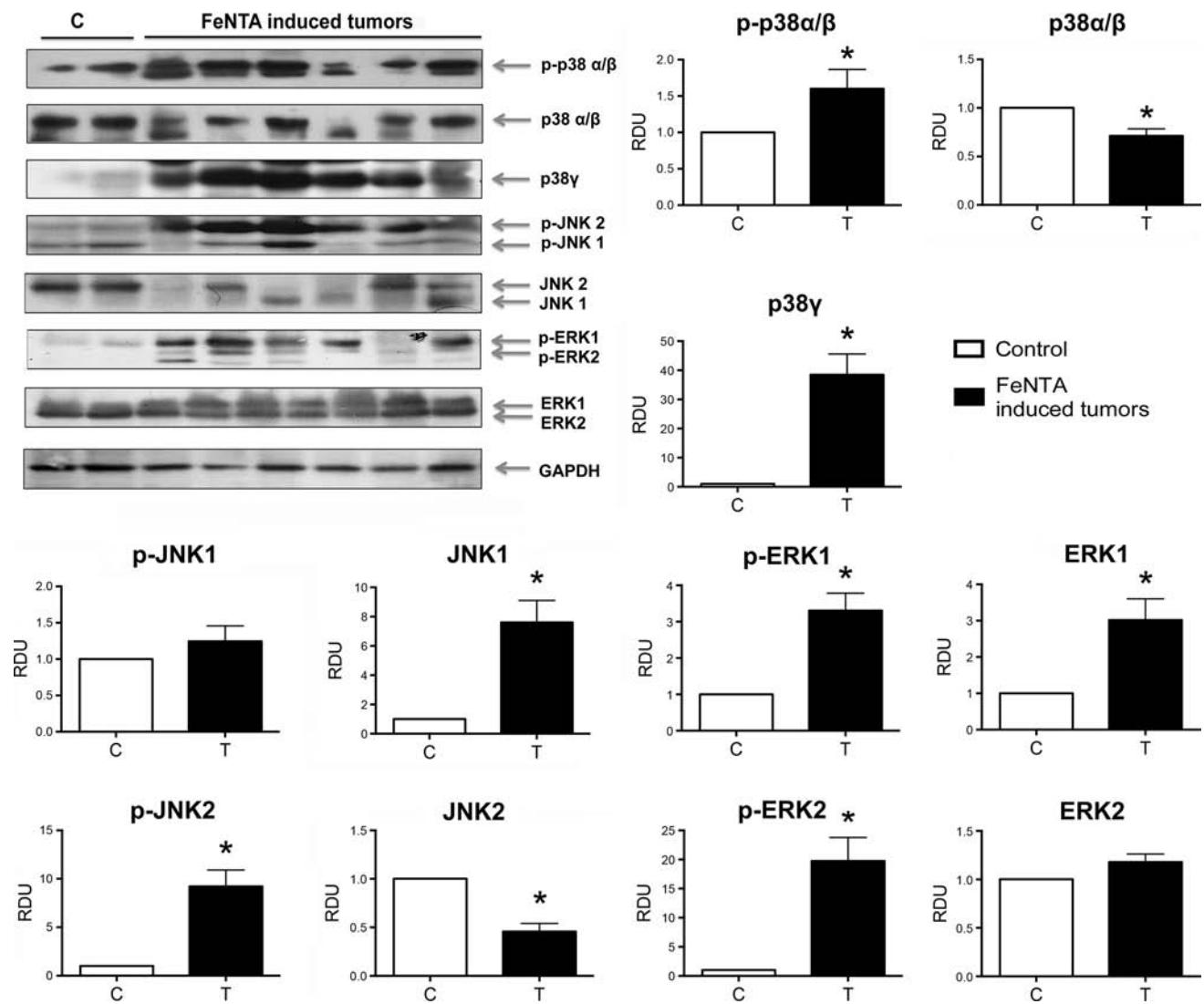


Fig. 2 MAPKs' behavior in FeNTA-induced renal tumors. Images of representative Western blots and histograms are shown. Phosphorylated p38 α/β levels increased while total kinase diminished, and total p38 γ isoform augmented. On the other hand, phospho-JNK1 levels widely varied among studied tumors so the mean was not statistically different versus normal renal tissue, but total JNK1 clearly rose; instead, phospho-JNK2 levels increased whereas those of total JNK2

were reduced. Also, some tumors exhibited higher levels of total JNK1 than total JNK2 isoform, or vice versa. Lastly, phosphorylated ERK1 and 2 isoforms increased, as well as total ERK1, but total ERK2 did not change. *RDU* relative densitometric units. GAPDH was used as loading control. *Bars* represent the mean \pm SEM. *n* = 3 for C group, *n* = 12 for tumors (T). **p* \leq 0.05 versus C

correlation was found between MAPKs' levels and tumor stage and/or grade, which were determined based on size and Fuhrman classification, respectively (data not shown) [7].

MAPKs' levels in liver and lung after exposition to FeNTA

Previously we reported that using the scheme of FeNTA treatment followed in the present work, no primary tumors are developed in liver or lung [7]; thus, in order to determine if the alterations observed in MAPKs were

particularly related to kidney, their status was determined in samples from these organs. No alterations were found in hepatic (Fig. 3) or pulmonary (Fig. 4) tissues after 1 and 2 months of FeNTA exposition, so MAPKs' response to carcinogen seems to be associated specially to kidney.

Discussion

Renal cell carcinoma is the most common malignancy arising from the adult kidney [1] and it is generally asymptomatic, so initial diagnosis frequently occurs in

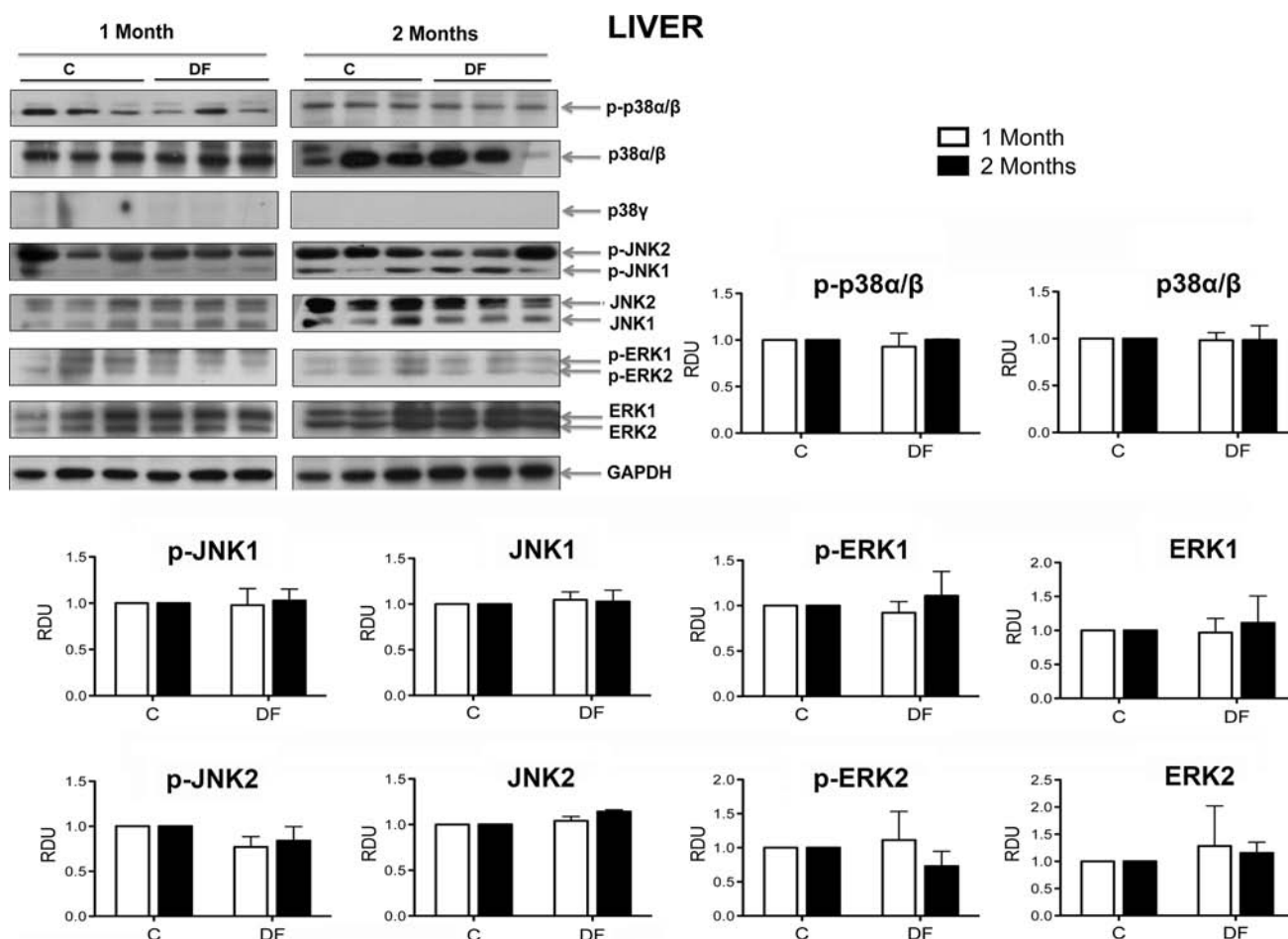


Fig. 3 MAPKs' behavior in liver tissue after 1 and 2 months of FeNTA treatment. Images of representative Western blots and histograms are shown. None of the MAPKs analyzed, p38α/β, JNK1 and 2, and ERK1 and 2 (phosphorylated and total forms),

exhibited alterations in this organ. Furthermore, p38γ isoform was not detected. *RDU* relative densitometric units. GAPDH was used as loading control. *Bars* represent the mean ± SEM. *n* = 4 for C group and *n* = 4 for DF group. *p* ≥ 0.05

advanced stages and even when metastasis is already present [42]. This makes it very difficult to study early developmental stages of this cancer in patients, and thus, a well-characterized experimental model of RCC induction may be useful to identify events probably involved in renal cells' malignization. In a prior work [7], we reported that histological characteristics of tumors induced by FeNTA correspond to clear cell RCC, the most common histological subtype in patients (70–75 %) [43]. Also, in that work, it was demonstrated that the exposure to the carcinogen during 1 and 2 months results in renal preneoplastic lesions, which were more severe after 2 months of FeNTA administration, suggesting that such times of treatment represent different early RCC developmental stages [7].

MAPKs' alterations are related to several malignancies, including RCC [17, 25–29, 33]. In the present work, elevated kidney levels of total and phosphorylated forms of p38α/β were detected after 1 month of FeNTA treatment, but this

rise becomes less intense as carcinogenesis process advances, and even a decrease of total p38α/β was found in tumor tissue, though its phosphorylated version still increased. Interestingly, Omori and coworkers described enhanced levels of p38α/β in proliferative areas in renal development and dysplasia, suggesting these proteins to have pro-proliferative potential in this organ [44, 45]. On the other hand, high amounts of both COX-2 and β-catenin have been reported in FeNTA-induced tumors [46, 47], proteins positively regulated by p38α/β [48, 49] and involved in cell proliferation and motility. Hence, renal cells might overexpress and activate p38α/β initially as an early response to repair tissue damage, since FeNTA induces acute renal necrosis [7], but then this rise gradually decreases, although their levels remain augmented in experimental tumors, as has been reported for human RCC [25]. However, it is not possible to know if the kinase behavior evolved along carcinogenesis in patients as observed here, and that is one of the valuable advantages of this experimental model.

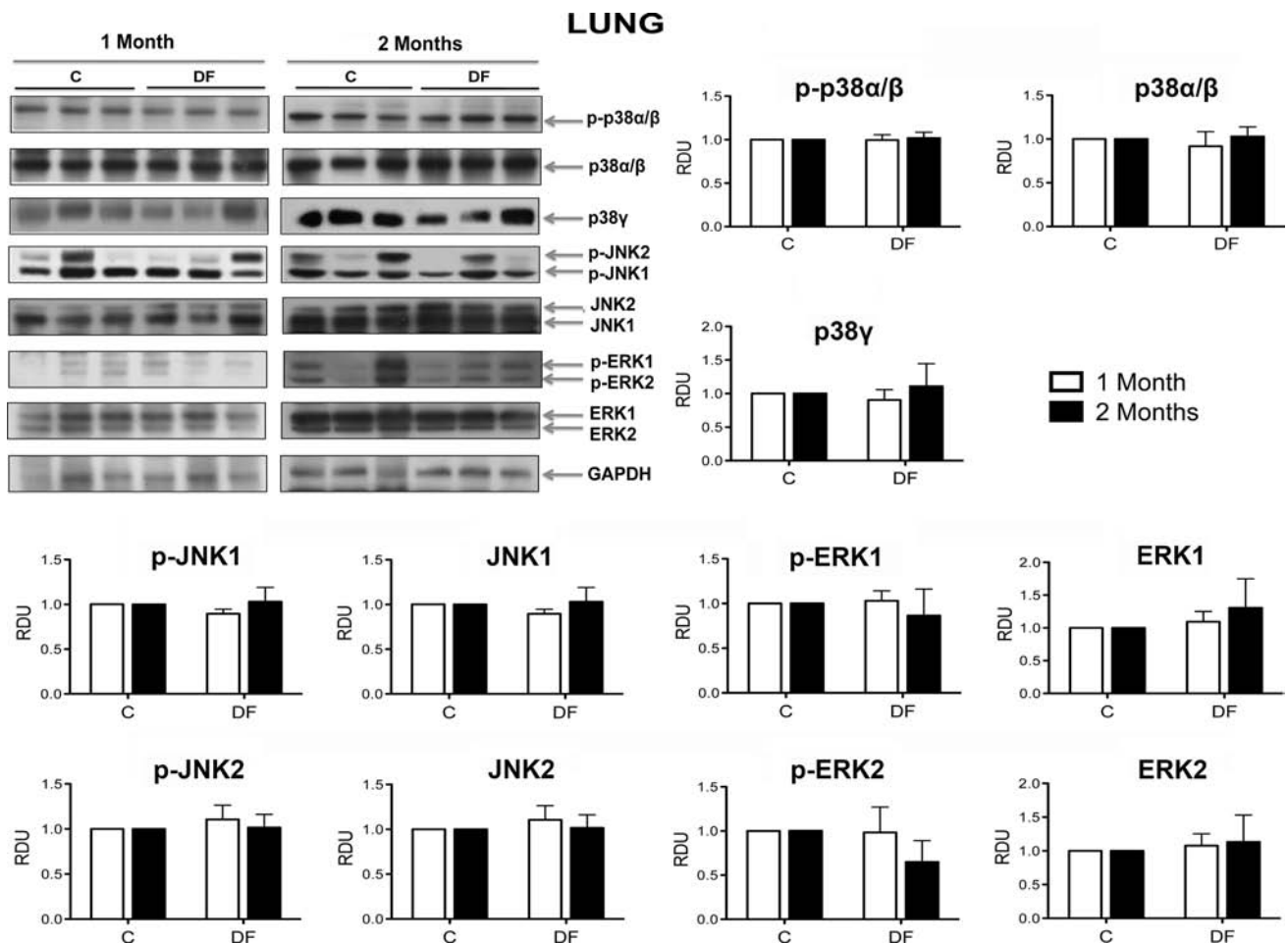


Fig. 4 MAPKs' behavior in pulmonary tissue after 1 and 2 months of FeNTA treatment. Images of representative Western blots and histograms are shown. None of the MAPKs analyzed, p38α/β and γ, JNK1 and 2, and ERK1 and 2 (phosphorylated and total forms),

exhibited alterations in this organ. *RDU* relative densitometric units. GAPDH was used as loading control. *Bars* represent the mean ± SEM. *n* = 4 for C group and *n* = 4 for DF group. *p* ≥ 0.05

High renal levels of p38γ were also detected after 1 and 2 months of FeNTA treatment, but in this case, the effect grows as carcinogenesis moves forward reaching levels higher than 30-fold in tumors versus normal kidney. Likewise, p38γ is highly expressed in breast, brain, and colon malignancies [50–52], but its status in human RCC tumors has not been established. This kinase is related to cell proliferation and motility, and plays an important role in k-Ras-mediated transformation in various cell lines, independently of its phosphorylation state [53, 54]. Therefore, p38γ overexpression may participate in FeNTA-induced renal cancer development and maintenance, and it would be relevant to analyze the behavior of this specific p38 isoform in human tumors since it could be one of the mechanisms responsible for the high RCC metastatic capacity.

On the other hand, low total JNK2 and high total JNK1 levels were established at all times studied after FeNTA treatment compared to kidney samples from C group. In

contrast, p-JNK2 levels did not change after 1 month of FeNTA treatment but they increased at 2 months and in tumors, while p-JNK1 levels were high at early stages, and were not altered in tumors. So, JNK1 and 2 isoforms seem to be switching from one to the other throughout carcinogenesis, presumably JNK1 participating in initial events of the process, and JNK2 rather having a role in cells already transformed. Moreover, it is very interesting to note that tumors exhibiting higher JNK1 levels than others also presented lower JNK2, and vice versa. Considering that many evidences support that their behavior and effects are distinctive [28, 29], the above suggests that the degree of JNK isoforms expression may be related to specific characteristics of each tumor; that is, probably, tumors with higher JNK1 levels are in a more proliferative state, while those with greater JNK2 expression may possess major metastatic potential, as has been suggested in other tumorigenesis models [55, 56]. On the other hand, in some malignancies,

JNK1 acts as tumor suppressor, while JNK2 has an oncogenic role [29], but in others, their effects are opposite [28]. In human RCC, the role of these kinases is controversial, whereas some authors report that JNK activation leads to apoptosis in RCC cell lines [30, 32, 57–59], An et al. [33] described that the blockade of JNK activation provokes reduced growth of RCC cells. These observations make our results more interesting as JNK isoforms were not distinguished in the previous works related to RCC; therefore, if JNK is considered as a therapeutic target, the specific effect on 1 and 2 isoforms must be taken into account.

With respect to ERK, an increase in the levels of its phosphorylated form is a particularly common alteration in human RCC [36, 38], as well as in experimental models in mice and rats other than the FeNTA-induced one [39, 40, 60]. In concordance, in the present work, both studied p-ERK isoforms, 1 and 2, were clearly elevated at all stages analyzed. Besides, Vaidya et al. advised that ERK1/2 phosphorylation is essential for proper mice renal tubular repair and proliferation of kidney cells [61]; so, it is possible that, initially, FeNTA treatment prompts ERK activation to repair kidney damage, but repeated carcinogen administrations lead to sustained kinase activity, facilitating, finally, tumor promotion and maintenance, and this last seems to occur also in RCC originated by different causes and in different species.

On the other hand, taking into account an overview of MAPKs' behavior, cells with high p-ERK/p-p38 ratio have been reported to exhibit a more malignant phenotype [62–65], and based on the changes of these MAPKs observed along carcinogenesis in the present work, it is likely that at 1 month of FeNTA treatment, low values of p-ERK/p-p38 coefficient due to high p-p38 levels could be making renal cells to be less malignant, but as carcinogen administration continues, the elevation of p-p38 becomes lower, and, as a result, p-ERK/p-p38 ratio grows facilitating tumor development. Moreover, during rat kidney development, as well as in renal dysplasia and cysts, high p-p38 and p-ERK have been reported and suggested to be related to epithelial to mesenchymal transition (EMT) [45, 46, 66, 67], which is proposed as an initial event for tumor development in many malignancies [68]. Thus, FeNTA may cause EMT via p38 and ERK, but the activation also of JNK may allow the acquisition of additional pro-proliferative, anti-apoptotic, and/or enhanced cell motility advantages.

Importantly, our results show that none of the MAPKs' alterations observed in kidney were present in liver or lung of FeNTA-treated rats. This strongly supports the hypothesis of their participation in renal carcinogenesis in this experimental model, since we have previously described that FeNTA exposure does not induce primary hepatic or pulmonary tumors [7], as Ansar et al. also reported using a similar scheme of treatment [69].

Another interesting finding is that the studied tissues displayed per se some differences in MAPKs' expression. Accordingly to Court et al. [70], p38 γ was barely or not detectable in kidney and liver, whereas lung presented high levels of this kinase; likewise, kidney and liver showed higher levels of total and phosphorylated JNK2 than JNK1 counterparts, and the opposite happened in lung.

To our knowledge, this is the first time that MAPKs' behavior is analyzed in response to FeNTA treatment, and, more important, the first time that their status is studied at different stages of the carcinogenesis process in this in vivo model. However, the precise role of these kinases in renal cell malignization is still to be clarified, and efforts are going on in our laboratory in this respect, such as the analysis of pathways upstream and downstream from MAPKs.

In summary, renal MAPKs' response evolves and shows a growing pro-carcinogenic potential in their combination throughout the protocol to induce RCC by FeNTA exposition, which sustains their participation in renal cells malignization, and supports the model as a useful tool to test individual or combined MAPK targeted drugs as preventive and/or curative therapies, as well as to identify other events probably involved in tumor development, which are interesting and significant perspectives of the present work.

Acknowledgments This work was supported by Universidad Nacional Autónoma de México through Dirección General de Asuntos del Personal Académico—Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT) under projects IN227010 and IN221313, and through Faculty of Chemistry under PAIP number 4194-10, as well as by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) under project 81026, given to MEIR. FAAA, CYVO, and TOPP received a fellowship from CONACYT. The authors appreciate the collaboration of M.V.Z. Lucía Macías Rosales for her valuable assistance in animal care and treatment. The funding sponsors had no involvement in this study design, the data collection, analysis and interpretation, the manuscript writing, or the decision to submit the manuscript for publication.

References

1. Vasudev NS, Selby PJ, Banks RE (2012) Renal cancer biomarkers: the promise of personalized care. *BMC Med* 27(10):112
2. Okada S, Midorikawa O (1982) Induction of the rat renal adenocarcinoma by Fe-nitritotriacetate (Fe-NTA). *Jpn Arch Intern Med* 29:485–491
3. Ebina Y, Okada S, Hamasaki S, Ogino F, Li JL, Midorikawa O (1986) Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of iron and aluminum-nitritotriacetate complexes in rats. *J Natl Cancer Inst* 76:107–113
4. Li JL, Okada S, Hamazaki S, Ebina Y, Midorikawa O (1987) Subacute nephrotoxicity and induction of renal cell carcinoma in mice treated with ferric nitritotriacetate. *Cancer Res* 47:1867–1869
5. Athar M, Iqbal M (1998) Ferric nitritotriacetate promotes *N*-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis* 19:1133–1139

6. Jahangir T, Sultana S (2006) Modulatory effects of *Pluchea lanceolata* against chemically induced oxidative damage, hyperproliferation and two-stage renal carcinogenesis in Wistar rats. *Mol Cell Biochem* 291:175–185
7. Vargas-Olvera CY, Sánchez-González DJ, Solano JD, Aguilar-Alonso FA, Montalvo-Muñoz F, Martínez-Martínez CM, Medina-Campos ON, Ibarra-Rubio ME (2012) Characterization of *N*-diethylnitrosamine-initiated and ferric nitrilotriacetate-promoted renal cell carcinoma experimental model and effect of a tamarind seed extract against acute nephrotoxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 369:105–117
8. Hiroyasu M, Ozeki M, Kohda H, Echizenya M, Tanaka T, Hiai H, Toyokuni S (2002) Specific allelic loss of p16 (INK4A) tumor suppressor gene after weeks of iron-mediated oxidative damage during rat renal carcinogenesis. *Am J Pathol* 160:419–424
9. Taniyai E, Hayashi H, Yafune A, Watanabe M, Akane H, Suzuki K, Mitsumori K, Shibutani M (2012) Cellular distribution of cell cycle-related molecules in the renal tubules of rats treated with renal carcinogens for 28 days: relationship between cell cycle aberration and carcinogenesis. *Arch* 86:1453–1464
10. Bahnmann R, Leibold E, Kittel B, Mellert W, Jäckh R (1998) Different patterns of kidney toxicity after subacute administration of Na-nitrilotriacetic acid and Fe-nitrilotriacetic acid to Wistar rats. *Toxicol Sci* 46:166–175
11. Umemura T, Sai K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y (1990) Oxidative DNA damage, lipid peroxidation and nephrotoxicity induced in the rat kidney after ferric nitrilotriacetate administration. *Cancer Lett* 54:95–100
12. Toyokuni S, Uchida K, Okamoto K (1994) Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Natl Acad Sci* 91:2616–2620
13. Chen L, Wang Y, Kairaitis LK, Wang Y, Zhang BH, Harris DC (2001) Molecular mechanisms by which iron induces nitric oxide synthesis in cultured proximal tubule cells. *Exp Nephrol* 9:198–204
14. Gago-Dominguez M, Castelao JE (2006) Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radic Biol Med* 40:721–733
15. Bosetti C, Scotti L, Maso LD, Talamini R, Montella M, Negri E, Ramazzotti V, Franceschi S, La Vecchia C (2007) Micronutrients and the risk of renal cell cancer: a case-control study from Italy. *Int J Cancer* 120:892–896
16. Bosetti C, Rossi M, McLaughlin JK, Negri E, Talamini R, Lagiou P, Montella M, Ramazzotti V, Franceschi S, LaVecchia C (2007) Flavonoids and the risk of renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 16:98–101
17. Kim EK, Choi EJ (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802:396–405
18. Peti W, Page R (2013) Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Sci* 22:1698–1710
19. Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ (2013) MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene* 513:1–13
20. Cuadrado A, Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429:403–417
21. Han J, Sun P (2007) The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem Sci* 32:364–371
22. Hui L, Bakiri L, Stepniak E, Wagner EF (2007) p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* 6:2429–2433
23. Koul HK, Pal M, Koul S (2013) Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. *Genes Cancer* 4:342–359
24. Tang J, Qi X, Mercola D, Han J, Chen G (2005) Essential role of p38gamma in K-Ras transformation independent of phosphorylation. *J Biol Chem* 280:23910–23917
25. Samaras V, Tsopanomichalou M, Stamatelli A, Arnaoutoglou C, Samaras E, Arnaoutoglou M, Poulias H, Barbatis C (2009) Is there any potential link among caspase-8, p-p38 MAPK and bcl-2 in clear cell renal cell carcinomas? A comparative immunohistochemical analysis with clinical connotations. *Diagn Pathol* 4:7
26. Ozbek E, Aliskan T, Otunctemur A, Calik G, Cakir S, Dursun M, Somay A (2012) Comparison of tumor grade and stage with nuclear factor kappa b and p38 mitogene activated protein kinase expressions in renal cell cancer. *Arch Ital Urol Androl* 84:53–60
27. Ambrose M, Ryan A, O'Sullivan GC, Dunne C, Barry OP (2006) Induction of apoptosis in renal cell carcinoma by reactive oxygen species: involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2, p38delta/gamma, cyclooxygenase-2 down-regulation, and translocation of apoptosis-inducing factor. *Mol Pharmacol* 69:1879–1890
28. Sabapathy K, Wagner EF (2004) JNK2: a negative regulator of cellular proliferation. *Cell Cycle* 3:1520–1523
29. Bubici C, Papa S (2014) JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 171:24–37
30. Mizuno R, Oya M, Shiomi T, Marumo K, Okada Y, Murai M (2004) Inhibition of MKP-1 expression potentiates JNK related apoptosis in renal cancer cells. *J Urol* 172:723–727
31. Takano Y, Iwata H, Yano Y, Miyazawa M, Virgona N, Sato H, Ueno K, Yano T (2010) Up-regulation of connexin 32 gene by 5-aza-2'-deoxycytidine enhances vinblastine-induced cytotoxicity in human renal carcinoma cells via the activation of JNK signalling. *Biochem Pharmacol* 80:463–470
32. Xu M, Hong M, Xie H (2013) Histone deacetylase inhibitors induce human renal cell carcinoma cell apoptosis through p-JNK activation. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 33:1409–1415
33. An J, Liu H, Magyar CE, Guo Y, Veena MS, Srivatsan ES, Huang J, Rettig MB (2013) Hyperactivated JNK is a therapeutic target in pVHL-deficient renal cell carcinoma. *Cancer Res* 73:1374–1385
34. Bogoyevitch MA, Court NW (2004) Counting on mitogen-activated protein kinases—ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal* 16:1345–1354
35. Deschênes-Simard X, Kottakis F, Meloche S, Ferbeyre G (2014) ERKs in cancer: friends or foes? *Cancer Res* 74:412–419
36. Oka H, Chatani Y, Hoshino R, Ogawa O, Kakehi Y, Terachi T, Okada Y, Kawaichi M, Kohno M, Yoshida O (1995) Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 55:4182–4187
37. Lee HJ, Kim DI, Kang GH, Kwak C, Ku JH, Moon KC (2009) Phosphorylation of ERK1/2 and prognosis of clear cell renal cell carcinoma. *Urology* 73:394–399
38. Campbell L, Nuttall R, Griffiths D, Gumbleton M (2009) Activated extracellular signal-regulated kinase is an independent prognostic factor in clinically confined renal cell carcinoma. *Cancer* 115:3457–3467
39. Marin-Kuan M, Nestler S, Verguet C, Bezençon C, Piguat D, Delatour T, Mantle P, Cavin C, Schilter B (2007) MAPK-ERK activation in kidney of male rats chronically fed ochratoxin A at a dose causing a significant incidence of renal carcinoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 224:174–181
40. Cohen JD, Gard JM, Nagle RB, Dietrich JD, Monks TJ, Lau SS (2011) ERK crosstalks with 4EBP1 to activate cyclin D1 translocation during quinol-thioether-induced tuberosclerosis renal cell carcinoma. *Toxicol Sci* 124:75–87
41. Salinas-Sánchez AS, Giménez-Bachs JM, Serrano-Oviedo L, Nam Cha S, Sánchez-Prieto R (2012) Role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in the sporadic renal cell carcinoma. *Actas Urol Esp* 36:99–103
42. Nogueira M, Kim HL (2008) Molecular markers for predicting prognosis of renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 26:113–124
43. Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A, Martignoni G, Rini BI, Kutikov A (2014)

- Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. *Eur Urol*. doi:10.1016/j.eururo.2014.04.029
44. Omori S, Hida M, Ishikura K, Kuramochi S, Awazu M (2000) Expression of mitogen-activated protein kinase family in rat renal development. *Kidney Int* 58:27–37
 45. Omori S, Fukuzawa R, Hida M, Awazu M (2002) Expression of mitogen-activated protein kinases in human renal dysplasia. *Kidney Int* 61:899–906
 46. Liu YT, Shang D, Akatsuka S, Ohara H, Dutta KK, Mizushima K, Naito Y, Yoshikawa T, Izumiya M, Abe K, Nakagama H, Noguchi N, Toyokuni S (2007) Chronic oxidative stress causes amplification and overexpression of ptpbz1 protein tyrosine phosphatase to activate beta-catenin pathway. *Am J Pathol* 171:1978–1988
 47. Rehman MU, Tahir M, Khan AQ, Khan R, Lateef A, Oday-O-Hamiza Qamar W, Ali F, Sultana S (2013) Chrysin suppresses renal carcinogenesis via amelioration of hyperproliferation, oxidative stress and inflammation: plausible role of NF- κ B. *Toxicol Lett* 216:146–158
 48. Fitzsimmons BL, Zattoni M, Svensson CI, Steinauer J, Hua XY, Yaksh TL (2010) Role of spinal p38alpha and beta MAPK in inflammatory hyperalgesia and spinal COX-2 expression. *NeuroReport* 21:313–317
 49. Kim MK, Maeng YI, Sung WJ, Oh HK, Park JB, Yoon GS, Cho CH, Park KK (2013) The differential expression of TGF- β 1, ILK and wnt signaling inducing epithelial to mesenchymal transition in human renal fibrogenesis: an immunohistochemical study. *Int J Clin Exp Pathol* 6:1747–1758
 50. Hou SW, Zhi HY, Pohl N, Loesch M, Qi XM, Li RS, Basir Z, Chen G (2010) PTPH1 dephosphorylates and cooperates with p38gamma MAPK to increase ras oncogenesis through PDZ-mediated interaction. *Cancer Res* 70:2901–2910
 51. Rosenthal DT, Iyer H, Escudero S, Bao L, Wu Z, Ventura AC, Kleer CG, Arruda EM, Garikipati K, Merajver SD (2011) p38 γ promotes breast cancer cell motility and metastasis through regulation of RhoC GTPase, cytoskeletal architecture, and a novel leading edge behavior. *Cancer Res* 71:6338–6349
 52. Yang K, Liu Y, Liu Z, Liu J, Liu X, Chen X, Li C, Zeng Y (2013) p38 γ overexpression in gliomas and its role in proliferation and apoptosis. *Sci Rep* 3:2089
 53. Qi X, Pohl NM, Loesch M, Hou S, Li R, Qin JZ, Cuenda A, Chen G (2007) p38alpha antagonizes p38gamma activity through c-Jun-dependent ubiquitin-proteasome pathways in regulating Ras transformation and stress response. *J Biol Chem* 282:31398–313408
 54. Loesch M, Zhi HY, Hou SW, Qi XM, Li RS, Basir Z, Iftner T, Cuenda A, Chen G (2010) p38gamma MAPK cooperates with c-Jun in trans-activating matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 285:15149–15158
 55. Hui L, Zatloukal K, Scheuch H, Stepniak E, Wagner EF (2008) Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J Clin Invest* 118:3943–3953
 56. Mitra S, Lee JS, Cantrell M, Van den Berg CL (2011) c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) enhances cell migration through epidermal growth factor substrate 8 (EPS8). *J Biol Chem* 286:15287–15297
 57. Ishizawa J, Yoshida S, Oya M, Mizuno R, Shinojima T, Marumo K, Murai M (2004) Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway activates stress kinases and induces apoptosis in renal cancer cells. *Int J Oncol* 25:697–702
 58. Ou YC, Yang CR, Cheng CL, Raung SL, Hung YY, Chen CJ (2007) Indomethacin induces apoptosis in 786-O renal cell carcinoma cells by activating mitogen-activated protein kinases and AKT. *Eur J Pharmacol* 563:49–60
 59. Liang YY, Zheng LS, Wu YZ, Peng LX, Cao Y, Cao X, Xie P, Huang BJ, Qian CN (2014) RASSF6 promotes p21(Cip1/Waf1)-dependent cell cycle arrest and apoptosis through activation of the JNK/SAPK pathway in clear cell renal cell carcinoma. *Cell Cycle* 13:1440–1449
 60. Yoon HS, Monks TJ, Everitt JJ, Walker CL, Lau SS (2002) Cell proliferation is insufficient, but loss of tuberlin is necessary, for chemically induced nephrocarcinogenicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F262–F270
 61. Vaidya VS, Shankar K, Lock EA, Dixon D, Mehendale HM (2003) Molecular mechanisms of renal tissue repair in survival from acute renal tubule necrosis: role of ERK1/2 pathway. *Toxicol Pathol* 31:604–618
 62. Aguirre Ghiso JA, Kovalski K, Ossowski L (1999) Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J Cell Biol* 147:89–104
 63. Aguirre-Ghiso JA, Liu D, Mignatti A, Kovalski K, Ossowski L (2001) Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(-MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol Biol Cell* 12:863–879
 64. Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L (2003) ERK(-MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy: regulation by p38(SAPK). *Cancer Res* 63:1684–1695
 65. Aguirre-Ghiso JA, Ossowski L, Rosenbaum SK (2004) Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth. *Cancer Res* 64:7336–7345
 66. Omori S, Hida M, Fujita H, Takahashi H, Tanimura S, Kohno M, Awazu M (2006) Extracellular signal-regulated kinase inhibition slows disease progression in mice with polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17:1604–1614
 67. Omori S, Kitagawa H, Koike J, Fujita H, Hida M, Pringle KC, Awazu M (2008) Activated extracellular signal-regulated kinase correlates with cyst formation and transforming growth factor-beta expression in fetal obstructive uropathy. *Kidney Int* 73:1031–1037
 68. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J (2014) Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* 16:488–494
 69. Ansar S, Iqbal M, Athar M (1999) Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitrosylacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. *Carcinogenesis* 20:599–606
 70. Court NW, dos Remedios CG, Cordell J, Bogoyevitch MA (2002) Cardiac expression and subcellular localization of the p38 mitogen-activated protein kinase member, stress-activated protein kinase-3 (SAPK3). *J Mol Cell Cardiol* 34:413–426

12. REFERENCIAS

- Agarwal MK, Iqbal M, Athar M. **Vitamin E inhibits hepatic oxidative stress, toxicity and hyperproliferation in rats treated with the renal carcinogen ferric nitrilotriacetate.** Redox Rep 2005; 10: 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 para obtener el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L **ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK).** Cancer Res 2003; 63:1684-1695.
- Alberts B. *et al*, **Biología molecular de la célula**, Gaylar science, Taylor & Francisc group, Quinta edición en inglés, USA 2008, pp. 1161-1224.
- Ambrose M, Ryan A, O'Sullivan GC, Dunne C, Barry OP. **Induction of apoptosis in renal cell carcinoma by reactive oxygen species: involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2, p38delta/gamma, cyclooxygenase-2 down-regulation, and translocation of apoptosis-inducing factor.** Mol Pharmacol 2006; 69: 1879-1890
- An J, Liu H, Magyar CE, Guo Y, Veena MS, Srivatsan ES, Huang J, Rettig MB. **Hyperactivated JNK is a therapeutic target in pVHL-deficient renal cell carcinoma.** Cancer Res 2013; 73: 1374-1385.
- Aoki K, Taketo MM. **Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene.** J Cell Sci 2007; 120:3327-35.
- Arbiser J. **Molecular regulation of angiogenesis and tumorigenesis by signal transduction pathways: evidence of predictable and reproducible patterns of synergy in diverse neoplasms.** Semin Cancer Biol 2004; 14: 81-91.
- Athar M, Iqbal M. **Ferric nitrilotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress.** Carcinogenesis 1998; 19: 1133-1139.
- Awai M. **Experimental iron overload using ferric nitrilotriacetate (Fe³⁺-NTA): a proposal model of the diseases in man caused by iron overload.** Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi. 1986 Dec;49(8):1650-9.

Awazu M, Omoi S, Hida M. **MAP kinase in renal development.** Nephrol Dial Transplant 2002; 17: 5-7.

Bahnemann R, Leibold E, Kittel B, Mellert W, Jäckh R. **Different patterns of kidney toxicity after subacute administration of Na-nitritotriacetic acid and Fe-nitritotriacetic acid to Wistar rats.** Toxicol Sci 1998; 46: 166-175.

Berndt JD, Moon RT, Major MB. **Beta-catenin gets jaded and von Hippel-Lindau is to blame.** Trends Biochem Sci 2009; 34:101-104.

Behrens A, Haigh J, Mechta-Grigoriou F, Nagy A, Yaniv M, Wagner EF. **Impaired intervertebral disc formation in the absence of Jun.** Development 2003; 130: 103-109.

Bikkavilli RK, Feigin ME, Malbon CC. **p38 mitogen-activated protein kinase regulates canonical Wnt-beta-catenin signaling by inactivation of GSK3beta.** J Cell Sci. 2008 Nov 1;121(Pt 21):3598-607.

Bilim V, Kawasaki T, Katagiri A, Wakatsuki S, Takahashi K, Tomita Y: **Altered expression of beta-catenin in renal cell cancer and transitional cell cancer with the absence of beta-catenin gene mutations.** Clin Cancer Res 2000; 6:460-466.

Bilim V, A Ougolkov,² K Yuuki,¹ S Naito,¹ H Kawazoe,¹ A Muto,¹ M Oya,³ D Billadeau,⁴ T Motoyama,⁵ and Y Tomita^{1,*} **Glycogen synthase kinase-3: a new therapeutic target in renal cell carcinoma.** Br J Cancer 2009; 101: 2005–2014.

Bode AM, Dong Z. **The functional contrariety of JNK.** Mol Carcinog 2007; 46: 591-598.

Bosetti C, Rossi M, McLaughlin JK, Negri E, Talamini R, Lagiou P, Montella M, Ramazzotti V, Franceschi S, LaVecchia C. **Flavonoids and the risk of renal cell carcinoma.** Cancer Epi- demiol Biomark 2007; Prev 16:98–101

Bhuvarahamurthy V, Kristiansen GO, Johannsen M, Loening SA, Schnorr D, Jung K, Staack A. **In situ gene expression and localization of metalloproteinases MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, and their inhibitors TIMP1 and TIMP2 in human renal cell carcinoma.** Oncol Rep 2006; 15: 1379-84.

Bubici C, Papa S. **JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets.** Br J Pharmacol. 2014; 171: 24-37.

Campbell L, Nuttall R, Griffiths D, Gumbleton M. **Activated extracellular signal-regulated kinase is an independent prognostic factor in clinically confined renal cell carcinoma.** Cancer 2009; 115: 3457-67.

Cheng PY, Lee YM, Shih NL, Chen YC, Yen MH. **Heme oxygenase-1 contributes to the cytoprotection of alpha-lipoic acid via activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells.** Free Radic Biol Med 2006; 40: 1313-1322.

Chitalia VC, Foy RL, Bachschmid MM, Zeng L, Panchenko MV, Zhou MI, Bharti A, Seldin DC, Lecker SH, Dominguez I, Cohen HT: **Jade-1 inhibits Wnt signalling by ubiquitylating beta-catenin and mediates Wnt pathway inhibition by pVHL.** Nat Cell Biol 2008; 10:1208-16.

Chu Q, Han N, Yuan X, Nie X, Wu H, Chen Y, Guo M, Yu S, Wu K. **DACH1 inhibits cyclin D1 expression, cellular proliferation and tumor growth of renal cancer cells.** J Hematol Oncol 2014; 7: 73.

Cojocaru E, Lozneau L, Giușcă SE, Căruntu ID, Danciu M. **Renal carcinogenesis--insights into signaling pathways.** Rom J Morphol Embryol 2015; 56: 15-19.

Cole AM, Ridgway RA, Derkits SE, Parry L, Barker N, Clevers H, Clarke AR, Sansom OJ. **p21 loss blocks senescence following Apc loss and provokes tumourigenesis in the renal but not the intestinal epithelium.** EMBO Mol Med. 2010; 2: 472-86.

Cruciat CM. **Casein kinase 1 and Wnt/ β -catenin signaling.** Curr Opin Cell Biol 2014; 31: 46-55.

Cruz-White A., **Efecto del pretratamiento con un extracto de semillas de uva sobre el daño oxidativo y otras alteraciones inducidas por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de Hierro (FeNTA) en un estudio *in vivo*,** Tesis para obtener el grado de maestra en ciencias, Facultad de Química, UNAM, 2007.

Cui XL, Ding Y, Alexander LD, Bao C, Al-Khalili OK, Simonson M, Eaton DC, Douglas JG. **Oxidative signaling in renal epithelium: Critical role of cytosolic phospholipase A2 and p38(SAPK).** Free Radic Biol Med 2006; 41: 213-221.

Curiel Muñíz P. **Efectos del aumento en los niveles de pkcz en un modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA.** Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM, 2014.

Dahl E, Wiesmann F, Woenckhaus M, Stoehr R, Wild PJ, Veeck J, Knüchel R, Klopocki E, Sauter G, Simon R, Wieland WF, Walter B, Denzinger S, Hartmann A, Hammerschmied CG: **Frequent loss of SFRP1 expression in multiple human solid tumours: association with aberrant promoter methylation in renal cell carcinoma.** Oncogene 2007; 26:5680-5691.

Dávalos-Salas M. **Efecto del tratamiento con un concentrado de arándano sobre alteraciones inducidas por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)**

tanto in vivo como in vitro. Tesis para obtener el grado de maestra en ciencias, Facultad de Química, UNAM, 2006.

De Borst MH, Prakash J, Melenhorst WB, van den Heuvel MC, Kok RJ, Navis G, van Goor H. **Glomerular and tubular induction of the transcription factor c-Jun in human renal disease.** J Pathol 2007; 213: 219-228.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. **MAP kinase signalling pathways in cancer.** Oncogene 2007; 26: 3279-3290.

Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., Sherr, C.J. **Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.** Genes Dev. 1998; 12, 3499–3511.

Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. **p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis.** Cancer Cell 2007; 11: 191-205.

Dunn C, Wiltshire C, MacLaren A, Gillespie DA. **Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor.** Cell Signal 2002; 14: 585-593.

Ediriwickrema A, Saltzman WM. **Nanotherapy for Cancer: Targeting and Multifunctionality in the Future of Cancer Therapies.** ACS Biomater Sci Eng 2015; 1: 64-78.

Eferl R, Wagner EF. **AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis.** Nat Rev Cancer 2003; 3: 859-868.

Eybl V, Kotyzová D, Cerná P, Koutensky J. **Effect of melatonin, curcumin, quercetin, and resveratrol on acute ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced renal oxidative damage in rats.** Hum Exp Toxicol 2008; 27: 347-53.

Fukuda A, Osawa T, Hitomi K, Uchida K. **4-Hydroxy-2-nonenal cytotoxicity in renal proximal tubular cells: protein modification and redox alteration.** Arch Biochem Biophys 1996; 333:419-426.

Fuchs SY, Xie B, Adler V, Fried VA, Davis RJ, Ronai Z. **c-Jun NH2-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors.** J Biol Chem 1997; 272: 32163-32168.

Gago-Dominguez M, Castelao JE. **Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights.** Free Radic Biol Med 2006; 40: 721-733.

Genestra M. **Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants.** Cell Signal 2007; 19: 1807-1819.

Gupta J, del Barco Barrantes I, Igea A, Sakellariou S, Pateras IS, Gorgoulis VG, Nebreda AR. **Dual function of p38 α MAPK in colon cancer: suppression of colitis-associated tumor initiation but requirement for cancer cell survival.** Cancer Cell 2014; 25: 484-500.

Haddad AQ, Margulis V. **Tumour and patient factors in renal cell carcinoma-towards personalized therapy.** Nat Rev Urol 2015; 12: 253-262.

Han J, Sun P. **The pathways to tumor suppression via route p38.** Trends Biochem Sci 2007; 32: 364-371.

Harris WB. **Biomarkers for evaluating racial disparities in clinical outcome in patients with renal cell carcinoma.** Mol Aspects Med 2015: S0098-2997.

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. **AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings.** J Cell Sci 2004; 117(Pt 25): 5965-5973.

Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kawamoto K, Kikuno N, Kawakami K, Yamamura S, Ueno K, Majid S, Saini S, Ishii N, Dahiya R: **Wnt antagonist gene DKK2 is epigenetically silenced and inhibits renal cancer progression through apoptotic and cell cycle pathways.** Clin Cancer Res 2009; 15:5678-5687.

Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kawamoto K, Kikuno N, Ueno K, Yamamura S, Zaman MS, Khatri G, Chen Y, Saini S, Majid S, Deng G, Ishii N, Dahiya R: **Wnt antagonist DKK1 acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma.** Int J Cancer 2011; 128: 1793-1803.

Hiroyasu M, Ozeki M, Kohnda H, Echizenya M, Tanaka T, Hiai H, Toyokuni S. **Specific allelic loss of p16 (INK4) tumor suppressor gene after weeks of iron-mediated oxidative damage during rat renal carcinogenesis.** Am J Pathol 2002; 160; 419-424.

Hong S, Park KK, Magae J, Ando K, Lee TS, Kwon TK, Kwak JY, Kim CH, Chang YC. **Ascochlorin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by suppressing activator protein-1-mediated gene expression through the ERK1/2 signaling pathway: inhibitory effects of ascochlorin on the invasion of renal carcinoma cells.** J Biol Chem 2005; 280: 25202-25209.

Hsu TC, Young MR, Cmarik J, Colburn NH. **Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis.** Free Radic Biol Med 2000; 28:1338-1348.

Huang D, Ding Y, Luo WM, Bender S, Qian CN, Kort E, Zhang ZF, VandenBeldt K,

Duesbery NS, Resau JH, Teh BT. **Inhibition of MAPK kinase signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis in vivo.** *Cancer Res* 2008; 68: 81-88.

Hui, L., L. Bakiri, et al. **p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis.** *Cell Cycle* 2007; 6: 2429-2433.

Hui L, Zatloukal K, Scheuch H, Stepniak E, Wagner EF **Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation.** *J Clin Invest* 2008; 118: 3943-3953

Ichihashi K, Osawa T, Toyokuni S, Uchida K. **Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes: implications for oxidative stress.** *J Biol Chem* 2001; 276: 23903-23913.

Ishizawa J, Yoshida S, Oya M, Mizuno R, Shinojima T, Marumo K, Murai M. **Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway activates stress kinases and induces apoptosis in renal cancer cells.** *Int J Oncol* 2004; 25: 697-702.

Janssens N, Andries L, Janicot M, Perera T, Bakker A: **Alteration of frizzled expression in renal cell carcinoma.** *Tumour Biol* 2004; 25:161-171.

Ji H, Wang J, Nika H, Hawke D, Keezer S, Ge Q, Fang B, Fang X, Fang D, Litchfield DW, Aldape K, Lu Z: **EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated disassociation of alpha-Catenin from beta-Catenin and transactivation of beta-Catenin.** *Mol Cell* 2009; 36:547-59.

Jung JE, Lee HG, Cho IH, Chung DH, Yoon SH, Yang YM, Lee JW, Choi S, Park JW, Ye SK, Chung MH. **STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells.** *FASEB J* 2005; 19: 1296-8.

Kanellis J, Ma FY, Kandane-Rathnayake R, Dowling JP, Polkinghorne KR, Bennett BL, Friedman GC, Nikolic-Paterson DJ. **JNK signalling in human and experimental renal ischaemia/reperfusion injury.** *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 2898-908.

Kappelmann M, Bosserhoff A, Kuphal S. **AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma.** *Eur J Cell Biol* 2014; 93: 76-81.

Karin M, Gallagher E. **From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance.** *IUBMB Life* 2005; 57: 283-295.

Kayahara M, Wang X, Tournier C. **Selective regulation of c-jun gene expression by mitogen-activated protein kinases via the 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-**

responsive element and myocyte enhancer factor 2 binding sites. Mol Cell Biol 2005; 25: 3784-3792.

Kawakami K, Hirata H, Yamamura S, Kikuno N, Saini S, Majid S, Tanaka Y, Kawamoto K, Enokida H, Nakagawa M, Dahiya R: **Functional significance of Wnt inhibitory factor-1 gene in kidney cancer.** Cancer Res 2009; 69:8603-8610.

Kim YS, Kang YK, Kim JB, Han SA, Kim KI, Paik SR: **beta-catenin expression and mutational analysis in renal cell carcinomas.** Pathol Int 2000; 50: 725-730.

Kimoto T, Koya S, Hino K, Yamamoto Y, Nomura Y, Micallef MJ, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M. **Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin C.** Pathol Int 2000; 50: 679-89.

Kojima T, Shimazui T, Hinotsu S, Joraku A, Oikawa T, Kawai K, Horie R, Suzuki H, Nagashima R, Yoshikawa K, Michiue T, Asashima M, Akaza H, Uchida K: **Decreased expression of CXXC4 promotes a malignant phenotype in renal cell carcinoma by activating Wnt signaling.** Oncogene 2009; 28: 297-305.

Koo AS, Chiu R, Soong J, Dekernion JB, Belldegrun A. **The expression of C-jun and junB mRNA in renal cell cancer and in vitro regulation by transforming growth factor beta 1 and tumor necrosis factor alpha 1.** J Urol 1992; 148: 1314-1318.

Koul HK, Pal M, Koul S. **Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors.** Genes Cancer 2013; 4: 342-359.

Kraus C, Reina-Sanchez J, Sulekova Z, Ballhausen WG. **Immunochemical identification of novel high-molecular-weight protein isoforms of the adenomatous polyposis coli (APC) gene.** Int J Cancer. 1996; 26; 65:383-8.

Krishna M, Narang H. **The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple.** Cell Mol Life Sci 2008; 65: 3525-3544.

Laine A, Ronai Z. **Ubiquitin chains in the ladder of MAPK signaling.** Sci STKE 2005; 2005: re5.

Larkin JM, Eisen T. **Renal cell carcinoma and the use of sorafenib.** Ther Clin Risk Manag 2006; 2: 87-98.

Lash LH, Parker JC, Scott CS. **Modes of action of trichloroethylene for kidney tumorigenesis.** Environ Health Perspect 2000; 108 suppl 2: 225-240.

Lee HJ, Kim DI, Kang GH, Kwak C, Ku JH, Moon KC. **Phosphorylation of ERK1/2 and prognosis of clear cell renal cell carcinoma.** Urology 2009; 73: 394-399.

Leibold E, Deckardt K, Mellert W, Potthoff-Karl B, Grundler O, Jäckh R. **NTA and Fe(III)NTA: differential patterns of renal toxicity in subchronic studies.** Hum Exp Toxicol 2002; 21: 445-452.

Liang J, Slingerland JM. **Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression.** Cell Cycle. 2003; 2: 339-45.

Liang YY, Zheng LS, Wu YZ, Peng LX, Cao Y, Cao X, Xie P, Huang BJ, Qian CN. **RASSF6 promotes p21 (cip1/Waf1)-dependent cell cycle arrest and apoptosis through activation of the JNK/SAPK pathway in clear cell renal cell carcinoma.** Cell Cycle 2014; 13: 1440-1449.

Li JL, Okada S, Hamazaki S, Ebina Y, Midorikawa O. **Subacute nephrotoxicity and induction of renal cell carcinoma in mice treated with ferric nitrilotriacetate.** Cancer Res 1987; 47: 1867-1869.

Linehan WM, Rubin JS, Bottaro DP: **VHL loss of function and its impact on oncogenic signaling networks in clear cell renal cell carcinoma.** Int J Biochem Cell Biol 2009; 41: 753-756.

Lima MS1, Pereira RA, Costa RS, Tucci S, Dantas M, Muglia VF, Ravinal RC, Barros-Silva GE. **The prognostic value of cyclin D1 in renal cell carcinoma.** Int Urol Nephrol 2014; 46: 905-913.

Liu Y, Wen JK, Dong LH, Zheng B, Han M. **Krüppel-like factor (KLF) 5 mediates cyclin D1 expression and cell proliferation via interaction with c-Jun in Ang II-induced VSMCs.** Acta Pharmacol Sin. 2010; 31:10-8. doi: 10.1038/aps.2009.185. Epub 2009 Dec 28.

Liu YT, Shang D, Akatsuka S, Ohara H, Dutta KK, Mizushima K, Naito Y, Yoshikawa T, Izumiya M, Abe K, Nakagama H, Noguchi N, Toyokuni S. **Chronic oxidative stress causes amplification and overexpression of ptpnz1 protein tyrosine phosphatase to activate beta-catenin pathway.** Am J Pathol 2007; 171:1978-88.

Loesch M, Zhi HY, Hou SW, Qi XM, Li RS, Basir Z, Iftner T, Cuenda A, Chen G. **p38gamma MAPK cooperates with c-Jun in trans-activating matrix metalloproteinase 9.** J Biol Chem 2010; 285: 15149-58.

López-Ramos D. **Efecto del carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro y de un antioxidante polifenólico sobre la expresión del gen de ciclina D1,** Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga, Facultad de Química, UNAM, 2007.

MacDonald BT, Tamai K, He X: **Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases.** Dev Cell 2009; 17: 9-26.

Matthews CP, Colburn NH, Young MR. **AP-1 a target for cancer prevention.** Curr Cancer Drug Targets 2007; 7: 317-324.

Marston W. **Genetic basis of renal cell carcinoma: Disease-specific approaches to therapy.** P T 2005; 1092-911/05: 362-367.

Marin-Kuan M, Nestler S, Verguet C, Bezençon C, Piguet D, Delatour T, Mantle P, Cavin C, Schilter B. **MAPK-ERK activation in kidney of male rats chronically fed ochratoxin A at a dose causing a significant incidence of renal carcinoma.** Toxicol Appl Pharmacol 2007; 224: 174-81.

Meixner A, Karreth F, Kenner L, Wagner EF. **JunD regulates lymphocyte proliferation and T helper cell cytokine expression.** EMBO J 2004; 23: 1325-1335.

Meloche S, Pouyssegur J. **The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition.** Oncogene. 2007; 26: 3227-3239.

Mishra R. **Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer.** Mol Cancer 2010; 9: 144.

Mitra S, Lee JS, Cantrell M, Van den Berg CL **c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) enhances cell migration through epidermal growth factor substrate 8 (EPS8).** J Biol Chem 2011; 286: 15287-15297.

Mizuno R, Oya M, Shiomi T, Marumo K, Okada Y, Murai M. **Inhibition of MKP-1 expression potentiates JNK related apoptosis in renal cancer cells.** J Urol 2004; 172: 723-727.

Montalvo Muñoz F. **Estudio del papel de la proteína p53 y el efecto de un extracto de tamarindo en la respuesta a un carcinógeno renal in vivo.** Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, UNAM, 2008.

Morin PJ, Weeraratna AT. The APC tumor suppressor pathway. Methods Mol Biol 2003; 222:21-40.

Näthke I. **APC at a glance.** J Cell Sci. 2004; 117:4873-5.

Navarro García R. **Funcionalidad de la ciclina D1 en etapas tempranas de un modelo de carcinogénesis renal y efecto de un compuesto antioxidante.** Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM, 2013.

Nelson EC, Evans CP, Lara PN Jr. **Renal cell carcinoma: current status and emerging therapies.** Cancer Treat Rev 2007; 33:299-313.

Ohno Y, Izumi M, Tachibana M, Kawamura T, Yoshioka K, Aoyagi T, Ohori M, Namiki K, Sakamoto N, Nakagami Y, Hatano T, Akimoto S, Nishimura T: **Characterization and gene expression analysis of novel matched primary and metastatic renal cell carcinoma cell lines.** *Oncol Rep* 2008; 20: 501-509.

Oka H, Chatani Y, Hoshino R, Ogawa O, Kakehi Y, Terachi T, Okada Y, Kawaichi M, Kohno M, Yoshida O. **Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma.** *Cancer Res* 1995; 55: 4182-4187.

Omori S, Hida M, Ishikura K, Kuramochi S, Awazu M. **Expression of mitogen-activated protein kinase family in rat renal development.** *Kidney Int* 2000; 58: 27-37.

Omori, S., R. Fukuzawa, et al. **Expression of mitogen-activated protein kinases in human renal dysplasia.** *Kidney Int* 2002; 61: 899-906.

Omori S, Hida M, Fujita H, Takahashi H, Tanimura S, Kohno M, Awazu M. **Extracellular signal-regulated kinase inhibition slows disease progression in mice with polycystic kidney disease.** *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1604-1614.

Omori S, Kitagawa H, Koike J, Fujita H, Hida M, Pringle KC, Awazu M. **Activated extracellular signal-regulated kinase correlates with cyst formation and transforming growth factor-beta expression in fetal obstructive uropathy.** *Kidney Int* 2008; 73: 1031-1037.

Ou YC, Kuan YH, Li JR, Raung SL, Wang CC, Hung YY, Chen CJ. **Induction of apoptosis by luteolin involving Akt inactivation in human 786-0 renal cell carcinoma cells.** *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 109105.

Oya M, Mikami S, Mizuno R, Marumo K, Mukai M, Murai M. **C-jun activation in acquired cystic kidney disease and renal cell carcinoma.** *J Urol* 2005; 174: 726.

Ozbek E , Aliskan T, Otunctemur A, Calik G, Cakir S, Dursun M, Somay A. **Comparison of tumor grade and stage with nuclear factor kappa b and p38 mitogene activated protein kinase expressions in renal cell cancer.** *Arch Ital Urol Androl* 2012 84:53-60.

Pacheco Bernal I. **Niveles de akt y p-akt en diferentes tejidos en etapas tempranas de un modelo experimental de carcinogénesis renal y efecto de un extracto de semillas de tamarindo.** Tesis que para obtener el título de Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica, Facultad de Química, UNAM, 2014.

Pan JS, Hong MZ, Ren JL. **Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis.** *World J Gastroenterol* 2009; 15:1702-1707.

Pacheco Bernal I. **Niveles de akt y p-akt en diferentes tejidos en etapas tempranas de un modelo experimental de carcinogénesis renal y efecto de un extracto de semillas de tamarindo.** Tesis para obtener el título de Licenciado en Química Farmacéutico Biológica, Facultad de Química, UNAM, 2014.

Pariante Pérez TO. **Participación de Nf-kb en la carcinogenicidad del nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) y efecto de un extracto de semilla de tamarindo (EST).** Tesis para obtener el grado de maestra en ciencias, Facultad de Química, UNAM, 2012.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. **Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.** *Endocr Rev* 2001; 22: 153-183.

Pećina-Slaus N, Pavelić K, Pavelić J. **Loss of heterozygosity and protein expression of APC gene in renal cell carcinomas.** *J Mol Med (Berl)*. 1999; 77:446-53.

Pećina-Slaus N, Gall-TroSelj K, Slaus M, Radić K, NikuSeva-Martić T, Pavelić K. **Genetic changes of the E-cadherin and APC tumour suppressor genes in clear cell renal cell carcinoma.** *Pathology*. 2004; 36:145-51.

Peruzzi B, Athauda G, Bottaro DP. **The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product represses oncogenic beta-catenin signaling in renal carcinoma cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; Sep 26; 103: 14531-14536.

Polzer K, Soleiman A, Baum W, Axmann R, Distler J, Redlich K, Kilian A, Krönke G, Schett G, Zwerina J. **Selective p38MAPK isoform expression and activation in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated crescentic glomerulonephritis: role of p38MAPKalpha.** *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 602-608.

Pramanik R, Qi X, Borowicz S, Choubey D, Schultz RM, Han J, Chen G. **p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun. The determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity.** *J Biol Chem*. 2003; 278: 4831-9.

Preece NE, Evans PF, Howarth JA, King LJ, Parke DV. **The induction of autoxidative tissue damage by iron nitrilotriacetate in rats and mice.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 93: 89-100.

Preece NE, Hall DE, Howarth JA, King LJ, Parke DV. **Effects of acute and sub-chronic administration of iron nitrilotriacetate in the rat.** *Toxicology* 1989; 59: 37-58.

Puisieux A, Brabletz T, Caramel J **Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors.** *Nat Cell Biol* 2014; 16:488-494

- Pyles RB, Santoro IM, Groden J, Parysek LM. **Novel protein isoforms of the APC tumor suppressor in neural tissue.** *Oncogene*. 1998; 8;16: 77-82.
- Qi X, Pohl NM, Loesch M, Hou S, Li R, Qin JZ, Cuenda A, Chen G. **p38alpha antagonizes p38gamma activity through c-Jun-dependent ubiquitin-proteasome pathways in regulating Ras transformation and stress response.** *J Biol Chem* 2007; 282: 31398-408.
- Raivich G. **c-Jun expression, activation and function in neural cell death. Inflammation and repair.** *J Neurochem* 2008; 107: 898-906.
- Rangel Gómez AT. **Comportamiento de la proteína cinasa Ce(PKCe) en una etapa temprana del modelo de carcinogénesis renal por FeNTA.** Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, UNAM, 2011.
- Ramos JW. **The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 2707-2719.
- Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A. **Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake.** *Br J Pharmacol*. 2009; 156: 885-98.
- Rehman MU, Tahir M, Khan AQ, Khan R, Lateef A, Oday-O-Hamiza, Qamar W, Ali F, Sultana S. **Chrysin suppresses renal carcinogenesis via amelioration of hyperproliferation, oxidative stress and inflammation: plausible role of NF-κB.** *Toxicol Lett*. 2013; 216: 146-58.
- Roskoski R Jr. **ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation.** *Pharmacol Res* 2012; 66: 105-43.
- Ronkainen H, Kauppila S, Hirvikoski P, Vaarala MH. **Evaluation of myosin VI, E-cadherin and beta-catenin immunostaining in renal cell carcinoma.** *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29:2.
- Russell RC, Ohh M. **The role of VHL in the regulation of E-cadherin: a new connection in an old pathway.** *Cell Cycle* 2007; 6: 56-59.
- Saadeddin A, Babaei-Jadidi R, Spencer-Dene B, Nateri AS: **The links between transcription, beta-catenin/JNK signaling, and carcinogenesis.** *Mol Cancer Res* 2009; 7:1189-1196.
- Sabapathy K1, Wagner EF. **JNK2: a negative regulator of cellular proliferation.** *Cell Cycle* 2004; 3:1520-1523.

Saeki K, Machida M, Kinoshita Y, Takasawa R, Tanuma S. **Glycogen synthase kinase-3 β 2 has lower phosphorylation activity to tau than glycogen synthase kinase-3 β 1.** Biol Pharm Bull 2011;34:146-9.

Saini S, Liu J, Yamamura S, Majid S, Kawakami K, Hirata H, Dahiya R. **Functional significance of secreted Frizzled-related protein 1 in metastatic renal cell carcinomas.** Cancer Res 2009; 69: 6815-6822.

Sansom OJ, Griffiths DF, Reed KR, Winton DJ, Clarke AR. **Apc deficiency predisposes to renal carcinoma in the mouse.** Oncogene. 2005; 24: 8205-10.

Shaulian E, Karin M. **AP-1 in cell proliferation and survival.** Oncogene 2001; 20: 2390-400.

Shiina H, Igawa M, Breault J, Ribeiro-Filho L, Pookot D, Urakami S, Terashima M, Deguchi M, Yamanaka M, Shirai M, Kaneuchi M, Kane CJ, Dahiya R. **The human T-cell factor-4 gene splicing isoforms, Wnt signal pathway, and apoptosis in renal cell carcinoma.** Clin Cancer Res 2003; 9: 2121-32.

Stepniak E, Ricci R, Eferl R, Sumara G, Sumara I, Rath M, Hui L, Wagner EF. **c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity.** Genes Dev 2006; 20: 2306-2314.

Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A, Martignoni G, Rini BI, Kutikov A. **Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity.** Eur Urol 2015; 67: 85-97.

Sun M, Larcher A, Karakiewicz PI. **Optimal first-line and second-line treatments for metastatic renal cell carcinoma: current evidence.** Int J Nephrol Renovasc Dis 2014; 7: 401-407.

Sutherland C. **What Are the bona fide GSK3 Substrates?** Int J Alzheimers Dis 2011;2011:505607. Epub 2011 May 18.

Suzuki H, Ueda T, Komiya A, Okano T, Isaka S, Shimazaki J, Ito H: **Mutational state of von Hippel-Lindau and adenomatous polyposis coli genes in renal tumors.** Oncology 1997; 54:252-7.

Szabo E, Riffe ME, Steinberg SM, Birrer MJ, Linnoila RI. **Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis.** Cancer Res 1996; 56: 305-315.

Takano Y, Iwata H, Yano Y, Miyazawa M, Virgona N, Sato H, Ueno K, Yano T. **Up-regulation of connexin 32 gene by 5-aza-2'-deoxycytidine enhances viniblastine**

induced cytotoxicity in human renal carcinoma cells via the activation of JNK signalling. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 463-470

Tang J, Qi X, Mercola D, Han J, Chen G. **Essential role of p38gamma in K-Ras transformation independent of phosphorylation.** *J Biol Chem* 2005; 280: 23910-23917.

Taniai E, Hayashi H, Yafune A, Watanabe M, Akane H, Suzuki K, Mitsumori K, Shibutani M. **Cellular distribution of cell cycle-related molecules in the renal tubules of rats treated with renal carcinogens for 28 days: relationship between cell cycle aberration and carcinogenesis.** *Arch Toxicol* 2012; 86: 1453-1464.

Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M. **Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression.** *Cancer Sci* 2007; 98: 629-35.

Tauriello DV, Maurice MM. **The various roles of ubiquitin in Wnt pathway regulation.** *Cell Cycle* 2010; 9:3700-9.

Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M. **Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation.** *Science*. 2008;320:667-70.

Togashi A, Katagiri T, Ashida S, Fujioka T, Maruyama O, Wakumoto Y, Sakamoto Y, Fujime M, Kawachi Y, Shuin T, Nakamura Y: **Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2), a novel diagnostic marker for renal cell carcinoma and potential target for molecular therapy.** *Cancer Res* 2005; 65:4817-4826.

Torres MM., (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 para obtener el título de Química Farmacéutica Biólogo, Facultad de Química, UNAM.

Toyokuni S, Uchida K, Okamoto K, Hattori-Nakakuki Y, Hiai H, Stadtman ER. **Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 2616-2620.

Toyokuni S. **Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation.** *Biotherapy* 1998; 11: 147-154.

Toyokuni S, Okada K, Kondo S, Nishioka H, Tanaka T, Nishiyama Y, Hino O, Hiai H. **Development of high-grade renal cell carcinomas in rats independently of somatic mutations in the Tsc2 and VHL tumor suppressor genes.** *Jpn J Cancer Res* 1998; 89:814-820.

Umemura T, Sai K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y. **A possible role for oxidative stress in potassium bromate (KBrO₃) carcinogenesis.** Carcinogenesis 1995; 16: 593-597.

Urakami S, Shiina H, Enokida H, Hirata H, Kawamoto K, Kawakami T, Kikuno N, Tanaka Y, Majid S, Nakagawa M, Igawa D, Dahiya R. **Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA.** Clin Cancer Res 2006; 12: 6989:6997.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** Chem Biol Interact 2006; 160: 1-40.

Vaidya VS, Shankar K, Lock EA, Dixon D, Mehendale HM **Molecular mechanisms of renal tissue repair in survival from acute renal tubule necrosis: role of ERK1/2 pathway.** Toxicol Pathol 2003; 31:604-618.

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 para obtener el grado de Maestra en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

Vargas-Olvera CY, Sánchez-González DJ, Solano JD, Aguilar-Alonso FA, Montalvo-Muñoz F, Martínez-Martínez CM, Medina-Campos ON, Ibarra-Rubio ME. **Characterization of N-diethylnitrosamine-initiated and ferric nitrilotriacetate-promoted renal cell carcinoma experimental model and effect of a tamarind seed extract against acute nephrotoxicity and carcinogenesis.** Mol Cell Biochem 2012; 369: 105-117.

Vasudev NS, Selby PJ, Banks RE. **Renal cancer biomarkers: the promise of personalized care.** BMC Med 2012; 27:112

Vineis P, Schatzkin A, Potter JD. **Models of carcinogenesis: an overview.** Carcinogenesis 2010; 31: 1703-9.

Wagner EF, Nebreda AR. **Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development.** Nat Rev Cancer 2009; 9: 537-549.

Wu CY, Hsieh HL, Sun CC, Yang CM. **IL-1beta induces MMP-9 expression via a Ca²⁺-dependent CaMKII/JNK/c-JUN cascade in rat brain astrocytes.** Glia. 2009; 57:1775-89.

Xu M, Hong M, Xie H. **Histone deacetylase inhibitors induce human renal cell carcinoma cell apoptosis through p-JNK activation.** Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2013; 33: 1409-1415.

Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, Yonehara S, Nishida E. **Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression.** *Curr Biol.* 2006 Jun 20;16(12):1171-1182.

Yoon HS, Monks TJ, Everitt JI, Walker CL, Lau SS **Cell proliferation is insufficient, but loss of tuberin is necessary, for chemically induced nephrocarcinogenicity.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F262-F270.

Young MR, Colburn NH. **Fra-1 a target for cancer prevention or intervention.** *Gene* 2006; 379: 1-11.

Zang T, Zhuang L, Zhang Z, Xin D, Guo Y: **Beta-catenin and its mRNA in renal cell carcinoma.** *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2000; 38:37-39.

Zentella de Piña M, *et al.*. **Papel fisiológico de los radicales libres.** *Bol Educ Bioq* 1995; 15: 152-161.

Zenz R, Scheuch H, Martin P, Frank C, Eferl R, Kenner L, Sibilina M, Wagner EF. **c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling.** *Dev Cell* 2003; 4: 879-889.

Zhao ZS, Khan S, O'Brien PJ. **The prevention of ferric nitrilotriacetate-induced nephro- and hepatotoxicity by methylenedioxybenzene antioxidants.** *Chem Biol Interact* 1997; 108: 107-18.