



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTATUS DE LA VÍA AKT/TSC2/mTORC1 EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
CARCINOGENESIS RENAL INDUCIDA CON FeNTA.

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
IGNACIO PACHECO BERNAL

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO FACULTAD DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO FACULTAD DE QUÍMICA
DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO. MAYO DE 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la **Dra. María Elena Ibarra Rubio** en el laboratorio 120 del edificio F del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM.

Investigación realizada gracias al financiamiento por parte del programa **UNAM-DGAPA-PAPIIT** con los proyectos No. IN-221313 e IN228716, así como de la Facultad de Química bajo el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (**PAIP**) No. 5000-9109.

Durante los estudios de Maestría el sustentante gozó de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, **CONACyT** (549544) y del financiamiento para la asistencia a un congreso nacional (SMB, 2014) por parte del Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP).

Se reconoce la colaboración y asesoría técnica del M. en C. José Dolores Solano Becerra, Técnico Académico del laboratorio 120. Asimismo, se agradece al personal de la Unidad de Experimentación Animal, especialmente a M.V.Z. Lucia Macías Rosales, por su indispensable contribución en el cuidado y manejo de los animales.

Se agradecen los valiosos comentarios y observaciones del comité tutor que asesoró el desarrollo de este trabajo, así como de los miembros del jurado asignado para la revisión de la presente tesis.

Comité tutor:

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño, Facultad de Química-UNAM,
Dra. Gloria Gutiérrez Venegas, Facultad de Odontología-UNAM,
Dra. María Elena Ibarra Rubio, Facultad de Química-UNAM,

Jurado:

PRESIDENTE Dra. Victoria Chagoya de Sánchez,
VOCAL Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez,
VOCAL Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz,
VOCAL Dra. Ana María Salazar Martínez,
SECRETARIO Dra. Marcela Lizano Soberón.

ABREVIATURAS

4EBP1	Proteína de unión al factor eucariote de inicio de la traducción 4E
Akt/PKB	Proteína cinasa B
CCR	Carcinoma de Células Renales
CCRcc	Carcinoma de Células Renales de células claras
DEN	<i>N</i> -Dietilnitrosamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EE	Error Estándar
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FeNTA	Nitrilotriacetato de Hierro
GAP	Proteína activadora de GTPasa
GSH	Glutación
HIF	Factor inducible por hipoxia
mTOR	Proteína blanco de Rapamicina en Mamíferos
mTORC1	Complejo 1 de mTOR
mTORC2	Complejo 2 de mTOR
OGG1	8-oxoguanina DNA glicosilasa
p70S6K1	Cinasa beta 1 de la proteína ribosomal S6
p-Akt	Akt fosforilada en S473
p-mTOR	mTOR fosforilada en S2448
p-TSC2	TSC2 fosforilada en T1462
Raptor	Proteína regulatoria asociada a mTOR
Rheb	Homólogo de Ras enriquecido en cerebro
Rictor	Compañero de mTOR insensible a rapamicina

SFB	Suero Fetal Bovino
SOD	Superóxido dismutasa
t-Akt	Akt total
t-mTOR	mTOR total
TSC2	Complejo 2 de esclerosis tuberosa
t-TSC2	TSC2 total
URD	Unidades Relativas de Densitometría
WB	Western Blot
γ -GTP	γ -Glutamil Transpeptidasa

ÍNDICE

1 RESUMEN.....	1
2 INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Cáncer.....	3
2.2 Carcinoma de células renales (CCR).....	5
2.3 Nitrotriacetato de hierro (FeNTA) como modelo de estudio del CCR.....	7
2.4 Akt/ Proteína cinasa B (PKB) y CCR.....	11
2.5 Vía Akt/TSC2/mTORC1.....	13
2.5.1 TSC2.....	14
2.5.2 mTOR.....	14
2.6 TSC2, mTOR y CCR.....	17
3 JUSTIFICACIÓN.....	19
4 HIPÓTESIS.....	21
5 OBJETIVOS.....	21
5.1 Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos particulares.....	21
6 MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
6.1 Protocolo de tratamiento con FeNTA.....	22
6.2 Preparación y administración de <i>N</i> -dietilnitrosamina (DEN).....	24
6.3 Preparación y administración del nitrotriacetato de hierro (FeNTA).....	24
6.4 Métodos.....	25
6.4.1 Niveles de TSC2, mTOR y sus formas fosforiladas mediante Western blot (WB).....	25
6.4.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	26

6.4.3 Electroforesis y transferencia	26
6.4.4 Detección de las proteínas de interés	26
7 RESULTADOS	29
7.1 Apariencia macroscópica de riñones.....	29
7.2 Condiciones para la determinación en riñón de proteínas de alto peso molecular mediante Western Blot (WB).....	30
7.3 Niveles de t-TSC2 y p-TSC2	30
7.4 Niveles de t-mTOR y p-mTOR	34
8 DISCUSIÓN.....	37
9 CONCLUSIONES	44
10 PERSPECTIVAS	44
11 ANEXOS.....	45
11.1 Preparación de nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).....	45
11.2 Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	45
11.3 Electroforesis.....	47
11.3.1 Preparación de los geles para electroforesis	47
11.3.2 Preparación de las muestras	48
11.4 Transferencia a membrana de fluoruro de polivinilo (PVDF).....	49
11.5 Detección de proteínas	50
11.6 Revelado de las placas de rayos X	51
11.7 Revelado en el fotodocumentador.....	51
12 REFERENCIAS	53

1 RESUMEN

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

En nuestro laboratorio se ha implementado dicho modelo en ratas Wistar, obteniendo los tumores con un esquema de tratamiento de una administración única de DEN y 4 meses de exposición al carcinógeno, los cuales presentan las características histológicas correspondientes al CCR que se observan en el humano. Asimismo, después de uno y dos meses de tratamiento con FeNTA se han encontrado lesiones pre-neoplásicas y diferentes alteraciones pro-carcinogénicas, por lo que hemos establecido estos tiempos de estudio como diferentes etapas tempranas del desarrollo de la neoplasia.

La vía Akt/TSC2/mTORC1 se considera una de las rutas clave en la señalización celular, está involucrada en eventos de supervivencia, proliferación y crecimiento celulares, y se ha observado alterada en diversos tipos de cáncer. Cuando se activa la cinasa Akt, fosforila a la proteína TSC2 en la T1462, desactivándola. Esta inactivación de TSC2 permite que mTOR sea fosforilada en la S2448, cuando forma parte del complejo 1 (mTORC1), lo que aumenta la capacidad traduccional en general, y particularmente de algunos mRNAs como los de ciclina D1 y HIF.

Específicamente, en tumores de CCR humano se ha reportado la activación de esta vía, caracterizada por un aumento en los niveles de p-Akt (S473), p-TSC2 (T1462) y p-mTOR (S2448), lo que correlaciona con un incremento en los niveles proteicos de

ciclina D1 y HIF 1 y 2 α . Sin embargo, se desconoce su estatus durante la oncogénesis renal.

Interesantemente, en trabajos previos en nuestro laboratorio se encontró un aumento en los niveles renales de p-Akt, así como un aumento en los niveles proteicos de ciclina D1 y HIF en ratas tratadas con FeNTA en etapas tempranas. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se decidió analizar posibles consecuencias del incremento de los niveles de Akt en la regulación de TSC2 y mTOR en etapas tempranas del modelo de CCR inducido con FeNTA. Para esto, se utilizaron ratas Wistar macho que se distribuyeron en un grupo control (C), y tratados con: DEN (D), FeNTA (F) y DEN+FeNTA (DF). Se administró la dosis única de DEN a los grupos correspondientes y catorce días después se comenzó el tratamiento con FeNTA dos veces por semana durante uno y dos meses.

Se observó que los niveles renales de p-TSC2 aumentaron después de un mes de tratamiento con FeNTA, y este incremento se exacerbó a casi el doble después de dos meses. En cuanto a los niveles de TSC2 total (t-TSC2), se encontró un aumento en ambos tiempos de estudio, lo cual puede ser una respuesta de las células para intentar prevenir/inhibir la activación del complejo mTORC1. En concordancia con la inactivación de TSC2, los niveles de p-mTOR aumentaron en respuesta al tratamiento carcinogénico a los dos tiempos analizados. En cambio, los niveles de t-mTOR se mantuvieron sin cambios, indicando que probablemente la regulación de esta cinasa se da a nivel post-traducciona, lo cual se hace evidente por el aumento de los niveles de p-mTOR.

La correlación entre el aumento en los niveles renales de TSC2 fosforilada en T1462 y en los niveles de mTOR fosforilada en S2448 concuerda con el comportamiento previamente observado de p-Akt. En conjunto, estas observaciones sugieren que la activación de la vía Akt/TSC2/mTORC1 puede ser uno de los mecanismos involucrados en la carcinogénesis renal por FeNTA.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer

El cáncer es un término para denominar a un conjunto de enfermedades que se caracterizan por trastornos en el crecimiento, muerte y diferenciación de las células, que conducen a la formación de masas tumorales capaces de diseminarse (King RJB *et al.*, 2006).

El proceso que lleva a la generación de esta patología se conoce como carcinogénesis, durante el cual una o más células adquieren capacidades que les confieren un potencial transformante (Figura 1) que puede llevar a la generación de una neoplasia (Hanahan D & Weinberg RA, 2011).



Figura 1. Capacidades adquiridas en el proceso carcinogénico. Se ha propuesto que las células adquieren diversas capacidades a lo largo del proceso carcinogénico, que les confieren un potencial transformante. (Modificada de Hanahan D & Coussens LM, 2012).

Para su estudio, el proceso carcinogénico se ha dividido en tres etapas: a) iniciación, cuando las células sufren mutaciones no letales que pueden ser revertidas mediante sistemas de reparación del DNA; b) promoción, cuando las células iniciadas comienzan, por acumulación de mutaciones y mecanismos de presión selectiva, a proliferar y evitar la muerte celular, dando como resultado una progenie de células en estado pre-neoplásico, que pueden ser controladas por eventos de senescencia o apoptosis; esta etapa ya no es reversible pero sí es contenible; y c) progresión, cuando las células pre-neoplásicas sufren alteraciones que les permitirán convertirse en células neoplásicas, las cuales tendrán una proliferación anormal que generará un tumor que posteriormente podrá diseminarse por un proceso llamado metástasis (Figura 2A) (Valko M *et al.*, 2006).

Las causas que pueden desencadenar el cáncer son diversas, y una de ellas es el estrés oxidante. Se denomina estrés oxidante al aumento en la proporción de especies oxidantes con respecto a los niveles de las defensas antioxidantes de la célula (Saldaña-Balmori Y & Zentella de Piña M, 1995). Dentro de las especies oxidantes más comunes están las especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales son producto del metabolismo celular normal y juegan un papel importante en la estimulación de vías de señalización en respuesta a cambios intracelulares y en las condiciones ambientales (Reuter S *et al.*, 2010). Sin embargo, si las EROs son producidas por periodos largos y/o en concentraciones anormales, pueden ocasionar daño en las funciones y estructuras celulares, así como inducir mutaciones somáticas y transformación celular (Fang J *et al.*, 2009; Khandrika L *et al.*, 2009). Como se observa en la Figura 2B, niveles bajos a moderados de estrés oxidante pueden participar en la promoción tumoral, mientras que niveles moderados a altos pueden tener efectos mutagénicos, y niveles altos de estrés pueden inducir apoptosis y/o necrosis; esto último es muy importante en los ciclos de muerte y regeneración celular que llevan a una proliferación sostenida y aumentan la probabilidad de seguir acumulando mutaciones (Valko M *et al.*, 2006).

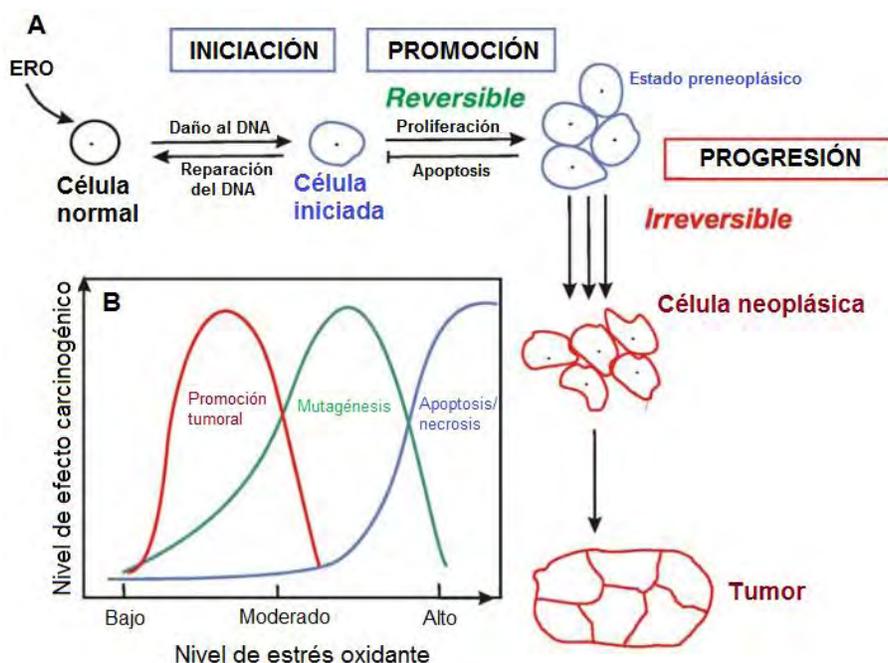


Figura 2. Etapas del proceso carcinogénico. El desarrollo del cáncer se lleva a cabo en tres etapas: iniciación, promoción y progresión (A), en las cuales puede participar el estrés oxidante a diferentes niveles, desde promoción tumoral y mutagénesis hasta la inducción de apoptosis/necrosis (B). ERO: Especies Reactivas de Oxígeno (Modificado de Valko M *et al.*, 2006).

El CCR es el cáncer renal más común, representando del 70 al 80% de todas las neoplasias del riñón, es uno de los tipos de cáncer urológico más letales, y constituye del 2 al 3% de todos los tipos de cáncer en adultos (Nelson EC *et al.*, 2007; Rini B *et al.*, 2009; Siegel RL *et al.*, 2016). Este cáncer está entre los menos comprendidos, tiene un alto índice de mortalidad, su incidencia continua en aumento y presenta problemas terapéuticos (Rini B *et al.*, 2009). La incidencia a nivel mundial es de alrededor de 209 000 casos nuevos y aproximadamente 100 000 muertes por año (Gupta K *et al.*, 2008). En un estudio reportado en 2013 en Estados Unidos se estimaron más de 60 000 nuevos casos de cáncer renal, resultando más de 13 000 de ellos en defunción (Siegel RL *et al.*, 2016).

En México, en 2012, se reportó una incidencia de 3,851 casos y un total de 2,115 defunciones (International Agency for Research on Cancer, 2012).

El diagnóstico del CCR es difícil ya que este tipo de cáncer es asintomático incluso en etapas avanzadas, por lo que su diagnóstico frecuentemente se da cuando la metástasis ya está presente (Dalgin GS *et al.*, 2007).

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

El CCR se origina en las estructuras tubulares del riñón, y aunque hoy en día se han identificado 14 tipos histológicos (Shuch B *et al.*, 2015; Srigley JR *et al.*, 2013), los cuatro tipos principales son: a) carcinoma de células renales de células claras (CCR cc) que es el tipo más común y representa del 75-80% de todos los casos de CCR, b) papilar (10-15%), c) cromóforo (5%) y d) de ducto colector (1%). La ocurrencia del CCR en hombres y mujeres se da en una proporción 2:1 (Lipworth L *et al.*, 2006). Alrededor del 4% de los casos de CCR son hereditarios y el 96% son esporádicos (Banumathy G & Cairns P, 2010).

Existe evidencia de la presencia de estrés oxidante en el CCR; por ejemplo, se encontraron niveles elevados de EROs y óxido nítrico (NO) en sangre de pacientes con esta neoplasia, así como un incremento en la peroxidación lipídica en el tejido tumoral (Ganesamoni R *et al.*, 2012). Aunado a esto, los principales factores de riesgo establecidos para el CCR son el humo del tabaco con un riesgo relativo de 2-3 (Yuan JM *et al.*, 1998; Hunt JD *et al.*, 2005); la obesidad, específicamente el índice de masa corporal (Bjorge T *et al.*, 2004; van Dijk BA *et al.*, 2004), y la hipertensión (McLaughlin JK *et al.*, 1995). Estos tres factores juntos se han asociado con un 49% de los casos (Siegel RL *et al.*, 2011), e, interesantemente, todos estos factores están vinculados con niveles altos de estrés oxidante (Gago-Domínguez M & Castela JE, 2006; Harris WB, 2015). Además, en algunos estudios se ha reportado un efecto protector por el consumo de frutas y verduras,

alimentos que contienen diversos compuestos antioxidantes (Van Dijk BA *et al.*, 2005; Rashidkhani B *et al.*, 2005; Bravi F *et al.*, 2007; Lee JE *et al.*, 2007).

2.3 Nitritotriacetato de hierro (FeNTA) como modelo de estudio del CCR

Como se ha mencionado anteriormente, debido a las diversas complicaciones que presenta el diagnóstico del CCR humano, es prácticamente imposible estudiar las etapas tempranas del desarrollo de esta neoplasia. Por este motivo consideramos que desarrollar modelos experimentales que asemejen esta patología puede ser muy útil. Uno de ellos es aquél inducido con nitritotriacetato de hierro (FeNTA), que es un complejo formado por el Fe^{3+} y el ácido nitritotriacético (Figura 3), de fácil absorción y se transporta eficientemente a las células del parénquima de varios órganos como el riñón (Awai M *et al.*, 1979).

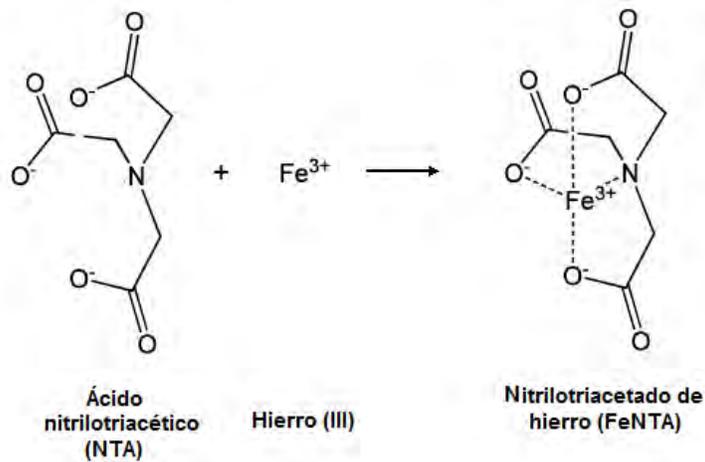


Figura 3. Estructura química del FeNTA. El compuesto FeNTA se forma por la complejación del ácido nitritotriacético con el hierro (III), (Modificada de Nishida Y *et al.*, 2007).

Se ha propuesto que después de la administración intraperitoneal (i.p) en ratas, el FeNTA es absorbido por el mesotelio hacia la vena porta y enviado a circulación previo paso por el hígado (Toyokuni S, 1996; Okada S *et al.*, 1993). Cuando el FeNTA se encuentra en circulación, es filtrado por el glomérulo renal y llega posteriormente al túbulo proximal (Figura 4).

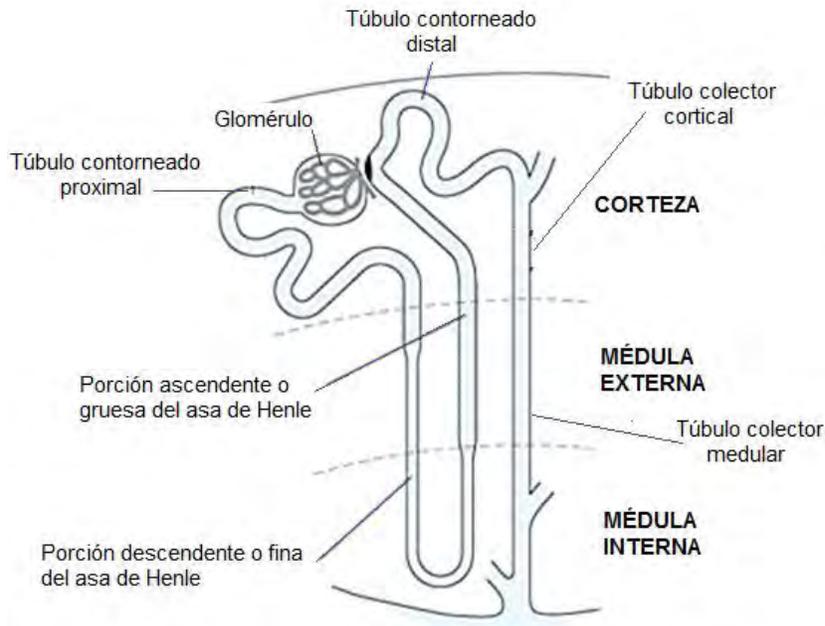


Figura 4. Porciones tubulares básicas de la nefrona. La unidad funcional del riñón es la nefrona, la cual consta de dos partes principales, la corteza y la médula (externa e interna) renales. Dentro de la corteza se ubica el glomérulo y los túbulos proximales, distales y colectores corticales, principalmente. En cambio, en la porción medular se encuentre principalmente el asa de Henle y el túbulo colector medular (modificado de Guyton AC & Hall JE, 1997).

Como se muestra en la Figura 5, dentro del túbulo proximal, el Fe^{3+}NTA es reducido por acción del glutatión a Fe^{2+}NTA (Toyokuni S, 1998), catalizando la reacción de Fenton-Haber Weiss, con la cual se generan especies reactivas de oxígeno (Figura 6) (Tsuchiya K *et al.*, 2005), induciendo de esta manera el daño en las células del túbulo proximal (Tanaka T *et al.*, 2000).

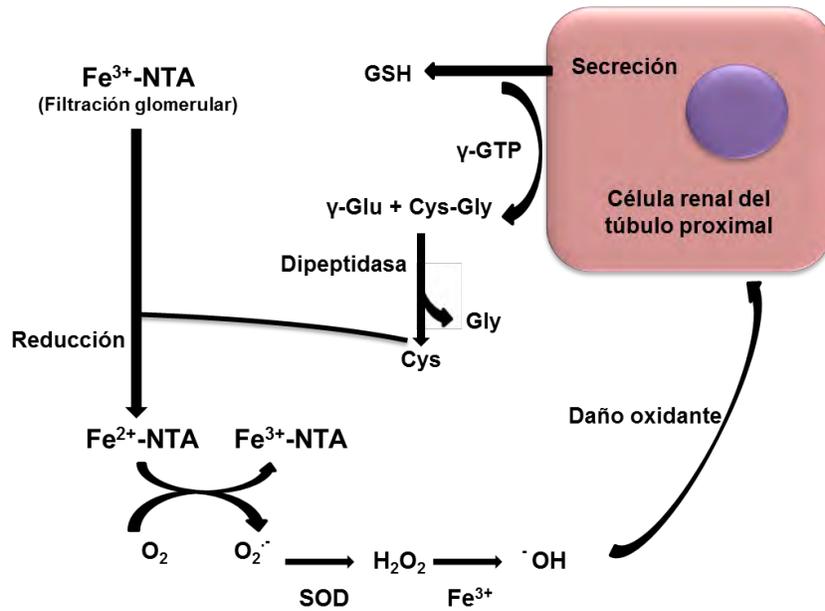


Figura 5. Propuesta del metabolismo del FeNTA en riñón. El FeNTA es filtrado hacia los túbulos proximales, donde es reducido por acción del glutatión (GSH) desencadenando la reacción de Fenton-Haber Weiss. GSH: Glutatión, γ -GTP: γ -Glutamyl transpeptidasa (Modificada de Toyokuni S, 1996 y Okada S *et al.*, 1993).

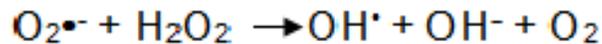
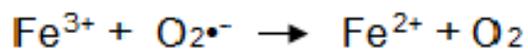
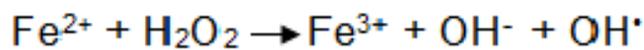


Figura 6. Generación de ERO's mediante la reacción de Fenton-Haber Weiss.

Una de las ventajas que ofrece este modelo es que los tumores inducidos parecen ser la contraparte histológica del CCR humano de células claras, que es el subtipo más común (Vargas-Olvera CY, 2009; Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012). Además, se ha observado que

utilizar N,N-dietilnitrosamina (DEN) como iniciador tumoral reduce el tiempo de formación de tumores a sólo 4 meses y aumenta la incidencia a un 80-85% (Athar M & Iqbal M, 1998; Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012), a diferencia del uso únicamente del FeNTA y de otros modelos que tardan hasta 2 años (Umemura T *et al.*, 1995; Lash LH *et al.*, 2000).

A pesar de que este modelo se ha utilizado para el estudio de carcinogénesis renal, aún no están claras las alteraciones moleculares que llevan a la transformación celular y desarrollo de CCR, por lo que el contar con este modelo experimental bien caracterizado nos permitiría definir sus alcances como equivalente del padecimiento en el humano, representando así una valiosa herramienta para la búsqueda de alteraciones específicas, la identificación de nuevos marcadores en etapas tempranas del CCR para su detección oportuna y el desarrollo de agentes terapéuticos más eficaces.

En nuestro laboratorio se encontró que la exposición a FeNTA durante uno y dos meses genera lesiones pre-neoplásicas como displasia, además de alteraciones moleculares potencialmente pro-carcinogénicas (Aguilar-Alonso FA, 2010; Rangel-Gómez AT, 2011; Curiel-Muñiz P, 2012; Pariente-Pérez TO, 2012; Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012; Navarro-García R, 2013). Sin embargo, se necesita ahondar en estos estudios para tener un panorama más claro de las moléculas involucradas en el desarrollo de este cáncer.

El FeNTA se maneja en general como un carcinógeno específico de riñón que induce tumores hasta en un 80% de los roedores tratados, y que en algunos casos puede presentarse metástasis en hígado y pulmón (Ebina Y *et al.*, 1986; Toyokuni S, 1998; Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha reportado que en ratones usando un protocolo similar se inducen adenomas y adenocarcinomas primarios de pulmón en un 30% de los animales estudiados (Kimoto T *et al.*, 2001). Por otro lado, se sabe que tras 12 horas de la administración de FeNTA se induce un incremento en los niveles de estrés oxidante, así como daño tisular y algunos eventos pro-proliferativos en hígado (Agarwal MK *et al.*, 2005). No obstante, no se han encontrado reportes que indiquen que la exposición a FeNTA genere cáncer primario de origen hepático. Con base en estos

antecedentes, se puede decir que el FeNTA causa daño en hígado y pulmón, no obstante, con el esquema de tratamiento utilizado en nuestro laboratorio no hemos observado el desarrollo de tumores primarios en estos órganos (Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012).

Además, en protocolos de tratamiento durante uno y dos meses a FeNTA se analizó el estatus de diversas proteínas que encontramos alteradas en el tejido renal, sin encontrar cambios en tejido hepático y pulmonar. Estas evidencias refuerzan la idea de que las alteraciones que encontramos en riñón pueden participar en el desarrollo del CCR en el modelo, y que si bien, el FeNTA puede causar daño en otros tejidos, bajo el esquema de tratamiento utilizado en nuestro laboratorio parece que el FeNTA induce el desarrollo de neoplasias específicamente en riñón.

2.4 Akt/ Proteína cinasa B (PKB) y CCR

La proteína Akt, también conocida como PKB (por sus siglas del inglés Protein Kinase B), es una cinasa de serina/treonina que regula diversos eventos celulares y tiene una amplia variedad de blancos directos (Hanada M *et al.*, 2004). Puede fosforilar, y de esta manera inhibir, proteínas pro-apoptóticas como Bad y Foxo3a, previniendo así apoptosis (Manning BD & Cantley LC, 2003; Datta SR *et al.*, 1999), o bien puede fosforilar y activar numerosas proteínas pro-oncogénicas involucradas en la progresión del ciclo celular, como HDM2, IKK y Skp2 (Ozes ON *et al.*, 1999; Ecker K & Hengst L, 2009; Lin HK *et al.*, 2002; Zhou BP *et al.*, 2001). Así mismo, Akt regula el crecimiento celular y la traducción de proteínas mediante fosforilación e inactivación de TSC2, resultando esto en la activación de la vía mTORC1 (Li Y *et al.*, 2004; Manning BD & Cantley LC, 2003). Además, Akt regula el metabolismo de glucosa a través de la fosforilación y consecuente inactivación de GSK3 β (Bondy CA & Cheng CM, 2004), por mencionar sólo algunos ejemplos.

Existe evidencia del aumento en la activación de Akt en el CCR humano. Por ejemplo, se ha encontrado mediante inmunohistoquímica que los niveles proteicos de p-Akt (S473) en tejido tumoral de CCR están aumentado con respecto al tejido adyacente al tumor y a

oncocitomas renales, los cuales se han designado como lesiones benignas del CCRcc (Hennenlotter J *et al.*, 2012), así como el aumento de t-Akt y p-Akt en tumores primarios y líneas celulares de CCR humano, determinado por Western blot e inmunocitoquímica (Kim J *et al.*, 2009). Los tumores exhibieron heterogeneidad en los niveles de p-Akt, pero en todas las muestras el nivel de la cinasa fosforilada fue mayor con respecto a sus contrapartes de tejido renal sano (Kim J *et al.*, 2009). Interesantemente, en otro trabajo se observó mediante inmunohistoquímica la tinción contra p-Akt tanto en citosol como en núcleo (Pantuck AJ *et al.*, 2007). En este estudio la tinción citosólica se detectó en el 93% de los tumores analizados, y la presencia fue mucho mayor en CCR de células claras (CCRcc) que en otros subtipos histológicos. Por otra parte, la tinción nuclear fue positiva en el 61% de los tumores y esto correlacionó con la enfermedad no metastásica en los pacientes, por lo cual la localización nuclear de p-Akt se asoció con un pronóstico favorable, mientras que su ubicación citosólica con un pronóstico desfavorable (Pantuck AJ *et al.*, 2007).

No hay reportes en la literatura en cuanto al estatus de Akt y p-Akt en etapas tempranas del desarrollo de CCR humano, por evidentes razones, ni en el CCR inducido con FeNTA; en este último caso no se conoce el estatus de la cinasa en los tumores. Los únicos antecedentes directos al respecto son hallazgos de nuestro laboratorio donde se encontró un aumento en los niveles totales de Akt (t-Akt) y p-Akt en corteza renal de ratas expuestas durante uno y dos meses a FeNTA, sin observar cambios en hígado y pulmón (Pacheco-Bernal I, 2014). Esto indica que Akt está acumulándose y siendo activada en etapas tempranas de la carcinogénesis y que la respuesta de Akt parece ser específica del riñón. Por lo tanto, consideramos interesante estudiar posibles consecuencias del aumento en la activación de Akt, particularmente sobre proteínas blanco que se hayan reportado alteradas en CCR humano y participen en vías de señalización que se están estudiando en nuestro laboratorio, continuando así con la caracterización del modelo experimental y aportando evidencias de los posibles mecanismos involucrados en la carcinogénesis renal inducida con FeNTA.

2.5 Vía Akt/TSC2/mTORC1

TSC2 (por sus siglas en inglés, Tuberous Sclerosis Complex 2) es regulada por múltiples fosforilaciones, tanto activantes (como es el caso de aquellas realizadas por GSK3 β y AMPK) como inactivantes (por ejemplo, aquellas realizadas por Akt, RSK1 y ERK1/2), y cuya combinatoria aún no está del todo comprendida (Dibble CC & Manning BD, 2010). p-Akt inactiva a TSC2 mediante su fosforilación en los residuos S939, S981, S1130, S1132 y T1462, siendo la fosforilación en la T1462 la mejor caracterizada. TSC2 se considera el principal inhibidor de la activación del complejo mTORC1 en respuesta a la privación de nutrientes y/o factores de crecimiento, el cual es un modulador clave de los procesos de traducción y crecimiento celular (Figura 7) (Bellacosa A *et al.*, 2005; Martelli AM *et al.*, 2010).

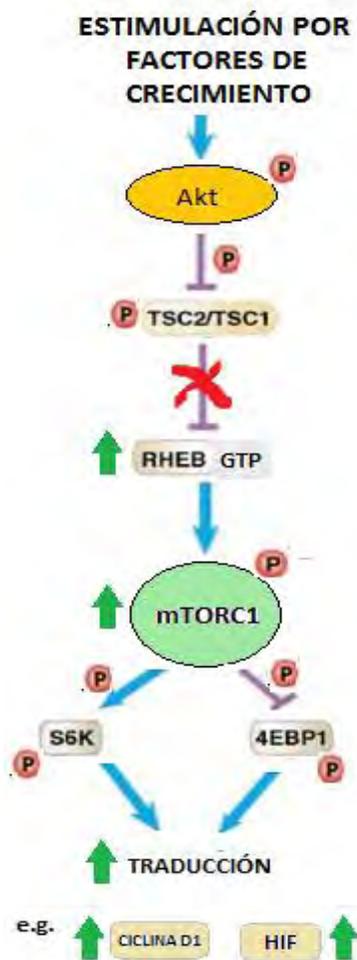


Figura 7. Vía Akt/TSC2/mTORC1. Una vez activada, p-Akt inhibe directamente a TSC2 por fosforilación. TSC2 es una GAP que funciona en asociación con TSC1 para inactivar la proteína G pequeña Rheb. La inactivación del complejo TSC1/TSC2 mediada por Akt permite la acumulación de Rheb en un estado unido a GTP. Rheb-GTP aumenta la actividad de cinasa del complejo mTORC1. Los blancos más conocidos de mTORC1 son p70S6K (S6K) y 4E-BP1, los cuales son críticos para el proceso de traducción. HIF y ciclina D1 son blancos indirectos de mTORC1, ya que la actividad de este complejo favorece la traducción de los mRNAs de HIF y ciclina D1, entre otros (Modificada de Bellacosa A *et al.*, 2005).

2.5.1 TSC2

TSC2, también conocido como tuberina, es una proteína altamente conservada en mamíferos (>80% de homología en secuencia de aminoácidos) que tiene un peso aproximado de 200 kDa (Kandt RS *et al.*, 1992; Consortium ECTS, 1993), y que tanto en humano como en rata tiene al menos 4 isoformas con peso molecular similar, todas generadas por splicing alternativo (Xu L *et al.*, 1995; Xiao GH *et al.*, 1995; UniProtKB-P49815 (TSC2_HUMAN) (2002-2017)).

Esta proteína forma un heterodímero con la proteína TSC1 (también conocida como hamartina) (Ronser M *et al.*, 2008) para regular la activación del complejo mTORC1 a través de Rheb (Figura 6) (Bellacosa A *et al.*, 2005; Martelli AM *et al.*, 2010). TSC2 tiene actividad catalítica intrínseca de proteína activadora de GTPasa (GAP), mientras que TSC1 le brinda estabilidad a TSC2, impidiendo que sea degradada (Ronser M *et al.*, 2008). El complejo TSC1/TSC2 induce entonces a la proteína Rheb (que es un miembro de la familia de proteínas G pequeñas) a hidrolizar el GTP que lleva unido, generándose Rheb-GDP. Rheb puede activar al complejo mTORC1 sólo cuando tiene unido GTP, y de esta manera es como TSC2 impide la activación de mTORC1 (Dibble CC & Manning BD, 2010).

2.5.2 mTOR

mTOR (por sus siglas en inglés mammalian Target Of Rapamycin) es una proteína perteneciente a la familia de las cinasas relacionada con PI3K (PIKK), que está altamente conservada en mamíferos (Memmott RM & Dennis PA, 2009) y forma parte de dos complejos multiproteicos conocidos como complejos 1 y 2 de mTOR (mTORC1 y mTORC2). Estos complejos se caracterizan por estar conformados por diferentes proteínas y por tener diferentes sustratos (Figura 8). mTORC1 está conformado por las proteínas mTOR, Raptor, mLST8 (GβL), PRAS40, FKBP38 y DEPTOR, y es sensible al

compuesto rapamicina y sus análogos. En su caso, mTORC2 se compone de las proteínas mTOR, Rictor, mLST8, SIN1, Protor, DEPTOR y es generalmente descrito como insensible a rapamicina y sus análogos (Dowling RJ *et al.*, 2010).

La señalización por mTORC1 integra el censo de las condiciones ambientales (nutrientes, niveles de oxígeno, hormonas, factores de crecimiento, estrés, etc.) y la el estado metabólico celular. De esta manera mTORC1 controla los procesos anabólicos para promover la traducción y el crecimiento celular (Tamburini J *et al.*, 2009).

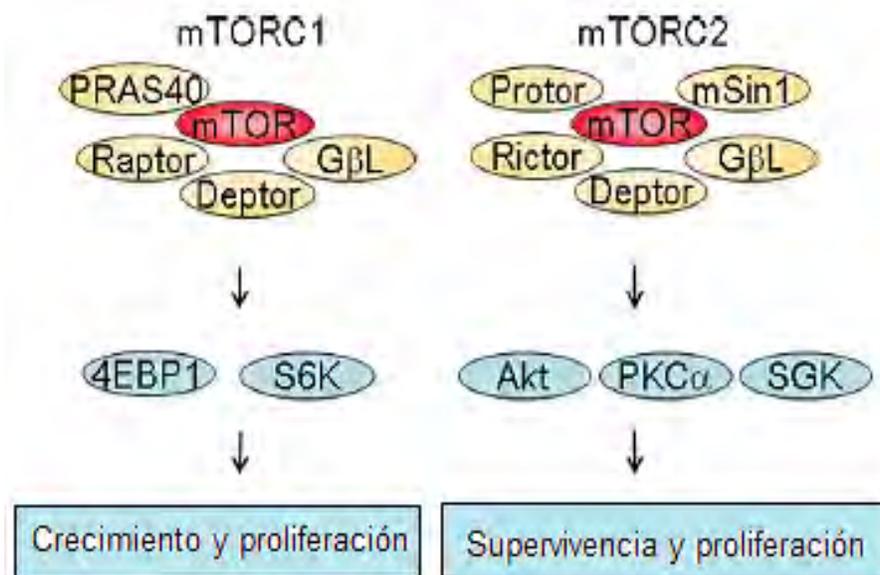


Figura 8. Composición de mTORC1 y mTORC2. mTORC1 está formado por mTOR, Raptor, PRAS40, mLST8 (GβL) y Deptor. mLST8 se une a mTOR en ambos complejos. Deptor actúa como inhibidor de ambos complejos. mTORC2 contiene a Rictor, mSIN1 y Protor 1 (Modificada de Tchevkina E & Komelkov A, 2012).

Por un lado, mTORC1 regula la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de p70S6K 1/2 en el residuo T389 y de 4E-BP1 en el residuo T70. p70S6K1/2, a su vez, fosforila a la

proteína S6, que forma parte del complejo ribosomal 40S, llevando a una traducción activa de mRNAs. Cabe mencionar se ha descrito un “loop” de retroalimentación positiva entre p70S6K y mTORC1, ya que p70S6K una vez activado puede fosforilar a mTOR en la S2448 cuando forma parte del complejo mTORC1, aumentando así su actividad, y esta fosforilación se ha manejado como indicativo de la completa activación de mTORC1 (Copp J *et al.*, 2009). Por su parte, la fosforilación de 4E-BP1 resulta en la liberación del factor de iniciación de la traducción eucariote 4E (eIF4E) el cual se asocia con el factor de iniciación eucariote 4G (eIF4G) para estimular el inicio de la traducción (Wang X *et al.*, 2005). Los miembros de la familia 4E-BP son supresores de la traducción de un conjunto de transcritos referidos como “mRNAs sensibles a eIF4E”. Este conjunto de mRNAs se caracteriza por tener regiones 5'UTR largas y complejas, y codifican para proteínas que son reguladoras clave de la supervivencia y proliferación celular, incluyendo ciclina D1, HIF, c-Myc y STAT3 (Culjkovic B *et al.*, 2006). Particularmente, ciclina D1 permite el progreso del ciclo celular, mientras que HIF (HIF-1 α y HIF-2 α) resulta crucial para la adaptación de las células en condiciones de hipoxia, y tanto ciclina D1 como HIF se han reportado desreguladas en diversos tipos de cáncer incluyendo el CCR humano (Li L & Kaelin Jr. WG, 2011).

Además, mTORC1 regula la síntesis proteica de manera indirecta a través de la activación del factor IA del inicio de la transcripción (TIF-IA), que es un factor que transduce las señales extracelulares a la maquinaria de transcripción de la RNA polimerasa I, con la consecuente estimulación de la biogénesis del rRNA para el ensamble de los ribosomas (Mayer C *et al.*, 2004).

Por otro lado, cabe mencionar que se ha observado que la inhibición de mTORC1 lleva a una disminución en los niveles proteicos de HIF1 y 2 α en condiciones de normoxia e hipoxia moderada, y se ha propuesto que el mecanismo de regulación de los niveles de HIF se da a nivel traduccional (Knauo KX *et al.*, 2009). Estas observaciones coinciden con la creciente evidencia de la existencia de mecanismos de regulación de HIF en respuesta a factores de crecimiento (Koh MY *et al.*, 2008).

2.6 TSC2, mTOR y CCR

En el CCR humano se ha reportado un aumento en los niveles proteicos de varios de los componentes del complejo mTORC1, lo que le confiere a las células tumorales capacidades de crecimiento, proliferación y angiogénesis necesarias para su supervivencia (Youssef RM *et al.*, 2012).

Otra característica común del CCR humano es el aumento en los niveles de HIF-1 y 2α , generalmente asociado a la pérdida de función del supresor tumoral VHL, éste último encargado de la ubiquitinación de HIF (Shen C & Kaelin WG Jr, 2013). Sin embargo, se ha reportado que en el CCR mTORC1 induce el aumento en la traducción del mRNA de HIF, y que este mecanismo es independiente de VHL, siendo esta respuesta regulada por el estímulo con factores de crecimiento (Hudson CC *et al.*, 2002; Fingar DC *et al.*, 2004). Así mismo, en esta neoplasia hay un aumento en los niveles proteicos de la ciclina D1, y se ha sugerido que esto puede ser resultado de la regulación por mTORC1, que induce la traducción del mRNA de ciclina D1 (Ma XM & Blenis J, 2009). Acorde con lo anterior, en la clínica se utilizan inhibidores de mTOR en pacientes con CCR, pero el tratamiento no es suficientemente efectivo, debido en parte a la falta de comprensión de la regulación de mTOR (Santoni M *et al.*, 2014).

En cuanto a TSC2, son limitados los estudios en el CCR humano. Se sabe que las personas deficientes en esta proteína desarrollan una enfermedad conocida como esclerosis tuberosa, las cuales presentan desórdenes neurológicos y crecimiento de masas celulares en diversos tejidos, desarrollando angiomiolipomas renales y, en algunos casos, CCR (Rouvière O *et al.*, 2013).

En cambio, hay varios estudios sobre TSC2 en el modelo experimental de la rata Eker, el cual se ha utilizado para la comprensión del CCR. La rata Eker presenta una mutación en

un alelo del gen *Tsc2*, y un segundo “hit” inactiva el alelo normal de este gen llevando al desarrollo de la neoplasia (Liu MY *et al.*, 2003). También en el modelo de la rata Eker se ha encontrado un aumento en los niveles de HIF2 α , y esta alteración se ha asociado a la ausencia de TSC2 (Liu MY *et al.*, 2003).

Por último, en el CCR inducido con FeNTA no se ha estudiado el estatus de TSC2 ni de mTOR, sin embargo, en etapas tempranas del modelo encontramos un aumento en los niveles tanto de ciclina D1 como de HIF 1 α y 2 α , además de un aumento en los niveles de t-Akt y p-Akt (S473) (Pacheco-Bernal I, 2014), sugiriendo que la activación de Akt podría inactivar a TSC2, con la consecuente activación de mTORC1 mediada por Rheb, y que este mecanismo podría ser responsable, al menos en parte, del aumento en los niveles proteicos de ciclina D1 y HIF1 y 2 α (Aguilar-Alonso FA, 2010; Navarro-García R, 2013; Curiel-Muñiz P, 2014).

3 JUSTIFICACIÓN

El carcinoma de células renales (CCR) es el cáncer renal más común en adultos y tiene un alto índice de mortalidad, debido en gran parte a que frecuentemente se diagnostica en etapas muy avanzadas. Uno de los escasos modelos experimentales que existen para el estudio del CCR, es aquél inducido con el carcinógeno nitrilotriacetato de hierro (FeNTA), y que ha mostrado similitudes importantes con la neoplasia en humano.

Con el fin de identificar los posibles mecanismos involucrados en la carcinogénesis así como de caracterizar el modelo y establecer su equivalencia con la enfermedad en el humano, en nuestro grupo de investigación se está analizando en este modelo animal el estatus de vías de señalización que se han vinculado con el desarrollo de cáncer en general y que se han observado alteradas en los tumores de CCR humano. Entonces, parte importante de esta línea de investigación es analizar el comportamiento de las vías de señalización en etapas tempranas del modelo, que son prácticamente imposibles de estudiar en el humano, que es cuando se dan las alteraciones que llevan a la transformación celular, y además es cuando un proceso canceroso puede ser más controlable, e incluso curable.

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

Se han descrito alteraciones en la vía Akt/TSC2/mTORC1 en el CCR humano, tanto en tumores como en líneas celulares. Así mismo, la activación de esta vía se ha asociado con el aumento en los niveles de ciclina D1 y HIF, que son proteínas importantes para la progresión del ciclo celular y la angiogénesis, respectivamente. Interesantemente, en etapas tempranas del modelo de carcinogénesis renal inducida con FeNTA encontramos un aumento en los niveles de Akt y de Akt fosforilada en el residuo de S473, así como un aumento en los niveles de ciclina D1 y HIF 1 y 2 α , sugiriendo que la activación de Akt

podría participar en la inhibición de TSC2, teniendo como resultado la activación de mTORC1, y que este mecanismo podría contribuir, al menos en parte, al aumento en los niveles proteicos de ciclina D1 y HIF 1 α y 2 α .

Por lo tanto, en el presente proyecto nos interesó analizar en tejido renal de ratas expuestas a FeNTA durante uno y dos meses, los niveles proteicos de TSC2 total (t-TSC2) y su fosforilación en T1462 (p-TSC2), la cual es realizada por Akt, así como de mTOR total (t-mTOR) y fosforilada en S2448 (p-mTOR), fosforilación que es indicativa de su activación cuando forma parte del complejo mTORC1.

4 HIPÓTESIS

Los niveles de TSC2 fosforilada en T1462 así como de mTOR fosforilada en S2448 aumentarán en etapas tempranas de un modelo experimental de carcinogénesis renal inducida con FeNTA, de acuerdo con el aumento en los niveles renales de p-Akt (S473) previamente observado.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar el estatus de TSC2 y mTOR en etapas tempranas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA, como probable consecuencia de la activación de Akt.

5.2 Objetivos particulares

1. Desarrollar protocolos de exposición a FeNTA durante uno y dos meses en ratas Wistar macho.
2. Establecer las condiciones para el análisis por Western blot de TSC2, p-TSC2 (T1462), mTOR y p-mTOR (S2448).
3. Determinar en corteza renal de animales tratados durante uno y dos meses:
 - a) Los niveles de TSC2 y p-TSC2 (T1462)
 - b) Los niveles de mTOR y p-mTOR (S2448)

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Protocolo de tratamiento con FeNTA

El esquema de tratamiento y los grupos de estudio se resumen en la Tabla 1 y en la Figura 9.

Tabla 1. Grupos de estudio y esquemas de tratamiento para el desarrollo del protocolo de exposición a FeNTA.

Grupo	No. de animales	Esquema de tratamiento
Control (C)	10	Vehículos (solución salina y Na ₂ HCO ₃ 120 mM)
DEN (D)	6	Administración i.p. única de N-dietilnitrosamina (DEN) (200 mg/kg)
FeNTA (F)	10	Administración i.p. de nitrilotiacetato de hierro (FeNTA) dos veces por semana con aumentos semanales de la dosis (3, 5, 7, 9 mg _{Fe} /kg).
D+F	10	Administración i.p. única de N-dietilnitrosamina (DEN) (200mg/kg) y posterior administración i.p. de nitrilotiacetato de hierro (FeNTA) dos veces por semana con aumentos semanales de la dosis (3, 5, 7, 9 mg _{Fe} /kg).

i.p., intraperitoneal.

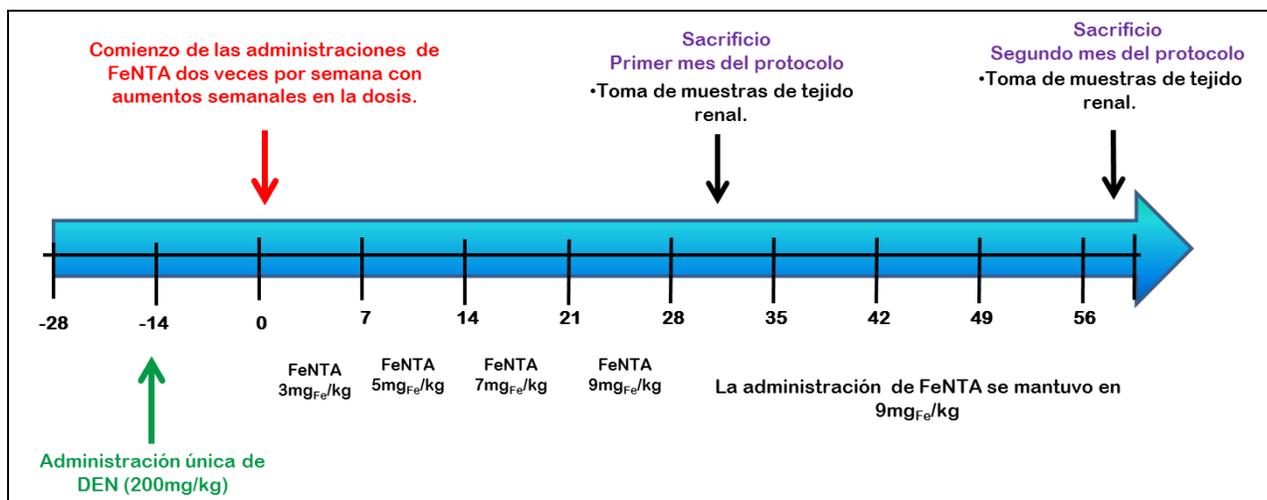


Figura 9. Esquema de tratamiento para el desarrollo del protocolo experimental. Las ratas se mantienen en un periodo de adaptación de dos semanas en el bioterio. Posteriormente se les administra el DEN a una dosis única de 200 mg/kg vía intraperitoneal (i.p.). Quince días después, se inicia la administración del FeNTA con un esquema de dos inyecciones i.p. semanales y con aumentos semanales de la dosis, iniciando con 3 mg_{Fe}/kg, pasando por 5 y 7 mg_{Fe}/kg, hasta alcanzar una dosis final de 9 mg_{Fe}/kg, la cual se mantiene posteriormente. Uno o dos meses después de la primera administración de FeNTA, según sea el caso, se sacrifican los animales por decapitación a las 48 horas de la última administración del carcinógeno, obteniéndose las muestras a analizar.

Se utilizaron ratas macho Wistar (Harlan México-UNAM), cuyo peso inicial osciló entre 50 y 70 g. Los animales se distribuyeron en 4 grupos: Control (C), DEN (D), FeNTA (F) y DEN+FeNTA (DF). El grupo control fue tratado con los vehículos correspondientes, mientras que los animales del grupo DEN+FeNTA recibieron el iniciador tumoral DEN y el promotor tumoral FeNTA, ya que su combinación lleva al desarrollo de CCR con una mayor incidencia y en un menor tiempo (aproximadamente 6 meses) que con la administración únicamente de FeNTA (1 año aproximadamente). El grupo DEN se incluyó como un control para asegurar que las alteraciones que se observen no sean debidas a este iniciador tumoral *per se* (Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012).

Las ratas de todos los grupos experimentales se sacrificaron por decapitación 48 horas después de la última administración de FeNTA a los grupos correspondientes. De cada rata se obtuvieron ambos riñones y se separó la corteza de la médula. La corteza se dividió en fracciones, las cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta que fueron analizadas.

6.2 Preparación y administración de *N*-dietilnitrosamina (DEN)

La DEN se obtuvo de Sigma Aldrich Inc. (St. Louis MO,EUA) y se preparó diluyendo el contenido del frasco (1 mL de 990-999 mg/mL) en 11 mL de solución salina y ajustando el volumen a administrar dependiendo del peso de cada rata para cubrir la dosis. Su administración fue vía intraperitoneal (i.p.) 15 días antes de la primera inyección de FeNTA en una dosis única de 200 mg/kg. La dosis se eligió de acuerdo con la literatura (Khan N & Sultana S, 2005; Athar M & Iqbal M, 1998) y protocolos previos de nuestro laboratorio (Vargas-Olvera CY, 2009).

6.3 Preparación y administración del nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)

El FeNTA se preparó siguiendo el método de Awai *et al.*, 1979, con ligeras modificaciones (Vargas-Olvera CY, 2009). Se preparó una solución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 160 mM (Sigma Aldrich Inc., St. Louis MO,EUA) y otra de nitrilotriacetato de sodio 320 mM (Sigma Aldrich Inc., St. Louis MO,EUA), utilizando en ambos casos una solución de Na_2HCO_3 120 mM como disolvente. Se mezclan ambas soluciones en una proporción 1:2 v/v respectivamente y se ajusta el pH a 7.4 con la solución de Na_2HCO_3 . La concentración final de hierro es de 2.98 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}$ (ver anexo 11.1). El FeNTA se administró recién preparado vía parenteral dos veces por semana durante 4 semanas con un aumento semanal de la dosis, partiendo de 3 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{kg}$ hasta alcanzar una dosis de 9 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{kg}$, la cual se mantuvo hasta los dos meses.

El volumen de solución de FeNTA administrada se basa en la concentración de hierro y en el peso del animal, efectuando un cálculo como en el siguiente ejemplo:

Para administrar una dosis de 3 mg_{Fe}/kg a una rata cuyo peso es de 0.260 kg

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

6.4 Métodos

6.4.1 Niveles de TSC2, mTOR y sus formas fosforiladas mediante Western blot (WB)

Por medio de la técnica de Western blot se pueden detectar proteínas que han sido separadas de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida y que después han sido transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilo (PVDF). Para la detección se utilizan anticuerpos específicos contra las proteínas de interés, que en este caso son TSC2, p-TSC2, mTOR y p-mTOR.

Para estudiar las proteína de interés en las muestras, se homogenizan 100 mg de corteza renal en 650µL de amortiguador de lisis pH 7.4 en baño de hielo, cuya composición es: 1,4- ditioneol (DTT) 1 mM, TRIS HCl 10 mM, glicerol al 30%, EDTA 1 mM, triton X-100 al 1%, ortovanadato 1 mM, fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 1 mM, azida de sodio 15 mM, e inhibidores de proteasas y de fosfatasa (Roche). Los homogenados obtenidos se centrifugan a 13,500 rpm (centrifuga Thermo Scientific Legend RT+, Alemania) a 4°C durante 30 min, y posteriormente el sobrenadante se recupera y almacena a -20°C hasta el día de su análisis.

A cada homogenado se le determina el contenido de proteínas totales mediante el método de Bradford como se describe a continuación.

6.4.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

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

6.4.3 Electroforesis y transferencia

Con base en la determinación de proteínas totales por el método de Bradford, se calcula el volumen de homogenado necesario para cargar entre 110 y 120 μg de proteínas totales, para el caso de las cortezas renales, en cada pozo de los geles de acrilamida para electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La electroforesis se corre durante 2.5 h a 100 V. Posteriormente se realiza la transferencia semiseca (Transblot SD semidry Transfer Cell, BioRad) de las proteínas a una membrana de PVDF (Immobilion-P, Millipore Corporation, MA, USA) durante 2 horas a 270 mA (ver anexos 11.3 y 11.4).

6.4.4 Detección de las proteínas de interés

Al ser TSC2 y mTOR proteínas de alto peso molecular (200 y 289 kDa, respectivamente), su detección por WB es un poco más compleja, por lo que fue necesario establecer las condiciones ideales para poder estudiarlas mediante esta técnica. En las tablas 2 a 5 se muestran las condiciones utilizadas en el WB para la detección de cada una de las proteínas estudiadas.

En términos generales, una vez terminada la transferencia, se bloquea la membrana con suero fetal bovino (SFB) al 10% durante 1 h. Después se hibrida durante toda la noche con el anticuerpo primario específico (Tablas 2 a 5) contra las proteínas de interés. Al día

siguiente, se retira el anticuerpo primario y las membranas se lavan 3 veces con PBS-Tween 0.1%, durante 15 min cada vez. Posteriormente, se incuban una hora con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a la peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, EUA). Como el control de carga se utiliza α -tubulina. Transcurrido ese tiempo se elimina el anticuerpo secundario sobrante realizando tres lavados de 15 minutos cada uno con PBS. Por último, en el cuarto oscuro se adicionan los sustratos de la peroxidasa (luminol y H₂O₂) (Millipore Immobion™ Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore Corporation, MA, USA) y se exponen las membranas a una placa de rayos X (ver anexos 11.5 y 11.6). En el caso particular para la detección de mTOR y p-mTOR, se utilizó el equipo ChemiDoc™ XRS, BioRad, ya que la sensibilidad de dicho equipo permitió detectar las bandas de interés sin interferencia de la señal de fondo que se obtenía utilizando el método convencional con placas de rayos X (ver anexo 11.7).

Tabla 2. Condiciones utilizadas en el WB para la detección de TSC2 (200 kDa).

Condiciones utilizadas	
Electroforesis	100 V x 2.5 h
Transferencia semiseca	270 mA x 2 h
Bloqueo	SFB al 10% x 15 min
Anticuerpo primario	Anti-TSC2 1:1000 / Incubación de 10-12 h
Anticuerpo secundario	Anti-conejo 1:40 000 x 1 h

Tabla 3. Condiciones utilizadas en el WB para la detección de p-TSC2 (200 kDa).

Condiciones utilizadas	
Electroforesis	100 V x 2.5 h
Transferencia semiseca	270 mA x 2 h
Bloqueo	SFB al 10% x 30 min
Anticuerpo primario	Anti-p-TSC2 1:1000 / Incubación de 10-12 h
Anticuerpo secundario	Anti-conejo 1:40 000 x 1 h

Tabla 4. Condiciones utilizadas en el WB para la detección de mTOR (289 kDa).

Condiciones adecuadas	
Electroforesis	100 V x 2.5 h
Transferencia semiseca	270 mA x 2 h
Bloqueo	SFB al 10% x 1.5 h
Anticuerpo primario	Anti-mTOR 1:750 / Incubación de 10-12 h
Anticuerpo secundario	Anti-conejo 1:60 000 x 1 h

Tabla 5. Condiciones utilizadas en el WB para la detección de p-mTOR (289 kDa).

Condiciones adecuadas	
Electroforesis	100 V x 2.5 h
Transferencia semiseca	270 mA x 2 h
Bloqueo	TBS al 5% incubado con el anticuerpo primario
Anticuerpo primario	Anti-p-mTOR 1:750 / Incubación de 10-12 h
Anticuerpo secundario	Anti-conejo 1:40 000 x 1 h

Las placas obtenidas se analizan por densitometría utilizando el programa Image J (Broken Symmetry Soft). Se realiza esta determinación tanto para las proteínas de interés como para el control de carga. Posteriormente, para cada muestra se obtiene la relación entre los valores densitométricos de la banda de la proteína de interés y aquella del control de carga, y después el valor de esta relación se divide entre el valor promedio de la misma correspondiente al grupo control. De esta manera los datos se expresan como el promedio de los valores obtenidos para las muestras de cada grupo experimental +/- el error estándar (EE), lo cual se grafica utilizando el programa "Graphpad Prism" versión 5. La significancia estadística se estableció por medio del análisis de varianza, ANOVA, y utilizando el método de comparación múltiple de Newman Keuls. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron a partir de un valor de $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 Apariencia macroscópica de riñones

Al momento de la extirpación de los riñones, se realizó un análisis macroscópico para determinar si se presentaba algún cambio por el tratamiento con FeNTA. Los riñones de los grupos C y D presentaron características macroscópicas similares, mientras que a partir de mes de exposición al carcinógeno en los grupos F y DF se observó palidez de la corteza renal, así como enrojecimiento medular, e incluso a los dos meses de tratamiento se observó la presencia de quistes (Figuras 10A y B).

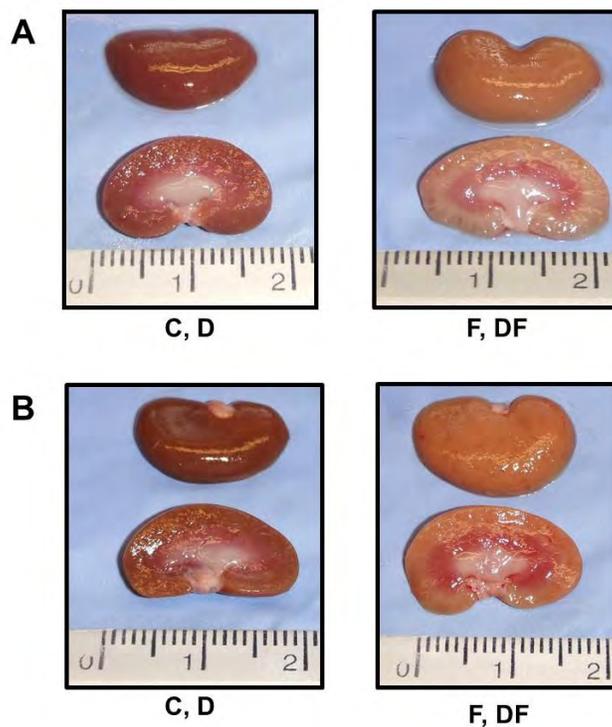


Figura 10. Imágenes representativas de la apariencia macroscópica de riñones obtenidos después de uno y dos meses de tratamiento. (A y B) Los riñones correspondientes a las ratas del grupo D presentaron una apariencia macroscópica similar al grupo C, mientras que los grupos tratados con el carcinógeno mostraron enrojecimiento medular y palidez en la corteza renal. Además, a los dos meses es evidente la presencia de quistes en los grupos tratados con el carcinógeno (B).

7.2 Condiciones para la determinación en riñón de proteínas de alto peso molecular mediante Western Blot (WB)

La transferencia de proteínas de alto peso molecular ha sido un problema al que se enfrentan muchos investigadores (Kurien BT & Scofield RH, 2006). Generalmente, los sistemas de transferencia semiseca han sido considerados como ideales para la transferencia de proteínas de bajo o mediano peso molecular, pero no así para la transferencia de proteínas de alto peso molecular. En cambio, la transferencia húmeda es considerada como el método de elección para la transferencia de proteínas de alto peso molecular (Kilmer G *et al.*, 2015). Por lo tanto, en el presente estudio se consideró inicialmente la transferencia húmeda, pero, aunque se logró transferir proteínas de un peso molecular mayor a 150 kDa en membranas de PVDF, no se detectaron las proteínas de interés (TSC2 y mTOR, 200 y 289 kDa, respectivamente). Ante tal situación, se utilizó la transferencia semiseca, decidiendo aumentar el amperaje para mejorar la capacidad de transferencia. Probando diferentes amperajes y variando el tiempo de la transferencia se determinó que utilizando 270 mA de corriente durante 2.5 hrs fue adecuado para transferir proteínas de peso molecular mayor a 150 kDa (datos no mostrados). Utilizando esta condición de transferencia, se probaron diferentes condiciones de bloqueo, dilución de anticuerpos primarios y secundarios, obteniendo como condiciones ideales las que se enlistan en las tablas 2-5.

7.3 Niveles de t-TSC2 y p-TSC2

Como se mencionó anteriormente, en nuestro laboratorio ya se había observado un aumento en los niveles de t-Akt y p-Akt en las ratas tratadas durante uno y dos meses con FeNTA (grupos F y DF), además de un aumento en los niveles de ciclina D1 y HIF 1 y 2 α , sugiriendo que la activación de Akt podría participar en la inhibición de TSC2, lo

que resultaría en la activación de mTORC1, y este mecanismo podría contribuir, al menos en parte, al aumento en los niveles de dichas proteínas. Por lo tanto, se decidió analizar primero los niveles de TSC2, en sus formas tanto total (t-TSC2) como fosforilada en la T1462 (p-TSC2). Para este análisis, se utilizaron muestras del protocolo realizado durante el desarrollo de la presente tesis, así como de un protocolo realizado anteriormente en el laboratorio, corroborando la reproducibilidad de éstas alteraciones entre protocolos.

En la figura 11 se muestran imágenes de Western blot representativas, así como la gráfica de los análisis densitométricos de todas las autorradiografías en corteza renal después de un mes de exposición a FeNTA.

Como se puede observar, el grupo tratado únicamente con DEN (D) no mostró cambios con respecto al grupo control (C), en ninguna de las determinaciones analizadas. En cambio, los niveles t-TSC2 y p-TSC2 en los grupos F y DF presentaron un aumento significativo con respecto al grupo control, sin presentar diferencia entre ellos. Específicamente, los niveles de t-TSC2 se incrementaron alrededor de 6-7 veces, mientras que los de p-TSC2 se incrementaron alrededor de 4 veces.

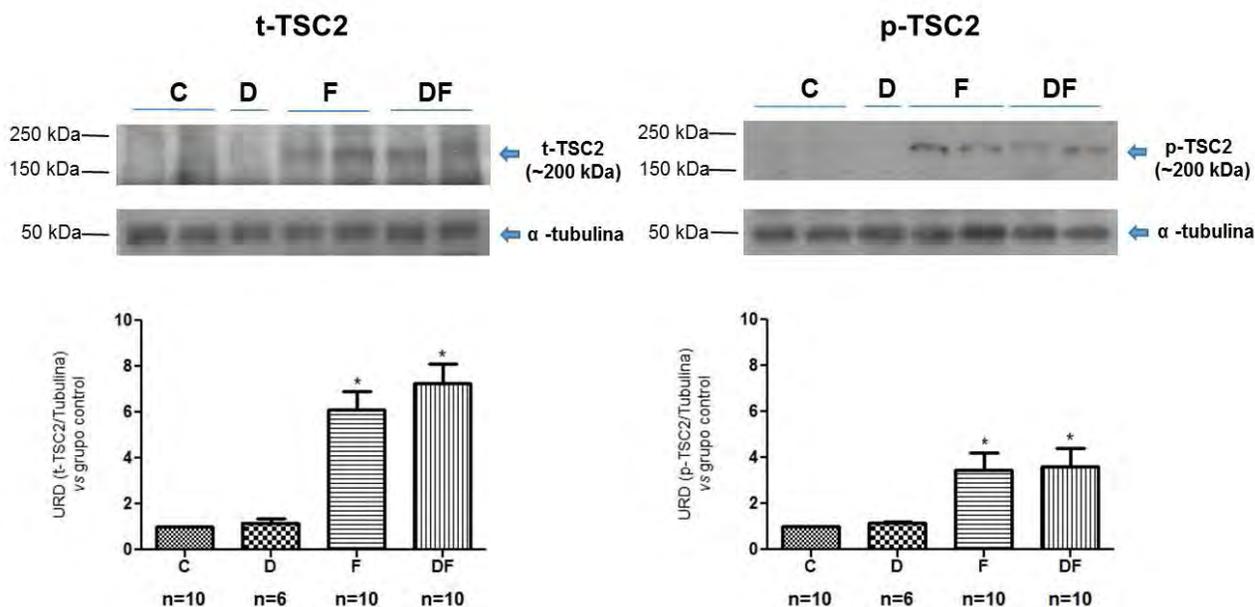


Figura 11. Niveles renales de TSC2 total (t-TSC2) y fosforilada (p-TSC2) después de un mes de tratamiento con FeNTA. En la parte superior se muestran las imágenes de Western blot representativas donde se observan las bandas correspondientes a t-TSC2 (A) y p-TSC2 (B), así como aquellas correspondientes a α-tubulina, que se utilizó como control de carga. En la parte inferior están las gráficas de los análisis densitométricos de todas las determinaciones. El grupo D no presentó cambios, en cambio en los grupos F y DF se observó un aumento significativo. Cada columna representa media ± error estándar (EE) de n muestras analizadas obtenidas de diferentes animales. * $p \leq 0.05$ vs. grupo control. URD, unidades relativas de densitometría.

Para caracterizar mejor el comportamiento de esta proteína durante la carcinogénesis se decidió analizar el estatus de t-TSC2 y p-TSC2 después de dos meses de tratamiento con el carcinógeno, ya que, por hallazgos previos, este tiempo parece representar una etapa temprana diferente de la carcinogénesis inducida con FeNTA (Figura 12). Como se puede observar tanto en las imágenes representativas como en

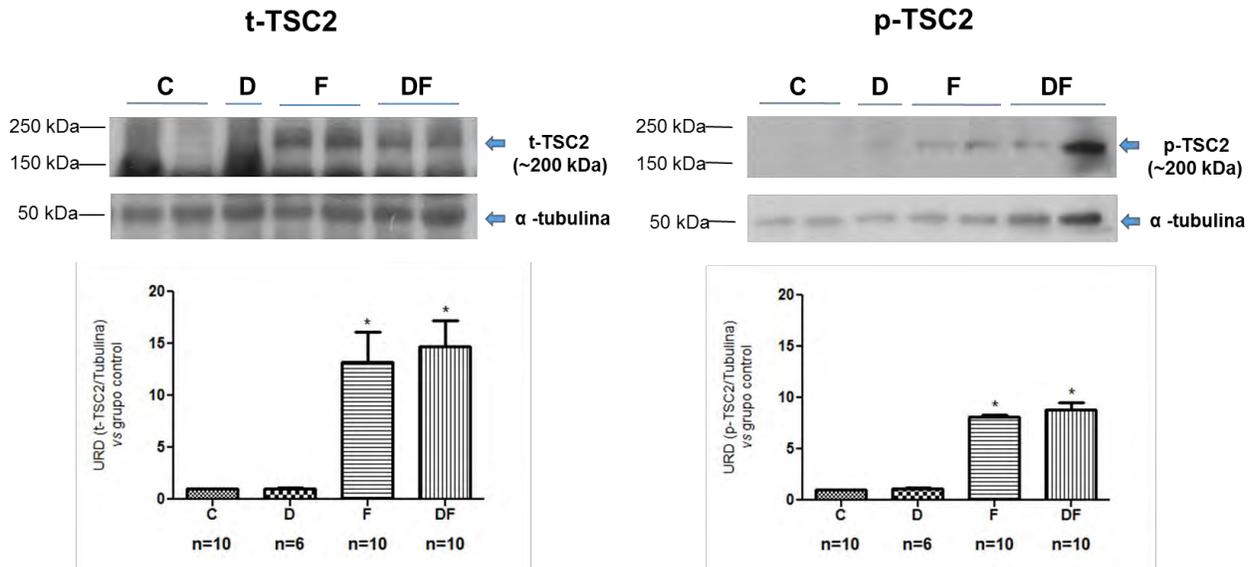


Figura 12. Niveles renales de TSC2 total (t-TSC2) y TSC2 fosforilado (p-TSC2) después de dos meses de tratamiento con FeNTA. En la parte superior se muestran las imágenes de Western blot representativas donde se observan las bandas correspondientes a t-TSC2 (A) y p-TSC2 (B), así como aquellas correspondientes a α -tubulina, que se utilizó como control de carga. En la parte inferior están las gráficas de los análisis densitométricos de todas las determinaciones. El grupo D no presentó cambios, en cambio en los grupos F y DF se observó un aumento significativo. Cada columna representa media \pm error estándar (EE) de n muestras analizadas obtenidas de diferentes animales. * $p \leq 0.05$ vs. grupo control. URD, unidades relativas de densitometría.

las gráficas, el grupo tratado únicamente con D no mostró cambios con respecto al grupo C. En cambio, los grupos F y DF presentaron un aumento de 13-15 veces para la proteína total, y de 8-9 veces para la proteína fosforilada, con respecto al grupo control, por lo que se puede decir que las alteraciones observadas a un mes no sólo persisten, sino que se exacerban a los dos meses de tratamiento. Asimismo, no hubo diferencia significativa entre los grupos F y DF.

7.4 Niveles de t-mTOR y p-mTOR

El aumento en los niveles de p-TSC2 es indicativo de que muy probablemente esté activando a mTOR cuando forma parte del complejo 1 (mTORC1). Por lo tanto, se midieron los niveles proteicos de esta cinasa tanto en su forma total (t-mTOR) como fosforilada en S2448 (p-mTOR), indicativa de la activación del complejo mTORC1.

En las figuras 13 y 14 se muestran imágenes de los Western blot representativos, así como las gráficas de los análisis densitométricos correspondientes a todas las determinaciones realizadas tanto de t-mTOR como de p-mTOR, después de uno y dos meses de tratamiento, respectivamente. En el caso de p-mTOR se observa un doblete, por lo que mediante el cálculo de desplazamiento electroforético relativo y el uso de controles positivos, como células HeLa ó U373, se determinó que la banda superior tiene un peso de 289 kDa, correspondiente a p-mTOR. La identidad de la banda inferior no se ha determinado.

Como se puede observar, ninguno de los grupos experimentales mostró cambios en los niveles de t-mTOR con respecto al grupo C en los tiempos estudiados; en cambio, los niveles de p-mTOR se incrementaron alrededor de 6 veces en los grupos F y DF a partir de un mes, y este incremento fue de alrededor de 7 veces después de dos meses de tratamiento, indicando la activación de mTOR debida al tratamiento con el carcinógeno.

Por otro lado, al igual que en el caso de TSC2, no se presentaron diferencias significativas entre los grupos F y DF.

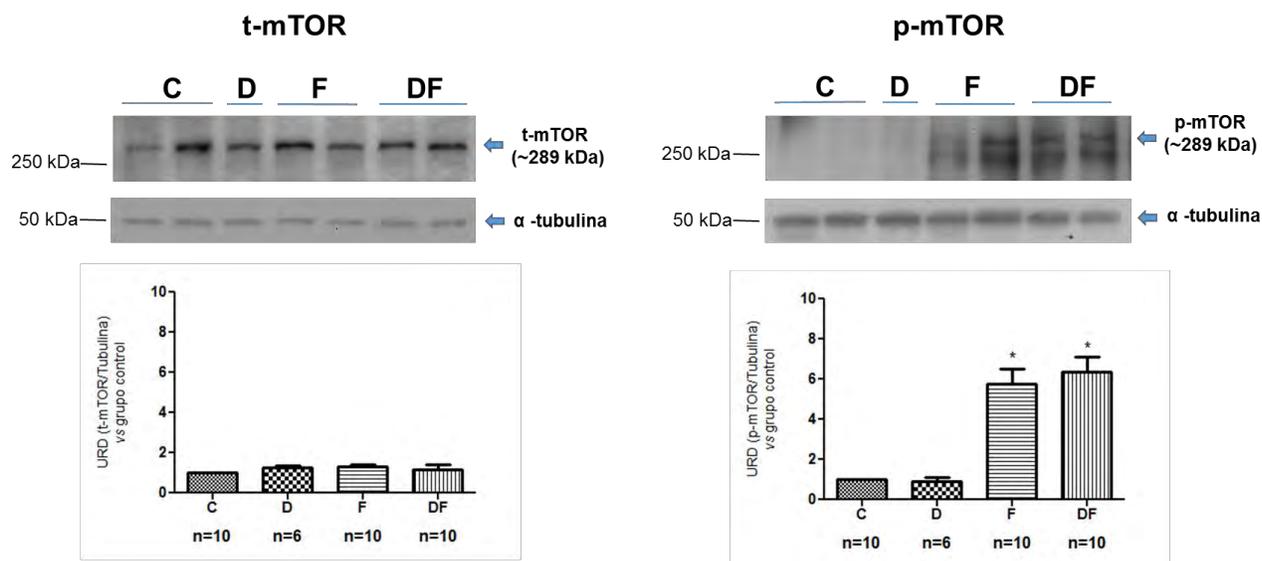


Figura 13. Niveles renales de mTOR total (t-mTOR) y fosforilado (p-mTOR) después de un mes de tratamiento con FeNTA. En la parte superior se muestran las imágenes de Western blot representativas donde se observan las bandas correspondientes a t-mTOR (A) y p-mTOR (B), así como aquellas correspondientes a α -tubulina, que se utilizó como control de carga. En la parte inferior están las gráficas de los análisis densitométricos de todas las determinaciones realizadas. Los niveles t-mTOR no cambiaron en ninguno de los grupos, mientras que en los grupos F y DF se observó un aumento significativo de p-mTOR. Cada columna representa la media \pm error estándar (EE) de n número de muestras analizadas obtenidas de diferentes animales. * $p \leq 0.05$ vs. grupo control. URD, unidades relativas de densitometría.

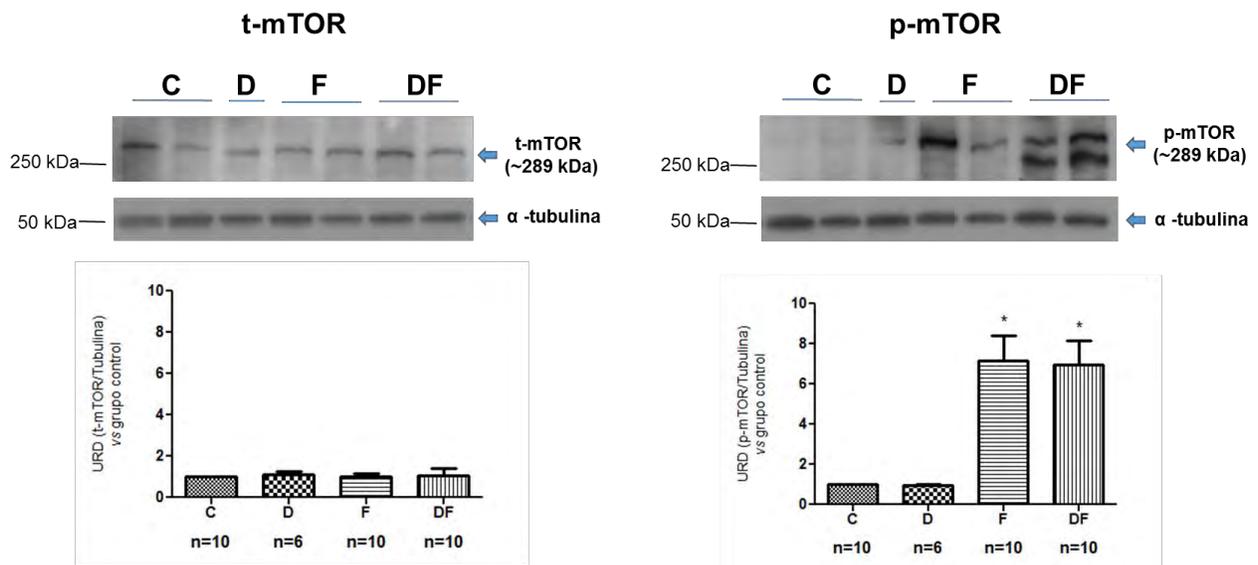


Figura 14. Niveles renales de mTOR total (t-mTOR) y fosforilado (p-mTOR) después de dos meses de tratamiento con FeNTA. En la parte superior se muestran las imágenes de Western blot representativas donde se observan las bandas correspondientes a t-mTOR (A) y p-mTOR (B), así como aquellas correspondientes a α -tubulina, que se utilizó como control de carga. En la parte inferior están las gráficas de los análisis densitométricos de todas las determinaciones realizadas. Los niveles t-mTOR no cambiaron en ninguno de los grupos, mientras que en los grupos F y DF se observó un aumento significativo de p-mTOR. Cada columna representa la media \pm error estándar (EE) de n número de muestras analizadas obtenidas de diferentes animales. * $p \leq 0.05$ vs. grupo control. URD, unidades relativas de densitometría.

8 DISCUSIÓN

La vía Akt/TSC2/mTORC1 está involucrada en múltiples eventos celulares como son supervivencia, crecimiento y proliferación, y se ha demostrado que dicha vía está alterada en diversos tipos de cáncer (Martelli AM *et al.*, 2010). La cinasa p-Akt fosforila a la proteína TSC2 en la T1462, desactivándola (Li Y *et al.*, 2004; Manning BD & Cantley LC, 2003). La inactivación de TSC2 permite que mTOR interaccione con Rheb-GTP (Zheng X *et al.*, 2014), y mediante dicha interacción se facilita la fosforilación de mTOR en la S2448, cuando forma parte del complejo 1 (mTORC1), lo que aumenta la capacidad traduccional de las células y particularmente de algunos mRNAs, como son los de ciclina D1 y HIF (Dodd KM & Tee AR, 2015; Miloslavski R *et al.*, 2014; Thoreen CC *et al.*, 2012).

Particularmente, en tumores de CCR humano se ha reportado la activación de esta vía, presentándose un aumento en los niveles de p-Akt (S473), p-TSC2 (T1462) y p-mTOR (S2448), lo que correlaciona con un incremento en los niveles proteicos de ciclina D1 y HIF 1 y 2 α (Youssef RM *et al.*, 2012; Ma XM & Blenis J, 2009; Shen C & Kaelin WG Jr, 2013). Sin embargo, hasta la fecha no había reportes del comportamiento de esta vía de señalización en etapas tempranas de la carcinogénesis renal, las cuales son prácticamente imposibles de estudiar en el humano, debido a que esta enfermedad generalmente se detecta cuando está muy avanzada, e incluso cuando ya se desarrolló metástasis (Dalgin GS *et al.*, 2007). Por lo tanto, se decidió analizar su comportamiento en etapas tempranas del modelo experimental de carcinogénesis renal por exposición a FeNTA, en el cual se desarrollan tumores que presentan características histológicas muy similares al CCR de células claras, que es el subtipo histológico más común en el humano, lo que hace proponer al modelo como una herramienta útil para comprender esta enfermedad. El hallazgo de nuestro laboratorio que constituyó el antecedente directo del presente trabajo fue el aumento en los niveles de t-Akt y p-Akt después de un mes de tratamiento con FeNTA, incremento que se mantuvo después de dos meses (Pacheco-Bernal I, 2014). En cambio, los niveles de la cinasa se conservaron normales

tanto en hígado como en pulmón, donde no se desarrollan tumores primarios con nuestro esquema de tratamiento, apoyando fuertemente la hipótesis de la participación de Akt en la carcinogénesis renal (Pacheco-Bernal I, 2014). Aunado a esto, previamente se encontró un aumento en los niveles proteicos de ciclina D1 y HIF 1 y 2 α en riñón después de uno y dos meses de tratamiento (Aguilar-Alonso FA, 2010; Curiel-Muñiz P, 2014). Por lo tanto, una de las probables consecuencias de la activación de Akt sería la inactivación de TSC2, con la consecuente activación del complejo 1 de mTOR (mTORC1), lo que en última instancia podría ser uno de los mecanismos que llevan al aumento previamente observado en los niveles proteicos de ciclina D1 y HIF 1 y 2 α en etapas tempranas. Partiendo de esto, se decidió analizar los niveles de TSC2 y mTOR, tanto de las proteínas totales (t-TSC2 y t-mTOR, respectivamente) como sus formas fosforiladas, en la T1462 para el caso de TSC2 (p-TSC2), y en la S2448 para mTOR (p-mTOR), fosforilaciones indicativas de la regulación de su actividad en esta vía de señalización. Esto se realizó en muestras de corteza renal obtenidas después de uno y dos meses de exposición a FeNTA, tiempos que representan diferentes etapas tempranas de la carcinogénesis renal en este modelo experimental.

Ahora bien, el compuesto identificado como carcinógeno renal es el FeNTA (Okada S & Midorikawa O, 1982; Toyokuni S, 1996), por lo que se incluyó un grupo expuesto únicamente al mismo. Así mismo, en el presente trabajo, además del grupo control (C) que recibió los vehículos de los tratamientos, se incluyó el grupo expuesto sólo con el iniciador tumoral DEN (D), en el cual no se encontraron alteraciones en ninguna de las determinaciones realizadas en los tiempos estudiados, lo cual indica que este tratamiento por sí solo no tiene efecto en los niveles de TSC2 ni de mTOR, tanto de sus formas totales como fosforiladas. En cambio, las alteraciones se presentan en los dos grupos tratados con FeNTA (F y DF), por lo que se puede decir que las alteraciones observadas son efecto del carcinógeno. Es importante aclarar que el esquema de exposición a DEN utilizado en nuestro protocolo no induce el desarrollo de tumores renales, por lo que las alteraciones encontradas muy probablemente participen en el proceso de carcinogénesis renal inducido por FeNTA.

En el grupo F se encontró que aumentan los niveles de p-TSC2 después de un mes de tratamiento y este incremento se mantuvo después de dos meses. Por lo tanto, el hecho de que esta alteración persista, sugiere fuertemente que la fosforilación de TSC2 puede estar participado en el proceso de carcinogénesis por exposición al carcinógeno FeNTA. En cuanto a los niveles de TSC2 total, inicialmente esperábamos que se encontraran disminuidos, ya que así se han reportado en el CCR humano, además de que su fosforilación inactivadora mediada por Akt puede inducir la disociación del complejo TSC1/TSC2, haciendo a TSC2 más susceptible a degradación (Martelli AM *et al.*, 2010), y de hecho esto podría explicar la disminución de sus niveles en el CCR humano, donde p-Akt está aumentada. Sin embargo, en el presente trabajo se encontró un aumento en los niveles de t-TSC2 tanto después de un mes como después de dos meses, lo que probablemente sea una respuesta para intentar proteger contra la malignización a las células renales de ratas sometidas al tratamiento con el carcinógeno, ya que, el aumento de los niveles de t-TSC2 puede llevar a la prevención/inhibición de la activación de mTOR cuando forma parte de mTORC1. Sin embargo, encontramos que los niveles de p-mTOR (S2448, indicativo de la activación de mTORC1) están aumentados tanto a uno como a dos meses de tratamiento, por lo que parece ser que el aumento en los niveles de t-TSC2 no es suficiente para evitar la activación de mTORC1. Acorde con lo anterior, al comparar los niveles relativos de p-TSC2 con respecto a t-TSC2, resulta que aproximadamente el 50% de esta proteína está siendo fosforilada (inactivada). Entonces, muy probablemente en estos tiempos de estudio muchas de las células expuestas al insulto carcinogénico expresen TSC2 como respuesta protectora, pero aquellas células donde los estímulos pro-carcinogénicos prevalecen, como fosforilación inactivante de TSC2 y la consecuente fosforilación activadora de mTORC1, serán las que posteriormente se malignizarán llevando al desarrollo de CCR en nuestro modelo de estudio (Vargas-Olvera CY, 2009).

Por otro lado, el aumento en los niveles de t-TSC2 puede ser una respuesta celular que tenga otras implicaciones además de la regulación de mTORC1. Se ha descrito que existe una relación directa entre los niveles proteicos de TSC2 y los de OGG1, la cual

es una glicosilasa que participa en la reparación del DNA. Además, se ha reportado que esta glicosilasa se encuentra disminuida en el CCR humano (Audebert M *et al.*, 2000). Con base en lo anterior, se puede pensar que el aumento en los niveles de t-TSC2 en etapas tempranas podría llevar a un aumento en los niveles de OGG1, lo que ayudaría a contener el daño al DNA de las células renales que son expuestas al carcinógeno (Simone S *et al.*, 2008; Habib SL *et al.*, 2010), dado que dicho daño ha sido bien establecido en el modelo experimental (Kawanishi S *et al.*, 2002; Bahnemann R *et al.*, 1998).

Asimismo, debemos mencionar que, a dos meses de tratamiento con el carcinógeno encontramos una correlación entre el aumento de los niveles renales de p-Akt inducido por FeNTA, que habían sido previamente estudiados en nuestro laboratorio, con el aumento actual en los niveles de p-TSC2 y p-mTOR. En cambio, en nuestro estudio previo, a un mes de tratamiento no encontramos alteraciones en los niveles de p-Akt para el grupo tratado sólo con FeNTA, mientras que sí estamos encontrando un aumento en los niveles de p-TSC2 y p-mTOR a este tiempo de estudio. Esta falta de correlación puede tener diversas explicaciones. Por ejemplo, se ha sugerido que las fosforilaciones de activación sobre Akt (T308 y S473), además de brindarle cierta actividad, también pueden mediar su selectividad por algunos sustratos específicos. Particularmente, se ha sugerido que la fosforilación en T308, pero no necesariamente en S473, lleva a la fosforilación de TSC2 en su T1462 (Vladakonda L *et al.*, 2013). Dado que la fosforilación analizada en Akt fue en S473, si esta sugerencia es correcta, probablemente analizando la fosforilación en T308 sí haya correlación con los niveles de p-TSC2 encontrados en el presente proyecto. Otra manera de explicar la falta de correlación entre los niveles de p-Akt y p-TSC2 en este grupo de estudio podría ser que, dado que las mediciones que realizamos mediante WB son a un tiempo puntual de tratamiento, en ese momento Akt ya haya realizado su actividad de fosforilar a TSC2 y esté siendo desfosforilada con el fin de contener el proceso carcinogénico, y por lo tanto, el incremento en los niveles de p-TSC2 observado a un mes de exposición al carcinógeno en el grupo tratado únicamente con FeNTA sea un efecto remanente de la

actividad de Akt. Esta idea está apoyada en el hecho de que, a un mes de tratamiento, observamos que en algunas de las alteraciones que hemos estudiado, el comportamiento no presenta un patrón como el que se esperaría canónicamente, lo cual puede deberse a que durante el establecimiento del proceso carcinogénico ocurre una adaptación continua de las células a los insultos. Sin embargo, a los dos meses de tratamiento, tiempo que representa una etapa temprana distinta y más avanzada, las alteraciones que observamos son aquellas que prevalecieron llevando en última instancia al desarrollo de la neoplasia. No obstante, tampoco podemos descartar que otra cinasa pudiera estar fosforilando a TSC2 en este residuo, tal como RSK1, la cual fosforila a TSC2 en el residuo de interés con una menor afinidad (Dibble CC & Manning BD, 2010).

Por su parte, los niveles de t-mTOR se mantuvieron sin cambios en el tratamiento con FeNTA con respecto al grupo control en los dos tiempos estudiados, a diferencia de lo reportado en el CCR humano, en donde los niveles totales de esta proteína se incrementan (Youssef RM *et al.*, 2012). Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer reporte de los niveles proteicos de t-mTOR en etapas tempranas del desarrollo de CCR. Ahora bien, aunque la regulación de los efectos de muchas proteínas se da mediante cambios en sus niveles proteicos, en el caso de mTOR la principal forma de regularse es mediante modificaciones post-traduccionales, de las cuales, la fosforilación es la más estudiada. Por lo tanto, el hallazgo del mantenimiento sin cambio de los niveles de t-mTOR en estos tiempos de la carcinogénesis renal refuerza la idea de la regulación de esta cinasa a nivel post-traducciona, evidenciado por el aumento de los niveles de p-mTOR.

Ahora bien, aunque el FeNTA por sí solo genera CCR, ocurre con una baja incidencia (12-20%) y se necesita un periodo prolongado de tratamiento para que esto suceda (alrededor de 1 año) (Okada S & Midorikawa O, 1982). Por lo tanto, en el protocolo de tratamiento utilizado en nuestro laboratorio se combina la exposición de los animales al iniciador tumoral DEN con el promotor tumoral FeNTA ya que esta combinación lleva al desarrollo de CCR con una mayor incidencia y en un menor tiempo (aproximadamente

6 meses) (Vargas-Olvera CY *et al.*, 2012) que con la administración únicamente de FeNTA.

En este grupo DF se encontró que, de manera similar al grupo FeNTA, existe un aumento en los niveles de p-TSC2 después de un mes, y este aumento se mantiene después de dos meses de tratamiento, lo que correlaciona con un aumento en los niveles de p-mTOR tanto a uno como a dos meses, mientras que los niveles de t-mTOR permanecen sin cambios en ambos tiempos de estudio, teniendo implicaciones similares a las que se han discutido para el grupo FeNTA. Interesantemente, como antecedentes directos del presente trabajo (Pacheco-Bernal I, 2014), teníamos que los niveles de p-Akt se incrementan tanto a uno como a dos meses de tratamiento en el grupo DF, lo cual correlaciona perfectamente con el comportamiento encontrado de TSC2 y mTOR, y que difiere parcialmente con el comportamiento discutido para el grupo FeNTA a un mes de tratamiento. Esta diferencia puede sugerirse como una de las razones que lleven al desarrollo de CCR en un menor tiempo con el tratamiento DF, es decir, que el aumento en la activación de Akt desde un mes de tratamiento puede contribuir al desarrollo más rápido del proceso carcinogénico en este grupo de estudio, y esto puede estar mediado en parte por su posible participación en la regulación de la vía TSC2/mTORC1. Así mismo, este comportamiento se puede interpretar como una evidencia más de que los tiempos de exposición a FeNTA estudiados representan etapas tempranas del desarrollo de la neoplasia ya que éstas son alteraciones pro-carcinogénicas dadas las funciones biológicas de ambas proteínas.

El comportamiento global de p-TSC2 y p-mTOR indican que efectivamente se está dando una regulación positiva de esta vía, lo cual culminaría con la activación de sus moléculas blanco, como son las proteínas 4EBP1 y S6K1, específicamente las fosforilaciones en T389 para S6K1 (p-S6K1), y T70 para 4EBP1 (p-EBP1), indicativas de la activación mediada por mTORC1. La activación de estos blancos moleculares puede tener como consecuencia en última instancia el aumento en los niveles de diferentes proteínas, como ciclina D1 y HIF 1 y 2 α (Martelli AM *et al.*, 2010; Ma XM & Blenis J, 2009). Interesantemente, en nuestro laboratorio se ha encontrado un aumento

en los niveles tanto de ciclina D1 como de HIF 1 y 2 α a estos tiempos de estudio (Aguilar-Alonso FA, 2010; Navarro-García R, 2013; Curiel-Muñiz P, 2014), sugiriendo que la activación de Akt podría inducir la fosforilación y consecuente inactivación de TSC2, llevando a la activación de mTORC1, y este último podría ser responsable, al menos en parte, del aumento previamente observado en los niveles proteicos de ciclina D1 y HIF 1 y 2 α . Más aún, estas moléculas también se han observado aumentadas en los tumores experimentales, al igual que en el CCR humano, por lo que muy probablemente también p-Akt, p-TSC2 y p-mTOR estén aumentados en las neoplasias inducidas con FeNTA, lo que coincidiría con lo reportado en los tumores humanos.

9 CONCLUSIONES

Los niveles renales de TSC2 fosforilada en T1462 aumentan después de un mes de tratamiento con el carcinógeno, y este aumento se exagera a los dos meses, lo que correlaciona con el aumento sostenido en los niveles de mTOR fosforilada en S2448 a ambos tiempos estudiados. Estos resultados concuerdan con el comportamiento previamente observado de p-Akt.

En conjunto, estas observaciones sugieren que la activación de la vía Akt/TSC2/mTOR puede ser uno de los mecanismos involucrados en la carcinogénesis renal por FeNTA.

10 PERSPECTIVAS

- Analizar el estatus de la vía Akt/TSC2/mTORC1 en tumores de CCR inducidos con FeNTA.
- Analizar los niveles de los blancos canónicos de mTORC1, como son 4EBP1 y S6K, tanto en etapas tempranas como en tumores.
- Para corroborar que Akt sea la responsable de fosforilar a TSC2, se podría estudiar la interacción de estas proteínas mediante la técnica de co-inmunoprecipitación (CoIP).

11 ANEXOS

11.1 Preparación de nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)

NaHCO₃ 120 mM. Se disuelven 0.504 g de NaHCO₃ en 40 mL de agua desionizada y se aforan a 50 mL.

Nitrato de hierro Fe(NO₃)₃• 9H₂O 160 mM. Se disuelven 0.646 g de nitrato de hierro y se aforan a 10mL con NaHCO₃ 120 mM.

Nitrilotriacetato de sodio Na₂NTA 320 mM. Se disuelven 1.88 g de Na₂NTA en 25 mL de solución de NaHCO₃ 120 mM.

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

11.2 Determinación de proteínas por el método de Bradford

Soluciones

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

Procedimiento

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

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

Tabla 6. Preparación de la curva patrón de ASB para la determinación de proteínas totales mediante la técnica de Bradford.

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

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

11.3 Electroforesis

11.3.1 Preparación de los geles para electroforesis

Para el caso de TSC2 y p-TSC2:

1. Se preparan geles de gradiente de SDS-poliacrilamida a partir de una solución de acrilamida al 30% con agitación suave. El gel de resolución inferior tiene una concentración de la solución de acrilamida al 5%, el gel de resolución superior tiene una concentración de la solución de acrilamida al 7%, y el gel concentrador tiene una concentración de la solución de acrilamida al 4%.
2. Se vacía la mezcla del gel de resolución inferior en los moldes, llenando hasta 1.5 cm de la base inferior del molde.
3. Se añaden 150 μ L de isopropanol para eliminar las burbujas de la superficie del gel de resolución y se deja polimerizar durante 20 min.
4. Se elimina el isopropanol por decantación y se realizan 3 lavados con agua desionizada para eliminar la acrilamida no polimerizada.
5. Se elimina el exceso de humedad con papel filtro Whatman.
6. Se prepara una segunda mezcla de acrilamida al 7% y se coloca sobre el gel de resolución inferior hasta alcanzar un ancho de 3.5 cm. Este es el gel de resolución superior.
7. Se repiten los pasos 3 a 5.
8. Se prepara una tercera mezcla de acrilamida al 4% y se coloca sobre el gel de resolución superior hasta llegar al borde del molde.
9. Se coloca el peine evitando hacer burbujas.
10. Se dejan polimerizar 15 minutos (éste gel será llamado gel concentrador).
11. Se quitan con cuidado los peines y se lava con agua para eliminar la acrilamida no polimerizada.
12. Se colocan cuidadosamente los geles en una cámara de electroforesis con amortiguador de electroforesis (Tris 25mM, glicina 250 mM, SDS 0.1%, pH=8.3).

Para el caso de mTOR y p-mTOR:

La preparación de los geles de poliacrilamida es similar al método descrito anteriormente, con la variación en la concentración de los geles. El gel de resolución inferior tiene una concentración de la solución de acrilamida al 7%, el gel de resolución superior tiene una concentración de la solución de acrilamida al 5%, y el gel concentrador tiene una concentración de la solución de acrilamida al 4%.

11.3.2 Preparación de las muestras

1. Se coloca un volumen de muestra correspondiente a 120 μg de proteína (para el caso de mTOR y p-mTOR) o bien de 110 μg (para el caso de TSC2 y p-TSC2) en un tubo eppendorff.
2. Se coloca el mismo volumen de buffer desnaturalizante (Tris HCl 50 mM pH=6.8, β -mercaptoetanol 1%, SDS 1%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%)
3. Se mezcla suavemente.
4. Se colocan los tubos en agua hirviendo durante 4 min.
5. Se colocan las muestras en hielo durante 2 min y después de una ligera centrifugación se cargan las muestras en el gel concentrador.
6. Se corren los geles a 110 mV por 10 min y posteriormente a 100 mV durante 2.5 h en una cámara de electroforesis (BIO-RAD)
7. Se desmontan los moldes y se retiran los geles con mucho cuidado.
8. Se elimina el gel concentrador y se coloca el gel de resolución en amortiguador de transferencia durante 10 min para su para la posterior transferencia de proteínas a membranas de PVDF.

11.4 Transferencia a membrana de fluoruro de polivinilo (PVDF)

1. Se recortan las membranas (IMMOBILON, Millipore) con dimensiones de 9x8 cm.

2. Minutos antes de terminada la electroforesis se acondicionan las membranas para la transferencia como se indica en seguida:

- Se sumergen 5 min en metanol.
- Posteriormente y evitando que las membranas se sequen, se elimina el metanol sumergiendo las membranas en agua durante 2 min.
- Se retiran las membranas del agua y se colocan en amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, metanol 10%, pH=8.3) durante 10min.

2. La transferencia semi seca se realiza en el equipo (Transblot SD Semidry transfer cell, BioRad) y se monta de la siguiente manera:

- Se coloca un papel filtro Whatman (previamente humedecido en amortiguador de transferencia) sobre el ánodo del equipo.
- Se coloca la membrana sobre el papel filtro cuidando que la membrana no se seque y evitando la formación de burbujas.
- Se coloca el gel sobre la membrana.
- Se coloca un segundo papel filtro y se eliminan las burbujas.
- Se coloca el cátodo del equipo cuidando que el sistema haya cerrado bien.
- La transferencia se corre durante 2h a 135 mA/gel.

3. Minutos antes de que termine la transferencia se preparan las soluciones de bloqueo con suero fetal bovino (SFB) al 10% diluido en PBS-Tween (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM; Na₂HCO₃ 100 mM, KH₂CO₃ 2 mM, Tween 0.1%, pH=7.4), o bien amortiguador de Tris salino al 5% diluido en agua desionizada (TBS por sus siglas en inglés; Tris-Cl 50 mM, NaCl 150 mM, pH= 7.5, se diluye al 5% con agua desionizada).

4. Terminada la transferencia se retiran las membranas y se colocan en 5 mL de solución de bloqueo con agitación constante. Las condiciones específicas para cada proteína se muestran en las tablas 2 a 5.
5. Minutos antes de que termine el bloqueo se preparan 5 mL de la dilución del anticuerpo primario para cada membrana (la dilución, así como el diluyente depende de la proteína a detectar; ver tablas 2 a 5).
6. Terminado el tiempo de bloqueo se elimina la solución de bloqueo y se colocan 5 mL de anticuerpo primario y se deja en agitación constante durante 10 a 12 h a 4 °C.
7. Posteriormente se retira el anticuerpo primario y se hacen 3 lavados de 15 min c/u a las membranas con PBS-Tween (para TSC2, p-TSC2, mTOR) o TBS (para el caso de p-mTOR).
8. Antes de terminar el último lavado se prepara la dilución del anticuerpo secundario con PBS-Tween (el tipo de anticuerpo y la dilución depende de la proteína a detectar, ver tablas 2 a 5).
9. Una vez terminado el último lavado, se retira el PBS-Tween o TBS y se coloca el anticuerpo secundario. Se deja incubando durante 1 h con agitación constante.
10. Posteriormente se retira el anticuerpo secundario y las membranas se lavan 3 veces con PBS durante 15 min cada uno.

11.5 Detección de proteínas

1. Se preparan 400 µL del sustrato de detección (luminol y H₂O₂) (Millipore Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore Corporation, MA, USA) por cada membrana a revelar (IMMOBILON, Millipore) y evitando la exposición de este sustrato a la luz se deja a temperatura ambiente durante 30 min.
2. En la oscuridad se recortan las placas de rayos X del mismo tamaño que las membranas.

3. En la oscuridad se colocan las membranas en el cassette de detección.
4. Se colocan 400 μL del sustrato de detección (luminol y H_2O_2) (Millipore ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore Corporation, MA, USA) sobre la membrana (lado que contiene las proteínas), posteriormente se coloca un acetato para distribuir uniformemente el sustrato de detección (eliminando las burbujas que se formen).
5. Posteriormente, se expone una placa de rayos X encima de la membrana durante cierto tiempo (este tiempo depende de la proteína a detectar).

11.6 Revelado de las placas de rayos X

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

11.7 Revelado en el fotodocumentador

1. Se preparan 400 μL del sustrato de detección para cada membrana (IMMOBILON, Millipore) evitando su exposición a la luz y se deja a temperatura ambiente durante 30 min.

2. Se utiliza el fotodocumentador ChemiDoc™ XRS (BioRad), mediante su aplicación de detección que quimioluminiscencia.
3. Se saca la charola del fotodocumentador, se coloca un acetato limpio y encima de éste se coloca la membrana (el lado que contiene las proteínas queda cara arriba).
4. Se colocan 400 µL del sustrato de detección (luminol y H₂O₂) (Millipore Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore Corporation, MA, USA) sobre la membrana. Se cubre toda la membrana con luminol, pero si se requiere ahorrar reactivo se puede colocar el sustrato de detección solo sobre el área donde está la proteína de interés a detectar.
5. Posteriormente, se cierra la charola y se da inicio al programa de detección de quimioluminiscencia, el cual registra fotografías a intervalos de tiempo definidos.
5. Se guardan las fotografías deseadas en un dispositivo USB para su posterior análisis con el programa de Image J (Broken Symmetry Soft).

12 REFERENCIAS

Agarwal MK *et al.*, (2005). Vitamin E inhibits hepatic oxidative stress, toxicity and hyperproliferation in rats treated with the renal carcinogen ferric nitrilotriacetate. *Redox Report: Communications in free radical research*. 10(2): 62-70.

Aguilar-Alonso FA, (2010). Alteraciones en AP-1, MAPKs y ciclina D1 inducidas por la exposición subcrónica al carcinógeno renal FeNTA y efecto de un extracto de semillas de tamarindo (EST). Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

Athar M & Iqbal M, (1998). Ferric nitrilotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis*. 19(6): 1133-1139.

Audebert M *et al.*, (2000). Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Research*. 60(17): 4740-4744.

Awai M *et al.*, (1979). Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *American Journal of Pathology*. 95(3): 663-673.

Bahnemann R *et al.*, (1998). Different patterns of kidney toxicity after subacute administration of Na-nitrilotriacetic acid and Fe-nitrilotriacetic acid to Wistar rats. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*. 46(1): 166-175.

Banumathy G & Cairns P, (2010). Signaling pathways in renal cell carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*. 10(7): 658-664.

Bellacosa A *et al.*, (2005). Activation of AKT kinases in Cancer: implications for therapeutic targeting. *Advances in Cancer Research*. 94:29-86.

Bjorge T *et al.*, (2004). Relation of height and body mass index to renal cell carcinoma in two million Norwegian men and women. *American Journal of Epidemiology*. 160 (12): 1168–76.

Bradford MM, (1976.) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-54.

Bravi F *et al.*, (2007). Food groups and renal cell carcinoma: A case-control study from Italy. *International Journal of Cancer*. 120(3): 681-685.

Bondy CA & Cheng CM, (2004). Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *European Journal of Pharmacology*. 490(1-3):25-31.

Cantley LC, (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 296(5573): 1655-1657.

Consortium ECTS, (1993). Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell*. 75(7): 1305–1315.

Copp J *et al.*, (2009). TORC-specific phosphorylation of mTOR: phosphor-Ser2481 is a marker for intact mTORC2. *Cancer Research*. 69(5): 1821-1827.

Culjkovic B *et al.*, (2006). eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *Journal of Cell Biology*. 175(3): 415–426.

Curiel-Muñiz P (2012). Comportamiento de la proteína cinasa C z en etapas tempranas de un modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA. Tesis de licenciatura en Química Farmacéutico Biológica, Facultad de Química, UNAM.

Curiel-Muñiz P (2014) Efectos del aumento en los niveles de PKC ζ en un modelo de carcinogénesis renal inducido por FeNTA. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

Dalgin GS *et al.*, (2007). Identification and characterization of renal cell carcinoma gene markers. *Cancer Informatics*. 3: 65-92.

Datta SR *et al.*, (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development*. 13(22): 2905-2927.

Dibble CC & Manning BD, (2010). The TSC1-TSC2 complex: A key signal-interacting node upstream of TOR. *Enzymes*. 28: 21-48.

Dodd KM & Tee AR, (2015). STAT3 and mTOR; co-operating to drive HIF and angiogenesis. *Oncoscience*. 2(11): 913-914.

Dowling RJ *et al.*, (2010). Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1804(3): 433–439.

Ebina Y *et al.*, (1986). Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of iron- and aluminum-nitritoltriacetate complexes in rats. *Journal of the National Cancer Institute*. 76(1):107-113.

Ecker K & Hengst L, (2009). Skp2: caught in the Akt. *Nature Cell Biology*. 11(4): 377-9.

Fang J *et al.*, (2009). Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61(4): 290–302.

Fingar DC *et al.*, (2004). mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and Cellular Biology*. 24(1): 200–216.

Fisher R *et al.*, (2013). Current and future systemic treatments for renal cell carcinoma. *Seminars in Cancer Biology*. 23(1): 38-45.

Gago-Domínguez M & Castelao JE, (2006). Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radical Biology & Medicine*. 40 (4): 721-33.

Ganesamoni R *et al.*, (2012). Status of oxidative stress in patients with renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*. 187(4): 1172-6.

Gupta K *et al.*, (2008). Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer Treatment Reviews*. 34(3): 193–205.

Guyton AC & Hall JE (1997). Unidad V. Los riñones y los líquidos corporales, en *Tratado de fisiología médica*. Novena Edición. Prentice Hall, 345-349.

Habib SL *et al.*, (2010). Novel mechanism of reducing tumorigenesis: upregulation of the DNA repair enzyme OGG1 by rapamycin-mediated AMPK activation and mTOR inhibition. *European Journal of Cancer*. 46(15): 2806-2820.

Hanada M *et al.*, (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1697(1-2): 3-16.

Hanahan D & Coussens LM, (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 21(3): 309-322.

Hanahan D & Weinberg RA, (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144 (5): 646-74.

Harris WB, (2015). Biomarkers for evaluating racial disparities in clinical outcome in patients with renal cell carcinoma. *Molecular Aspects of Medicine*. 45: 47-54.

Hennenlotter J *et al.*, (2012). Akt signalling parameters are different in oncocytomas compared to renal cell carcinoma. *World Journal of Urology*. 30(3): 353–359.

Hudson CC *et al.*, (2002). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Molecular and Cellular Biology*. 22(20): 7004–7014.

Hunt JD *et al.*, (2005). Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *International Journal of Cancer*. 114(1): 101–108.

International Agency for Research on Cancer, (2012). GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. The GLOBOCAN Project. Consultado en marzo de 2017 de <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.

Kandt RS *et al.*, (1992). Linkage of an important gene locus for tuberous sclerosis to a chromosome 16 marker for polycystic kidney disease. *Nature Genetics*. 2(1): 37–41.

Kawanishi S *et al.*, (2002). The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*. 32(9): 822-832.

Khan N & Sultana S, (2005). Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sciences*. 77 (11): 1194-210.

Khandrika L *et al.*, (2009). Role of oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Letters*. 282(2): 125–136.

Kilmer G *et al.*, (2015). Successful transfer of high molecular weight proteins during Western Blotting. Guide to gels and transfer methods for high molecular weight proteins, featuring the Pierce Power Blotter., ThermoFisher SCIENTIFIC.

Kim J *et al.*, (2009). Cytoplasmic sequestration of p27 via AKT phosphorylation in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 15(1): 81–90.

Kimoto T *et al.*, (2001). Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. *Virchows Arch*. 438(3): 259-270.

King RJB & Robins MW (2006). *Cancer Biology*. Third edition. Pearson Education Limited.

Knauo KX *et al.*, (2009). Mutual regulation of hypoxia-inducible factor and mammalian target of rapamycin as a function of oxygen availability. *Molecular Cancer Research*. 7(1): 88-98.

Koh MY *et al.*, (2008). HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends in Biochemical Sciences*. 33(11): 526-534.

Kurien BT & Scofield RH (2006). Western blotting. *Methods*. 38(4); 283-293.

Lash LH *et al.*, (2000). Modes of action of trichloroethylene for kidney tumorigenesis. *Environmental Health Perspectives*. 108 Suppl 2: 225-240.

Lee JE *et al.*, (2007). Intakes of coffee, tea, milk, soda and juice and renal cell cancer in a pooled analysis of 13 prospective studies. *International Journal of Cancer*. 121(10): 2246–2253.

Li L & Kaelin Jr. WG, (2011). New insights into the biology of renal cell carcinoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 25(4): 667-686.

Lin HK *et al.*, (2002). Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *The EMBO Journal*. 21(15):4037-48.

Lipworth L *et al.*, (2006). The epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *The Journal of Urology*. 176 (6 Pt 1): 2353-2358.

Liu MY *et al.*, (2003). Up-regulation of Hypoxia-inducible Factor 2 α in renal cell carcinoma associated with loss of Tsc-2 tumor suppressor gene. *Cancer Research*. 63(10): 2675-2680.

Li Y *et al.*, (2004). TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends in Biochemical Sciences*. 29(1): 32-8.

Manning BD & Cantley LC, (2003). Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends in Biochemical Sciences*. 28(11): 573-576.

Martelli AM *et al.*, (2010). The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/akt/Mammalian target of rapamycin signaling network in cancer stem cell biology. *Cancers*. 2(3): 1576-1596.

Ma XM & Blenis J, (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translation control. *Molecular Cell Biology*. 10(5): 307-318.

Mayer C *et al.*, (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes & Development*. 18(4): 423-434.

McLaughlin JK *et al.*, (1995). International renal-cell cancer study. VIII. Role of diuretics, other anti-hypertensive medications and hypertension. *International Journal of Cancer*. 63(2): 216–221.

Memmott RM & Dennis PA, (2009). Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signaling*. 21(5): 656–664.

Miloslavski R *et al.*, (2014). Oxygen sufficiency controls TOP mRNA translation via the TSC-Rheb-mTOR pathway in a 4E-BP-independent manner. *Journal of Molecular Cell Biology*. 6(3): 255-266.

Navarro-García R, (2013). Funcionalidad de la ciclina D1 en etapas tempranas de un modelo de carcinogénesis renal y efecto de un compuesto antioxidante. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

Nelson EC *et al.*, (2007). Renal cell carcinoma: current status and emerging therapies. *Cancer Treatment Reviews*. 33(3): 299-313.

Nishida Y *et al.*, (2007). Origin of renal proximal tubular injuries by Fe(III)-nta chelate. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*. 62(7-8): 608-612.

Okada S & Midorikawa O, (1982). Induction of the rat renal adenocarcinoma by ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA). *Japan Archives of Internal Medicine*. 29 (8): 485-91.

Okada S *et al.*, (1993). Glutathione cycle dependency of ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation in mouse proximal renal tubules. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 301(1): 138-142.

Ozes ON *et al.*, (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 401(6748): 82-85.

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 de licenciatura Química Farmacéutico Biológica, Facultad de Química, UNAM.

Pantuck AJ et al., (2007). Prognostic relevance of the mTOR Pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer*. 109(11): 2257-2267.

Pariante-Pérez TO, (2012). Participación de NF- κ B en la carcinogenicidad del nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) y efecto de un extracto de tamarindo (EST). Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

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

Rashidkhani B *et al.* (2005). Fruits, vegetables and risk of renal cell carcinoma: a prospective study of Swedish women. *International Journal of Cancer*. 113(3): 451–455.

Reuter S *et al.*, (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*. 49(11): 1603-1616.

Rini B *et al.*, (2009). Renal Cell Carcinoma. *Lancet*. 373(9669): 1119–1132.

Ronser M *et al.*, (2008). The tuberous sclerosis gene products harmatin and tuberin are multifunctional proteins with a wide spectrum of interacting partners. *Mutation Research*. 658(3): 234-246.

Rouvière O *et al.*, (2013). Kidney damage due to tuberous sclerosis complex: management recommendations. *Diagnostic and Interventional Imaging*. 94(3): 225-237.

Saldaña-Balmori Y & Zentella de Piña M, (1996). Papel fisiológico de los radicales libres. *Boletín de Educación Bioquímica, México*. 15(4): 152-161.

Santoni M *et al.*, (2014). Emerging strategies to overcome the resistance to current mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1845(2): 221-231.

Shen C & Kaelin WG Jr, (2013). The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Seminars in Cancer Biology*. 23(1): 18-25.

Shuch B *et al.*, (2015). Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. *European Urology*. 67(1): 85-97.

Siegel RL *et al.*, (2011). Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*. 61(4): 212-236.

Siegel RL *et al.*, (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 66(1): 7-30.

Simone S *et al.*, (2008). Mechanism of oxidative damage in diabetes: tuberin inactivation and downregulation of DNA repair enzyme 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine-DNA glycosylase. *Diabetes*. 57(10): 2626-2636.

Srigley JR *et al.*, (2013). The international society of urological pathology (ISUP) Vancouver classification of renal neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology*. 37(10): 1469-1489.

Tamburini J *et al.*, (2009). Targeting translation in acute myeloid leukemia: A new paradigm for therapy? *Cell Cycle*. 8(23): 3893–3899.

Tanaka T *et al.*, (2000). Expression of stress-response and cell proliferation genes in renal cell carcinoma induced by oxidative stress. *The American Journal of Pathology*. 156(6): 2149-2157.

Tchevkina E & Komelkov A, (2012). Protein phosphorylation as a key mechanism of mTORC1/2 signaling pathways. *Protein phosphorylation in human health*. InTech. 3-50.

Thoreen CC *et al.*, (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*. 485(7396): 109-113.

Toyokuni S *et al.*, (1994). Formation of 4-hydroxy-2-nonenal modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(7): 2616-2620.

Toyokuni S, (1996). Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radical Biology & Medicine*. 20(4): 553-566.

Toyokuni S, (1998). Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation. *Biotherapy*. 11(2-3): 147-154.

Tsuchiya K *et al.*, (2005). Oxygen radicals photo-induced by ferric nitrilotriacetate complex. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1725(1): 111-119.

Umemura T *et al.*, (1995). A possible role for oxidative stress in potassium bromate (KBrO₃) carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 16(3): 593-597.

UniProtKB-P49815 (TSC2_HUMAN) (2002-2017). Consultado el 28 de enero de 2017 de <http://www.uniprot.org/uniprot/P49815>.

Valko M *et al.*, (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160 (1): 1-40.

van Dijk BA *et al.*, (2004). Relation of height, body mass, energy intake, and physical activity to risk of renal cell carcinoma: results from the Netherlands Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*. 160(12): 1159–1167.

van Dijk BA *et al.*, (2005). Vegetable and fruit consumption and risk of renal cell carcinoma: Results from the Netherlands cohort study. *International Journal of Cancer*. 117(4): 648–654.

Vargas-Olvera CY, (2009). Efecto de un Extracto de Semillas de Tamarindo (EST) sobre el Desarrollo de Cáncer Renal Inducido por Nitritotriacetato de Hierro (FeNTA). Tesis para obtener el grado de maestra en ciencias (bioquímicas), México, Facultad de Química, UNAM.

Vargas-Olvera CY *et al.*, (2012). Characterization of N-diethylnitrosamine-initiated and ferric nitritotriacetate-promoted renal cell carcinoma experimental model and effect of a tamarind seed extract against acute nephrotoxicity and carcinogénesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 369(1-2): 105-117.

Vladakonda L *et al.*, (2013). The paradox of Akt-mTOR interactions. *Frontiers in Oncology*. 3: 165.

Wang X *et al.*, (2005). Distinct signaling events downstream of mTOR cooperate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 25(7): 2558–72.

Xiao GH *et al.*, (1995). Identification of tuberous sclerosis 2 messenger RNA splice variants that are conserved and differentially expressed in rat and human tissues. *Cell Growth and Differentiation*. 6(9): 1185-1191.

Xu L *et al.*, (1995). Alternative splicing of the tuberous sclerosis 2 (TSC2) gene in human and mouse tissues. *Genomics*. 27(3): 475–480.

Yuan JM *et al.*, (1998). Tobacco use in relation to renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 7(5): 429–433.

Youssef RM *et al.*, (2012). Prognostic markers in renal cell carcinoma: A focus on the mammalian target of rapamycin pathway. *Arab Journal of Urology*. 10(2): 110-117.

Zheng X *et al.*, (2014). Current models of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation by growth factors and amino acids. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(11): 20753-20769.

Zhou BP *et al.*, (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt mediated MDM2 phosphorylation. *Nature Cell Biology*. 3(11): 973-982.