



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS POR INMUNOHISTOQUÍMICA DE AKT, GSK-3beta Y beta-CATENINA EN TUMORES RENALES INDUCIDOS EN RATA CON NITROTRIACETATO DE HIERRO.**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

DANIELA TENORIO HERNÁNDEZ



CIUDAD DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** PROF. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI  
**VOCAL:** PROFA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO  
**SECRETARIO:** PROF. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS  
**1ER. SUPLENTE:** PROF. JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ  
**2° SUPLENTE:** PROFA. LAURA CARMONA SALAZAR

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO F-120 , DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA ,  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO**

---

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**DR. FRANCISCO ANTONIO AGUILAR ALONSO**

---

**SUSTENTANTE:**

**DANIELA TENORIO HERNÁNDEZ**

---

# Índice

1. <b>Resumen</b> .....	1
2. <b>Antecedentes</b> .....	3
2.1. Cáncer.....	4
2.2. Carcinoma de células renales.....	5
2.2.1. Clasificación Fuhrman.....	6
2.3. Modelo experimental de CCR.....	8
2.4. Akt/PKB.....	11
2.5. GSK-3 $\beta$ .....	14
2.6. $\beta$ -catenina.....	17
3. <b>Justificación</b> .....	20
4. <b>Hipótesis</b> .....	21
5. <b>Objetivo general</b> .....	21
5.1. Objetivos particulares.....	21
6. <b>Materiales y Métodos</b> .....	22
6.1. Reactivos.....	22
6.2. Protocolo experimental.....	22
6.3. Obtención y preparación del tejido renal.....	24
6.4. Inmunohistoquímica.....	24
7. <b>Resultados y discusión</b> .....	27
7.1. Análisis macroscópico de tumores inducidos con FeNTA.....	27
7.2. Análisis microscópico e inmunohistoquímica.....	28
7.2.1. p-Akt.....	30
7.2.2. p-GSK-3 $\beta$ .....	33
7.2.3. $\beta$ -catenina.....	35
8. <b>Conclusiones</b> .....	40

9. <b>Perspectivas</b> .....	41
10. <b>Anexos</b> .....	42
11. <b>Bibliografía</b> .....	50

# 1. Resumen

El carcinoma de células renales (CCR) representa el 3% de todos los tipos de cáncer en el adulto. Debido a su curso asintomático, el diagnóstico se realiza cuando el cáncer se encuentra avanzado y su tratamiento se vuelve únicamente paliativo, por lo que su índice de mortalidad es del 53% a nivel mundial; por esta razón, surge la necesidad de contar con un modelo experimental que permita la búsqueda de alteraciones específicas de esta neoplasia o marcadores moleculares que faciliten el diagnóstico en etapas tempranas, todo esto con la finalidad de proponer estrategias preventivas y/o blancos terapéuticos más eficaces.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un protocolo experimental de carcinogénesis renal en ratas, en el cual la repetida administración de nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) induce la formación de tumores renales, los cuales se están caracterizando por medio de diferentes técnicas bioquímicas y de biología molecular. La histología de estos tumores sugiere que son la contraparte del CCRcc en el humano.

La proteína cinasa B o Akt es una cinasa de residuos de serina y treonina que es activada en respuesta a múltiples estímulos y que regula varias moléculas clave en el control de la supervivencia celular y la apoptosis; entre estas moléculas se encuentra la cinasa  $3\beta$  de la glucógeno sintasa (GSK- $3\beta$ ), la cual es fosforilada e inhibida por Akt. La GSK- $3\beta$  también es una cinasa de residuos de serina y treonina, inicialmente se identificó como reguladora del metabolismo de glucosa. Sin embargo, hoy en día se sabe que participa en diversas vías de señalización celular e interacciona con diferentes factores de transcripción que determinan la supervivencia o muerte celular. Uno de los blancos de GSK- $3\beta$  es  $\beta$ -catenina, la cual participa en la adhesión célula-célula y que al ser fosforilada por GSK- $3\beta$  se ubiquitina y es degradada vía proteosomal. Por lo tanto, la inhibición de GSK- $3\beta$  lleva a la estabilización de  $\beta$ -catenina, su acumulación en el citoplasma y translocación nuclear donde regula factores de transcripción que promueven la proliferación. En algunos tipos de cáncer en el humano, incluyendo el CCR, se ha encontrado un aumento en los niveles de Akt total y fosforilada, GSK- $3\beta$  (solamente la total en tumores y fosforilada en líneas celulares de CCR) y  $\beta$ -catenina.

Interesantemente, en el modelo inducido por FeNTA también se identificó un incremento de estas moléculas en etapas tempranas de la carcinogénesis, sin embargo, se desconocía su comportamiento en los tumores experimentales por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar los niveles y distribución tisular de p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina en el tejido tumoral mediante inmunohistoquímica.

Se encontró un aumento en los niveles de las 3 moléculas en el tejido tumoral en comparación con el riñón de ratas control y el tejido no tumoral tratado con FeNTA, además del aumento de los niveles citoplasmáticos de p-GSK-3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina, así como la presencia de p-Akt en el núcleo de las células tumorales lo cual no se observó en el tejido control. Los tumores de menor tamaño presentaron características histológicas más homogéneas al igual que las alteraciones de los niveles proteicos de las 3 moléculas, mientras que la apariencia histológica de los tumores de mayor tamaño fue diferente, así como sus alteraciones moleculares comparadas con los tumores de menor tamaño. El patrón de expresión de las proteínas estudiadas sugiere que las alteraciones en los niveles y localización celular posiblemente tenga un papel importante en los primeros estadios de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA.

Lo observado en el presente trabajo sugiere que probablemente la activación de la cascada de señalización Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenina pueda ser un mecanismo importante de carcinogénesis renal inducida por FeNTA.

Los resultados obtenidos se compararon con lo informado en el CCR humano encontrando equivalencias en el comportamiento de cada proteína en los tumores del modelo y en CCR humano. Esto refuerza las evidencias sobre las similitudes que existen entre las alteraciones moleculares encontradas en el modelo experimental y las descritas en CCR humano.

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>Akt/PKB</b>	Proteína cinasa B.
<b>APC</b>	Proteína poliposis adenomatosa coli.
<b>CCR</b>	Carcinoma de células renales.
<b>CCRcc</b>	Carcinoma de células renales de células claras.
<b>CK1</b>	Creatinin cinasa 1.
<b>DEN</b>	<i>N</i> -Dietilnitrosamina.
<b>FeNTA</b>	Nitriлотriacetato de hierro.
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Cinasa 3 $\beta$ de la glucógeno sintasa.
<b>H&amp;E</b>	Tinción hematoxilina y eosina.
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica.
<b>mTOR</b>	Proteína blanco de Rapamicina en mamíferos.
<b>mTORC1</b>	Complejo 1 de la proteína blanco de Rapamicina en mamíferos.
<b>mTORC2</b>	Complejo 2 de la proteína blanco de Rapamicina en mamíferos.
<b>p-Akt</b>	Akt foforilada en S473.
<b>PDK1</b>	Cinasa 1 dependiente de 3'-fosfoinositidos.
<b>PH</b>	Dominio de homología a plecstrina.
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-cinasa.
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
<b>PIP3</b>	Fosfatidil3,4,5-trifofato.
<b>p-GSK-3<math>\beta</math></b>	Cinasa 3 $\beta$ de la glucógeno sintasa fosforilada en S9.
<b>PTEN</b>	Fosfatasa de PIP3.



## 2. Antecedentes

### 2.1. Cáncer

Cáncer es el término que engloba a un conjunto de enfermedades caracterizadas por la alteración en el crecimiento celular anormal y excesivo. Las células cancerosas se originan de células normales cuya naturaleza ha cambiado. Estas células tienen una división más acelerada de lo normal y no responden normalmente a los estímulos hormonales y nerviosos habituales. Esta patología tiene distintas causas, entre ellas alteraciones mutagénicas o no mutagénicas inducidas por radiación, compuestos químicos ambientales, hormonas, etc. Existen cambios fundamentales de la fisiología celular que en conjunto determinan el fenotipo maligno (Kumar *et al.*, 2010; Monzon *et al.* 2011; Hanahan y Coussens, 2012) que incluyen: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogenia mantenida, capacidad para invadir otros tejidos y hacer metástasis, defectos en la reparación del ADN y evasión del ataque inmunitario como se resume en la figura 1.



**Figura 1. Capacidades adquiridas del cáncer.** Se ha propuesto que las células adquieren diversas capacidades a lo largo del proceso carcinogénico, que les confieren un potencial transformante (*Modificado de Hanahan y Coussens, 2012*).

## 2.2. Carcinoma de Células Renales

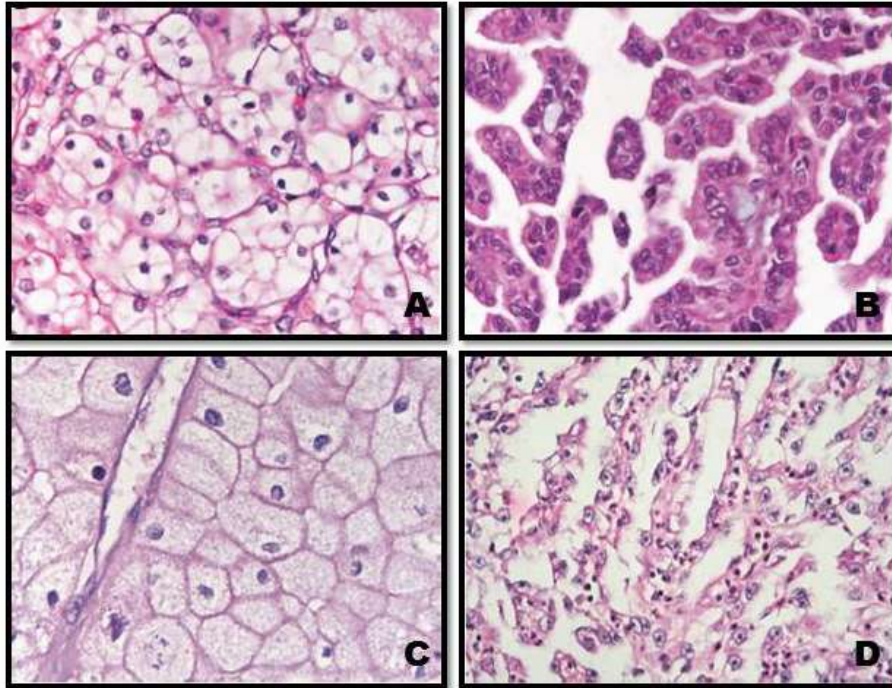
El carcinoma de células renales (CCR) es el tipo más común, representa casi el 3% de los tumores malignos en adulto y parece ser el tipo más agresivo de cáncer genitourinario.

Como principales factores de riesgo se encuentran el tabaquismo (20-30%) (Yuan *et al.*, 1998; Hunt *et al.*, 2005), la hipertensión (McLaughlin *et al.*, 1995), la obesidad y la diabetes (Bjorge *et al.*, 2004; Dhote *et al.*, 2000).

Por lo general, el CCR es asintomático y se diagnostica hasta etapas muy avanzadas, esto “influye” en el pronóstico; aunado a que es resistente a quimio y radioterapia (Zacchia *et al.*, 2011), lleva a que la supervivencia de cinco años sea menor al 90% para el estadio I, y de 20% a 30% para el estadio IV (Kopper y Timar, 2006). Más aún el CCR muestra una fuerte heterogeneidad, presentando 4 principales subtipos histológicos con distintas alteraciones cada uno, por lo que su respuesta a las terapias es diferente (Banumathy y Cairns, 2010, Linehan *et al.*, 2003). En la figura 2 se muestran imágenes histológicas de los 4 subtipos más comunes y que se describen a continuación.

- *CCR de células claras* (Fig. 2A). Es el tipo más común de CCR, representa aproximadamente el 80% de los casos. Tras la tinción con hematoxilina y eosina, este subtipo presenta una histología altamente característica, en la cual las células presentan un citoplasma claro por el alto contenido en lípidos y glucógeno y una membrana citoplasmática muy bien definida.
- *CCR papilar* (Fig. 2B). Es el segundo subtipo más común representando el 10-15% de los casos. Este cáncer forma proyecciones pequeñas llamadas papilas, parecidas a dedos, en alguna parte del tumor, si es que no están presentes en la mayor parte del mismo. Algunos médicos llaman a estos cánceres cromofílicos porque las células absorben ciertos tintes y lucen de color rosa cuando se observan con un microscopio.
- *CCR cromóforo* (Fig. 2C). Este subtipo representa alrededor del 5% de los casos de CCR. Al igual que el subtipo de células claras, El CCR cromóforo presenta células pálidas pero son mucho más grandes.

- *CCR de ducto colector* (Fig. 2D). Es el tipo de CCR con comportamiento más agresivo y corresponde a menos del 1% de las neoplasias epiteliales renales. En tinción H&E se observa la disposición tubular de la lesión con núcleos prominentes y nucléolos hiper cromáticos.



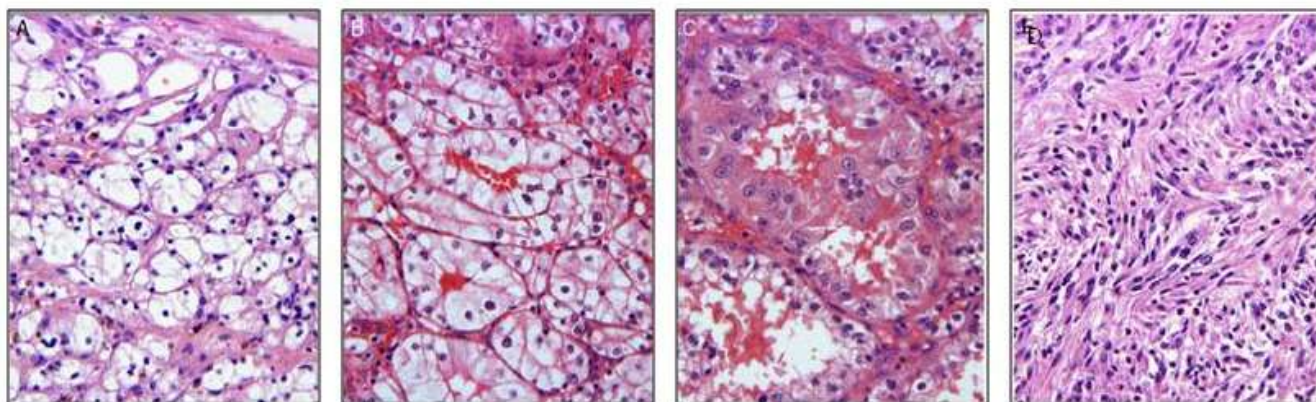
**Figura 2. Microfotografías de subtipos histológicos más frecuentes de CCR.**(A) CCR de células claras 80%, (B) CCR papilar 10-15%, (C) CCR cromóforo 5% y (D) CCR de ducto colector 1%. H&E ,400x (tomado de Mancini, et al. 2008).

### 2.2.1. Clasificación Fuhrman

Esta clasificación se basa en el tamaño nuclear, la forma, el contenido y tamaño del nucléolo, por lo que también se le llama clasificación nuclear o grado nuclear (la descripción de cada grado Fuhrman se presenta en la figura 3) es el más frecuentemente utilizado en Europa y América del Norte (Fuhrman *et al.* 1982; Armin *et al.* 2002; Ozer *et al.*, 2002; Roux *et al.* 2007; Ficarra *et al.*, 2001). El grado nuclear de CCR muestra valor pronóstico independiente de predicción de supervivencia. La supervivencia cáncer-específica a 5 años es de 194%, 86%, 59% y 31% para los pacientes con grados Fuhrman I, II, III, y IV, respectivamente (Ficarra *et al.*, 2001). El grado nuclear es un factor independiente del estadio tumoral, incluso las modificaciones de los esquemas de

Fuhrman fueron equivalentes en su capacidad para predecir la tasa de supervivencia de CCR (Roux *et al.*, 2007). El aumento del área nuclear y la variación en la forma se asocia con un pronóstico desfavorable. A pesar de que se ha establecido la importancia pronostica de la clasificación Fuhrman para CCRcc, su adecuación a los otros subtipos no está clara. Estudios recientes ponen en duda la utilidad de este sistema de clasificación en CCR cromóforo (Delahunt *etal.*, 2007). Las características microscópicas de cada grado se describen a continuación.

- Grado I (Fig. 3A). Núcleos redondos, uniformes (aprox. 10 micras); nucléolos no visibles a x400.
- Grado II (Fig. 3B). Núcleos más grandes (aprox. 15 micras) con contornos irregulares; se ven pequeños nucléolos a x400.
- Grado III (Fig. 3C). Núcleos más grandes (aprox. 20 micras) con contornos más irregulares; nucléolos prominentes a x100.
- Grado IV (Fig. 3D). Características del grado 3 más núcleos pleomórficos o multilobulados, con o sin células fusiformes, en algunos casos veremos áreas sarcomatoides.



**Figura 3. Microfotografías de tumores de CCRcc con distintos grados Fuhrman.** (A) Grado I, (B) grado II, (C) grado III y (D) grado IV. H&E, 400x (Tomado de Delahunt *et al.*, 2007).

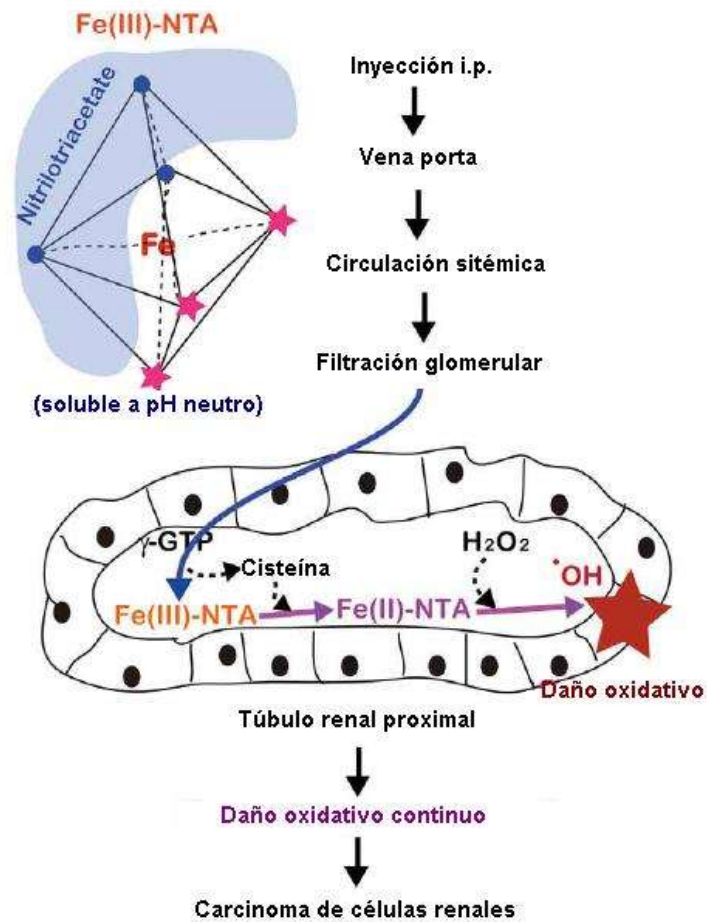
### 2.3. Modelo experimental de CCR

Dadas las múltiples complicaciones para el estudio del CCR, un modelo experimental bien caracterizado sería una herramienta muy útil para la búsqueda de alteraciones específicas, marcadores moleculares y así proponer estrategias terapéuticas.

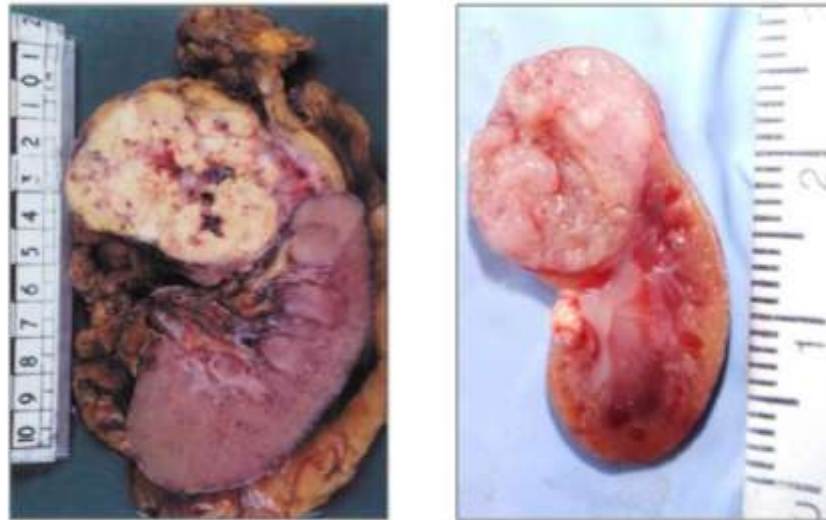
Entre los modelos que se han desarrollado, se encuentra aquel inducido en roedores por la exposición a nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) (Nishida 1999). El FeNTA es un complejo de hierro que al ser administrado por vía intraperitoneal repetidamente genera CCR (Toyokuni, 2014; Vargas-Olvera *et al.*, 2012). Aun no está claro el mecanismo carcinogénico de este compuesto, sin embargo está ampliamente demostrada la participación de estrés oxidante (Toyokuni, 1996; Athar e Iqbal, 1998) y se ha sugerido que su efecto en el riñón se da como se describe en la figura 4, induce daño oxidante en los túbulos proximales renales después de una sola administración intraperitoneal. Esto depende de dos características distintivas de lumen del túbulo renal proximal: escasez de proteínas antioxidantes tales como la albúmina y el medio ambiente reductor (Toyokuni, 2014). El que el estrés oxidante esté involucrado en la carcinogénesis inducida con FeNTA es importante ya que se sabe que el CCR, como en otros tipos de cáncer, está relacionado con el estrés oxidante (Ganesamoni *et al.*, 2012; Szatrowski *et al.*, 1991).

En el 1998 Athar e Iqbal (1998) y Toyokuni (1996) describieron que el subtipo histológico de CCR generado por FeNTA no era homogéneo (Athar e Iqbal., 1998; Toyokuni, 1996). Interesantemente, en nuestro laboratorio encontramos que la apariencia macroscópica es similar al CCRcc humano (figura 5) y que todos los tumores desarrollados corresponden al subtipo histológico de CCRcc, el cual es el más común en el humano (Vargas-Olvera *et al.* 2012). La discrepancia entre lo observado por otros autores y los hallazgos de nuestro laboratorio pueden deberse a diferencias en los esquemas de tratamiento y/o en las cepas de roedores utilizadas.





**Figura 4. Posible mecanismo por el cual el nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) induce la carcinogénesis.** La administración intraperitoneal de FeNTA, pasa a través de la vena porta, a la circulación sistémica, posteriormente al riñón donde la sangre se filtra en el glomérulo y pasa a los túbulos proximales que es donde el FeNTA ejerce su mayor daño por la generación de estrés oxidante (*modificado de Toyokuni, 2014*).



**Figura 5. Comparativo de la apariencia macroscópica de CCRcc humano y CCRcc inducido por FeNTA.** La imagen izquierda corresponde a un tumor de CCRcc humano (*tomado de Michael y Pandha, 2003*) y la fotografía derecha presenta un tumor de CCR inducido con FeNTA en nuestro laboratorio, se observa la similitud entre la localización y apariencia de ambos tumores.

En nuestro laboratorio, se han estudiado las etapas tempranas de carcinogénesis, es decir, la exposición a 1 y 2 meses al carcinógeno FeNTA, en dichas etapas ya se han observado la formación de lesiones displásicas y neoplásicas; también se encontraron alteraciones en distintas proteínas que pueden estar contribuyendo al desarrollo del cáncer como: NF- $\kappa$ B, IKK, HIF, PKC, ciclina D1, p21, Rb, c-Jun, las MAPKs son algunos ejemplos (Aguilar-Alonso, 2015; Navarro-García, 2013; Vargas-Olvera *et al.*, 2012; Pariente-Pérez, 2012; Curiel-Muñiz, 2012; Rangel-Gómez, 2011). Después de 6 meses de iniciar la administración de FeNTA ya se presenta la formación de tumores renales, sin embargo es poco lo que se conoce todavía sobre las alteraciones moleculares en los tumores.

## 2.4. Akt/PKB

La cinasa de residuos de serina y treonina Akt tiene una gran variedad de sustratos celulares implicados en diferentes procesos, como la supervivencia, proliferación, metabolismo y migración celular (Ingerborg *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Sae y Sale, 2008; Blandino-Rosano *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2008; Buttricks y Wakefield, 2008; Keefe *et al.*, 2010). Existen tres isoformas de Akt: Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$  y Akt3/PKB $\gamma$ . La Akt1 y la Akt2 se expresan de forma ubicua (Hanada *et al.* 2004), mientras que Akt3 se encuentra predominantemente en cerebro, corazón y riñón (Masure S. *et al.*, 1999). Todas ellas son altamente conservadas y poseen un dominio de plekstrina (PH) que es una secuencia peptídica de 100 a 120 aminoácidos (Chan, *et al.* 1999) que forma parte de muchas proteínas transductoras de señales, confiriéndoles propiedades de adhesión sobre la membrana plasmática.

La activación de Akt es dependiente de la cinasa de fosfatidil inositol 3 (PI3K), esta última se activa por la estimulación de receptores de factores de crecimiento y hormonales con actividad de cinasas de tirosina (RTKs) como el receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R), el de insulina (IR), el de insulina tipo 1 (IGF1-R), el de factor de crecimiento epidermal (EGF-R) y el factor de crecimiento a fibroblastos (FGF-R) (Chan. *et al.*, 1999; Coffey *et al.*, 1998; Schlessinger, 2000). Una vez activa PI3K fosforila al fosfatidil inositol 3,4-bifosfato (PIP2) convirtiéndolo a fosfatidil inositol 3,4,5- trifosfato (PIP3); el dominio PH de Akt tiene alta selectividad sobre los fosfolípidos PIP2 y PIP3, pero sólo PIP2 la activa provocando su reclutamiento hacia la membrana plasmática (Figura 6) (Chan *et al.*, 1999; Coffey *et al.*, 1998; Toker y Newton, 2000; Cantley, 2002; Yuan y Cantley, 2008; Vogt *et al.*, 2009).

Las 3 isoformas tienen sitios similares de fosforilación: Thr 308/Ser 473 en Akt1, Thr 309/Ser 474 en Akt2 y Thr 305/Ser 472 en Akt3, ambos residuos necesitan ser fosforilados para su completa activación (Franke, 2008). El residuo Thr es fosforilado por cinasa 1 dependiente de 3'-fosfoinosítidos (PDK1), que es también reclutada a la membrana plasmática por PIP3 (Bayascas, 2010; Raimondi y Falasaca, 2011). El residuo de Ser es blanco de el complejo 2 de la proteína blanco de Rapamicina en mamíferos (mTORC2) (Zoncu *et al.*, 2011).

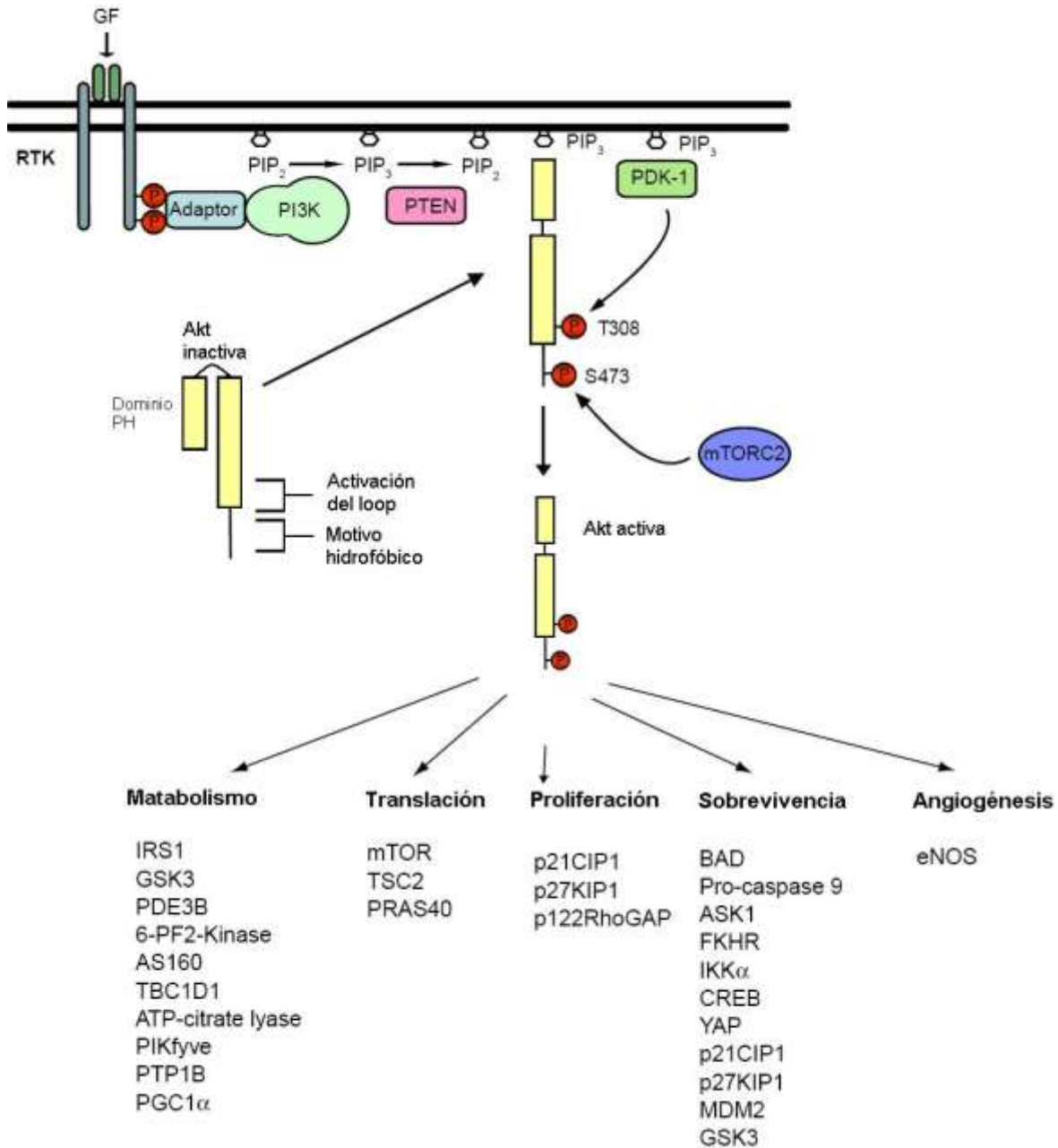


Una vez activada, Akt fosforila sus sustratos en serinas o treoninas en un motivo conservado caracterizado por la presencia de arginina en posiciones -5 y -3. Entre sus principales dianas, están proteínas pro-apotóticas que se inactivan al ser fosforiladas, como Bad (Datta *et al.*, 1997) y la familia de factores de transcripción Forkhead bOX O (FOXO) (Tzivion *et al.*, 2011; Kloet y Burgering. 2011), y por otro lado activa a NF- $\kappa$ B, que induce la expresión de genes antiapoptóticos (Romashkova y Makarov, 1999). Puede regular el metabolismo, mediante la inactivación de la glucógeno sintasa kinasa-3 (GSK3) ( Diehl *et al.*, 1998; Gregory *et al.*, 2003), y el ciclo celular, por la activación de Mdm2 que entra al núcleo disminuyendo los niveles de p53 (Oren, 2003; Feng *et al.*, 2004), además fosforila a p21<sup>Cip</sup>, un inhibidor de la unión Cdk-ciclina, esta fosforilación impide que p21<sup>Cip</sup> se trasloque al núcleo y sea degradada en el citoplasma , por lo tanto promueve el ciclo celular (Pestell *et al.*,1999; Zhou y Hung,2005). Hay que destacar que la regulación de mTORC1 por Akt es importante para la proliferación celular y la supervivencia, mTORC1 controla la síntesis de numerosas proteínas implicadas en el ciclo celular progresión y el crecimiento celular (Nicholson y Anderson, 2002; Los *et al.*, 2009).

Las isoformas de Akt se encuentran en el citoplasma, sin embargo se ha reportado su forma activa (p-Akt) en el núcleo, esta migración responde a distintos estímulos como el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), hipoglucemia, insulina y factor de crecimiento nervioso (NGF) (Meier *et al.*, 1997; Astroul *et al.*, 1999; Mistafaet *et al.*, 2008; Leininger *et al.*, 2004; Borgatti *et al.*, 2003). De hecho, en el núcleo se localizan algunos de los sustratos de Akt como, el inhibidor de Cdk-ciclina, p21<sup>Cip</sup> y los factores de transcripción FOXO y p300. Sin embargo, se desconoce hasta el momento si tiene funciones diferentes dentro del núcleo a las que ya se describieron.

Se ha encontrado que el aumento en la forma activa de Akt es un evento frecuente en varios tipos de tumores malignos humanos, incluyendo cáncer de colon (Itoh *et al.*, 2002), de ovario (Kurose *et al.*, 2001), endometrial (Kigawa *et al.*, 2001), y tiroideo (Ringel *et al.*, 2001), Por otra parte, se ha demostrado el aumento de los niveles de mTORC2 en el núcleo simultaneo al incremento de los niveles de p-Akt en las variantes agresivas del carcinoma papilar de tiroides, por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de

que mTORC2 puede estar fosforilando a Akt dentro del núcleo de las células neoplásicas de la tiroides (Liu y Brown, 2011).

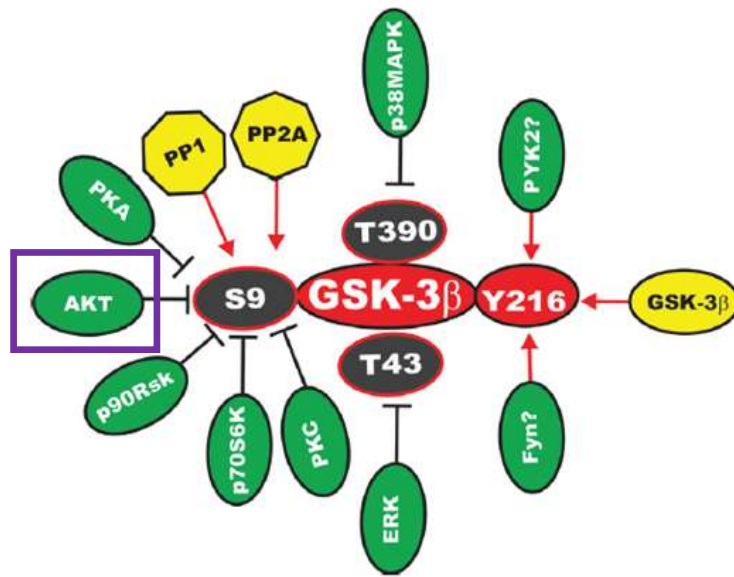


**Figura 6. Esquema de activación de PI3K/Akt en respuesta a factores de crecimiento (GF).** PI3K activa a Akt que conduce a la activación o inhibición de muchos efectores de vías de señalización que intervienen en distintos procesos celulares como se indica (Modificado de Ingerborg et al., 2011).

En el CCR humano, se ha informado una alta activación de Akt, sin embargo, el mecanismo subyacente queda por esclarecerse aunque se sabe que esta vía juega un rol fundamental en su desarrollo (Banumathy y Cairns, 2010). Interesantemente en etapas tempranas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA se ha encontrado un aumento en los niveles de Akt total y fosforilada (Pacheco-Bernal, 2014) lo que sugiere que puede estar implicada en el proceso de malignización de las células renales, no obstante se desconoce su comportamiento en los tumores experimentales.

## **2.5. GSK-3 $\beta$**

La cinasa de la glucógeno sintasa 3 (GSK-3 por sus siglas en inglés) es una cinasa de residuos de serina y treonina que fue identificada inicialmente como reguladora en la síntesis de glucógeno. Actualmente se sabe que participa en muchas otras vías de señalización y está implicada en múltiples procesos celulares como síntesis proteica, proliferación, apoptosis, diferenciación, dinámica de microtúbulos, motilidad y polarización celular (Frame y Cohen, 2001; Doble y Woodgett, 2003; Jope y Johnson 2004; Grimes y Jope, 2001; Luo, 2009; Pap y Cooper, 2002; Sánchez *et al.* 2003; Cohen y Frame, 2001). La familia de GSK-3 consiste en dos proteínas con dominios altamente conservados: GSK-3 $\alpha$  y GSK-3 $\beta$ , cada molécula tiene funciones diferentes, por lo que una no sustituye la ausencia de la otra; ambas tienen mayor afinidad por sustratos ya fosforilados. La familia de GSK-3 fosforila alrededor de 40 proteínas incluyendo 12 factores de transcripción (Sutherland, 2011). La desregulación de vías de señalización en las que participa GSK-3 $\beta$  ha sido relacionada con el desarrollo de enfermedades como diabetes, Alzheimer, trastornos bipolares y cáncer (Woodgett, 2001). Con respecto a la regulación de la muerte celular, GSK-3 $\beta$  ha sido descrita como una molécula pro- o anti-apoptótica, dependiendo tanto del tipo celular como del estímulo empleado para inducir apoptosis (Beurel y Jope, 2006). A pesar de estar basalmente activa, la actividad de GSK-3 $\beta$  puede ser regulada por fosforilación, localización o asociación con otras proteínas.



**Figura 7. Sitios de fosforilación de GSK-3 $\beta$  y cinasas responsables de su regulación.** De color amarillo dentro de octágonos son las fosforilasas capaces de activar a GSK-3 $\beta$  y de color verde las cinasas que fosforilan en posición S9 que resultan en su inactivación (*modificado de McCubrey et al., 2015*).

Varias cinasas fosforilan GSK-3 $\beta$  en la S9, como se muestra en la figura 7, inhibiendo su actividad, entre éstas se encuentran: la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa B (PKB/Akt), las cinasas ribosomales p90 (p90Rsk) y p70 (p70S6K) y la proteína cinasa C (PKC) (Sutherland C, 2011; Patel y Woodgett, 2008).

GSK-3 $\beta$  se localiza en el citoplasma, el núcleo y la mitocondria, y su presencia en cada uno de estos compartimentos celulares determinará su accesibilidad a diversos sustratos. Por ejemplo, GSK-3 $\beta$  puede fosforilar un gran número de factores de transcripción que se localizan en el núcleo como NF- $\kappa$ B (Mishra, 2010; Hoefflick *et al.*, 2000; Barre y Perkins, 2010), Snail (Haraguchi *et al.*, 2008; Yook *et al.*, 2006), Notch (Foltz *et al.*, 2002; Kashikor *et al.*, 2011) y FOXO (G-Amalak *et al.*, 2002), sin embargo la presencia de GSK-3 $\beta$  en el núcleo es muy dinámica, aumentando, considerablemente en determinadas fases del ciclo celular o durante el proceso de apoptosis (Meares *et al.*, 2007). Esto permite que sólo en estos momentos esos factores de transcripción sean accesibles para GSK-3 $\beta$ .

Dentro del núcleo también se encuentran proteínas diana de GSK-3 $\beta$  que se encargan de la regulación del ciclo celular. Esta cinasa puede fosforilar a p21<sup>Cip</sup> (Rossig *et al.*, 2002) y a las ciclinas D1 y E, lo que lleva a su exportación nuclear y degradación, de esta manera GSK3- $\beta$  participa en la inhibición del ciclo celular (Diehl *et al.*, 1998; Welcker, 2003; Leis *et al.*, 2002).

Otro mecanismo de regulación que ejerce GSK-3 $\beta$  se produce mediante su interacción con otras proteínas, siendo la vía de Wnt una de las más estudiadas. En condiciones basales GSK-3 $\beta$  forma parte de un complejo proteico que facilita la acción de GSK-3 $\beta$  sobre  $\beta$ -catenina. La estimulación con Wnt favorece la disrupción de este complejo, reduciendo la actividad de GSK-3 $\beta$  sobre  $\beta$ -catenina, lo cual resulta en un aumento en la estabilidad de ésta última y translocación nuclear favoreciendo genes que promueven la proliferación (Patel y Woodgett, 2004; Chen *et al.*, 2010; Curtin y Lorenzi, 2010).

Aberraciones en la actividad de GSK-3 $\beta$  se han implicado en muchas patologías, por ejemplo se ha visto que la supresión de su actividad por forforilación se asocia a la progresión del cáncer (McCubrey *et al.*, 2015). La sobreexpresión de GSK-3 $\beta$  puede promover la formación de tumores, como sucede en varios tipos de cáncer incluyendo: colon, hígado, ovario y páncreas (Luo, 2009; Shakoori *et al.*, 2005; Ougolkov *et al.*, 2005). En tumores de CCR humano, se ha descrito la acumulación nuclear de GSK-3 $\beta$  total y se ha propuesto su inhibición para un posible tratamiento terapéutico (Bilim *et al.*, 2009). Por otro parte, el estudio en líneas celulares de CCR de la forma fosforilada de GSK-3 $\beta$ , revelo que está incrementada (Ho *et al.*, 2012) y el tratamiento propuesto para disminuir el tamaño de los tumores fue transfectar células de CCR con la forma constitutivamente activa de GSK-3 $\beta$  e implantarlas en tumores inducidos en ratón, dicha prueba tuvo un efecto positivo al disminuir el tamaño de los tumores. Las determinaciones realizadas en etapas tempranas de carcinogénesis renal inducida con FeNTA en nuestro laboratorio mostraron que los niveles de la forma inactiva de esta proteína están incrementadas, sin cambios en los niveles totales (Aguilar-Alonso, 2015) por lo tanto podría estar participando en el mecanismo de generación del CCR además esto nos da un indicio de su similitud con el CCR humano, sin embargo aun no se sabe su estatus en los tumores inducidos que es uno de los objetivos del presente trabajo.

## 2.6. $\beta$ -catenina

Las cateninas son una familia de proteínas citoplasmáticas que fueron originalmente identificadas por su asociación con la molécula de adhesión celular E-cadherina (Kemler, 1993; Piepenhagen y Nelson, 1993).

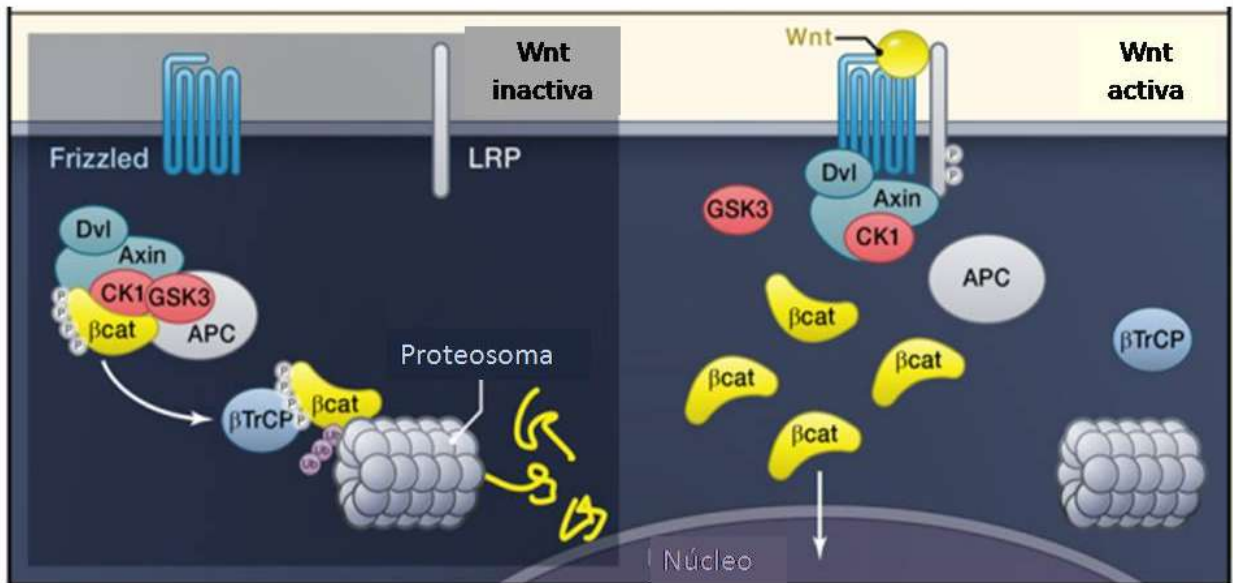
La  $\beta$ -catenina es una proteína multifuncional importante en la adhesión célula-célula y en la traducción de señales que está codificada en el gen *CTNNB1*. Esta proteína desempeña un papel crucial en la adhesión célula-célula uniendo el dominio plasmático de E-cadherina a  $\alpha$ -catenina, que ancla el complejo de adhesión al citoesqueleto de actina (Kemler, 1993; Ben-Ze'ev y Geiger, 1998). Por otro lado,  $\beta$ -catenina es un componente fundamental de la vía de señalización Wnt/Wingless (Wg), que desempeña un papel clave en una variedad de procesos de desarrollo (Cox y Peifer, 1998; Willert y Nusse, 1998).

Los niveles celulares de la proteína  $\beta$ -catenina, así como su localización subcelular, están estrictamente regulados. La transcripción del gen de  $\beta$ -catenina está regulada por varios factores de transcripción como p53 y p300. Cuando no está asociada con uniones célula-célula y la vía Wnt no está activa, la  $\beta$ -catenina se incorpora a un complejo grande de proteínas encargadas de su regulación citoplasmática (figura 8). Este complejo está formado por la proteína codificada por el gen supresor de tumores APC, la CK1 $\alpha$ , así como GSK-3 $\beta$  y la proteína axina/conductina (Behrens *et al.*, 1998; Ikeda *et al.*, 1998). La formación de este complejo resulta en la fosforilación y posterior degradación proteolítica de  $\beta$ -catenina por el sistema ubiquitin-proteosoma (Aberle *et al.*, 1997; Salomon *et al.*, 1997).

El mecanismo por el cual  $\beta$ -catenina es degradada se describe a continuación. Primero APC se une a  $\beta$ -catenina, la proteína APC se fosforila, generando un cambio conformacional que facilita esta unión. Después  $\beta$ -catenina es fosforilada inicialmente en la Ser 45 por CK1 $\alpha$  y secuencialmente por GSK-3 $\beta$  en la Thr 41, Ser 37 y Ser 33 (Taelman V, 2010). Como consecuencia de esta fosforilación  $\beta$ -catenina es poliubiquitinizada por la ubiquitina ligasa  $\beta$ -Trcp (del inglés,  *$\beta$ -transducing repeat containing protein*) y posteriormente degradada por el proteosoma (Zhou y Hung, 2005). Adicionalmente, APC evita la defosforilación de  $\beta$ -catenina mediada por la fosfatasa 2A

(PP2A), protegiendo el sitio de reconocimiento de  $\beta$ -TrCP (Hans y Nusse, 2012). La disminución de los niveles de CK1 $\alpha$  inhibe la fosforilación y degradación de  $\beta$ -catenina y provoca una anormal embriogénesis asociada con una excesiva señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (Liu *et al.*, 2002).

Existe un mecanismo de degradación de  $\beta$ -catenina diferente y que depende de la actividad del producto del gen Slah-1. Esta proteína, cuya expresión es activada por p53, interacciona con el extremo carboxilo terminal de APC y promueve la degradación de  $\beta$ -catenina independientemente de la fosforilación por GSK-3 $\beta$  y sin requerir la interacción de  $\beta$ -catenina y  $\beta$ -TrCP (Matsuzawa y Reed, 2001; Liu *et al.* 2001).



**Figura 8. Representación esquemática de la vía de señalización Wnt- $\beta$ -catenina.** Wnt se une al receptor Fzd y al co-receptor LRP5/6, lo que activa la proteína Dvl que, a su vez, inhibe al complejo APC/Axina/GSK-3 $\beta$ . Como resultado, la  $\beta$ -catenina no se degrada, se acumula y migra al núcleo. En la figura de la izquierda, se muestra que en ausencia del ligando Wnt,  $\beta$ -catenina es reclutada por el complejo APC/axina/ GSK-3 $\beta$  y fosforilada por GSK-3 $\beta$ . Una vez fosforilada,  $\beta$ -catenina es degradada en el proteosoma (Hans y Nusse, 2012).

Cuando  $\beta$ -catenina no es degradada se transloca al núcleo donde se asocia con miembros de la familia de factores de transcripción TCF/LEF (del inglés *T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor*) y estimula la transcripción de una variedad de genes, muchos de ellos implicados en la tumorigénesis, como ciclina D1 y c-myc (He *et*

*al.*, 1998; Shtutman *et al.* 1999; Tetsu y McCormick, 1999). Estos genes son responsables, respectivamente, de que las células tumorales proliferen más rápidamente y no sean susceptibles a procesos de diferenciación terminal (Van Wetering *et al.*, 2002; Tetsu y McCormick, 1999). Dada la potencial naturaleza oncogénica de las diferentes dianas del complejo  $\beta$ -catenina/TCF, la  $\beta$ -catenina es considerada un oncogén (Rubinfeld *et al.*, 1997; Nusse y Varmus, 1982).

El 85% de los casos de carcinoma colorrectal, se presentan mutaciones en el gen APC; las cuales afectan su función en el complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina. Entonces, debido a estas alteraciones genéticas,  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma en líneas celulares de cáncer colorrectal, además de que la señalización Wnt está activada constitutivamente. En el caso del CCR humano se ha encontrado la acumulación citoplasmática de  $\beta$ -catenina como un evento frecuente (Zhu *et al.*, 2000). De la misma manera en el modelo experimental de carcinogénesis renal se observa que hay un aumento en los niveles de  $\beta$ -catenina en etapas tempranas (Aguilar-Alonso, 2015) lo que sugiere su posible participación en la malignización inducida con FeNTA, pero para continuar con la caracterización y el aporte de evidencia de la similitud entre el CCR humano y el CCR inducido con FeNTA es importante conocer el estado de  $\beta$ -catenina en los tumores experimentales.



### 3. Justificación

El CCR es la enfermedad oncológica del aparato urinario más común en adultos. Se diagnostica mayoritariamente en estadios muy avanzados debido a su curso asintomático, además por sus diferentes subtipos el tratamiento se complica ya que son resistente a la quimio y radio terapia y cada subtipo tiene características moleculares distintas, a esto debe su alta tasa de mortalidad. La implementación de un modelo experimental de inducción de CCR para su estudio podría ser útil para la búsqueda de alteraciones específicas, marcadores moleculares de etapas tempranas, así como proponer y probar posibles estrategias preventivas y/o terapéuticas.

En nuestro laboratorio estamos caracterizando uno de los pocos modelos experimentales usados para el estudio CCR en ratas que es inducido con FeNTA. Es importante resaltar que al menos en la parte histológica, los tumores inducidos con FeNTA parecen ser la contraparte de CCRcc en el humano que es el subtipo más común.

Aunque en etapas tempranas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA se han encontrado alteraciones en los niveles de Akt, GSK-3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina, su comportamiento en tumores inducidos aún se desconoce. Por lo anterior, se consideró importante determinar el perfil de expresión de dichas proteínas en los tumores experimentales por medio de inmunohistoquímica, ya que permite detectar y localizar *in situ* componentes celulares y al mismo tiempo distinguir la morfología tisular. Saber la localización de las proteínas es de vital importancia ya que sus funciones pueden depender de ésta. La caracterización de estas moléculas aportará evidencias acerca de la similitud entre su comportamiento en el CCR humano y el CCR inducido en nuestro modelo. Además, esta información sería útil para profundizar en la búsqueda de marcadores moleculares de diagnóstico o blancos preventivos y/o terapéuticos.

## **4. Hipótesis**

Los niveles y localización de p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina se verán alterados en los tumores inducidos con FeNTA, como ya se ha observado en etapas tempranas del modelo. Se espera que dichas alteraciones sean similares a las descritas en el CCR humano y en etapas tempranas del modelo experimental.

## **5. Objetivo general**

- Determinar el estatus de p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina en tumores de diferente tamaño inducidos con FeNTA.

### **5.1. Objetivos particulares**

- Estandarizar en nuestro laboratorio la inmunohistoquímica.
- Establecer las condiciones en las cuales se puede realizar la determinación de p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina por medio de IHQ.
- Realizar el análisis de las proteínas de interés.
- Determinar si existe relación entre el comportamiento de estas proteínas y el tamaño del tumor.
- Comparar los resultados del modelo experimental con lo observado en CCR en humano.

## **6. Materiales y métodos**

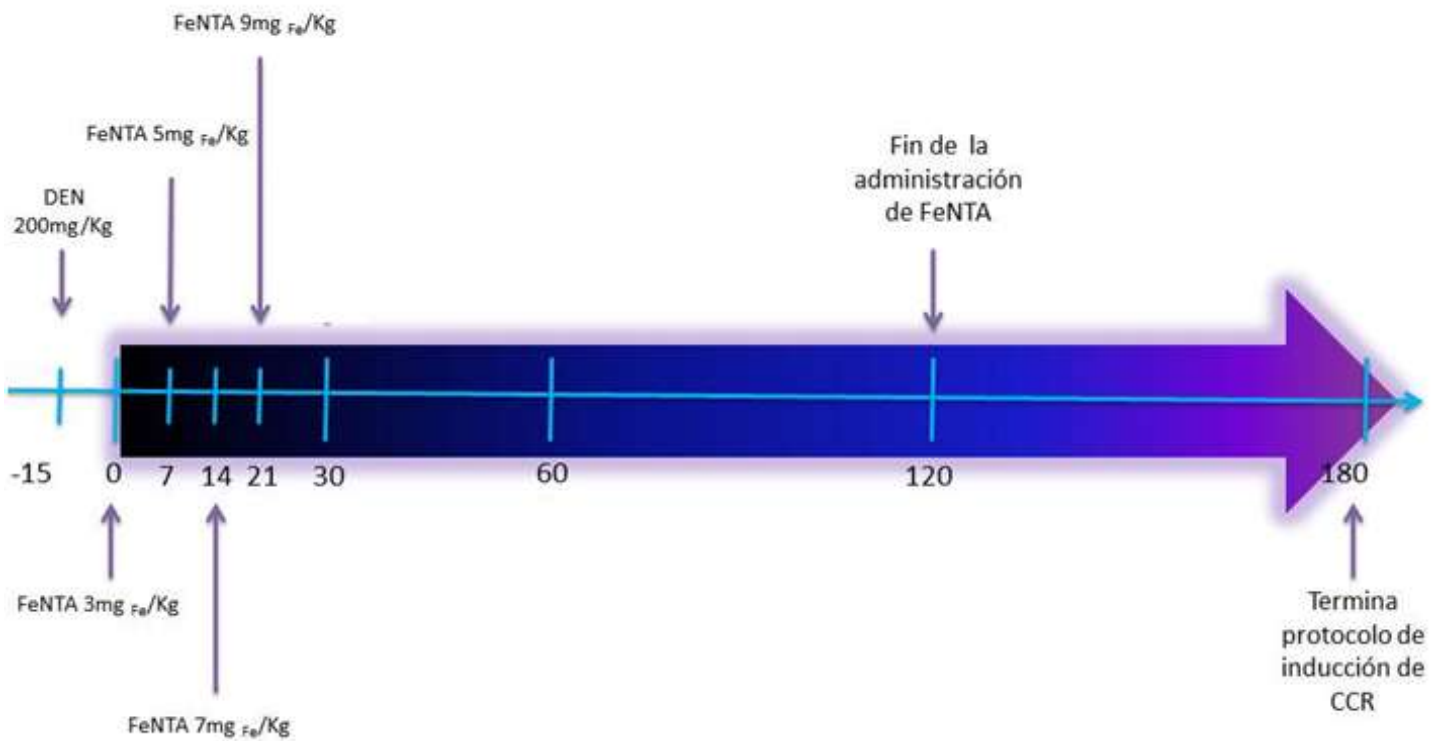
### **6.1. Reactivos**

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Aldrich, inc (St. Louis MO, EUA): Nitrato de hierro ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ), nitrilotriacetato de sodio, dietil nitrosamina (DEN), hematoxilina, Triton 100x. De J.T. Baker (Xalostoc, Edo de Mex., Mex.): xilol, etanol (al 100%), etanol (al 96%), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). La albumina de suero bovino libre de IgGs se adquirió en Jackson immuno research Lab inc (West Grove PA, USA). Los anticuerpos anti-p-Akt (sc-7985-R), anti-p-GSK-3 $\beta$  (sc-11757.R) y anti- $\beta$ -catenina (sc-7199) se obtuvieron de Santa Cruz Biotech, inc (St Cruz CA, USA). El kit de anticuerpo secundario acoplado a biotina y el kit de peroxidasa y diaminobencicina (DAB) se obtuvieron de Vector Laboratories (Orton Southgate, Peterbough, UK). El medio de montaje (organo/limonee Mount, Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA). El sedante empleado fue pentobarbital (Pet's Pharma de México, Edo. de Mex., Mex.).

### **6.2. Protocolo experimental**

El protocolo experimental de carcinogénesis se realizó como se describe en la figura 9. Se utilizaron ratas macho Wistar con peso inicial entre 50-70 g, las cuales se dividieron en dos grupos: control y con tratamiento con DEN y FeNTA (DF). Se utilizaron 6 ratas para el grupo control y 38 para el grupo DF, a las ratas control solo se les administró solución salina.

El DEN se utilizó como iniciador tumoral (Khan, Sultana, 2005) y se administró una dosis de 200 mg/kg a las ratas del grupo DF vía intraperitoneal. La preparación de la solución de DEN se realizó diluyendo el contenido del vial (990-999 mg) en 11 mL de solución salina y se ajustó el volumen a administrar según el peso de la rata.



**Figura 9.** Esquema de tratamiento para la inducción de la carcinogénesis renal por exposición a DEN y FeNTA.

Después de 15 días de la administración del DEN, se comenzó con las repetidas administraciones de FeNTA dos veces por semana con dosis que aumentaban gradualmente (3, 5, 7 y 9  $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{kg}$ .) durante un mes, después se mantuvo la dosis de 9  $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{kg}$  hasta completar los 4 meses de tratamiento, posteriormente los animales se mantuvieron sin tratamiento durante 2 meses.

El FeNTA se preparó siguiendo el método de Awai *et al.* (1979), con ligeras modificaciones (Vargas-Olvera *et al.*, 2012). El mismo día de administración, se preparó una solución de nitrato de hierro 160 mM y otra de nitrilotriacetato de sodio 320 mM, utilizando como disolvente en ambos casos una solución de bicarbonato de sodio 120 mM. Se mezclaron las 2 soluciones en proporción 1:2, quedando una concentración final de 2.98  $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}$ , se ajustó a pH 7.4 con bicarbonato de sodio.

### **6.3. Obtención y preparación de tejido renal.**

Al final del protocolo las ratas se anestesiaron con pentobarbital (0.025 g/kg) y el riñón izquierdo se perfundió con una solución Krebs Ringer y EDTA 250 mM, para lo cual se empleó un catéter semirrígido para canular la arteria renal y se pasó un volumen promedio de 40 mL con flujo constante de 2.2 cc/min con ayuda de una bomba peristáltica. Posteriormente se perfundieron con formalina para fijarlos, se escindieron y se conservaron en formalina. Los tumores obtenidos se clasificaron de acuerdo a su tamaño, dicha clasificación se muestra en la Tabla 1.

El siguiente paso fue la inclusión de los tejidos en parafina, previa deshidratación con concentraciones crecientes de alcohol (50%,70%, 80%, 96% y 100%) y xilol (50% EtOH , 100%), utilizando un procesador automático de tejidos.

Para incluir las muestras en parafina, se utilizaron “piezas metálicas deslizables” que se amoldan al tamaño del riñón, donde se vertió inicialmente una pequeña cantidad de parafina líquida que sirvió de base para colocar la muestra, en este caso el riñón. Durante este proceso se acomodó el riñón de acuerdo a la posición deseada en el corte para las laminillas, esto se realizó de la manera más rápida y continua posible, después se vertió el resto de la parafina para completar el bloque. Una vez que se observó la formación de una película sólida en la superficie se dejó enfriar para que fuera fácilmente desmontable.

Ya obtenido el bloque, se realizaron cortes transversales continuos de 5 micras de espesor utilizando un micrótopo de rotación marca Leica®. Los cortes se colocaron en portaobjetos, previamente impregnados con poli-lisina, para asegurar la adhesión de los mismos.

### **6.4. Inmunohistoquímica**

Este estudio se utilizó el método indirecto de inmunoperoxidasa. Para esto se seleccionaron 3 muestras control y al menos 3 muestras de cada tamaño de tumor (Tabla 1) y se siguió el mismo tratamiento para la determinación de cada proteína.

**Tabla 1.** Clasificación de tumores inducidos en el protocolo experimental de acuerdo a su tamaño y número de tumores analizados.

<b>Tamaño</b>	<b>Medida (mm)</b>	<b>n</b>
<b>P+</b>	<0.5	17
<b>T1</b>	0.5-1.5	13
<b>T2</b>	1.6-3.0	6
<b>T3</b>	3.1-5.0	5
<b>T4</b>	5.1-8.0	4
<b>T5</b>	8.1<	3
<b>Total</b>		48

Las laminillas con secciones de tejido se desparafinarán y se rehidrataron utilizando procedimientos estándar, comenzando con xilol, concentraciones decrecientes de etanol con agua y por último agua. La exposición de antígeno se realizó con solución de citrato de sodio a un pH de 6 y calentando en el microondas. Después de este procedimiento, se extinguió la actividad de peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3%. A continuación se utilizó albúmina libre de IgG para evitar las uniones inespecíficas. Finalmente las muestras se incubaron con los siguientes anticuerpos policlonales obtenidos de conejo:

- Anti-p-Akt S473
- Anti-p-GSK-3 $\beta$  S9
- Anti- $\beta$ -catenina

Las muestras se incubaron dentro de cámaras húmedas durante toda la noche a 4°C con 100  $\mu$ L anticuerpo primario por tejido, a una dilución de 1:250 preparada en una solución de Tritón al 3% y PBS. Asimismo, se realizaron controles negativos de la técnica en los cuales no se agregó el anticuerpo primario.

Posteriormente, se realizaron los lavados del anticuerpo 1° con PBS, después de los cuales se añadieron 100  $\mu$ L de el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a biotina. La

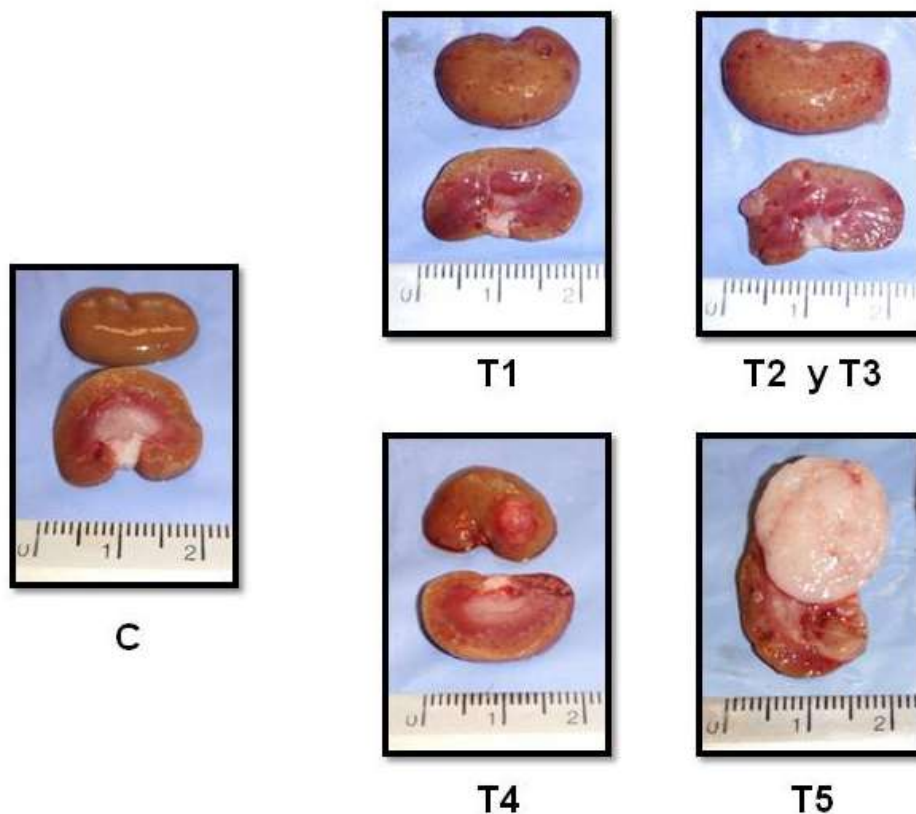
inmunorreacción se reveló adicionando una solución de DAB como cromógeno y peróxido de hidrógeno como substrato de la peroxidasa. Se contrastó la tinción con hematoxilina y posteriormente las muestras se deshidrataron nuevamente pasando las laminillas por concentraciones crecientes de etanol hasta xilol y montaron con medio de montaje.

Las laminillas fueron analizadas en un microscopio Nikon E600 acoplado a una cámara digital sight D5-5M para evaluar el perfil de expresión en el tejido renal.

## 7. Resultados y discusión

### 7.1. Análisis macroscópico de los tumores inducidos con FeNTA

Al finalizar el protocolo de carcinogénesis los animales se sacrificaron, se extirparon y analizaron macroscópicamente los riñones, los cuales ya presentaban la formación evidente de tumores. En la figura 10 se presentan fotografías representativas de tumores renales experimentales de distintos tamaños, descritos previamente en la Tabla 1. Los riñones además presentan daño considerable, áreas amarillas o cafés y zonas pálidas; con mucha frecuencia formaciones quísticas, necrosis y hemorragia.



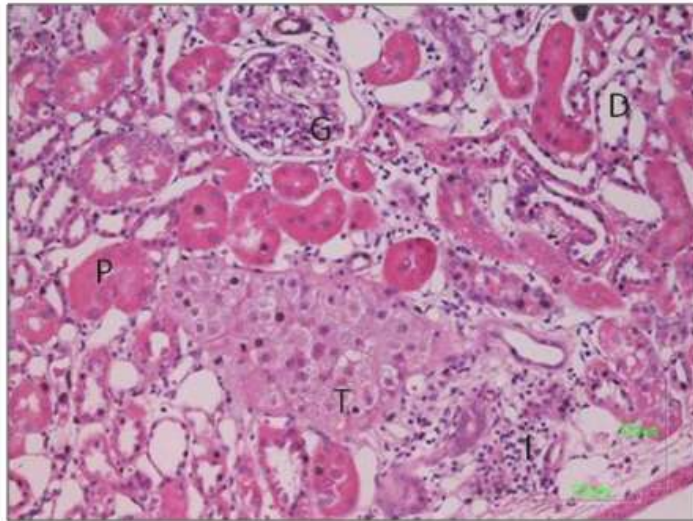
**Figura 10. Fotografías representativas de muestras obtenidas al final del protocolo experimental.** Se observan cambios macroscópicos de los riñones expuestos al carcinógeno con respecto al control (C) y se muestran ejemplos de tumores de distinto tamaño del grupo DF, T1 (0.5-1.5 mm), T2 (1.6-3.0 mm), T3 (3.1-5.0 mm), T4 (5.1-8.0 mm) y T5 (8.0mm<).



La incidencia en la formación de tumores fue del 86.66 %, de los cuales el 19.23 % fue unilateral y el 80.76% bilateral. Athar e Iqbal (1998) informaron una incidencia de 71% usando un esquema similar al de nuestro laboratorio (Athar e Iqbal, 1998). La diferencia en el número de tumores obtenidos puede deberse a múltiples factores, como distintas dosis y frecuencia de administración del carcinógeno y el tiempo que trascorra desde la exposición al FeNTA. Lo que quiere decir que al aumentar el lapso de tiempo desde la primera administración hasta el sacrificio de los animales será mayor la incidencia de formación de tumores. La incidencia en el primer protocolo realizado en el laboratorio fue de 68%, en el protocolo estudiado en el presente trabajo aumentó el porcentaje probablemente por los ajustes que se realizaron de acuerdo a la experiencia previa, estos cambios se mantendrán para protocolos posteriores y así mantener el número de tumores obtenidos.

## **7.2. Análisis microscópico e inmunohistoquímica**

Los tumores fueron todos corticales. El aspecto microscópico del tejido renal del grupo DF es característico de la exposición a un agente tóxico se observan dañadas las estructuras de la corteza renal, en la figura 11 se distinguen los túbulos proximales (P) y distales (D) y el glomérulo (G), la diferencian los túbulos proximales de los distales por el grosor de las células epiteliales que son más gruesas en los proximales, mientras que las células de los túbulos distales son alargadas, por su parte el glomérulo es un conglomerado de células más pequeñas, además en la microfotografía se observa un tumor P+ e infiltraciones de leucocitarias.



**Figura 11.** Microfotografía representativa de las estructuras de la nefrona en tejido tratado con DF, donde G es el glomérulo, P túbulo proximal y D túbulo distal. Al centro se encuentra un tumor pequeño (T) e infiltraciones de leucocitos (I) H&E (200x).

Se estudiaron un total de 48 tumores para el análisis de cada proteína (Tabla 1), cabe mencionar que para cada determinación se usaron las mismas muestras. Se encontró que la morfología histológica de los tumores cambiaba conforme aumentaba su tamaño, lo cual sugería que podría tratarse de otros subtipos histológicos de CCR. Las diferencias histológicas observadas podrían deberse al grado de avance Fuhrman de cada tumor, este sistema de clasificación se basa en la morfología nuclear de las células, el grado I se refiere a tumores con menos avance, donde la apariencia nuclear es igual al de las células no tumorales y el grado IV es el más avanzado donde las características celulares y nucleares han cambiado completamente, como se muestra en la figura 2 y el la figura sup 1. Interesantemente, la apariencia de los tumores experimentales de mayor tamaño es similar a aquella que presentan tumores de CCRcc humano con mayor grado Fuhrman. Estas observaciones indican, como ya hemos informado anteriormente, todos los tumores son de CCRcc (Vargas-Olvera, 2009). Esto es importante ya que el CCRcc representa el 80% de los casos de CCR humano (Banumathy y Cairns, 2010; Mancini *et.al.*, 2008 Linehan *et al.*, 2003; Thomas y Ossama, 2008; Delahunt *et al.*, 2013),

Para la definición del comportamiento de cada proteína por IHQ, distinguimos dos tipos de tinción: de nula a tenue y moderada a intensa, como en cada caso fue evidente la

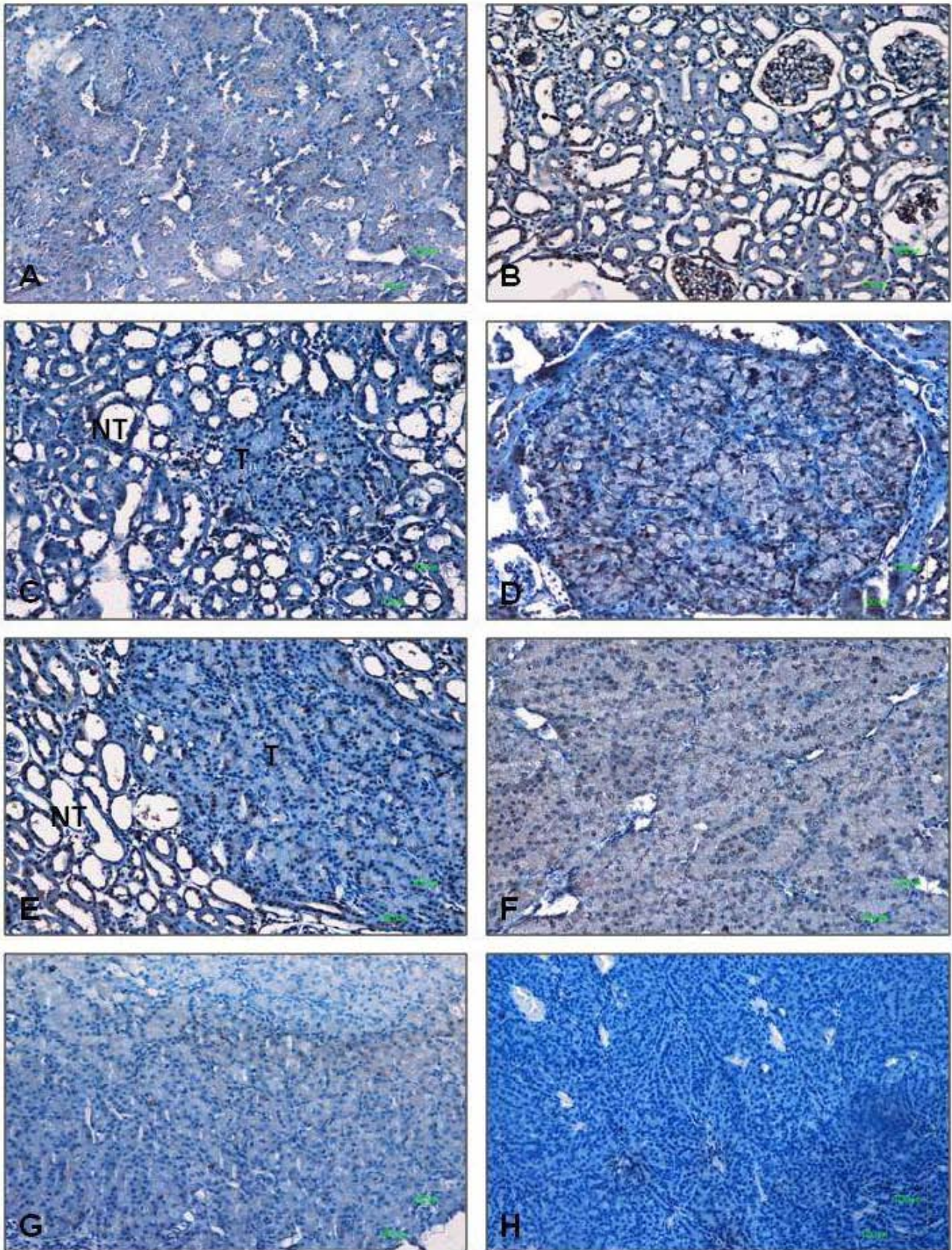
diferencia entre control, tejido tratado y tumores, no fue necesario el uso de ningún software de análisis especial.

### **7.2.1. p-Akt**

En el modelo proponemos la participación de la vía de señalización Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenina como un posible mecanismo de carcinogénesis de CCR. El iniciador de esta vía que responde al estímulo de factores de crecimiento es Akt una cinasa de residuos de serina y treonina, que fosforila distintas proteínas involucradas en varios procesos celulares como regulación del ciclo celular, de la apoptosis y del metabolismo (Ingerborg *et al.*, 2011). La activación de Akt esta mediada por fosfatidil-inositoles, cuando esta proteína es fosforilada secuencialmente en la treonina 308 y la serina 473 se activa completamente (Blankenship *et al.*, 1999), por lo que determinamos el estatus de p-Akt (ser 475),

En la figura 12 se observa que en el tejido renal no tumoral de muestras del grupo DF se tiene una mayor tinción en comparación con el tejido del grupo control, por su parte, en la mayoría de los tumores aumenta el número de células que mostraron este incremento fue mayor. Así mismo, la tinción es mayor en los tumores de menor tamaño (P+ a T3) que en los tumores T4 y T5 inclusive éste último pareciera ser negativo, esto puede deberse a que los niveles son muy bajos para que puedan ser detectados. Lo anterior indica que las alteraciones en los niveles de p-Akt disminuyen conforme aumenta el tamaño del tumor. Otra observación importante es la localización nuclear de Akt en los tumores de menor tamaño, mientras que en los T3 y T4 fue principalmente citoplasmática.





**Figura 12. Microfotografías representativas de la IHQ de p-Akt** en A) tejido sano de rata control, B) tejido no tumoral adyacente del grupo DF, C) tumor P+ (T) y



tejido no tumoral adyacente (NT), D) tumor T1, E) Tumor T2 y tejido adyacente (NT), F) tumor T3, G) Tumor T4 y H) Tumor T5 (x200).

En el modelo no se sabe qué es lo que está activando a Akt, sin embargo en el CCR humano se ha descrito que uno de los principales causantes del incremento de su forma activa es la disminución PTEN (Hager *et al.*, 2009; Hara *et al.*, 2005; Horiguchi *et al.*, 2003), una fosfatasa lipídica que desfosforila a PIP3 (Maechama y Dixon, 1998), por lo tanto, PTEN regula negativamente Akt (Panigrahi *et al.*, 2004) lo que suprime el crecimiento celular tumoral, regula la invasión y metástasis a través de las interacciones con las adhesiones focales, por lo que PTEN se considera un supresor tumoral. El estatus de PTEN no se ha estudiado en el modelo, por lo tanto sería importante estudiar el estatus de PTEN en el modelo para profundizar en las causas relacionadas con el incremento de los niveles de p-Akt en distintas etapas de la carcinogenesis renal inducida con FeNTA.

Además, Akt en el citoplasma tiene múltiples sustratos involucrados en la regulación del ciclo celular (vía MDM2/p21/p27/ciclina D), la inhibición de la subfamilia de proteínas pro-apoptóticas BH3 (vía BAD/FKHR/procaspasa 9) y la invasión de las células (vía NF- $\kappa$ B), entre otras. Previamente en nuestro laboratorio se ha analizado, a 1 y 2 meses del protocolo así como en tumores, p21<sup>Cip</sup>, encontrando alterado sus niveles (Navarro-García, 2013) y su localización (datos no publicados, figura sup 3) así como el aumento de la ciclina D1 (Aguilar-Alonso, 2010), por otra parte se ha encontrado que a 1 y 2 meses del tratamiento la actividad de NF- $\kappa$ B esta incrementada y disminuye al final del protocolo, sin cambios en los niveles proteicos (Pariente-Pérez, 2012). Esto sugiere que Akt puede estar mediando la localización de p21<sup>Cip</sup> y activando NF- $\kappa$ B como posible mecanismo de carcinogénesis en el modelo experimental con FeNTA.

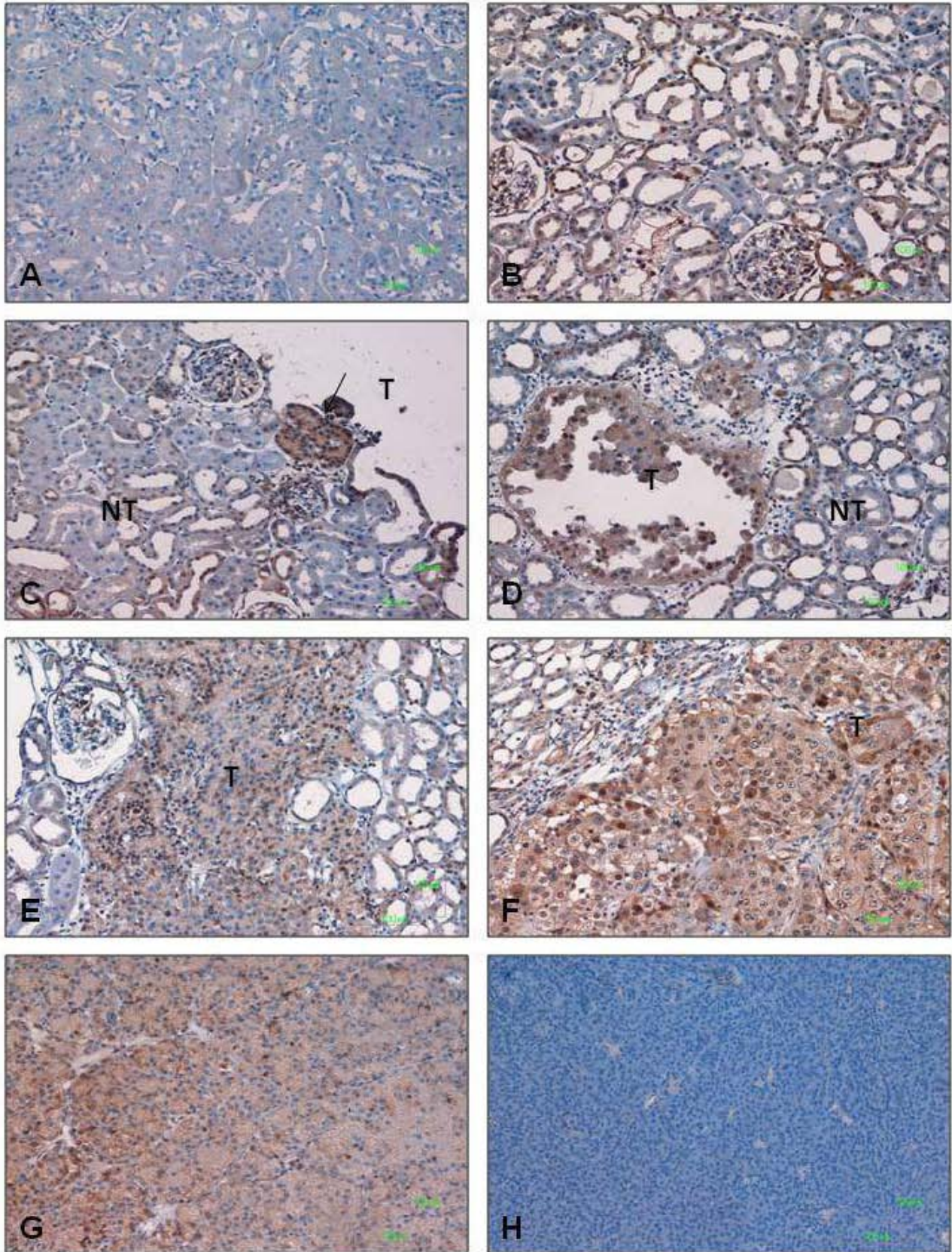
Se ha descrito la presencia de la forma activa de Akt en núcleo de las células tumorales ha sido reportada desde 1990 (Martelli *et al.*, 2012). De hecho, algunos de sus sustratos se localizan en el núcleo como la familia de factores de transcripción FoxO (Arden y Biggs, 2002; Calna y Brunet, 2000) o el coactivador transcripcional p300 (Huang y Chen, 2005). En el caso de la familia FoxO, la fosforilación de uno de sus miembros, FoxO3, mediada por Akt resulta en su exclusión nuclear por lo que se impide la transcripción de sus genes blanco que promueven la apoptosis e impiden la progresión del ciclo celular (Calna y Brunet, 2000). También Akt regula el paso de fase G0 a G1 por medio de la inhibición de la

expresión de p27<sup>Kip1</sup>, que es una proteína inhibidora de ciclinas (Collado *et al.*, 2000), por lo tanto éstos podrían ser mecanismos por los cuales p-Akt en núcleo estaría promoviendo la proliferación de las células tumorales. Por otra parte, el coactivador transcripcional p300 tiene actividad de acetiltransferasa la cual se activa al ser fosforilada por Akt, una vez activa controla la expresión de varios genes que participan en la proliferación y embriogénesis (Huang y Chen, 2005), por lo tanto la proliferación de la células tumorales puede estar siendo estimulada por dicho mecanismo.

El comportamiento de p-Akt en los tumores sugiere que esta proteína podría jugar un papel importante en etapas tempranas de la carcinogénesis. Lo anterior se refuerza por las observaciones reportadas previamente por Pacheco-Bernal en 2014, quien encontró que después de 1 y 2 meses de exposición al carcinógeno FeNTA existe un marcado aumento en los niveles de p-Akt. Este hallazgo se podría usarse como un marcador de diagnóstico en estadios tempranos, así como un blanco preventivo del CCR.

### **7.2.2. p-GSK-3 $\beta$**

La GSK-3 $\beta$  es una cinasa de residuos de serina y treonina, que entre sus funciones está la fosforilación de  $\beta$ -catenina para su posterior degradación (He *et al.*, 1998; Shtutman *et al.*, 1999). Esta cinasa es inactivada por su fosforilación en S9 por Akt (McCubrey *et al.*, 2015). En etapas tempranas de la carcinogénesis del modelo experimental la forma inactiva de GSK-3 $\beta$  ya se ha descrito que está incrementada (Aguilar-Alonso, 2015) lo que podría ser uno de los mecanismos relacionados con la activación de Akt involucrados en la malignización de células renales inducida con FeNTA.



**Figura 13. Microfotografías representativas de la IHQ de p-GSK-3β.** A) Tejido sano control, B) tejido no tumoral tratado con FeNTA, C) tumor P+ (T) localizado en el

borde del riñón y tejido adyacente no tumoral (NT), D) tumor T1 (T) y tejido adyacente no tumoral (NT), E) tumor T2, F) tumor T3, G) tumor T4 y H) tumor T5 (x200).

En el presente trabajo se observó un incremento de p-GSK-3 $\beta$  en tumores así como en el tejido adyacente, que relaciona con el comportamiento de Akt. Es decir, en los tumores de menor tamaño (P+ a T2) la tinción se observa con mayor intensidad, la que disminuyó en los tumores T3 y T4 y en el caso de los tumores T5 la tinción es aún menor que en los demás tumores (Figura 13). Además la localización fue mayoritariamente citoplasmática y con frecuencia nuclear en las células tumorales. Esto sugiere que la inhibición de GSK-3 $\beta$  puede estar participando en el desarrollo y crecimiento de los tumores en estadios tempranos de la carcinogénesis y su comportamiento cambia de acuerdo a las necesidades del tumor, por ejemplo la invasión de otros tejidos.

Entre los mecanismos por los cuales la inactivación de GSK-3 $\beta$  puede estar mediando la proliferación se encuentran la inhibición de la fosforilación de la ciclina D1, esta proteína permite el avance del ciclo celular y cuando GSK-3 $\beta$  la fosforila es exportada del núcleo y degrada vía proteosoma, si esto no ocurre el ciclo celular avanza promoviendo la proliferación. Liu y colaboradores (2007) reportaron el incremento de ciclina D1 en tumores de CCR inducidos solamente con FeNTA (Liu *et al.*, 2007), por otra parte en nuestro laboratorio también se ha detectado el mismo tipo de alteración en los tumores renales inducidos con DEN y FeNTA (datos no publicados), lo cual refuerza la posible participación de la forma inactiva de GSK-3 $\beta$  en la proliferación, supervivencia y tumorigénesis en el modelo experimental.

Además de ser sustrato de Akt, GSK-3 $\beta$  puede ser fosforilada en la S9 por otras proteínas como PKA, PKC, TNF- $\alpha$ , p90 y p70 (Sutherland, 2011; Patel y Woodgett, 2008). En etapas tempranas del modelo se han encontrado los niveles de PKCz aumentados (Curiel-Muñiz, 2014), por lo tanto esta proteína también podría estar participando en la inactivación de GSK-3 $\beta$ .

En líneas celulares de CCR se ha estudiado la regulación de GSK3- $\beta$  via PI3K/Akt, donde se encontró que esta vía está inactiva. Se observó que un inhibidor de PI3K provocó el aumento de GSK-3 $\beta$  activa y la disminución de la proliferación *in vitro* (Ho MY *et al.*, 2012). En el mismo trabajo, las células de CCR de ratón se transfectaron con GSK-3 $\beta$  activa constitutiva y se implantaron en tumores renales en ratones, esto derivó en la disminución



del crecimiento de los tumores *in vivo*. Bilim y colaboradores (2009) describieron el aumento de los niveles de GSK-3 $\beta$  y su acumulación en el núcleo, por lo que propusieron la inhibición de la cinasa como una estrategia terapéutica para CCR, sin embargo no se analizó si se encuentra inactiva (Bilim *et al.*, 2009). Esto se contrapone a lo encontrado por Ho y colaboradores (2012) en líneas celulares y los resultados del presente estudio, por lo que es necesario determinar qué forma de GSK-3 $\beta$  es la predomina en el CCR humano, además de hacer más relevantes nuestros resultados ya que nosotros sí demostramos que p-GSK-3 $\beta$  es la que aumenta en tumores experimentales de CCR. Por lo tanto el incremento de p-GSK-3 $\beta$  podría ser uno de los mecanismos responsables del desarrollo de CCR inducido con FeNTA. Aunado a esto, el antecedente del aumento en los niveles de la forma inhibida de esta cinasa en etapas tempranas de carcinogenesis (Aguilar-Alonso, 2015), apoya nuestra hipótesis de que esta forma inactiva es uno de varios mecanismos que contribuyen al desarrollo del CCR inducido con FeNTA, aumento que podría estar siendo regulado por Akt.

### **7.2.3. $\beta$ -catenina**

El siguiente elemento de la vía de señalización estudiada es  $\beta$ -catenina, el incremento en sus niveles citoplasmáticos lleva a la inducción de la proliferación y supervivencia celular mediante la activación de los factores de transcripción de la familia TEF/LEF (Geiger *et al.*, 1995) que promueven la transcripción de genes como ciclina D1 y c-myc (Tetsu y McCormick, 1999). Aunque Liu y colaboradores (2007) ya describieron el aumento de  $\beta$ -catenina en los tumores inducidos con FeNTA estos autores utilizaron esquemas de tratamiento distintos al implementado en el presente trabajo, por lo que se considera importante determinar el estatus de esta proteína en los tumores de obtenidos en nuestro modelo.

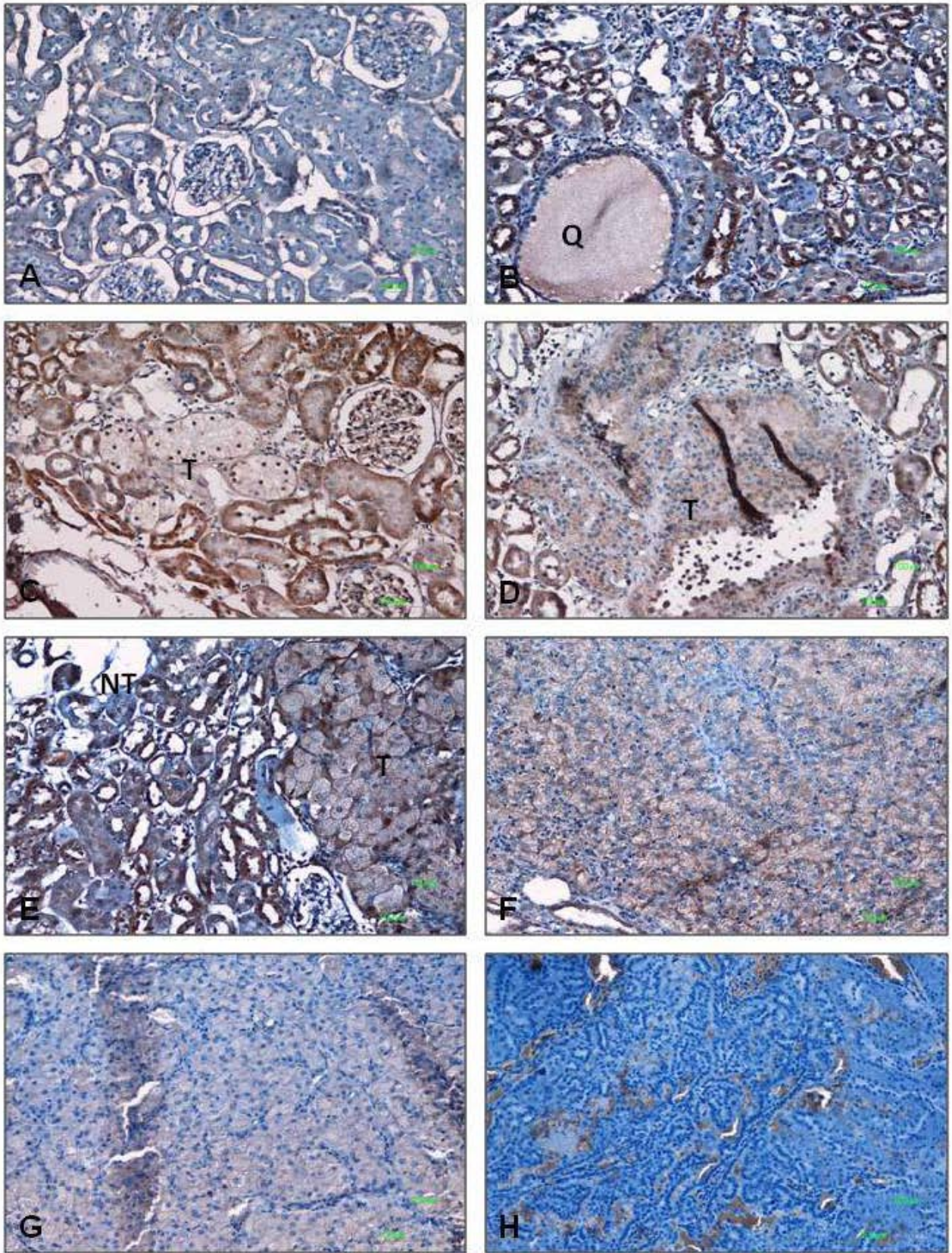
Las microfotografías de la IHQ se presentan en la figura 14. Los resultados obtenidos indican que  $\beta$ -catenina aumenta en los tumores así en el tejido adyacente no tumoral, pero el número de células positivas es mayor en el tejido tumoral comparado con el tejido sano, a diferencia del tejido de ratas control. En el caso de los tumores P+ a T3 la tinción se observa con mayor intensidad que en los tumores T4 y T5, tal como el comportamiento de

p-Akt y p-GSK-3 $\beta$ . Mientras que en el tejido control la localización fue membranal, en los tumores fue citosólica y en algunas células nuclear.

Debido a que todas las determinaciones realizadas en tumores T5 fueron negativas y con la finalidad de eliminar posibles falsos negativos se realizó la IHQ de ERK, la cual es una proteína abundante en varios tipos de cáncer incluyendo el CCR humano (Huang *et al.*, 2005; Ambrose *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009). Como se observa en la figura sup 2 la tinción de ERK en los T5 fue muy positiva, lo que indica que los resultados de p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina en los tumores T5 obtenidos en este trabajo son confiables.

Cuando GSK-3 $\beta$  fosforila a  $\beta$ -catenina promueve su degradación por el proteosoma evitando que se transloque al núcleo por su acumulación citoplasmica y promueva la trascricion de genes pro carcinógenos como la ciclina D1 y c-myc, entonces el incremento citoplasmático observado de  $\beta$ -catenina en las células tumorales puede relacionarse a que GSK-3 $\beta$  está siendo inactivada posiblemente por Akt. Otra de las proteínas del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina estudiadas en etapas tempranas de la carcinogénesis del protocolo es APC (Aguilar-Alonso, 2015) , esta proteína está disminuida, esto tambien podría estar contribuyendosa la acumulación de  $\beta$ -catenina al no estarse degradando, lo que se está realizando con arduos esfuerzos en nuestro laboratorio.





**Figura 14. Microfotografías representativas de la IHQ de  $\beta$ -catenina en** A) tejido control, B) tejido no tumoral del grupo DF también se observa un quiste (Q), C)

tumor P+ y tejido no tumoral adyacente, D) tumor T1, E) tumor T2 y tejido no tumoral (NT), F) tumor T3, G) tumor T4 y H) tumor T5 (x200).

En el CCR humano se ha encontrado el aumento de  $\beta$ -catenina al igual que Akt y GSK-3 $\beta$ . Se sabe que en el CCRcc  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma pero no frecuentemente en el núcleo, además su mutación no es común (Kime *et al.*, 2000). En un estudio realizado por Shimazui y colaboradores (1997) encontraron que solo el 24.5% de los tumores de CCR analizados muestran la expresión anormal de  $\beta$ -catenina estos datos se relacionaron con el estadio de avance tumoral sin embargo el resultado no fue significativo (Shimazui *et al.*, 1997). En líneas celulares de CCRcc se ha observado que VHL está involucrado en la regulación de  $\beta$ -catenina, ya que en la células que no expresan pVHL hay acumulación citoplasmática de  $\beta$ -catenina y en células transfectadas con VHL los niveles de  $\beta$ -catenina regresan a la normalidad, sin embargo no se sabe el mecanismo por el cual lo hace (Peruzzi *et al.* 2006; Laure y Delmas, 2006). Posiblemente el incremento de  $\beta$ -catenina este mediado por múltiples mecanismos incluyendo la frecuente disminución de VHL, lo cual debería ser estudiado en nuestro modelo de CCR.

Los resultados sugieren la probable intervención de las proteínas estudiadas en la carcinogénesis debido a la alteración en su localización y niveles en las etapas tempranas y en los tumores de menor tamaño, sin embargo es necesario determinar el papel específico que juegan en cada etapa de la carcinogénesis en este modelo de CCR, para posteriormente sugerir y probar posibles agentes terapéuticos. Por lo anterior sería muy útil contar con una línea celular derivada de los tumores de CCR inducidos con FeNTA, trabajo que se esta realizando actualmente en el laboratorio.

Los hallazgos del presente trabajo exponen otras semejanzas, a las ya previamente descritas (Vargas-Olvera, 2009,2012; Aguilar-Alonso, 2015), entre los tumores de CCR provocados con FeNTA y su contraparte humana. También las observaciones del reciente trabajo sugieren que la cascada de señalización Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenina podría tener un papel importante en la carcinogénesis renal inducida con FeNTA. Así como en el mantenimiento tumoral de neoplasias en estadios poco avanzados, pero no en lo tumores más avanzados.

## 8. Conclusiones

- Los resultados revelaron un incremento en los niveles de p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina en los tumores de menor tamaño (P+ a T3) con respecto al tejido renal de ratas control, como ya se había descrito en etapas tempranas de exposición a FeNTA. Mientras que en los tumores T5 fue negativa para las tres proteínas.
- Principalmente la localización subcelular de p-Akt en los tumores de menor tamaño fue nuclear y en los de mayor tamaño citoplasmática; por su parte p-GSK-3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina mayoritariamente se localizaron en el citoplasma de los tumores de menor estadio.
- El patrón de expresión en las proteínas en los tumores más avanzados sugiere que las alteraciones observadas son principalmente de promoción y mantenimiento de los tumores pequeños.
- Las alteraciones observadas sugieren que probablemente la activación de la vía de señalización Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenina puede ser uno de los mecanismos de carcinogénesis renal inducida por FeNTA.
- El perfil de expresión de las proteínas estudiadas es semejante con lo descrito en el CCR humano, lo que aporta aún más evidencia de la equivalencia entre el CCR inducido con FeNTA y el CCR humano.



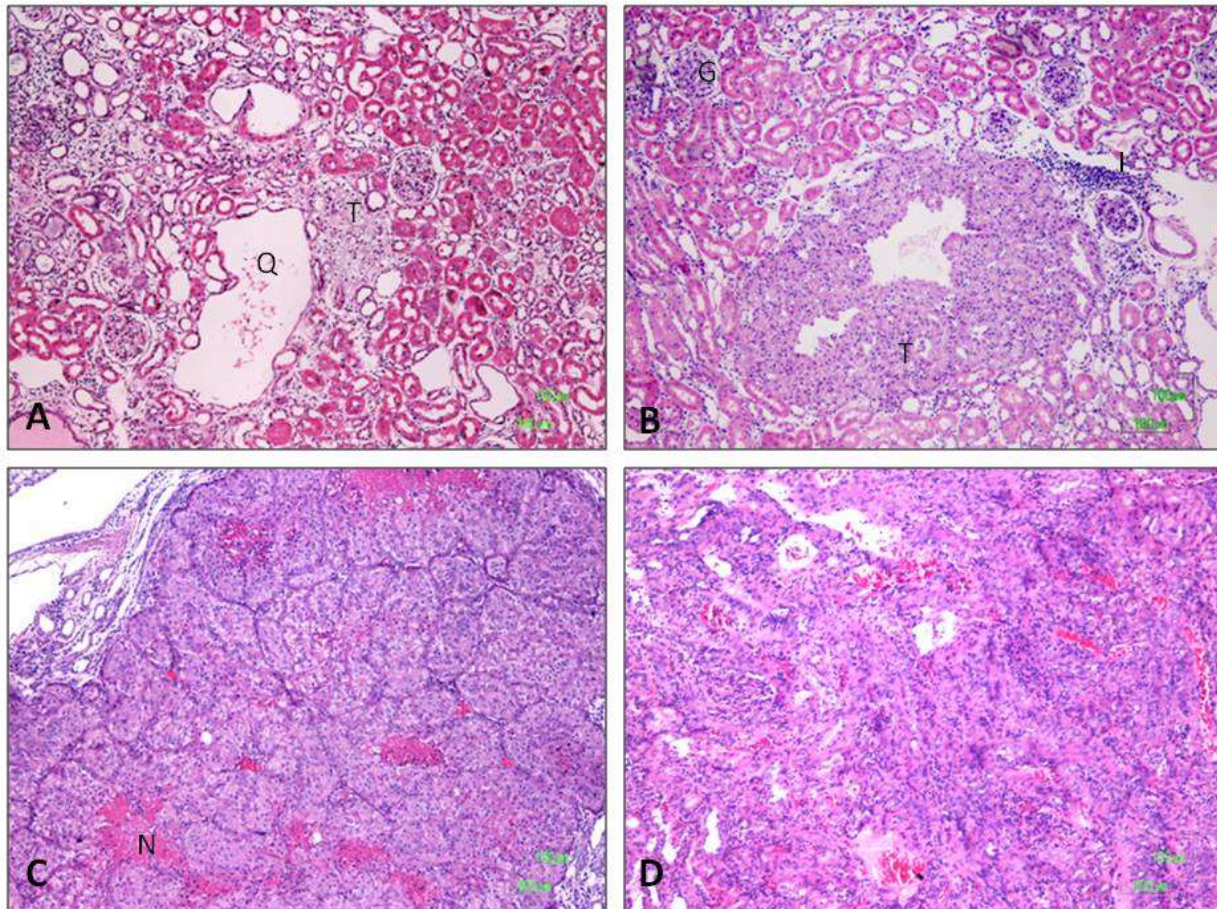
## 9. Perspectivas

Para continuar la caracterización del modelo de carcinogénesis inducida con FeNTA sería interesante estudiar el estado de las proteínas río arriba de la activación de Akt como PTEN y PI3K; otras proteínas intermediarias en la inhibición de GSK-3 $\beta$  y otras que forman parte del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina, así como de VHL. Para comprobar la interacción entre cada proteína podría realizarse co-inmunoprecipitación o localización por inmunofluorescencia de muestras de diferentes tiempos del protocolo. Una vez establecida la línea celular determinar el papel específico que tiene cada proteína y así poder proponer posibles biomarcadores de prevención y/o blancos terapéuticos para el CCR.

## 10. Anexos

### 10.1. Figuras suplementarias

#### 10.1.1. Grado nuclear Fuhrman

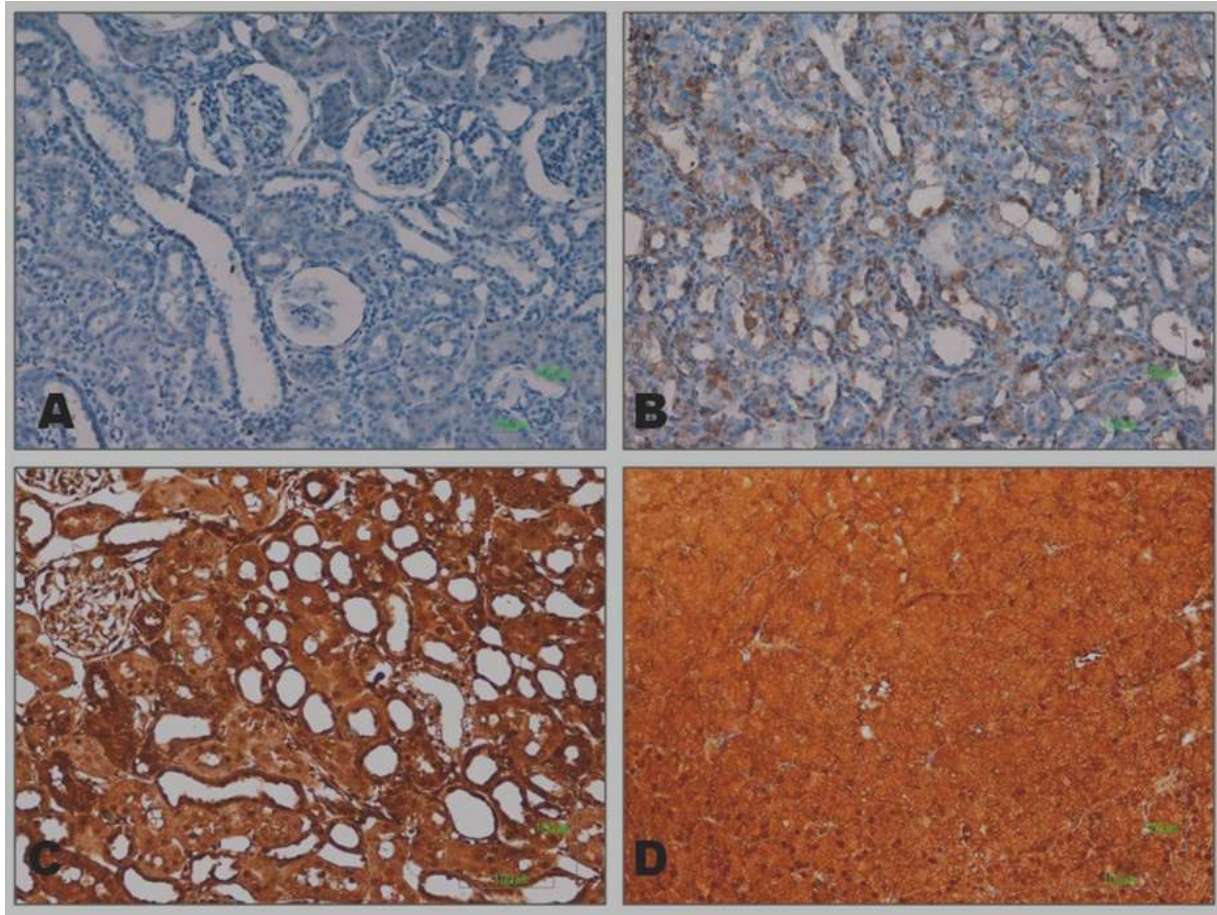


**Figura sup. 1.** Ejemplos de los diferentes grados Fuhrman en CCRcc de rata. A) grado I, el tumor (T) se localiza al centro de la microfotografía, a un costado de un quiste (Q). B) Grado II localizamos al tumor al centro, además podemos observar una zona de infiltración de leucocitos (I). C) Grado III un tumor de mayor tamaño y zonas de necrosis (N). D) Grado VI las células que forman al tumor ahora tienen una apariencia más alargada a la que llaman sarcomatoide, regularmente este tipo se observa en los tumores T5 inducidos y en el humano se relaciona con un mal pronóstico, H&E (100x).



## 10.1.2. Prueba de permeabilidad del tejido

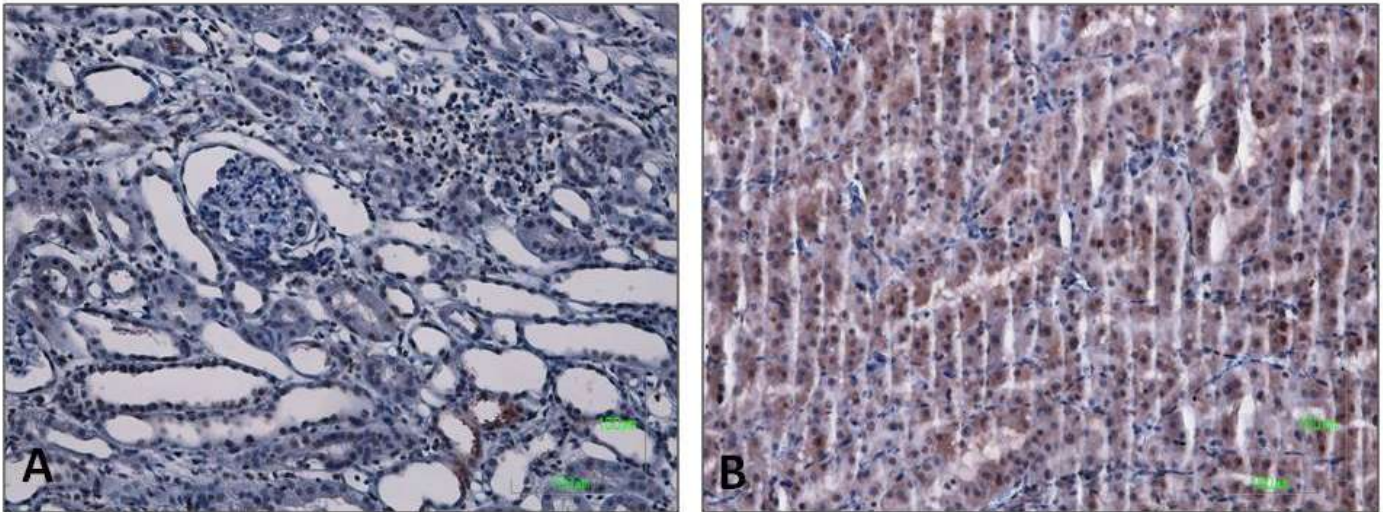
Controles positivos con ERK



**Figura sup. 2.** Microfotografía de diferentes muestras usando ERK como control positivo para probar la permeación del tejido. La fotografía A) es el control negativo (sin anticuerpo primario), B) tejido sano sin tratamiento con FeNTA, C) tejido adyacente a un tumor y D) tejido tumoral.



### 10.1.3. Determinación de la localización de p21 por IHQ



**Figura sup. 3.** Microfotografías de la IHQ de p21. En la fotografía A se presenta tejido renal no tumoral tratado con FeNTA, donde la localización es nuclear, en cambio en la imagen B observamos tejido tumoral donde la localización de p21 es citoplasmática y minoritariamente nuclear (x200).

## 10.2. Preparación de soluciones

### 10.2.1. Preparación de nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)

La solución de FeNTA se prepara en el momento del ensayo.

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

Pesar 0.6462g de nitrato de hierro y aforar con 10 mL de  $\text{NaHCO}_3$  120mM

- Nitrilotriacetato de sodio  $\text{Na}_2\text{NTA}$  320mM.

Pesar 1.8809 g de  $\text{Na}_2\text{NTA}$  en 25 mL de solución de  $\text{NaHCO}_3$  120mM.

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

- Bicarbonato de sodio  $\text{NaHCO}_3$  120 mM (Vehículo del carcinógeno).

Pesar 0.504 g de  $\text{NaHCO}_3$  y aforar con 50 mL de agua desionizada.

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

### 10.2.2. Perfusión

- Solución Krebs Ringer

Componentes	
Cloruro de Sodio (NaCl)	128 mM
Cloruro de Potasio (KCl)	5 mM
Fosfato monobásico de potasio anhidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.3 mM
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )	1.3 mM
Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )	2.1 mM
Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	14 mM

<b>Glucosa</b>	10 mM
<b>Albumina sérica bovina (ABS)</b>	1 mg/mL

Adicionar todos los componentes indicados, ajustar el pH a 7.4 y aforar con agua destilada.

- EDTA 250 mM

Pesar 23.27 g de EDTA y aforar con 250 mL de agua destilada. Agregar 0.5 mL de EDTA 250 mM por cada 200 mL de solución Krebs-Ringer.

### 10.3. Protocolo detallado de Inmunohistoquímica

- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1x).

<b>Componentes</b>	
<b>Cloruro de sodio (NaCl)</b>	136.9 mM
<b>Cloruro de potasio (KCl)</b>	2.68 mM
<b>Fosfato monobásico de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</b>	10.14 mM
<b>Fosfato dibásico de potasio anhidro (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	1.76 mM

- Citrato de sodio 0.01 M

Se prepara el mismo día de uso y lo necesario para cubrir completamente las laminillas, para un litro pesar 2.941 g de citrato de sodio dihidratado, disolver en agua desionizada en un volumen cercano a un litro y ajustar el pH 6 con HCl concentrado, aforar a 1 L.

- Anticuerpo primario

Preparación del Ac en PBS y Tritón 3% aprox 100 µL para cada tejido.

Se reserva el volumen adecuado para el control negativo.

- Anticuerpo secundario

De acuerdo al Kit IgG rabbit para peroxidasa.

Preparación

Para 1 mL.

- Ac 2° .....5µL (0.5%)

- Suero de bloqueo.....15µL (1.5%)

- PBS.....800µL

- Complejo avidina-biotina

Preparación.

- Avidina:.....20 µL (2%)

- Biotina:.....20 µL (2%)

- PBS.....960µL

- Diaminobencidina (DAB)

Para 2.5 mL.

Preparación

1 gota de buffer pH 7.5

2 gotas de DAB

1 gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En agua destilada

- **Protocolo**

0. 60°C 15-30 min Desparafinación

1. Rehidratación de tejidos (exponer 3 minutos en cada disolvente)

1.1. Xilol

1.2. Xilol

1.3. Etanol/Xilol 50:50

1.4. Etanol 100%

1.5. Etanol 96%

1.6. Etanol 80%

1.7. Etanol 70%

1.8. Etanol 50%

1.9. Agua destilada

## 2. Exposición de antígeno

2.1. Calentar la solución de Citrato de sodio 0.01 M pH 6 en microondas durante 5 min. Sumergir las laminillas y calentar durante 10 minutos en el microondas.

2.2. Reposar a TA 5' y repetir el paso 2.1 con solución nueva.

2.3. Dejar a TA 20'-45'

2.4. Lavado PBS 5' (x2)

## 3. Primer bloqueo

3.1. Bloquear con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en PBS durante 30'

3.2. Lavar con PBS 5' (x2)

## 4. Permeabilización de membrana

4.1. Tritón x100 0.5%

4.2. Lavar PBS 5' (x2)

## 5. Segundo Bloqueo

5.1. Delimitar el área el tejido con el lápiz de cera.

5.2. Bloquear con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%- Albúmina 5% en PBS, 30'

## 6. Anticuerpo primario

6.1. Añadir el Ac primario preparado en Tritón 3%-PBS incubar a 4°C x 24 horas.

6.2. Esperar a que las laminillas estén a TA.

6.3. Lavar con PBS 5' (x2).

## 7. Anticuerpo secundario

7.1. Ac 2° 1:100 x 2 horas a TA

7.2. Lavar PBS 5' (x2)

## 8. Complejo Avidina-biotina

8.1. Se prepara 30' antes de las 2 horas de incubación del Ac 2°, e incuba a TA.

8.2. Agregar e incubar 1 hora

8.3. Lavar PBS 5' (x2)

## 9. Revelado

9.1. Cubrir la muestra con DAB, incubar el tiempo necesario a TA. Hasta que el color aparezca.

9.2. Remover el excedente con H<sub>2</sub>O destilada

9.3. Realizar contraste con hematoxilina

9.4. Lavar con agua destilada en la caja copli.

9.5. Lavar con agua de la llave

9.6. Cubrir con Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> segundos

9.10. Regresar al agua destilada.

## 10. Deshidratación

10.1. Comenzando de agua a xilol

10.2. Agregar el medio de montaje y colocar el cubreobjetos.

## 11. Bibliografía

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert, Kemler R (1997).  **$\beta$ -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway.** EMBO J. 16:3797–3804

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.

Aguilar-Alonso FA (2015). **Evolución del comportamiento de c-Jun y moléculas relacionadas en distintas etapas de la carcinogénesis renal inducida con nitrilotriacetato de hierro.** Tesis para obtener el grado de Doctor en ciencias, Facultad de Química, UNAM.

Aguilar-Alonso FA, Solano JD, Vargas-Olvera CY, Pacheco-Bernal I, Pariente-Pérez TO, Ibarra-Rubio ME (2015). **MAPKs' status at early stages of renal carcinogenesis and tumors induced by ferric nitrilotriacetate.** Mol Cell Biochem. 404:161-70

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 kinases 1/2, p38 delta/gamma, cyclooxygenase-2 down regulation and translocation of apoptosis-inducing factor.** Mol Pharmacol. 69:1879-1890

Ames BN, Gold LS (1992). **Animal cancer tests and cancer prevention.** J Natl Cancer Inst Monogr. 12:125-32.

Arden KC, Biggs WH (2002). **Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling.** Arch Biochem Biophys. 403:292–298.

Armin MB, Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, de-Peralta Venturina M, Deshpande A, Menon M (2002). **Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases.** Am J Surg Pathol. 26: 281–91.

Astoul E, Watton S, Cantrell D (1999). **The dynamics of protein kinase B regulation during B cell antigen receptor engagement.** J Cell Biol. 145:1511–1520

Athar M, Iqbal M (1998). **Ferric nitrilotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat implications for the involvement oxidative stress.** Carcinogenesis. 22:1133-1139

Awai M, Narasaki M, Yamanoi Y, Seno S (1979). **Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis.** Am J Pathol. 95:663-73

Banumathy G, Cairns P (2010). **Signaling pathways in renal cell carcinoma.** Cancer Biol Ther. 10:658–664.

Barre B, Perkins ND (2010). **Phosphorylation of the p52 NF-kappaB subunit.** Cell Cycle. 9:4774-4775

Bayascas JR(2010). **PDK1: the major transducer of PI 3-kinase actions.** Curr Top Microbiol. 346:9–29

Behrens J, Jerchow BA, WurteleM, GrimmJ, AsbrandC, WirtzR, KuhIM, WedlichD, Birchmeier W. (1998). **Functional interaction of an axin homolog, conductin, with b -catenin, APC and GSK3b.** Science. 280:596–599

Ben-Ze'ev A, Geiger B (1998). **Differential molecular interactions of b-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer.** Curr Opin Cell Biol. 10:629–639.

Beurel E, Jope RS (2006). **The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways.** Prog Neurobiol. 79: 173-89

Bilim V, Ougolkov A, Yuuki K, Naito S, Kawazoe H, Muto A, Oya M, Billadeau D, Motoyama T, Tomita Y (2009). **Glycogen synthase kinase-3: a new therapeutic target in renal cell carcinoma.** Br J Cancer. 101:2005-2014

Bjorge T, Tretli S, Engeland A (2004). **Relation of height and body mass index to renal cell carcinoma in two million Norwegian men and women.** Am J Epidemiol. 160:1168-76

Blandino-Rosano M, Chen AY, Scheys JO, Alejandro EU, Gould AP, Taranukha T, Elghazi L, Cras-Meneur C, Bernal-Mizrachi E (2012). **mTORC1 signaling and regulation of pancreatic  $\beta$ -cell mass.** Cell Cycle. 11:1892–1902.

Blankenship C, Naglich JG, Whaley JM, Seizinger B, Kley N (1999). **Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity.** Oncogene. 18:1529-35.

Block K, Gorin Y, Hoover P, Williams P, Chelmicki T, Clark RA, Yoneda T, Abboud HE(2007). **NAD(P)H oxidases regulate HIF-2alpha protein expression.** J Biol Chem. 282:8019-8026

Block K, Gorin Y, New DD, Eid A, Chelmicki T, Reed A, Choudhury GG, Parekh DJ, Abboud HE (2010). **The NADPH oxidase subunit p22phox inhibits the function of the tumor suppressor protein tuberin.** Am J Pathol. 176:2447-5245.



Borgatti P, Martelli AM, Tabellini G, Bellacosa A, Capitani S, Neri LM (2003). **Threonine 308 phosphorylated form of Akt translocates to the nucleus of PC12 cells under nerve growth factor stimulation and associates with the nuclear matrix protein nucleolin.** J Cell Physiol. 196:79–88

Buttrick GJ, Wakefield JG (2008). **PI3-K and GSK-3: Akt-ing together with microtubules.** Cell Cycle. 7:2621–2625.

Cadenas E, Davies KJ (2000). **Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging.** Free Radic Biol Med. 29:222-230.

Calnan DM, Brunet A (2008). **The FoxO code.** Oncogene. 27:2276–2288

Cantley LC (2002). **The phosphoinositide 3-kinase pathway.** Science. 296:1655-1657

Caspie M, Zilberberg A, Eldar-Finkelman E, Rosin-Arbesfeld, R. (2008). **Nuclear GSK-3 $\beta$  inhibits the canonical Wnt signalling pathway in a  $\beta$ -catenin phosphorylation-independent manner.** Oncogene. 27:3546–3555

Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN (1999). **AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: Kinase Activation by Phosphoinositide-Dependent Phosphorylation.** Annu. Rev. Biochem. 68:965-1014.

Chen X, Stoeck A, Lee SJ, Shih IeM, Wang MM, Wang TL (2010). **Jagged1 expression regulated by Notch3 and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways in ovarian cancer.** Oncotarget. 1:210-218.

Cheng GZ, Zhang WZ, Wang LH (2008). **Regulation of cancer cell survival, migration, and invasion by twist: AKT2 comes to interplay.** Cancer Res. 68:957–960.

Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR (1998). **Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation.** The Biochem J. 335:1-13

Cohen P, Frame S (2001). **The renaissance of GSK3.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2:769–776

Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, Rivas C, Burgering BM, Serrano M, Lam EW (2000). **Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1.** J Biol Chem 276: 21960–68.

Cox RT, Peifer M (1998). **Wingless signaling: the inconvenient complexities of life. Curr. Biol., 8, R140–R144.** de Stanchina, E. et al. **E1A signaling to p53 involves the p19 (ARF) tumor suppressor.** Genes Dev. 12:2434–2442.

Curiel-Muñiz P (2014). **Efectos del aumento en los niveles de PKC $\zeta$  en un modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA.** Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM

Curtin JC, Lorenzi MV (2010). **Drug discovery approaches to target Wnt signaling in cancer stemcells.** *Oncotarget.* 1: 563-577.

DattaSR, DudekH, TaoX, Masters S, FuHA, GotohY, GreenbergME (1997). **Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.** *Cell.* 91:231–241.

Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, Egevad L, Algaba F, Moch H, Grignon DJ, Montironi R, Srigley JR; Members of the ISUP Renal Tumor Panel (2013). **The International Society of Urological Pathology (ISUP) Grading System for Renal Cell Carcinoma and Other Prognostic Parameters.** *Am J Surg Pathol.* 37:1490-1504

Delahunt B, Sika-Paotonu D, Bethwaite PB, McCredie MR, Martignoni G, Eble JN, Jordan TW (2007). **Fuhrman grading is not appropriate for chromophobe renal cell carcinoma.** *Am J Surg Pathol.* 31:957-60

Dhôte R, Pellicer-Coeuret M, Thiounn N, Debré B, Vidal-Trecan G (2000). **Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention.** *BJU Int.* 8: 20–27

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998). **Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.** *Genes Dev.* 12:3499-3511

Doble BW, Woodgett JR (2003). **GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase.** *J Cell Sci.* 116:1175-1186

Evans P, Halliwell B (1999). **Free radicals and hearing. Cause, consequence and criteria.** *Ann N Y Acad Sci.* 884:19-40

FengJH, TamaskovicR, YangZZ, BrazilDP, MerloA, HessD, HemmingsBA(2004). **Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation.** *J Biol Chem.* 279:35510–35517

Ficarra V, Righetti R, Martignoni G, D'Amico A, Pilloni S, Rubilotta E, Malossini G, Mobilio G (2001). **Prognostic value of renal cell carcinoma nuclear grading: multivariate analysis of 333 cases.** *Urol Int.* 67:130–4

Foltz DR, Santiago MC, Berechid BE, Nye JS (2002). **Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability.** *Curr Biol.* 12:1006-1011

Frame S, Cohen P (2001). **GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery.** *Biochem J.* 359:1–16

Franke TF (2008). **PI3K/Akt: getting it right matters.** *Oncogene.* 27:6473-88

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC (1997). **PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis.** Cell. 88:435–437

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C (1982). **Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma.** Am J Surg Pathol. 6: 655–63

G-Amlak M, Uddin S, Mahmud D, Damacela I, Lavelle D, Ahmed M, van Besien K, Wickrema A(2002). **Regulation of myeloma cell growth through Akt/Gsk3/forkhead signaling pathway.** Biochem Biophys Res Commun. 297:760- 764

Ganesamoni R, Bhattacharyya S, Kumar S, Chauhan A, Mete UK, Agarwal MM, Mavuduru R, Kaushik G, Mandal AK, Singh SK (2012). **Status of oxidative stress in patients with renal cell carcinoma.** J Urol. 187:1172-6

Geiger, B., Yehuda-Lenvenberg, S. y Bershdsky AD. (1995) **Molecular interaccions in the submembrane plaque cell-cell and cell-matrix adhesion.** Acta Ant (Basel). 154:46-62

Gregory MA, Qi Y, Hann SR (2003). **Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization.** J Biol Chem. 278:51606-12

Grimes CA, Jope RS (2001). **The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in cellular signaling.** Prog Neurobiol. 65:391–426

Guyton KZ, Kensler TW (1993).**Oxidative mechanisms in carcinogenesis.** Br Med Bull. 49:523–544

Hager M, Haufe H, Kemmerling R, Hitzl W, Mikuz G, Moser PL, Kolbitsch C (2009). **Increased activated Akt expression in renal cell carcinomas and prognosis.** J Cell Mol Med. 13:2181-2188

Hanada M, Feng JH, Hemmings A (2004).**Structure, regulation and function ofPKB/AKT — a major therapeutic target.** Biochim Biophys Acta. 1697:3–16

Hanahan D, Coussens LM (2012). **Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment.** Cancer Cell. 21:309-22

Hans C, Nusse R (2012). **Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Disease.** Cell. 149:1192-1205

Hara S, Oya M, Mizuno R, Horiguchi A (2005). **Akt activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor.** Annals of Oncology. 16:928-933

Haraguchi M, Okubo T, Miyashita Y, Miyamoto Y, Hayashi M, Crotti TN, McHugh KP, Ozawa M (2008). **Snail regulates cell-matrix adhesion by regulation of the expression of integrins and basement membrane proteins.** J Biol Chem. 283: 23514-23523.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998). **Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.** Science. 4:281:1509-12

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB (2005). **Exploiting the PI3K/Akt pathway for cancer drug discovery.** Nat Rev Drug Discov. 4:988-1004

Ho MY, Tang SJ, Chuang MJ, Cha CL, Li JY, Sun GH, Sun KH (2012). **TNF- $\alpha$  Induces Epithelial–Mesenchymal Transition of Renal Cell Carcinoma Cells via a GSK3b Dependent Mechanism.** Mol Cancer Res. 10:1109-1119

Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR (2000). **Requirement for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cell survival and NF- $\kappa$ B activation.** Nature. 406:86–90

Horiguchi A, Oya M, Uchida A, Marumo K, Murai M (2003). **Elevated Akt activation and its impact on clinicopathological features of renal cell carcinoma.** J Urol. 169:710–713

Hsieh AC, Truitt ML, Ruggero D (2011). **Oncogenic AKT activation of translation as a therapeutic target.** Br J Cancer. 105:329–336

Huang D, Ding Y, Luo WM, Bender S, Qian CN, Kort E, Zhang ZF, Vanden Beldt K, Duesbery NS, Resau JH, Teh BT (2008). **Inhibition of MAPK kinase signaling pathways are suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis in vivo.** Cancer Res. 68:81-88

Huang WC, Chen CC (2005). **Akt-phosphorylation of p300 at Ser-1834 is essential for its histone acetyltransferase and transcriptional activity.** Mol Cell Biol. 25:6592–6602

Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P(2005). **Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies.** Int Journal of Cancer. 114:101-108

Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC (2003). **Radical causes of cancer.** Nat Rev Cancer. 3:276–285

Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A(1998). **Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin and promotes GSK-3  $\beta$ -dependent phosphorylation of  $\beta$ -catenin.** EMBO J. 17:1371–1384

Ingeborg H, Emma E, Vincent E, Tavaré J (2011). **Akt signalling in health and disease.** Cell Signal. 23:1515–1527

Itoh N, Semba S, Ito M, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M (2002). **Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma.** *Cancer*. 94: 3127–3134

Jope RS, Johnson GV (2004). **The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3.** *Trends BiochemSci*. 29:95–102

Karen Block (2012). **Oxidative Stress and Redox-Signaling in Renal Cell Cancer, Emerging Research and Treatments in Renal Cell Carcinoma,** Dr. Robert Amato (Ed.), 137-155.

Kashikar ND, Zhang W, Massion PP, Gonzalez AL, Datta PK (2011). **Role of STRAP in regulating GSK3beta function and Notch3 stabilization.** *Cell Cycle*.10:1639-1654.

Keefe SM, Cohen MA, Brose MS (2010). **Targeting vascular endothelial growth factor receptor in thyroid cancer: the intracellular and extracellular implications.** *Clin. Cancer Res*. 16:778–783

Kemler R (1993). **From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion.** *Trends Genetics*. 9:317–321

Khan N, Sultana S (2005). **Chemomodulatory effect of Ficus racemosa extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats.** *Life Sci*. 77:1194-210

Kigawa J, Sato S, Shimada M, Takahashi M, Itamochi H, Kanamori Y, Terakawa N (2001). **p53 gene status and chemosensitivity in ovarian cancer.** *Hum Cell*. 14:165-71

Kim YS, Kanf YK, Kim JB, Han SA, Kim KI, Paik SR (2000). **β-catenin expression and mutational analysis in renal cell carcinomas.** *Path International*. 50:725-730

Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF Jr (1998). **The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis.** *Environ Health Perspect*. 10:289–295

Kloet DE, Burgering BM (2011). **The PKB/FOXO switch in aging and cancer .***Biochim Biophys Acta*. 1813:1926–1937

Kopper L, Tímár J (2006). **Genomics of renal cell cancer – does it provide breakthrough?.***Pathol Oncol Res*. 12:5–11

Kumar, V. Abbas A. Fausto N, Aster J (2010). **Patología estructural y funcional.** Robbins y Cotran. Elsevier. España. 278

Kurose K, Zhou XP, Araki T, Cannistra SA, Maher ER, Eng C (2001). **Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not**

**associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas.** Am J Pathol. 158:2097–2106

Larue L, Delmas V (2006). **The Wnt/beta-catenin pathway in melanoma.** Frontiers in Biosc. 11:733-742

Lee HJ, Parker JC, Scott CS (2009). **Phosphorylation of ERK1/2 and prognosis of clear cell renal cell carcinoma.** Urol. 73:394-399

Leininger GM, Backus C, Uhler MD, Lentz SI, Feldman EL(2004). **Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt effectors mediate insulin-like growth factor-I neuroprotection in dorsal root ganglia neurons.** FASEB J. 18:1544–1546

Leis H, Segrelles C, Ruiz S, Santos M, Paramio JM (2002). **Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3beta during mouse skin tumorigenesis.** Mol Carcinog. 35:180-185

Linehan WM, Walther MM, Zbar B (2003). **The genetic basis of cancer of the kidney.** J Urol. 170:2163–2172

Liu C, Li Y, Semenov C (2002). **Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism.** Cell. 108:837-847

Liu J, Brown RE (2011) **Morphoproteomics demonstrates activation of mammalian target of rapamycin pathway in papillary thyroid carcinomas with nuclear translocation of mTOR in aggressive histological variants.** Mod Pathol. 24:1553–1559

Liu Y, Shang D, Akatsuk 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 ptpcr1 protein tyrosine phosphatase to active  $\beta$ -catenin pathway.** Ame J Path. 6:1978-1989

Liu, J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, White RL, Matsunami N (2001). **Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein.** Mol Cell. 7:927-36

Los M, Maddika S, Erb B, Schulze-Osthoff K (2009). **Switching Akt: from survival signaling to deadly response.** Bioessays. 31:492–495

Luo J (2009). **Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy.** Cancer Lett. 273: 194–200

Luo W, Peterson A, Garcia BA, Coombs G, Kofahl B, Heinrich R, Shabanowitz J, Hunt DF, Yost HJ, Virshup DM (2007). **Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex.** EMBO J. 26:1511-21

Maehama T, Dixon JE (1998). **The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate.** J Biol Chem. 273:13375–13378

Mancini V, Battaglia M, Ditunno P, Palazzo S, Lastilla G, Montironi R, Bettocchi C, Cavalcanti E, Ranieri E, Selvaggi FP (2008). **Current insights in renal cell pathology,** Urol Oncol. 26:225-238

Manning BD, Cantley LC (2007). **AKT/PKB signaling: navigating downstream.** Cell. 129:1261–1274

Martelli AM, Evangelisti C, Chappell W, Abrams SL, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Nicoletti F, Libra M, Ruvolo V, Ruvolo P, Kempf CR, Steelman LS, McCubrey JA (2011). **Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway.** Leukemia. 25:1064–1079

Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, Evangelisti C (2012). **The emerging multiple roles of nuclear Akt.** Biochim Biophys Acta. 1823:2168–2178

Masure S, Haefner B, Wesselink JJ, Hoefnagel E, Mortier E, Verhasselt P, Tuytelaars A, Gordon R, Richardson A (1999). **Molecular cloning, expression and characterization of the human serine/threonine kinase Akt-3.** Eur J Biochem. 265: 353–360

Matsuzawa SI, Reed JC (2001). **Siah-1, SIP and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses.** Mol Cell. 7:915-26

McCubrey J, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Sokolosky M, Abrams SL, Montalto G, D'Assoro AB, Libra M, Nicoletti F, Maestro R, Basecke J, Rakus D, Gizak A, Demidenko ZN, Cocco L, Martelli AM, Cervello M (2015). **GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer.** Oncotarget. 5:2881-2911

McLaughlin JK, Chow WH, Mandel JS, Mellempgaard A, McCredie M, Lindblad P, Schlehofer B, Pommer W, Niwa S, Adami HO (1995). **International renal-cell cancer study. VIII. Role of diuretics other anti-hypertensive medications and hypertension.** Int J Cancer. 63:216-21

Meares GP, Zmijewska AA, Jope RS (2007). **HSP105 interacts with GRP78 and GSK3 and promotes ER stress-induced caspase-3 activation.** Cell Signal. 20:347-58

Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M, Hemmings BA (1997). **Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B $\beta$ .** J Biol Chem. 272:30491–30497

Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D, Rickman BH, Rogers AB, Moroski-Erkul CA, McFaline JL, Schauer DB, Dedon PC, Fox JG, Samson LD (2008). **DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice.** J Clin Invest. 118:2516–2525

Michael A, Pandha HS (2003). **Renal-cell carcinoma: tumour markers, T-cell epitopes, and potential for new therapies.** Lancet Oncol. 4:215-23

Mishra R (2010). **Glycogensynthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer?.** Molr Cancer. 9:144

Mistafa O, Hogberg J, Stenius U (2008). **Statins and ATP regulate nuclear pAkt via the P2X7 purinergic receptor in epithelial cells.**Biochem Biophys Res Commun. 365:131–136

Monzón OG, Mora-Padilla E, Torres-Tovar L, Dary-Gutierrez L (2011). **Bases moleculares del cáncer.** Repertorio de Medicina y Cirugía. 20:4

Navarro-García, Rocío (2013). **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,

Nicholson KM, Anderson NG (2002). **The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy.** Cell. Signal. 14:381-395

Nishida Y. (1999) **Structure and function of “free-ironion” in biological system and their model compounds.** Recent Res Devel Pure Appl Chem. 3:103-122

Nusse R, Varmus HE (1982). **Many tumors induced by the mouse mammary tumor irus contain a provirus integrated in the same region of the host genome.** Cell. 31:99-109

Oren M (2003). **Decision making by p53: life, death and cancer.** Cell Death Differ. 10:31–442

Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, Urrutia RA, Billadeau DD (2005). **Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells.** Cancer Res. 65: 2076-2081

Ouyang YB, Zhang XH, He QP, Wang GX, Siesjo BK, Hu BR (2000). **Differential phosphorylation at Ser473 and Thr308 of Akt-1 in rat brain following hypoglycemic coma.** Brain Res. 87:6191–195

Ozer E, Yorukoglu K, Sagol O, Demirel D, Tuzel E, Kirkali Z (2002). **Prognostic significance of nuclear morphometry in renal cell carcinoma.** BJU Int. 90: 20–25



Pacheco-Bernal I(2014). **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.

Panigrahi AR, Pinder SE, Chan SY, Paish EC, Robertson JF, Ellis IO (2004). **The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome.** J Pathol. 204:93–100

Pap M, Cooper GM (2002). **Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt/glycogensynthasekinase3 $\beta$  signaling pathway.**Mol Cell Biol.22:578–586

Pariante-Pérez TO(2012). **Participación de NF- $\kappa$ B en la carcinogénesis del nitrilotriacetato de Hierro (FeNTA) y efecto de un extracto de semilla de tamarindo (EST).** Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas .Facultad de Química, UNAM

Patel S, Woodgett (2008). **Glycogen synthase kinase-3 and cancer: good cop, bad cop?** Cancer Cell. 14:351-353

Peruzzi B, Athauda G, Bottaro DP (2006). **The von Hippel–Lindau tumor suppressor gene product represses oncogenic  $\beta$ -catenin signaling in renal carcinoma cells.** Proc Nat Acad Sci. 103:14531-6

Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ, Arnold A (1999). **The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation.** Endocr Rev. 20:501–534

Piepenhagen P, Nelson W (1993). **Defining E-cadherin-associated protein complexes in epithelial cells: plakoglobin, b- and g-catenin are distinct components.** J Cell Sci. 104: 751–762

Plas DR, Thompson CB (2005). **Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving.** Oncogene. 24:7435–7442

Polakis P (1999). **The oncogenic activation of beta-catenin.** Curr Opin Genet Dev. 9:15-21

Raimondi C, Falasca M (2011).**Targeting PDK1 in cancer,** Curr MedChem. 18:2763–2769

Rangel-Gómez AT (2011). **Comportamiento de la proteína cinasa C E (PKCE) en una etapa temprana del modelo de carcinogénesis renal por FeNTA.** Tesis de licenciatura en Química Farmacéutico Biológica, Facultas de Química, UNAM

Ridge CA, Pua BB, Madoff DC (2014). **Epidemiology and staging of renal cell carcinoma**. *Semin Intervent Radiol*. 31:3–8

Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, Burch H, Bernet V, Burman KD, Kohn LD, Saji M (2001). **Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma**. *Cancer Res*. 61: 6105–6111

Romashkova JA, Makarov SS (1999). **NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling**. *Nature*. 401:86-90

Rossig L, Badorff C, Holzmann Y, Zeiher AM, Dimmeler S (2002). **Glycogen synthase kinase-3 couples AKT-dependent signaling to the regulation of p21Cip1 degradation**. *J Biol Chem*. 277: 9684-9689

Roux-Leclercq N, Karakiewicz PI, Trinh QD, Ficarra V, Cindolo L, de la Taille A, Tostain J, Zigeuner R, Mejean A, Patard JJ (2007). **Prognostic ability of simplified nuclear grading of renal cell carcinoma**. *Cancer*. 109: 868–74

Rubin P (2003). **Oncología Clínica**, 8va edición. Elsevier Science. España, 32

Rubinfeld, P, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P (1997). **Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines**. *Science*. 275:1790-2

Sale EM, Sale GJ (2008). **Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting**. *Cell. Mol Life Sci*. 65:113–127

Salomon D, Sacco PA, Roy SG, Simchal, Johnson KR, Wheelock MJ, Ben-Ze'ev A (1997). **Regulation of b-catenin levels and localization by overexpression of plakoglobin and inhibition of the ubiquitin-proteasome system**. *J Cell Biol*. 139: 1325–1335

Sanchez JF, Sniderhan LF, Williamson AL, Fan S, Chakraborty-Sett S, Maggirwar SB, (2003). **Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -mediated apoptosis of primary cortical astrocytes involves inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B signaling**, *Mol Cell Biol*. 23:4649–4662

Schlessinger J (2000). **Cell signaling by receptor tyrosine kinases**. *Cell*. 103:211-225

Schulte-Hermann R, Timmermann-Trosiener I, Barthel G, Bursch W (1990). **DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion**. *Cancer Res*. 50:5127–5135

Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM (2010). **Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress**. *Mol Cell*. 40:310–322

Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, Modarressi MH, Billadeau DD, Mai M, Takahashi Y, Minamoto T (2005). **Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer:**

**its association with tumor cell survival and proliferation.** Biochem Biophys Res Commun. 334:1365-1373

Shimazui T, Bringuier PP, van Berkel H, Ruijter E, Akaza H, Debruyne FM, Oosterwijk E, Schalken JA (1997). **Decreased expression of alpha-catenin is associated with poor prognosis of patients with localized renal cell carcinoma.** Int J Cancer. 74:523-8

Shtutman M, Zhurinsky J, Simchal, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A (1999). **The cyclin D1 gene is a target of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway.** Proc Natl Acad Sci USA. 96:5522-7

Sutherland C (2011). **What are the bona fide GSK3 substrates?** Int J Alzheimers Disease. 1-23

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

Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec JL, Fuentealba LC, Vorwald PP, Gumper I, Sabatini DD, De Robertis EM (2010). **Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes.** Cell. 143:1136-48

Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y (2006). **Suppression of tumor growth by intratumoral injection of short hairpin RNA-expressing plasmid DNA targeting beta-catenin or hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ .** J Control Release. 116:90-5

Tetsu O, McCormick F (1999).  **$\beta$ -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells.** Nature. 398:422-426

Thomas J, Ossama T (2008). **Recent advances in the diagnosis of renal cell carcinoma.** Diag. Hist. 14:157-163

Toker A, Newton AC (2000). **Cellular signaling: pivoting around PDK1.** Cell. 103:185-188

Toyokuni S (1996). **Iron-Induced Carcinogenesis: The Role Of Redox Regulation.** Free Rad Biol & Medi. 20:553-566

Toyokuni S (2014). **Iron and thiols as two major players in carcinogenesis: friends or foes?** F in Pharm. 5:1-11

Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G (2011). **FoxO transcription factors; regulation by AKT and 14-3-3 proteins.** Biochim. Biophys. Acta. 1813:1938-1945

van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H (2002). **The beta-catenin/TCF-4**

**complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells.** Cell 111:241-250

Vargas-Olvera CY (2009). **Efecto de un extracto de semillas de tamarindo (EST) sobre el desarrollo de cáncer inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).** Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM

Vargas-Olvera CY, Solano JD, 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 tamarind seed extract against acute nephrotoxicity and carcinogenesis.** Mol Chem. 369:105-117

Vignais PV (2002). **The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism.** Cell Mol Life Sci. 59:428-1459

Vogt PK, Gymnopoulos M, Hart JR (2009). **PI3-kinase and cancer: changing accents.** Curr Opin Genet Dev. 19:12-17

Wang Z, Smith KS, Murphy M, Piloto O, Somerville TC, Cleary ML(2008). **Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy.** Nature. 455:1205-1209

Welcker M, Singer J, Loeb KR, Grim J, Bloecher A, Gurien-West M, Clurman BE, Roberts JM(2003). **Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation.** Mol Cell. 12:381-392

Willert K, Nusse R (1998). **b-catenin: a key mediator of Wnt signaling.** Curr Opin Genet Dev. 8:95–102

Woodgett JR (2001). **Judging a protein by more than its name: GSK-3.** Sci STKE 100:1-11

Yook JI, Li XY, Ota I, Hu C, Kim HS, Kim NH, Cha SY, Ryu JK, Choi YJ, Kim J, Fearon ER, Weiss SJ (2006). **A Wnt- Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells.** Nat Cell Biol. 8:1398-1406

Yuan JM, Castela JE, Gago-Dominguez M, Yu MC, Ross RK (1998). **Tobacco use in relation to renal cell carcinoma.** Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev. 7:429-33

Yuan TL, Cantley LC (2008). **PI3K pathway alterations in cancer: variation on a theme.** Oncogene. 27:5497-5510

Zacchia M, Vilasi A, Capasso A, Morelli F, De Vita F, Capasso G (2011). **Genomic and proteomic approaches to renal cell carcinoma.** J Nephrol. 24:155–164

Zhou BP, Hung MC (2005). **Wnt, hedgehog and snail: sister pathways that control by GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -Trcp in the regulation of metastasis.** Cell Cycle. 4:772-6

Zhu X, Kanai Y, Saito A, Kondo Y, Hirohashi S (2000). **Aberrant expression of h-catenin and mutation of exon 3 of the h-catenin gene in renal and urothelial carcinomas.** Pathol Int. 50:945–52

Zoncu R, Efeyan D, Sabatini M (2011). **mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing.** Nat Rev Mol Cell Biol. 12:21–35