



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER  
RENAL Y EFECTO DE UN EXTRACTO DE SEMILLAS DE TAMARINDO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. en C. CHABETTY YADIRA VARGAS OLVERA**

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO, FACULTAD DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN (IIB, UNAM)

DR. ARMANDO TOVAR PALACIO (INCMNSZ)

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## RECONOCIMIENTOS

La presente tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. María Elena Ibarra Rubio en el Laboratorio 120 (ahora 225), del Edificio F, de la Facultad de Química, UNAM.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA)** por el apoyo económico otorgado para la realización del trabajo experimental de esta tesis bajo el **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT)** a través de los proyectos IN227010, IN221313 e IN228716. Al **Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP)** de la Facultad de Química (5000-9109). Al **Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado (PAEP)**, 2015.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico otorgado bajo el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (Proyecto No. 284155) y por la beca otorgada para los estudios de doctorado (218101/207484).

Al **Dr. Dolores Javier Sánchez González**, Mayor Médico Cirujano y Jefe de la Subsección de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar por los análisis histológicos (de las muestras de tejido renal) y a la **Q. Claudia María Martínez Martínez** por su colaboración en la realización de los ensayos de inmunohistoquímica.

Al personal de la Unidad de Experimentación Animal, especialmente a **M.V.Z. Lucía Macías Rosales**, Técnico Académico Asociado "B" de T.C. de la UNAM, por su indispensable participación en el cuidado y manejo de animales.

A la **Dra. María Elena Ibarra Rubio**, por su tutoría y dirección de este proyecto de investigación y al **M. en C. José Dolores Solano Becerra** por su valiosa asesoría y asistencia técnica.

A los miembros del comité tutorial, **Dra. Marcela Lizano Soberón** y **Dr. Armando Tovar Palacio**, y al jurado asignado para la revisión de la tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.

## JURADO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESIDENTE	Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
VOCAL	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
VOCAL	Dra. Leticia Rocha Zavaleta
VOCAL	Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas
SECRETARIO	Dra. María Elena Chánez Cárdenas

## ÍNDICE

	Pág.
Lista de abreviaturas.....	IV
Lista de figuras.....	VII
Lista de tablas.....	IX
<b>I. ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
1.1 Carcinoma de células renales (CCR).....	1
1.1.1 Etiología y factores de riesgo.....	2
1.1.2 Clasificación histológica.....	2
Carcinoma de células renales de células claras (CCRcc).....	4
Carcinoma de células renales papilar (CCRp).....	6
Carcinoma de células renales cromóforo (CCRch).....	7
Carcinoma de células renales de ducto colector (CCRdc) .....	8
Subtipos histológicos presentados con menor frecuencia.....	8
Nuevos subtipos histológicos propuestos por la ISUP.....	10
Entidades tumorales emergentes o provisionales.....	11
1.1.3 Prognosis.....	12
1.1.4 Tratamiento del CCR.....	13
1.1.5 CCR en la población mexicana.....	16
1.1.6 Marcadores generales de CCR.....	17
1.2 Alteraciones bioquímicas y moleculares asociadas con el subtipo histológico de células claras.....	18
1.2.1 von Hippel Lindau (VHL).....	18
1.2.2 Factor inducible por hipoxia (HIF).....	19
1.2.3 Anhidrasa carbónica IX (CAIX).....	23
1.3 Estrés oxidante y cáncer.....	26
1.3.1 Estrés oxidante en el CCR.....	27
1.4 Modelo experimental de carcinogénesis renal.....	28
1.5 Compuestos antioxidantes	30
1.6 Generalidades sobre la especie <i>Tamarindus indica</i> .....	31
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1 Diseño experimental.....	35
4.1.1 Protocolo de nefrotoxicidad aguda.....	35
4.1.2 Protocolo de carcinogénesis renal.....	36
4.1.3 Análisis histológicos.....	36
4.1.4 Determinación de marcadores de función renal.....	37
4.1.5 Evaluación de marcadores de estrés oxidante.....	38

## ÍNDICE

	Pág.
4.1.6 Evaluación de alteraciones asociadas al CCRcc humano.....	38
4.2 Técnicas .....	39
4.2.1 Preparación del EST.....	39
4.2.2 Análisis del EST.....	39
Cuantificación de fenoles totales (FT).....	39
Inactivación del radical superóxido.....	40
4.2.3 Estudios de histología e inmunohistoquímica.....	41
4.2.4 Obtención de muestras de suero y orina.....	43
4.2.5 Determinación de la función renal.....	43
Cuantificación de creatinina.....	43
Cuantificación de nitrógeno ureico sanguíneo.....	44
4.2.6 Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry.....	44
4.2.7 Determinación de marcadores de estrés oxidante mediante técnicas espectrofotométricas.....	45
Evaluación de la peroxidación lipídica.....	45
Cuantificación de peróxido de hidrógeno.....	46
Cuantificación de proteínas oxidadas.....	47
4.2.8 Western blot de las diferentes proteínas estudiadas.....	48
4.2.9 ELISA directo.....	49
4.2.10 Análisis estadístico de los datos.....	50
 <b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	 <b>51</b>
5.1 Contenido de fenoles totales y evaluación de la capacidad antioxidante del EST.....	51
5.2 Protocolo de nefrotoxicidad aguda.....	51
5.3 Protocolo de carcinogénesis renal.....	53
5.3.1 Función renal.....	55
5.3.2 Apariencia macroscópica de los riñones.....	55
5.3.3 Análisis histológicos.....	58
5.3.4 Evaluación de marcadores de estrés oxidante por inmunohistoquímica.....	62
5.4 Marcadores moleculares de CCRcc.....	67
5.4.1 Evaluación de la proteína von Hippel-Lindau (pVHL).....	67
5.4.2 Evaluación del factor inducible por hipoxia (HIF1 $\alpha$ y HIF2 $\alpha$ ).....	69
5.4.3 Evaluación de anhidrasa carbónica IX (CAIX).....	72
5.4.4 Evaluación de CAIX en orina mediante ELISA directo.....	78
 <b>VI. RESUMEN DE RESULTADOS.....</b>	 <b>80</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>VIII. ARTÍCULO PUBLICADO.....</b>	<b>84</b>
<b>IX. APÉNDICE.....</b>	<b>100</b>
<b>X. REFERENCIAS.....</b>	<b>108</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASB	Albúmina sérica bovina
ACKD-RCC	Carcinoma asociado a la enfermedad quística adquirida
ADAMs	Adamalinas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	Comité de Unión Americana en Cancer
AMPK	Cinasa activada por AMP
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
BHD	Birt-Hogg-Dubé
bHLH	Hélice bucle hélice básica
BHT	Hidroxitolueno butilado
BUN	Nitrógeno ureico sanguíneo
CA	Dominio catalítico
CAIX	Anhidrasa carbónica IX
CCP-RCC	Carcinoma de células renales papilar (túbulo) células claras
CCR	Carcinoma de células renales
CCRcc	Carcinoma de células renales de células claras
CCRch	Carcinoma de células renales cromóforo
CCRp	Carcinoma de células renales papilar
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria cincuenta
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
CTAD	Dominio de transactivación de carboxilo terminal
CXCR4	Receptor de quimiocinas
Cys	Cisteína
DAB	Cromógeno diaminobencidina
DE	Desviación estándar
DEC	Dominio extracelular
DEN	N-dietilnitrosamina
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
dvl	Proteína dishevelled
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ECOG-PS	Grupo de Oncología Cooperativa del Este
EE	Error estándar
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
EPO	Eritropoyetina
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EST	Extracto de semillas de <i>Tamarindus indica</i> L.
FDA	Administración de alimentos y medicamentos

FeNTA	Nitritotriacetato de hierro
FH	Fumarato hidratasa
FIH	Factor inhibidor de HIF
FLCN	Foliculina
FNIP1	Proteína que interactúa con la foliculina 1
FNIP2	Proteína que interactúa con la foliculina 2
FOX	Naranja de xilenol-hierro <sup>3+</sup>
FT	Fenoles totales
$\gamma$ -GTP	$\gamma$ -glutamil transpeptidasa
$\gamma$ -Glu	$\gamma$ -glutamato
GLUT-1	Transportador de glucosa 1
GSH	Glutación reducido
Gly	Glicina
HIF	Factor inducible por hipoxia
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HLRCC	Carcinoma de células renales asociado al síndrome de leiomiomatosis hereditaria
HNE	Hidroxinonenal
HPH	Enzima prolilhidroxilasa de HIF
HPRCC	Carcinoma renal papilar hereditario
HRE	Elementos de respuesta a hipoxia
IC	Dominio intracitosólico
IFN- $\gamma$	Interferón- $\gamma$
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-2	Interleucina-2
INI1	Factor que interactúa con la integrasa 1
ISUP	Sociedad Internacional de Patología Urológica
LPS	Lipopolisacárido
LZIP	Zipper de leucina
MAPK	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
MDA	Malondialdehído
met	Gen de transición de tejido epitelial a mesenquimatoso
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MiT-RCC	Carcinoma de células renales asociado a la translocación familiar de microftalmia
mTOR	Sitio blanco de mamíferos para la rapamicina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NF-KB	Factor de transcripción nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
NTAD	Dominio de transactivación terminal
ODD	Dominio de degradación dependiente de oxígeno
OMS	Organización mundial de la salud
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno-1
PAS	Dominio proteico Per-Arnt-Sim

PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR-a y b	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas a y b
PDK1	Piruvato deshidrogenasa cinasa 1
PHD	Prolilhidroxilasas
PI3-K	Cinasa de fosfatidil inositol-3
PKC	Proteína cinasa C
PG	Dominio tipo proteoglicano
PGL4	Síndrome de paraganglioma tipo 4
PTEN/MMAC1	Homólogo de tensina y fosfatasa/mutado en múltiples cánceres avanzados 1
Ptprz1	Receptor de fosfatasa de residuos de tirosina b
RHPNM	Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas
rpm	Revoluciones por minuto
RPTP-b	Receptor tipo fosfatasa de tirosina
RTKs	Receptores tirosin cinasa
SDBH-RCC	Carcinoma de células renales asociado con la mutación succinato deshidrogenasa B
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ácido tricloroacético
TC-RCC	Carcinoma de células renales tubuloquístico
TFE3	Factor de transcripción E3
TGFa	Factor de crecimiento transformante alfa
TKIs	Inhibidores de cinasa de tirosina
TLF-RCC	Carcinoma de células renales folicular tipo tiroideo
TM	Dominio transmembranal
TMPO	Tetrametoxipropano
TNF	Factor de necrosis tumoral
TSC	Neoplasia asociada al complejo de esclerosis tuberosa
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer
u-PAR	Receptor activador de plasminógeno tipo urocinasa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR1-3	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1-3
VCL_ALK-RCC	Carcinoma de células renales asociado con la translocación cinasa linfoma anaplásico
VHL	von Hippel-Lindau



## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Imágenes con tinción H&E de los subtipos histológicos de CCR de acuerdo a la clasificación de Heidelberg (1996).....	2
<b>Figura 2.</b> Imágenes de los subtipos histológicos de CCR incorporados por la OMS en el 2004 a la clasificación de Heidelberg (1996) con tinción H&E.....	3
<b>Figura 3.</b> Imágenes de los subtipos histológicos de CCR incorporados por la clasificación de neoplasias renales de la Sociedad Internacional de Patología Urológica de Vancouver en el 2012 a la clasificación de Heidelberg (1996) y la OMS (2004) con tinción H&E.....	4
<b>Figura 4.</b> Estructura del gen VHL y dominios de la proteína.....	19
<b>Figura 5.</b> Dominios estructurales de las proteínas de la familia HIF.....	21
<b>Figura 6.</b> Regulación de HIF $\alpha$ en el CCR.....	22
<b>Figura 7.</b> Modelo de la estructura del dímero de CAIX en la membrana celular (A). Estructura del gen de CAIX y dominios de la proteína (B).....	25
<b>Figura 8.</b> Mecanismo propuesto de toxicidad renal inducida por FeNTA.....	29
<b>Figura 9.</b> Compuestos presentes en la semilla de <i>Tamarindus indica</i> L.....	32
<b>Figura 10.</b> Esquema de tratamiento del protocolo de nefrotoxicidad aguda.....	36
<b>Figura 11.</b> Esquema de tratamiento del protocolo de carcinogénesis renal.....	37
<b>Figura 12.</b> Clasificación Fuhrman basada en la morfología del núcleo así como contenido y prominencia de nucleólos.....	38
<b>Figura 13.</b> Fundamento para la determinación del radical superóxido y evaluación de la capacidad antioxidante del EST.....	41
<b>Figura 14.</b> Evaluación de la capacidad antioxidante del EST mediante la determinación de la inactivación del radical superóxido.....	51
<b>Figura 15.</b> Estudio de nefrotoxicidad aguda.....	52
<b>Figura 16.</b> Marcadores de estrés oxidante en riñón en el protocolo de nefrotoxicidad aguda: malondialdehído (MDA), proteínas oxidadas y niveles de peróxido de hidrógeno.....	54
<b>Figura 17.</b> Peso corporal de las ratas de los diferentes grupos de estudio durante el protocolo de carcinogénesis renal.....	54
<b>Figura 18.</b> Determinación de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) a un mes y dos meses de tratamiento con FeNTA.....	55
<b>Figura 19.</b> Determinación de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal.....	55
<b>Figura 20.</b> Fotografías representativas de los riñones después de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA.....	56
<b>Figura 21.</b> Fotografía de una rata que a pesar de que presentó tumores avanzados de CCR tiene una apariencia sana y fotografías representativas de los riñones al final del protocolo de carcinogénesis renal.....	57
<b>Figura 22.</b> Efecto del EST sobre el tamaño de los tumores de CCR.....	58
<b>Figura 23.</b> Alteraciones histológicas después de 1 mes y 2 meses de tratamiento con FeNTA y efecto del EST.....	60
<b>Figura 24.</b> Análisis histológicos de los tumores obtenidos al final del protocolo de carcinogénesis renal.....	61

<b>Figura 25.</b>	Efecto del extracto sobre el grado Fuhrman presentado en los tumores obtenidos al final del protocolo de carcinogénesis renal.....	62
<b>Figura 26.</b>	Inmunohistoquímica de marcadores de daño por estrés oxidante a lípidos y proteínas en muestras de tejido renal después de 1 mes y 2 meses de tratamiento con FeNTA.....	63
<b>Figura 27.</b>	Inmunohistoquímica de 4-hidroxinonenal (4-HNE) en diferentes lesiones de muestras obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal.....	64
<b>Figura 28.</b>	Cuantificación 4-hidroxinonenal (4-HNE) en todos los grupos estudiados al término del protocolo de carcinogénesis renal.....	65
<b>Figura 29.</b>	Inmunohistoquímica de nitrotirosina (3-NT) en diferentes lesiones de muestras obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal.....	65
<b>Figura 30.</b>	Cuantificación de 3-nitrotirosina (3-NT) en todos los grupos estudiados al término del protocolo de carcinogénesis renal.....	66
<b>Figura 31.</b>	Cuantificación de marcadores de daño de estrés oxidante a lípidos y proteínas durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal. 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Panel A) y nitrotirosina (3-NT) (Panel B)...	67
<b>Figura 32.</b>	Inmunohistoquímica de pVHL en muestras de tejido renal después de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA.....	68
<b>Figura 33.</b>	Inmunohistoquímica de pVHL en muestras de tejido renal obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal.....	69
<b>Figura 34.</b>	Inmunohistoquímica de HIF-2 $\alpha$ en muestras de tejido renal después de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA.....	70
<b>Figura 35.</b>	Inmunohistoquímica de HIF-2 $\alpha$ en muestras de tejido renal obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal.....	71
<b>Figura 36.</b>	Inmunohistoquímica de anhidrasa carbónica IX en muestras de tejido renal después de un mes de tratamiento con FeNTA.....	73
<b>Figura 37.</b>	Inmunohistoquímica de anhidrasa carbónica IX en muestras de tejido renal después de dos meses de tratamiento con FeNTA.....	73
<b>Figura 38.</b>	Distribución de anhidrasa carbónica (CA IX) en muestras de tejido renal obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis.....	75
<b>Figura 39.</b>	Cuantificación de anhidrasa carbónica (CAIX) después de uno y dos meses de tratamiento con FeNTA y al final del protocolo de carcinogénesis renal.....	76
<b>Figura 40.</b>	Western blot de anhidrasa carbónica IX (54 kDa) en muestras de tejido renal después de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA.....	76
<b>Figura 41.</b>	Niveles de anhidrasa carbónica IX (54 kDa) determinados por western blot en muestras de tejido renal obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal.....	77
<b>Figura 42.</b>	Niveles de anhidrasa carbónica IX (54 kDa) mediante western blot en muestras de tejido tumoral de los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal.....	77
<b>Figura 43.</b>	Excreción urinaria de CAIX en los diferentes grupos experimentales a los 3 tiempos estudiados durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal.....	79

<b>Anexo A.</b>	Excreción urinaria de CAIX en los diferentes grupos experimentales a los 3 tiempos estudiados durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal. La determinación se realizó mediante la técnica de ELISA directo.	79
-----------------	--	----

### LISTA DE TABLAS

		<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b>	Marcadores potenciales del carcinoma de células renales.....	18
<b>Tabla 2.</b>	Grupos de estudio y esquema de tratamiento del protocolo de nefrotoxicidad aguda.....	35
<b>Tabla 3.</b>	Grupos de estudio y esquema de tratamiento del protocolo de carcinogénesis renal.....	37
<b>Tabla 4.</b>	Diluciones de la solución stock 1 de EST.....	39
<b>Tabla 5.</b>	Diluciones de la solución stock 2 de EST.....	39
<b>Tabla 6.</b>	Curva patrón de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.....	40
<b>Tabla 7.</b>	Diluciones realizadas a cada una de las soluciones stock del extracto polifenólico para la determinación de inactivación del radical superóxido.....	41
<b>Tabla 8.</b>	Preparación de C-100%, el blanco y la muestra problema para cada dilución de extracto polifenólico presentado en la tabla 9 para la determinación de la capacidad de inactivación del radical superóxido.	42
<b>Tabla 9.</b>	Curva patrón de albúmina sérica bovina para la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry.....	45
<b>Tabla 10.</b>	Curva patrón de tetrametoxipropano para la cuantificación de MDA presente en las muestras.....	46
<b>Tabla 11.</b>	Curva patrón de peróxido de hidrógeno para su cuantificación en homogenados de tejido renal mediante el método de FOX.....	47
<b>Tabla 12.</b>	Reactivos que deben agregarse al blanco y a las muestras problema para la determinación de grupos carbonilo en las proteínas.....	48
<b>Tabla 13.</b>	Curva patrón de albúmina sérica bovina para la cuantificación de proteínas totales.....	48
<b>Tabla 14.</b>	Curva patrón de CAIX para la cuantificación de esta molécula en muestras de orina.....	50
<b>Tabla 15.</b>	Características de los tumores de carcinoma de células renales.....	57
<b>Tabla 16.</b>	Incidencia de CCR.....	58

## I. ANTECEDENTES

### 1.1 CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES (CCR)

---

El carcinoma de células renales (CCR) es el cáncer renal más común, ya que representa el 90% de todas las neoplasias del riñón, es uno de los tipos de cáncer urológico más letales y constituye alrededor del 3% de todas las neoplasias en adultos (Shaw, *et al.*, 2016). En el 2008 se presentaron 271,000 casos en el mundo, de los cuales 116,000 murieron a causa de este padecimiento (Escudier, *et al.*, 2013), y en las últimas tres décadas se ha reportado un aumento en la incidencia cada año en Europa y Estados Unidos (Ferlay, *et al.*, 2008; Ljungberg, *et al.*, 2011), presentándose con mayor frecuencia en pacientes entre los 75 y 84 años de edad y con una relación hombre/mujer (3:2) (Siegel, *et al.*, 2012).

El diagnóstico del CCR en etapas tempranas es difícil ya que es asintomático, y la clásica triada (hematuria, dolor y palpación de una masa en el flanco) sólo se presenta en el 6-10% de los casos, lo cual ocurre generalmente en etapas avanzadas de la enfermedad (Vogelzang, *et al.*, 2000; Corgna, *et al.*, 2007). Por esta razón, aproximadamente el 40% de los casos de CCR se diagnostican incidentalmente, o bien en etapas muy avanzadas. De hecho, se ha estimado que el 33% de los pacientes con CCR presentan metástasis en el momento del diagnóstico (Bielecka, *et al.*, 2014) y que tienen una tasa de supervivencia de 12 meses (Campbell, *et al.*, 2003). Más aún, los pacientes que han sido diagnosticados y tratados oportunamente tienen un alto índice de recurrencia (Cohen, *et al.*, 2005).

La detección de esta neoplasia usualmente se da accidentalmente mediante técnicas de imagenología, que con frecuencia se utilizaron para analizar otro tipo de padecimientos no relacionados; incluso, el CCR se ha encontrado accidentalmente en el 1.5% de las autopsias realizadas en Estados Unidos (Steven, *et al.*, 2005). Además de la clásica triada, los pacientes pueden presentar otros signos y síntomas en etapas avanzadas de la enfermedad siendo los más comunes hipertensión, caquexia, fatiga, pérdida de peso, fiebre, neuromiopatías, amiloidosis, índice de sedimentación globular elevado, anemia, anormalidades en pruebas de función hepática (síndrome de Stauffer), hipercalcemia y policitemia (Corgna, *et al.*, 2007). Estos síntomas sistémicos pueden deberse a metástasis o eventos paraneoplásicos (Chow, *et al.*, 2000), los cuales se encuentran aproximadamente en el 10-40% de los pacientes y están relacionados con la secreción de proteínas como la hormona paratiroidea, renina, eritropoyetina (EPO), gonadotropinas, lactógeno placentario, interleucina 6 e insulina (McDougal, *et al.*, 2000; Nelson, *et al.*, 2007). Los eventos paraneoplásicos se asocian usualmente con metástasis, aunque también se ha visto que pueden presentarse en pacientes con CCR localizado. Los órganos más comúnmente afectados por metástasis del CCR son pulmones, huesos, cerebro, hígado y glándulas adrenales, pero también se han reportado casos de metástasis en piel y órganos reproductores masculinos (Corgna, *et al.*, 2007).

### 1.1.1 Etiología y factores de riesgo

La etiología del CCR aún permanece sin elucidarse; se han asociado diversos factores de riesgo con el desarrollo de esta neoplasia, sin embargo, hasta el momento ninguno de ellos se ha considerado como factor etiológico definitivo. Entre los principales factores de riesgo que se han identificado son el tabaquismo, la obesidad y la hipertensión, y todos ellos están relacionados con la inducción de estrés oxidante (Ferlay, *et al.*, 2006); no obstante, se requiere mayor investigación sobre los efectos de estos factores y los mecanismos implicados en el desarrollo de este cáncer.

La gran mayoría de los casos de CCR ocurren de manera esporádica (96%) y sólo en una pequeña proporción la neoplasia está ligada a enfermedades hereditarias (4%) como por ejemplo, los síndromes de von Hippel-Lindau (VHL), Birt-Hogg-Dubé (BHD), el carcinoma renal papilar hereditario (HPRCC), la leiomiomatosis hereditaria (HLRCC), el cáncer familiar asociado a la succinato deshidrogenasa (SDH-RCC) y la neoplasia asociada al complejo de esclerosis tuberosa (TSC) (Rosner, *et al.*, 2009); sin embargo, la mayor parte del conocimiento actual acerca de los genes que predisponen al desarrollo de CCR (*VHL*, *FLCN*, *MET*, *FH*, *SDH*, *TSC1* y *TSC2*) se derivó originalmente del estudio de estas enfermedades y posteriormente se encontraron cambios similares en el cáncer renal esporádico (Pavlovich, *et al.*, 2004; Linehan, *et al.*, 2010).

### 1.1.2 Clasificación histológica

El CCR es considerado como un grupo diverso de tumores epiteliales en el riñón, cada uno caracterizado por una histología distinta. En las últimas décadas, el consenso en la clasificación de los diferentes subtipos histológicos ha sido el resultado tanto de evaluaciones morfológicas, histológicas y citogenéticas como moleculares. En la primera clasificación acordada en Heidelberg en 1996, se definieron tres subtipos histológicos principales con base en sus características morfológicas únicas: células claras (CCRc), papilar (CCRp) tipo I y II y cromóforo (CCRch) representando el 90-95% de los casos de CCR, además de algunos subtipos presentados con menor frecuencia como el CCR de ducto colector (<1%) y no clasificado (4%) (Kovacs, *et al.*, 1997) (Figura 1).

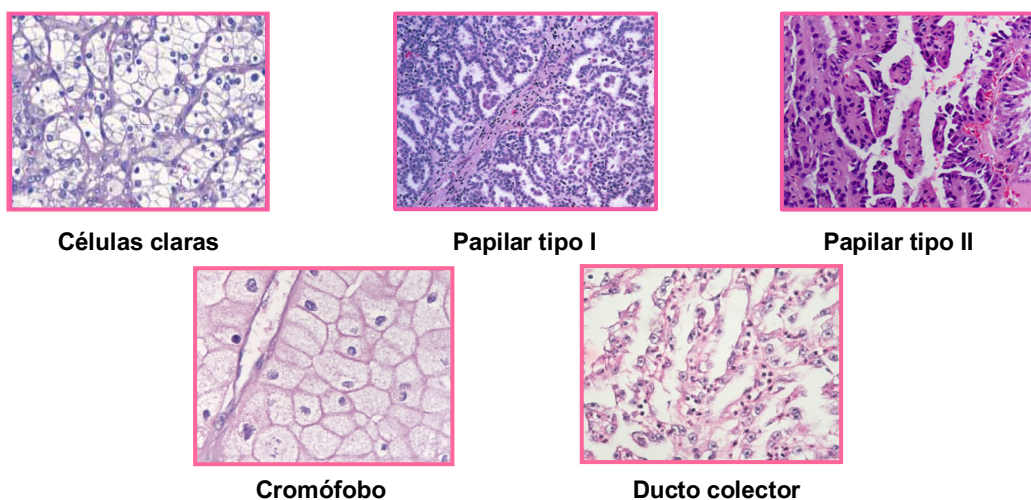


Figura 1. Imágenes con tinción H&E de los subtipos histológicos de CCR de acuerdo a la clasificación de Heidelberg (1996) (Srinivasa, *et al.*, 2006; Mancini, *et al.*, 2008).

Posteriormente, la clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2004, representó un cambio significativo a la clasificación anterior, enfatizando la heterogeneidad del CCR al incorporar las características genéticas a las características morfológicas. Esta clasificación incluye, además de los subtipos ya mencionados, subtipos encontrados con menor frecuencia como: el carcinoma renal asociado con neuroblastoma, el carcinoma asociado a la translocación Xp11, el carcinoma de células mucinosas, tubulares y fusiformes, el CCR de células claras multilocular quístico y el carcinoma medular renal (Figura 2).

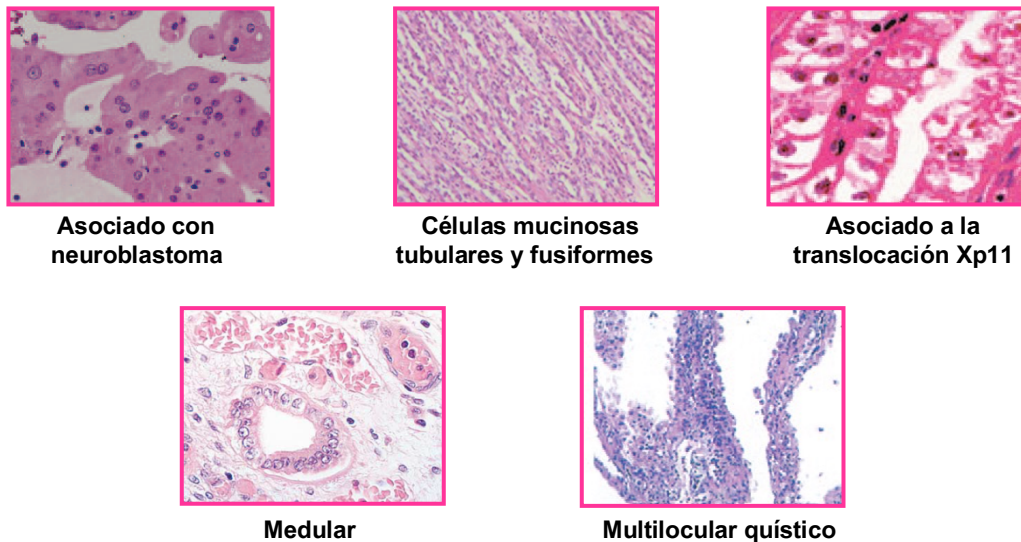


Figura 2. Imágenes de los subtipos histológicos de CCR incorporados por la OMS en el 2004 a la clasificación de Heidelberg (1996) con tinción H&E (OMS, 2004; Srinivasa, *et al.*, 2006; Mancini, *et al.*, 2008).

Estas 10 entidades han representado los subtipos más comunes encontrados en la clínica, sin embargo, la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) en Vancouver (2012), haciendo una revisión más exhaustiva, propuso 5 subtipos malignos de CCR adicionales: CCR tubuloquístico (TC-RCC), CCR asociado a la enfermedad quística adquirida (ACKD-RCC), CCR papilar (túbulo) células claras (CCP-RCC), CCR asociado a la translocación familiar de microftalmia (MiT-RCC) y CCR asociado al síndrome de leiomiomatosis hereditaria (HL-RCC), así como nuevas entidades tumorales emergentes: CCR folicular tipo tiroideo (TLF-RCC), CCR asociado con la mutación succinato deshidrogenasa B (SDBH-RCC) y CCR asociado con la translocación cinasa linfoma anaplásico (VCL\_ALK-RCC) (Srigley, *et al.*, 2013) (Figura 3). Lo importante de esto es que se ha visto que los subtipos histológicos de CCR al asociarse con diferentes alteraciones moleculares, tienen una presentación clínica única así como respuesta diferente a las terapias, por lo que, la elucidación de estas alteraciones, además de complementar la clasificación de los subtipos de CCR e incluso eventualmente reemplazar la clasificación morfológica, deja más en claro que la caracterización molecular pueda ser crítica para determinar el pronóstico y elegir la terapia más adecuada.

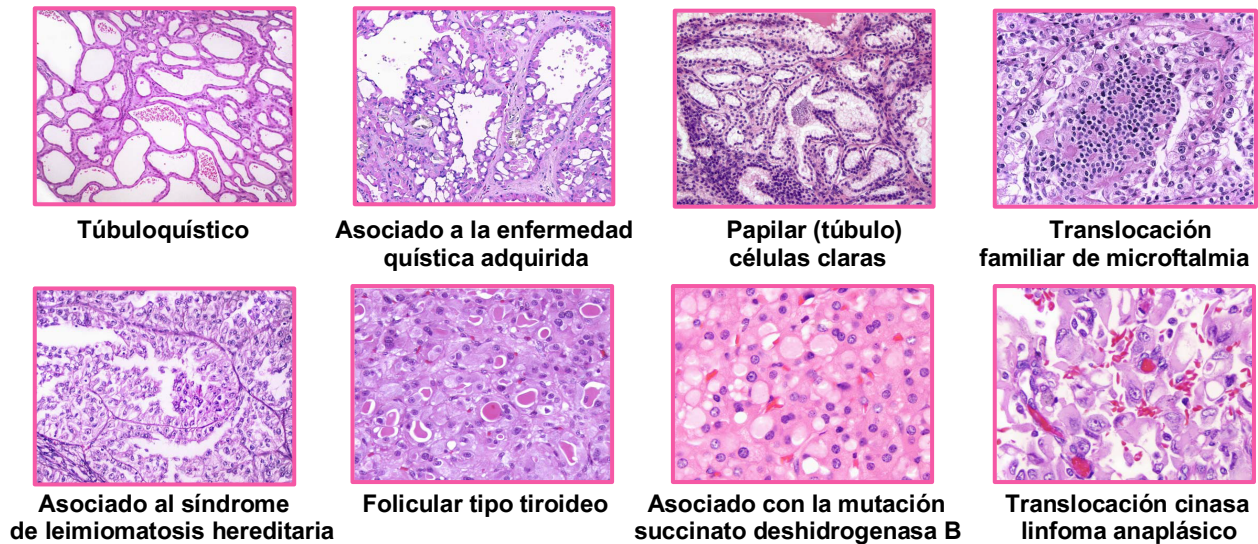


Figura 3. Imágenes de los subtipos histológicos de CCR incorporados en la Clasificación de Neoplasias Renales realizada por la Sociedad Internacional de Patología Urológica en Vancouver (2012) a las clasificaciones de Heidelberg (1996) y de la OMS (2004); H&E (Srigley, *et al.*, 2013).

#### ➤ **Carcinoma de células renales de células claras (CCRcc)**

El carcinoma de células claras (CCRcc) es el subtipo histológico que se presenta con mayor frecuencia (70-80%), y se cree que proviene de los túbulos proximales (Pavlovich, *et al.*, 2004; Rini, *et al.*, 2009). Aunque este subtipo puede presentarse a cualquier edad, afecta comúnmente a los pacientes entre su sexta o séptima década con una frecuencia del doble en hombres respecto a las mujeres (Cheville, *et al.*, 2003). En la mayoría de los casos, el CCRcc es bilateral y multifocal, y en el 45% se observa invasión de la grasa perirenal y sinusoidal y/o extensión a la vena renal (Walsh, *et al.*, 2002). Típicamente, los tumores se presentan como una masa globular unilateral bien demarcada con una cápsula fibrosa, la cual comúnmente sobresale de la corteza renal. La superficie cortada del tumor presenta una coloración amarillenta debido al alto contenido celular de lípidos como colesterol, lípidos neutrales y fosfolípidos (Gudas, *et al.*, 2014). Histológicamente, las células de estos tumores se pueden identificar por tener un citoplasma claro o eosinófilo dentro de una red vascular prominente con un patrón de crecimiento sólido, alveolar o acinar. Además, se encuentra comúnmente asociada la presencia de quistes, necrosis, hemorragia y calcificación (OMS, 2004). Una de las alteraciones más comunes en el CCRcc esporádico, es la inactivación del gen supresor de tumores von Hippel-Lindau (VHL), ya sea por mutaciones intragénicas esporádicas/adquiridas en una de las copias del gen VHL junto con la pérdida de la copia remanente debido a una gran deleción que afecta el brazo corto del cromosoma 3p25-26 humano (34-57%) (Gnarra, *et al.*, 1994; Brauch, *et al.*, 2000; Schraml, *et al.*, 2002). En otros casos (10-20%), la pérdida de pVHL es consecuencia del silenciamiento transcripcional de ambas copias del gen como resultado de una hipermetilación (Kim, *et al.*, 2004). De este modo, la pérdida de la función de pVHL ocurre en una proporción significativa de los casos de CCRcc esporádico llegando a estar presente en el 70-80% (Patrick, *et al.*, 2007). La importancia de pVHL en el CCR, es que esta proteína está involucrada en la regulación de diversas vías relacionadas con el ensamblaje de la matriz extracelular, regulación del ciclo celular, neovascularización y mecanismos celulares que permiten la

adaptación a condiciones de hipoxia (Igarashi, *et al.*, 2002); estas funciones biológicas se analizan más a fondo la sección 1.2.1.

Mientras que las mutaciones en el gen supresor de tumores *VHL* son las alteraciones más prominentes en el CCRcc, existen evidencias que sugieren que el papel de este gen en el crecimiento tumoral se manifiesta sólo en presencia de otras mutaciones, ya que se ha demostrado en estudios en fibroblastos de ratón y células epiteliales renales *in vitro*, así como en ratones knock out, que la inactivación de *VHL* únicamente induce senescencia y no CCR (Young, *et al.*, 2008; van Rooijen, E, *et al.*, 2010). Así mismo, se ha sugerido que la inactivación de *VHL* conduce a la formación de quistes pero no es suficiente para la transformación maligna (Haase, *et al.*, 2005). De hecho, en este subtipo de CCR se ha demostrado la existencia de otras alteraciones en genes próximos al de *VHL*, como la inactivación de la metiltransferasa *SETD2*, las demetilinasas de histonas *JARID1C* (también conocida como *KDM5C*) y *UTX* (también conocida como *KDM6A*), polibromo 1 (*PBRM1*) y la desubiquitinasa *BAP1* (Dalglish, *et al.*, 2010), todas ellas involucradas en el remodelamiento de la cromatina. Entre estas alteraciones, la mutación en *PBRM1*, gen que codifica para la proteína *BAF180* se ha identificado como la segunda alteración genética más común en CCRcc esporádico (alrededor del 40% de los casos) (Varela, *et al.*, 2011; Bielecka, *et al.*, 2014) y se ha demostrado que la pérdida de esta proteína codificada por el gen *PBRM1*, abate la inducción canónica de *p53*, uno de cuyos genes blanco, *p21*, actúa como inhibidor de cinasas dependientes de ciclina (Xia, *et al.*, 2008; Burrows, *et al.*, 2010). Por otro lado, el papel de la modificación de las histonas en el CCR todavía es poco claro, aunque los niveles de metilación en las histonas *H3K4* y *H3K27* parecen estar asociados con la prognosis del CCR (Ellinger, *et al.*, 2010; Rogenhofer, *et al.*, 2011), sin embargo, el significado biológico y clínico de estas modificaciones se desconoce actualmente.

Como se ha señalado, la mayoría de los casos de CCRcc son de origen esporádico, no obstante, los pacientes que sufren el síndrome de *VHL*, ocasionado por la pérdida de la función del gen supresor de tumores *VHL* en el 90% de los casos, están genéticamente predispuestos a desarrollar también este tipo de cáncer. De hecho, se ha demostrado que alrededor del 40-60% de los pacientes con la mutación de *VHL* presentan específicamente CCRcc (Lonser, *et al.*, 2003; Bielecka, *et al.*, 2014). Otro de los síndromes en los que se desarrolla CCRcc casi de manera exclusiva en pacientes con una edad promedio de 28 años (Bjornsson, *et al.*, 1996), es la esclerosis tuberosa, la cual es un desorden autosómico dominante causado por mutaciones en los cromosomas 9q34 o 16p13.3, en los genes de esclerosis tuberosa *TSC1* y *TSC2* respectivamente (Rosset, *et al.*, 2017; Linehan, *et al.*, 2013). Sin embargo, se han reportado también otras histologías en pacientes con TSC incluyendo la papilar, cromóforo y oncocitomas (Robertson, *et al.*, 1996; Washecka, *et al.*, 1991). El gen *TSC1* codifica para la proteína hamartina, una proteína que está involucrada en la adhesión celular a través de la GTPasa Rho y las proteínas de la familia ezrina-radixina-moesina cuya función es actuar como moléculas de unión a filamentos de actina (van Slegtenhorst, *et al.*, 1997). Por su parte, el gen *TSC2* codifica para la tuberina, la cual puede incrementar la actividad GTPasa y regular algunos miembros de la familia de proteínas Ras (Linehan, *et al.*, 2013). En conjunto, estas proteínas forman un complejo por lo que mutaciones en un gen u otro



conducen a un fenotipo clínico similar (Hino, *et al.*, 2004; Arai, *et al.*, 2011). Las proteínas del complejo TSC1/TSC2 suprimen la actividad de Rheb, una GTPasa pequeña tipo Ras que contribuye directamente a la activación del sitio blanco de mamíferos para la rapamicina 1 (mTOR) el cual fosforila reguladores de la traducción como S6K (proteína ribosomal fosforilada S6) y 4E-BP estimulando así el crecimiento celular. De esta forma, la pérdida de TSC1 o TSC2 conduce a la activación constitutiva de la vía de señalización que induce el crecimiento celular compuesta por Rheb, mTOR y S6K estimulando así el desarrollo tumoral (Sato, *et al.*, 2008).

➤ **Carcinoma de células renales papilar (CCRp)**

El CCRp, se presenta en el 10-15% de los casos de CCR, y al parecer, también se origina de los túbulos contorneados proximales. Los tumores de este subtipo se presentan como una masa bien circunscrita dentro de una pseudocápsula y se clasifican, a su vez, en dos variedades histológicas: tipo I y tipo II dependiendo de la morfología de las células tumorales que cubren las lesiones papilares (Delahunt, *et al.*, 2001). Los tumores tipo I tienen papilas cubiertas por una o dos capas de células pequeñas cuboides con citoplasma escaso y frecuentemente con la presencia de agregados de macrófagos espumosos, mientras que en los del tipo II, las células están arregladas en forma irregular o pseudoestratificada con gran cantidad de citoplasma eosinófilo, núcleos agrandados y nucléolo orangiofílico con halo perinucleolar. El subtipo I se caracteriza por presentar tumores multifocales bilaterales con calcificación observada en el 30% de los casos, mientras que los tumores del subtipo II frecuentemente son solitarios y unilaterales. Asimismo, los tumores tipo I usualmente son de un grado más bajo que los tumores de tipo II. Los pacientes con HPRCC presentan el riesgo de desarrollar CCRp tipo 1; el 67% se presenta a una edad promedio de 60 años aunque se han reportado casos de desarrollo temprano alrededor de los 19 años (Schmidt, *et al.*, 1999). Este subtipo se ha asociado con mutaciones en el oncogen de transición de tejido epitelial a mesenquimatoso met (por sus siglas en inglés) presente en el cromosoma 7q31 (Lubensky, *et al.*, 1999). Met es un protooncogen cuya proteína actúa como receptor transmembranal con actividad de tirosina cinasa sobre el factor de crecimiento de hepatocitos HGF (por sus siglas en inglés) (Schmidt, *et al.*, 1998 y 1999). La mayoría de las mutaciones en la línea germinal conducen a la activación de MET independiente de ligando (Kopper, *et al.*, 2006), lo que conduce a la sobrerregulación autocatalítica de la actividad del receptor, el cual interacciona con varias moléculas transductoras de señales y adaptadores como PI3K, pp60src, Gab1 y Grb2, y las respuestas biológicas a la activación del receptor depende, entonces, del sustrato que active. Por ejemplo, la vía Grb2-ras está involucrada con el crecimiento celular, mientras que la vía Gab1/PI3K está involucrada en morfogénesis y supervivencia celular. Se ha demostrado que la interacción de MET con otras proteínas de la superficie celular, incluyendo los receptores tirosin cinasas (RTKs por sus siglas en inglés), contribuye a la tumorigénesis y resistencia al tratamiento antineoplásico (Mahtouk, *et al.*, 2010).

En el caso del CCRp tipo I esporádico, las mutaciones en met sólo están presentes en una pequeña proporción de pacientes (13%), por lo que esta alteración es menos predominante si se compara con el gen VHL en el CCRcc (Linehan, *et al.*, 2010). Estas observaciones indican que la tumorigénesis de la mayoría de los casos de CCRp esporádico no se induce sólo por las mutaciones en met o por aumento en el número de copias

del cromosoma 7, sino que es posible que otros genes estén involucrados en este subtipo histológico. Por ejemplo, en el 68% de los pacientes con CCRp se han descrito mutaciones en el proto-oncogen KIT, no obstante el papel de KIT en esta patología necesita confirmarse (Lin, *et al.*, 2004).

El CCRp tipo II se encuentra más comúnmente en el CCR esporádico, sin embargo también se ha encontrado en pacientes con leiomatosis hereditaria (15%). Este síndrome es bastante agresivo cuando se presenta en pacientes jóvenes (18 años) debido a que este cáncer tiene la capacidad de propagarse aún cuando los tumores son muy pequeños. Se ha observado que el 70% de los individuos con este padecimiento fallece dentro de los primeros 5 años después de haberse diagnosticado y la metástasis se encuentra presente en el 50% de los casos. Esta variante no presenta las mutaciones en *met* observadas en el tipo 1, pero presenta mutaciones en la línea germinal del gen que codifica para la enzima mitocondrial del ciclo de Krebs fumarato hidratasa (FH) en el cromosoma 1q42.3-q43 (Pfaffenroth, *et al.*, 2008). Estas mutaciones se han encontrado en más del 90% de las familias con HLRCC, no obstante, el mecanismo por el cual la mutación de este gen ocasiona cáncer todavía no está claro; se sugiere que las mutaciones que inactivan a la FH resultan en una desregulación en la conversión de fumarato a malato en el ciclo de Krebs, lo que conduce a un incremento en los niveles de fumarato y, como consecuencia, en los niveles de su precursor, el succinato. La elevación de los niveles de fumarato inhibe a la enzima prolilhidroxilasa de HIF (PHD) conduciendo a la sobreexpresión de HIF y sus genes blanco (Pavlovich, *et al.*, 2004), resultando en un aumento del consumo de glucosa y una producción elevada de EROs, posiblemente a través de la activación de la NADPH oxidasa mediada por la proteína cinasa PKC- $\gamma$  (Sudarshan, *et al.*, 2009). Asimismo, se sugiere que el efecto de la mutación de FH sobre el ciclo de Krebs favorece una síntesis excesiva de ácidos grasos que en consecuencia promueve el crecimiento tumoral (Schmidt, *et al.*, 1999). Por otra parte, también se ha sugerido la participación del gen *myc* en la patogénesis del CCRp tipo 2; en particular, se ha establecido una asociación entre la amplificación del cromosoma 8q y la sobreexpresión subsecuente del oncogen *myc* (Furge, *et al.*, 2007).

#### ➤ **Carcinoma de células renales cromóforo (CCRch)**

El subtipo cromóforo (CCRch) se ha encontrado en el 5% de los casos de CCR y se cree que se origina de las células intercaladas tipo B del ducto colector (Storckel, *et al.*, 1997). Los tumores no están encapsulados pero se encuentran bien circunscritos con una superficie sólida y homogénea de color café claro. Éstos pueden ser multifocales y bilaterales cuyas células son grandes y poligonales con un citoplasma eosinófilo finamente reticulado y un núcleo atípico con un halo perinuclear con un patrón de crecimiento sólido, tubular o sarcomatoide. Los individuos con el síndrome de Birt-Hogg-Dubé presentan con frecuencia tumores renales múltiples a una edad promedio de 50 años al momento del diagnóstico, en particular CCRch en el 33% de los casos, aunque también se han identificado los subtipos de células claras (9%), papilar (<2%) y oncocitoma (aprox. 50%) (Nickerson *et al.*, 2002; Pavlovich, *et al.*, 2002). Este síndrome se caracteriza por presentar mutaciones en el gen FCLN ubicado en el cromosoma 17p11.2 (Nickerson, *et al.*, 2002) como inserciones, deleciones o mutaciones sin sentido en más del 90% de los casos. En el CCR esporádico, las mutaciones en FCLN son raras, sin embargo, se ha observado la metilación en su promotor, sugiriendo la participación de este gen en la tumorigénesis. Se ha

demostrado que la inactivación del gen FLCN que conduce a la degeneración del riñón puede provocar la enfermedad renal poliquística y la inducción de tumores renales en modelos murinos (Schmidt, *et al.*, 2001; Baba, *et al.*, 2006). La proteína que codifica el gen FLCN, la foliculina, induce varios procesos, incluyendo la formación de un complejo con los productos de dos genes recientemente identificados FNIP1 y FNIP2 (proteína que interactúa con la foliculina 1 y 2), los cuales se enlazan a AMPK (cinasa activada por AMP), un sensor de energía y nutrientes que regula a su vez, negativamente a mTOR, el principal controlador de la síntesis de proteínas y crecimiento celular (Seung-Beom, *et al.*, 2010; Zoncu, *et al.*, 2011). De hecho, se ha demostrado que la pérdida de la función de FCLN está asociada con la actividad de mTORC1 y pS6 durante la génesis de los quistes y la tumorigénesis renal (Chen, *et al.*, 2008; Hartman, *et al.*, 2009; Hudon, *et al.*, 2010). Otros estudios, sugieren que FLCN puede jugar un papel adicional en la señalización de TGF $\beta$  y que el aumento en la actividad transcripcional de HIF observado en tumores renales asociados con BHD y líneas celulares deficientes de FCLN provoca un incremento en la expresión de sus genes blanco incluyendo al transportador de glucosa 1 (GLUT 1) y de la enzima piruvato deshidrogenasa cinasa 1 (PDK1), desarrollando de esta forma la dependencia al metabolismo de glucosa para producir energía.

➤ **Carcinoma de células renales de ducto colector (CCRdc)**

Los tumores del carcinoma de ducto colector, también conocido como carcinoma de Bellini, presentes en un porcentaje menor al 1% de los casos, tienen una apariencia firme grisácea, blanca con bordes irregulares, y se cree que provienen de los ductos colectores que se encuentran en la médula renal (Rumpelt, *et al.*, 1991; Storckel, *et al.*, 1997). Estos tumores se caracterizan por tener células pleomórficas arregladas en túbulos irregulares dentro de un estroma desmoplásico. El CCRdc puede presentarse a cualquier edad, aunque tienden a presentarse en pacientes entre la cuarta y séptima década con una edad promedio de 55 años. Estos tumores son muy agresivos; un tercio de los pacientes presenta metástasis en el momento del diagnóstico y aproximadamente dos tercios muere de esta enfermedad a los dos años de haberse diagnosticado (Mancini, *et al.*, 2008). Debido a su baja frecuencia, existen pocos estudios sobre este subtipo de cáncer, no obstante, se ha demostrado que una de las principales alteraciones encontradas en el HLRCC (la mutación en el gen que codifica para la FH) también predispone al CCRdc (Pavlovich, *et al.*, 2004). La presencia de trisomía en el cromosoma 17, trisomía o tetrasomía del cromosoma 7 o la delección en el cromosoma 3p en este subtipo pueden diferenciarlo de los subtipos CCRp y CCRcc respectivamente. Así mismo, la monosomía del cromosoma 1 podría ser una característica común del CCRdc (Mancini, *et al.*, 2008). Por otro lado, la pérdida de la expresión del factor que interactúa con la integrasa 1 (INI1), un miembro del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF en el 15% de los casos, sugiere que tiene un papel en la patogénesis de este subtipo histológico (Ellwood, *et al.*, 2011; Rao, *et al.*, 2014).

➤ **Subtipos histológicos presentados con menor frecuencia**

**El carcinoma de células mucinosas, tubulares y fusiformes** se ha identificado recientemente como una nueva entidad de un neoplasma epitelial renal de bajo grado caracterizado por un curso sin dolor, y, en contraste con los otros subtipos de CCR, estos tumores son más comunes en mujeres (1:4). La edad promedio en la que

se presenta este subtipo es de 53 años con un rango que puede variar entre los 13 a 82 años. Macroscópicamente, este carcinoma se ha encontrado bien circunscrito con una coloración gris-blanca con apariencia mixoide, y con presencia de hemorragia y necrosis en algunos casos (Ferlicot, *et al.*, 2005). Microscópicamente está compuesto por túbulos pequeños elongados estrechamente empaquetados y células fusiformes con núcleos de bajo grado embebidas en un estroma mucinoso pálido. Las células individuales son pequeñas con forma oval o cuboide y características de alto grado nuclear (Argani, *et al.*, 2007). Por otro lado, **el CCR asociado con neuroblastoma** se presenta en los sobrevivientes de neuroblastoma infantil, del cual hombres y mujeres se encuentran afectados de la misma forma. Los tumores de CCR inducidos por esta patología son heterogéneos morfológicamente (Koyle, *et al.*, 2001) y se cree que puede estar involucrada la susceptibilidad genética (Eble, *et al.*, 2003). Algunos tumores se caracterizan por una arquitectura sólida y papilar, con células con un citoplasma eosinófilo abundante y con un menor número de células con citoplasma reticular y atipia leve a moderada. El pronóstico de este subtipo es favorable, ya que la mayoría de los pacientes se curan de esta enfermedad después de una resección quirúrgica, y los reportes de metástasis y mortalidad son poco comunes. Por su parte, **el carcinoma renal asociado con translocaciones en Xp11.2** típicamente ocurre en niños o adultos jóvenes (Argani, *et al.*, 2001 y 2002); la prevalencia de la translocación en adultos se ha estimado en alrededor del 1% aunque pueden tener un curso clínico más agresivo que el presentado en los niños el cual es indolente incluso cuando el cáncer se encuentra en etapa avanzada (Deng, *et al.*, 2012). La apariencia más común de los tumores es amarillo oscuro con regiones de necrosis y hemorragia, sin embargo, la morfología por sí misma aún es poco confiable para un diagnóstico definitivo y usualmente tiene que confirmarse por estudios genéticos. Las células de este carcinoma presentan una arquitectura anidada, se caracterizan por un citoplasma voluminoso, granular y de claro a eosinófilo, con bordes celulares discretos, cromatina vesicular y nucléolos prominentes. Las características más distintivas de estas células son las estructuras papilares alineadas con células claras, calcificación psammomatosa y núcleos hialinizados fibrovasculares. Los tumores se caracterizan por la presencia de diferentes translocaciones que involucran al gen que codifica para el factor de transcripción enlazado al intensificador IGHM 3 (*TFE3* por sus siglas en inglés) localizado en el brazo corto del cromosoma X (Xp11.2) (Thomas, *et al.*, 2008). Con respecto al **carcinoma medular**, se considera como una variante del carcinoma de ducto colector, el cual, se desarrolla preferencialmente en pacientes jóvenes con anemia falciforme alrededor de los 19 años, aunque el rango de edad puede oscilar entre los 5 a 69 años (Davis, *et al.*, 1995; Avery, *et al.*, 1996). Este subtipo es altamente agresivo, el 95% de los pacientes presenta metástasis y tiene un pronóstico muy pobre (vida media de 19 semanas después del diagnóstico) y una supervivencia media después de la cirugía de 15 semanas (Srigley, *et al.*, 1998). Los tumores están pobremente circunscritos, centralmente localizados, de coloración pardo a gris y con diversos grados de hemorragia y necrosis. La mayoría de los casos presentan áreas pobremente diferenciadas pero que consisten de capas de células. La característica más común es la presencia de un patrón de crecimiento reticular y una morfología quística adenoide más compacta. Las células son eosinófilas con un núcleo claro y usualmente con un nucléolo prominente. Por último, el **carcinoma multilocular quístico** se presenta a la edad promedio de 51 años (rango 20-76) con una frecuencia hombre:mujer de 2-3 a 1, y se caracteriza por presentar una masa tumoral solitaria bien circunscrita, con presencia de quistes

con fluido seroso y hemorrágico de tamaño variable. Su pronóstico es favorable sin presencia de metástasis después de la remoción quirúrgica completa del tumor (Comperat, *et al.*, 2012).

➤ **Subtipos histológicos propuestos por la ISUP**

**El CCR tubuloquístico (TC-RCC)**, ocurre predominantemente en la quinta y sexta década (rango 30-94 años) con una frecuencia de 7 veces o mayor en hombres respecto a las mujeres. Los tumores usualmente son solitarios, están bien circunscritos y encapsulados; y tienen una superficie similar a la de una envoltura de burbuja blanca o gris. Tiene un epicentro cortical o cortico-medular. Histológicamente, se aprecian túbulos bien formados de tamaño pequeño a mediano y algunos túbulos más grandes los cuales están quísticamente dilatados en proporciones variables. Los espacios luminales están alineados por células cuboidales con citoplasma abundante eosinófilo y frecuentemente presentan, al menos focalmente, una configuración en forma de clavo, mostrando un agrandamiento del núcleo y nucléolo prominente. El estroma es generalmente hipocelular y fibrótico. Por el momento, su pronóstico no ha sido totalmente establecido, la mayoría de los casos presentan un curso indolente, la recurrencia o metástasis se presenta con poca frecuencia y los estudios moleculares para este subtipo son limitados debido a su rareza.

**El CCR asociado a la enfermedad quística adquirida (ACKD-RCC)**, se presenta en pacientes relativamente jóvenes y se ha reportado que tiene un comportamiento más agresivo que otros subtipos de CCR. Los tumores frecuentemente presentan varias arquitecturas, aparecen como nódulos provenientes de las paredes de los quistes, ocasionalmente llenándolos completamente, o como masas sólidas separadas de estos quistes. Los tumores no quísticos están bien circunscritos y pueden rodearse de una cápsula fibrosa delgada mostrando calcificación distrófica. Las superficies cortadas son de color marrón a amarillas con áreas de hemorragia y necrosis friable. Se ha encontrado multifocalidad y bilateralidad en más del 50% y 20% de los casos respectivamente. Las células se caracterizan por tener un citoplasma eosinófilo, arquitectura cribriforme (tipo tamiz) debido a la presencia de agujeros microscópicos intracelulares y/o intercelulares y existe la presencia de cristales de oxalato intratumorales en la mayoría de los casos.

**El CCR túbulo papilar de células claras (CCP-RCC)**, se presenta con la misma frecuencia en hombres y mujeres con edad promedio de 60 años, generalmente con un curso indolente. Está compuesto de células claras de grado nuclear bajo y arquitectura variable papilar, tubular/acinar y quística. Los tumores se encuentran bien circunscritos y usualmente bien encapsulados, unicéntricos, unilaterales y pequeños, no obstante, la multifocalidad y bilateralidad puede estar presente en algunos casos. La superficie cortada del tumor es de color bronceado pálido a amarilla con áreas fibróticas aparentes y aspecto diferente, desde completamente sólido a predominantemente quístico. Una característica distintiva de este tumor es el arreglo lineal característico de núcleo diferente del aspecto basal, hacia la parte media o el ápice de las células. En algunos casos las papilas se encuentran estrechamente empacadas creando una apariencia sólida. Este subtipo comprende el 1% de todos los neoplasmas celulares renales y presenta una malignidad más baja que la comúnmente encontrada en un carcinoma. A nivel molecular, este carcinoma carece de deleciones del 3p25, mutaciones del gen VHL,

hipermetilación del promotor de VHL o trisomías de los cromosomas 7 y 17, ni exhibe otras características del CCRp.

El CCR asociado a la translocación familiar de microftalmia (CCR-MiT) forma parte de los tipos tumorales que ocurren esporádicamente en aproximadamente la mitad de los individuos con CCR con edad menor a los 20 años y que están asociados con translocaciones cromosomales. Este tumor papilar tiene un comportamiento extremadamente agresivo, y cuando la metástasis ocurre, los pacientes presentan un pronóstico bajo. En este subtipo se ha identificado una mutación en la línea germinal del gen que codifica al factor de transcripción MiT, uno de los miembros de la subfamilia de factores de transcripción asociados a la microftalmia, la cual se ha visto que afecta la modificación transcripcional y la activación de este factor, y, por tanto, conduce a la desregulación de la señalización celular asociada con el desarrollo de melanoma y CCR (Bertolotto, *et al.*, 2011; Libertino, *et al.*, 2013).

**El CCR asociado al síndrome de leiomiomatosis hereditaria (HLRCC)**, no es considerado del todo una nueva entidad, ya que desde que la OMS estableció modificaciones a la clasificación fue descrito como una entidad relacionada con el CCR hereditario. En ese entonces, no se enlistó como un subtipo histológico de CCR distinto ya que se sugirió que el HLRCC era un homólogo hereditario del CCR papilar tipo II, sin embargo, ahora se sabe el HLRCC es un tumor con un comportamiento agresivo, que debe reconocerse como un subtipo diferente y que, aunque frecuentemente presenta arquitectura papilar, también pueden presentarse patrones cribiformes y sólidos. Morfológicamente, la característica más distintiva de estos neoplasmas es citológica, en la que se puede observar un nucléolo eosinófilo prominente distintivo con un halo claro, similar a la citología de una inclusión por un citomegalovirus. El CCR y los leiomiomas en el HLRCC demuestran inactivación bialélica de FH, con mutaciones germinales en un alelo y la pérdida del segundo alelo, típico de un gen supresor de tumores. Asimismo, se ha visto que las mutaciones somáticas de la FH se encuentran, de hecho, raramente en el CCRp tipo II esporádico. Por otra parte, algunos autores consideran que el CCRp tipo II puede ser una entidad heterogénea que incluye distintos carcinomas renales múltiples.

➤ **Entidades tumorales emergentes o provisionales**

Existen otras entidades tumorales llamadas emergentes o provisionales que hasta el momento no se reconocen como nuevos subtipos histológicos ya que no se cuenta con la información suficiente para caracterizarlos debido a su baja frecuencia, el pronóstico no se encuentra bien definido, y aún hay divergencia de opiniones entre los expertos para reconocerlos como nuevas entidades distintivas debido a la similitud que presentan con la arquitectura de otros subtipos histológicos, así como de algunas características moleculares que también se encuentran asociadas con otras patologías (Srigley, *et al.*, 2013).

**El CCR folicular tipo tiroideo (TLF-RCC)**, está definido provisionalmente como carcinoma folicular bien diferenciado de la glándula tiroide que en la literatura solo se han reportado menos de 15 casos. El pronóstico no

está definido del todo, aunque de los casos reportados, los pacientes han mostrado estar libres de la enfermedad después de la resección quirúrgica, la edad promedio ha sido de 45 años con un rango de edad entre los 29 a 83 años y se ha visto un ligero predominio de presentarse en las mujeres (Srigley, *et al.*, 2013). Por otra parte, el **CCR asociado con la mutación succinato deshidrogenasa B (SDBH-RCC)**, como su nombre lo indica, se ha vinculado con mutaciones en la línea germinal de la enzima succinato deshidrogenasa B asociada con feocromocitoma/síndrome paraganglioma tipo 4 (PGL4). Este padecimiento solo se ha reportado en menos de 10 casos, principalmente en adultos jóvenes con edad promedio de 34 años (rango 10-62 años) con un curso indolente y seguimiento limitado. Algunos de estos individuos fueron diagnosticados con CCRcc y subsecuentemente también fueron identificados otros subtipos histológicos como el papilar tipo 2, oncocitoma y cromóforo (Vanharanta, *et al.*, 2004; Henderson, *et al.*, 2009; Ricketts, *et al.*, 2008; Srirangalingam, *et al.*, 2008). Para el **CCR asociado con la translocación cinasa linfoma anaplásico (VCL\_ALK-RCC)** se han encontrado únicamente dos casos de CCR albergando una translocación en t(2;10) (p23;q22) resultando en la fusión del gen que codifica a la proteína vinculina del citoesqueleto con el gen que codifica para la cinasa de linfoma anaplásico, y aunque presentan características clínicas y patológicas distintivas, la divergencia de opiniones ha dificultado su consideración como nueva entidad.

Por último, **el subtipo histológico no clasificado** asigna a los tumores renales cuyas características no concuerdan con ninguno de los subtipos reconocidos, este subtipo representa del 4 al 5% de todos los casos de CCR y es útil para definir un grupo de cáncer renal cuyas características clinicopatológicas y moleculares no han sido bien definidas y aún difiere claramente de otros subtipos histológicos (Kovacs, *et al.*, 1997). La mayoría de estos tumores tienen un grado citomorfológico alto y tienen un comportamiento clínico agresivo (Zisman, *et al.*, 2002).

### 1.1.3 Prognosis

El pronóstico del CCR se realiza mediante la evaluación de parámetros anatómicos, histopatológicos y clínicos (Volpe, *et al.*, 2010).

Entre los parámetros anatómicos, el estadio del tumor es el factor más importante para la evaluación patológica del CCR en el momento del diagnóstico por encima de los factores de pronóstico biológicos y moleculares que se han identificado (Lam, 2005 y 2006). El sistema TNM integra criterios para describir el estadio global de la enfermedad en los pacientes como el tamaño del tumor (T), y su propagación a través de parámetros como el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M).

Los factores histopatológicos incluyen el grado Fuhrman, la invasión microvascular, la presencia de características sarcomatoides, la necrosis tumoral y el subtipo histológico (Thomas, *et al.*, 2008). El grado Fuhrman es un sistema basado en el tamaño y morfología del núcleo celular así como en la presencia o ausencia de nucléolo (Figura 12), y, aunque este sistema es el más ampliamente utilizado para la clasificación del CCR y permanece como uno de los factores de pronóstico independientes, aún está sujeto a discrepancias intra e

interobservador (Ljungberg, *et al.*, 2007). Por otro lado, la invasión microvascular (MVI, por sus siglas en inglés) junto con el tamaño del tumor y el grado Fuhrman, ha cobrado importancia como herramienta de pronóstico del comportamiento clínico de este cáncer. Los pacientes con un tamaño de tumor mayor a 7 cm, un grado Fuhrman alto y evidencia de MVI tienen un riesgo alto de presentar recurrencia y/o progresión (Dall'Oglio, *et al.*, 2007). Otro factor histopatológico importante para el pronóstico, es la presencia o no de las características sarcomatoides, las cuales se definen por un patrón de crecimiento celular fusiforme e indican un alto grado de diferenciación celular de un subtipo existente, usualmente CCRcc y CCRp. Otro factor pronóstico importante de la supervivencia es la necrosis tumoral a cualquier grado, se considera como un componente histológico exclusivo de cambios degenerativos como hialinización, hemorragia o fibrosis (Lam, *et al.*, 2005). Así mismo, la asignación del subtipo histológico es crítica para el pronóstico de pacientes (Cheville, *et al.*, 2003; Jones, *et al.*, 2005). El CCRcc es el subtipo histológico más común y tiene un pronóstico menos favorable que los subtipos papilar y cromóforo; por su parte, los carcinomas de ducto colector y medular se asocian con el comportamiento clínico más agresivo y con un pronóstico pobre de todos los tipos de CCR (Srinivasa, *et al.*, 2006; Feng-Ming, *et al.*, 2012).

En cuanto a los factores de pronóstico clínico, éstos incluyen el estado general del paciente, síntomas localizados, caquexia, anemia y niveles elevados de plaquetas. Las escalas Karnofsky y ECOG-PS (Grupo de Oncología Cooperativa del Este, por sus siglas en inglés) se utilizan comúnmente para evaluar el impacto total de la enfermedad (Lam, *et al.*, 2008), por ejemplo, para documentar el progreso clínico y para evaluar la elegibilidad en ensayos clínicos (Fiala, *et al.*, 2001; Patard, *et al.*, 2003).

#### **1.1.4 Tratamiento del CCR**

El tratamiento del CCR depende del estadio en el que se encuentre esta enfermedad al momento del diagnóstico. En etapas tempranas se puede tratar de manera exitosa mediante nefrectomía parcial o radical. La nefrectomía parcial se ha establecido como estándar de oro para el manejo de tumores renales pequeños (de 4 cm o menores), y se practica cuando existe sólo un tumor en uno de los riñones, en tumores bilaterales, así como en pacientes con enfermedad renal crónica o condiciones médicas que puedan afectar de manera adversa la función del riñón a largo plazo (Uzzo, *et al.*, 2001). Otras opciones de tratamiento incluyen la ablación térmica, la cual puede ser por disminución de la temperatura (crioablación) o aumento de ésta (ablación con radiofrecuencia) sin la necesidad de realizar cirugía convencional, y ambas pueden realizarse de manera percutánea o laparoscópica (Gill, *et al.*, 2000 y 2005; Hafron, *et al.*, 2007). La limitación de la ablación térmica incluye una alta recurrencia local comparada con la escisión quirúrgica (Kunkle, *et al.*, 2008). Para tumores con tamaños mayores a los 7 cm y/o para aquéllos que tienen características de invasividad local se maneja típicamente la nefrectomía radical, la cual ocasionalmente también requiere de la extirpación de órganos adyacentes así como aislamiento y oclusión temporal de la región vascular, no obstante, sólo alrededor del 40-60% de los pacientes pueden curarse con este tratamiento quirúrgico agresivo (Rini, *et al.*, 2009) y el 20-30% de los pacientes desarrollan metástasis posteriormente.



En el CCR avanzado o metastásico, la nefrectomía también se usa para mejorar la calidad de vida de estos pacientes, particularmente aquéllos que presentan dolor, hemorragia, malestar, hipercalcemia, eritrocitosis o hipertensión (Corgna, *et al.*, 2007). La remoción del tumor primario puede aliviar todos o algunos de estos síntomas y junto con la inmunoterapia, el subtipo histológico de células claras ha tenido una mejor respuesta. Aunque el CCR es considerado como resistente a la radioterapia, varios reportes indican que los pacientes con metástasis cerebrales y óseas se puede beneficiar con este tratamiento. Cuando existe metástasis hacia los huesos, la radioterapia se utiliza para aminorar el dolor, y para aquéllos pacientes con metástasis en el cerebro, los cuales presentan frecuentemente hemorragias, el rápido tratamiento con radioterapia puede detener la progresión del daño neurológico. En el caso de la quimioterapia convencional, la respuesta a agentes como la vinblastina, la floxuridina y el 5-fluorouracilo ha sido poco efectiva (5-12%) (Libermann, *et al.*, 2007), la cual se cree puede estar relacionada con la expresión incrementada del receptor de resistencia a múltiples fármacos en las células del túbulo proximal (Mignogna, *et al.*, 2006), donde se sugiere que el CCR de células claras y papilar se origina. Por su parte, los agentes inmunoterapéuticos como la interleucina-2 (IL-2) y el IFN $\alpha$  han presentado una respuesta del 7-27% para el régimen más activo y del 5 al 15% en los casos de CCR metastásico respectivamente (Mc Dermott, *et al.*, 2005). Además, estas respuestas han sido parciales y de corta duración, acompañadas con una mortalidad sustancial por lo que su uso se limita a aquellos pacientes con buen estado general. Varios estudios donde combinan la inmunoterapia con el uso de agentes quimioterapéuticos han tenido una mejor respuesta, pero aún muy limitada, por ejemplo, la respuesta del 5-fluorouracilo es del 10%, administrado con IFN $\alpha$  la respuesta incrementa sólo al 19%, y con el uso de vinblastina en lugar del 5-fluorouracilo se han observado resultados similares. Por último, el uso de agentes progestacionales solos o en combinación con corticosteroides, testosterona o anti-estrógenos, ha producido respuestas menores al 10%.

Los avances recientes en el entendimiento de la biología molecular del CCR han permitido la introducción de agentes terapéuticos ofreciendo nuevas opciones para aquellos pacientes que no responden a la terapia convencional. La identificación de algunas alteraciones en vías de señalización implicadas en el CCRcc como el incremento en los niveles de los factores de crecimiento VEGF, PDGF y EGF, debido a la inactivación de pVHL ha conducido a la utilización de agentes terapéuticos que actúan disminuyendo la actividad de sus receptores específicos. Los inhibidores de cinasa de tirosina (TKIs por sus siglas en inglés) como el sorafenib (Nexavar®, Bayer), y el sunitinib (Sutent®, Pfizer) tienen como blanco a VEGF y receptores relacionados como VEGFR1-3 y PDGFR-a y b. El sorafenib, además, es un inhibidor a nivel de la cinasa de Raf (Stadler, *et al.*, 2005). Otras moléculas como el bevacizumab (Avastin®, Genetech) y valatinib (Bayer Schering y Novartis) actúan sobre VEGF inhibiendo la interacción con su receptor (Hilger, *et al.*, 2002). Otros agentes anti-VEGF como el axitinib (Inlyta®, Pfizer) y pazopanib (Votrient®, GSK) fueron aprobados recientemente por la FDA, y los fármacos como dovitinib (TKI-258), tivozanib (AV-951), cabozantinib (XL-184), cedinarib (AZD-2171), regorafenib (BAY-73-4506) y linifanib (ABT-869) se encuentran actualmente en investigación (Dabney, *et al.*, 2014). Los agentes como el gefitinib (Iressa®, AstraZeneca), cetuximab (Erbix®, Bristol-Mayer Squibb), erlotinib (Torceva®, Roche) y panitumumab (Vectibix®, Amgen) bloquean la función del receptor de EGF, y el lapatinib (Tykerb®, GSK) inhibe a sus receptores EGFR (Erb-1 y Erb-2). Por su parte, el temsirolimus (Torisel®, Wyeth) y everolimus (Afinitor®, Novartis) son

inhibidores de mTOR (Cho, *et al.*, 2007; Ravaud, *et al.*, 2008), el cual está implicado en la angiogénesis y en la vía de fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3-K).

La mayoría de estos agentes han mostrado tener una mejor respuesta (26-37%) en los pacientes que presentan el subtipo histológico de CCRcc, por lo que la clasificación histológica del CCR es crítica para el manejo clínico de la enfermedad. Varios estudios han investigado el potencial sinérgico de las TKIs como una nueva forma de bloquear múltiples vías de señalización simultáneamente, sin embargo, varios de ellos han resultado en un aumento significativo de la toxicidad. La administración secuencial de TKIs ha tenido resultados alentadores, pero la secuencia óptima de administración de TKIs todavía permanece sin determinarse. Por otro lado, los estudios que combinan el uso de las TKIs con la inmunoterapia han resultado en varios grados de éxito, siendo el bevacizumab y el IFN $\alpha$  la única combinación utilizada en la clínica actualmente, no obstante, de acuerdo a resultados recientes no se ha demostrado un beneficio claro y sólo se ha encontrado un incremento en su toxicidad (Dabney, *et al.*, 2014; Greef, *et al.*, 2016).

El escaso conocimiento que se tiene de los otros subtipos de CCR, debido, en parte, a su baja incidencia, ha hecho más difícil el desarrollo de terapias más dirigidas a cada uno, por lo que en su mayor parte se ha evaluado la efectividad de los agentes terapéuticos contra el CCRcc. Varios estudios retrospectivos sobre el uso de sunitinib, sorafenib y temsirolimus en pacientes con histología diferente al CCRcc han mostrado una respuesta del 3.7 al 16%, y aunque los porcentajes de respuesta pueden no ser tan altos como los presentados en los casos de CCR con histología de células claras, la terapia puede proveer una respuesta significativa (Schips, *et al.*, 2007; Choueiri, *et al.*, 2008). Para el CCRp, la participación de la vía MET, sugiere al menos tres estrategias terapéuticas: bloqueo de la activación de la cinasa con pequeñas moléculas que inhiben el enlace a ATP, bloqueo de la interacción HGF-MET, o bien bloqueo de interacciones entre MET activado y moléculas de señalización que convergen en esta vía (Kooper, *et al.*, 2006). Hasta el momento, se han desarrollado inhibidores de cinasa como el foretinib (XL-880) un inhibidor dual de MET/VEGFR2 y cabozantinib (XL-184) y anticuerpos neutralizantes (rilotumumab, AMG102) contra MET, así como savolitinib, cabozantinib y crizotinib sin embargo, todavía se encuentran en estudios de fase clínica I y II (Mahtouk, *et al.*, 2010; Harshman, *et al.*, 2013; Greef, *et al.*, 2016).

Otras estrategias para el tratamiento del CCR han incorporado la utilización de vacunas, anticuerpos monoclonales y trasplantes alogénicos. Algunas de las **vacunas** que se han evaluado incluyen los lisados de células tumorales autólogas, proteínas de choque térmico purificadas, células dendríticas y péptidos purificados (Biswas, *et al.*, 2009; Yoshimura, *et al.*, 2013), sin embargo, su efectividad y aplicación aún se encuentran en investigación ya que la mayoría de estos tratamientos se encuentran confinados por el momento en ensayos clínicos (Vergati, *et al.*, 2010; Jocham, *et al.*, 2004; Avigan, *et al.*, 2007; Escudier, *et al.*, 2012; Rahma, *et al.*, 2010; Greef, *et al.*, 2016). Por otra parte, la terapia con **anticuerpos monoclonales** se ha utilizado para promover la citotoxicidad celular o para transportar radioisótopos a las células tumorales. Específicamente, la expresión de CAIX en el 94% del CCRcc (Bleumer, *et al.*, 2004), la ha catalogado como un buen blanco para el tratamiento del

CCR. En relación a esto, existe un anticuerpo monoclonal tipo IgG que se enlaza a CAIX: WX-G250 (Rencarex®), cuyo efecto terapéutico se ha demostrado en pacientes que presentan expresión alta de CAIX (Shuch, *et al.*, 2008; Oosterwijk-Wakka, *et al.*, 2013). Por último, el uso de **transplantes alogénicos** de células madre (SCT por sus siglas en inglés), aunque ha tenido una respuesta del 0-56% en el CCR metastásico en ensayos clínicos, la eficacia de este tratamiento está asociada con una mortalidad superior al 33% (Bregni, *et al.*, 2011).

### 1.1.5 CCR en la población mexicana

En México, los datos sobre la epidemiología del CCR no se encuentran actualizados. En el 2001, el Compendio de Cáncer de la Dirección General de Epidemiología en México reportó que, de un total de 1577 casos presentados, el 81.7% falleció por causa de este padecimiento, y en el 2002, el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHPNM, 2002) reportó un total de 1664 casos (722 mujeres y 938 hombres) con una tasa de incidencia del 1.5% respecto a los demás tipos de cáncer.

En la capital del país, la estadística de casos de CCR se ha reportado en estudios con duración de 5 a 10 años, y no se tiene la información detallada sobre el índice de ocurrencia presentado en otros estados del país. La edad promedio de los pacientes es de 53 a 59 años (28-95 años), con una incidencia mayor en hombres con respecto a las mujeres (65 y 35% respectivamente), y el principal factor de riesgo identificado es el tabaquismo (59.2% al 71.6% de los casos analizados) (Petersen, *et al.*, 2001; Morales, *et al.*, 2002; Castellano-Orozco, *et al.*, 2008; Jasso, *et al.*, 2008), lo cual concuerda con lo reportado a nivel mundial. El Instituto Nacional de Nutrición, reportó que el porcentaje de casos de CCR detectados de manera accidental es del 17% en una revisión de 5 años, y en el Hospital General de México del 5.4% de un total de 110 pacientes (Suplemento Memorias XLV Congreso Nacional de Urología, 1994). Las causas de las consultas médicas iniciales se han relacionado con síntomas gastrointestinales como colitis, pancreatitis, cólicos vesiculares y abscesos hepáticos, y los métodos de diagnóstico incidental fueron ultrasonografía (37%), tomografía computarizada (37%), resonancia magnética (13%) y urografía (13%) (Morales, *et al.*, 2002). La hematuria es el síntoma presentado con mayor frecuencia (43.3-57.1%), seguido por hematuria y dolor lumbar (35%), 26.9% de los pacientes presentan una masa palpable, del 10 al 48.1% dolor lumbar, del 1.7 al 12.7% presentan los 3 síntomas de la clásica triada, y el 4.2-10% son asintomáticos (Jasso, *et al.*, 2008; Petersen, *et al.*, 2001). Entre los síndromes paraneoplásicos reportados se encuentran el síndrome de Stauffer, la hipertensión arterial, anemia, niveles de calcio sérico mayores a 10.2 mg/dL y pérdida de peso (Jasso, *et al.*, 2008; Petersen, *et al.*, 2001). En nuestro país el 82.7% de los pacientes presentan tumores de gran tamaño (mayores a 7 cm). Entre los pacientes diagnosticados con tumores pequeños T1 (tumores  $\leq 7$  cm confinados en el riñón) la supervivencia sin recurrencia es del 90% a los 5 años (Morales, *et al.*, 2002) y los factores de pronóstico de mayor peso son el estadio clínico y el grado Fuhrman. Al igual que en el resto del mundo, el subtipo histológico de CCR presentado con mayor frecuencia es el de células claras (94.2-100%) y los subtipos papilar, cromóforo y el sarcomatoide (1.4 al 5.7% de los casos). Por su parte, el grado nuclear Fuhrman que ha predominado en la mayoría de los estudios ha sido el II (32.7 al 70% de los casos) (Petersen, *et al.*, 2001; Jasso, *et al.*, 2008). En conjunto, el grado nuclear, el tamaño del tumor y el subtipo histológico son los factores que predicen la progresión del cáncer renal y tiempo de supervivencia (Petersen, *et al.*, 2001), al igual que el resto del mundo.

La cirugía es el tratamiento de elección para el CCR también en nuestro país. En el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” se realizó un análisis desde 1991 hasta el 2000 de 60 casos de pacientes con CCR tratados con nefrectomía radical, encontrándose metástasis en el 17.1%, presentando recurrencia en los pulmones y huesos (Castellano-Orozco, *et al.*, 2008). El RHPNM (2002) reportó que hasta 30% de los pacientes presentan metástasis al momento del diagnóstico y después de una nefrectomía entre el 20 al 30%. Los órganos más comúnmente afectados por metástasis del CCR de acuerdo a un estudio realizado por el servicio de urología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional, Siglo XXI durante 5 años (1998 al 2002) son los pulmones (80% de los casos), huesos (5%), cerebro (15%), y el tiempo promedio de sobrevida fue de 18 meses a partir del diagnóstico de metástasis (Jasso, *et al.*, 2008). También se han reportado casos de metástasis en piel (Aguilar-Barradas, *et al.*, 2009) y en órganos reproductores masculinos (Díaz de León Nevarez, *et al.*, 2007).

### **1.1.6 Marcadores generales de CCR**

Por todas las complicaciones que presenta el CCR, tanto de diagnóstico como de tratamiento, y por lo tanto la presencia de una alta mortalidad, hay un interés considerable en encontrar marcadores moleculares específicos que permitan la detección oportuna de este tipo de cáncer. Además, estos marcadores podrían ayudar a predecir el riesgo de desarrollar esta patología, establecer la posibilidad de recurrencias posteriores al tratamiento e identificar blancos terapéuticos y/o de mayor importancia para prevenir este cáncer.

Un marcador tumoral puede definirse como un indicador que incrementa o disminuye la sospecha de que un individuo presente cáncer (Motzer, *et al.*, 1996). Entre las características que debe tener un buen marcador se encuentran: a) presentar alta especificidad y sensibilidad, b) ser secretado por las células malignas y detectado por métodos simples, c) tener alta capacidad de diagnóstico en etapas tempranas de la enfermedad, d) permitir la detección de recurrencia del tumor, e) establecer el éxito de la terapia, f) tener una correlación directamente proporcional con el grado de avance del tumor, g) predecir la progresión de la enfermedad, h) estar socialmente aceptado ocasionando la menor incomodidad posible en el paciente y i) ser independiente de factores subjetivos como la metodología o experiencia del examinador (Kashyap, *et al.*, 2005; Kulasingam, *et al.*, 2008).

Como se mencionó anteriormente, el tamaño y grado del tumor han sido las herramientas más utilizadas para establecer el pronóstico de CCR en general (Eichelberg, *et al.*, 2009). Hasta el momento, se han investigado un sin número de marcadores moleculares, algunos de ellos con potencial clínico, pero ninguno hasta ahora se ha considerado como un marcador ideal para el diagnóstico del CCR; sólo se ha considerado el potencial de diagnóstico y pronóstico de diferentes marcadores que han funcionado en otros tipos de cáncer, pero ninguno de estos marcadores ha resultado ser útil para su detección temprana. Algunos de los marcadores potenciales propuestos para predecir la progresión de la enfermedad y supervivencia de pacientes con CCR, están relacionados con eventos celulares que permiten la proliferación y supervivencia de células cancerosas como la regulación del ciclo celular, la adhesión celular y la apoptosis, entre otras (Tabla 1).

**Tabla 1. Marcadores potenciales del carcinoma de células renales**

Inducibles por hipoxia	Proliferación	Regulación del ciclo celular	Adhesión celular	Patrón metastásico	Misceláneo
CAIX	Ki-67	p53	EpCAM	Survivina	Gelsolina
CAXII	Anilina	Bcl-2	EMA	PAX8	Vimentina
CXCR4	GST	PTEN	E-caderina	Topoisomerasa IIa	CA125
VEGF		Ciclina A	X-catenina	CP	CD44
EGF-1		P27	Caderina-6	CD95	Receptores androgénicos
				SAA	Caveolina-1
					VEGFR

Protzel, *et al.*, 2012.

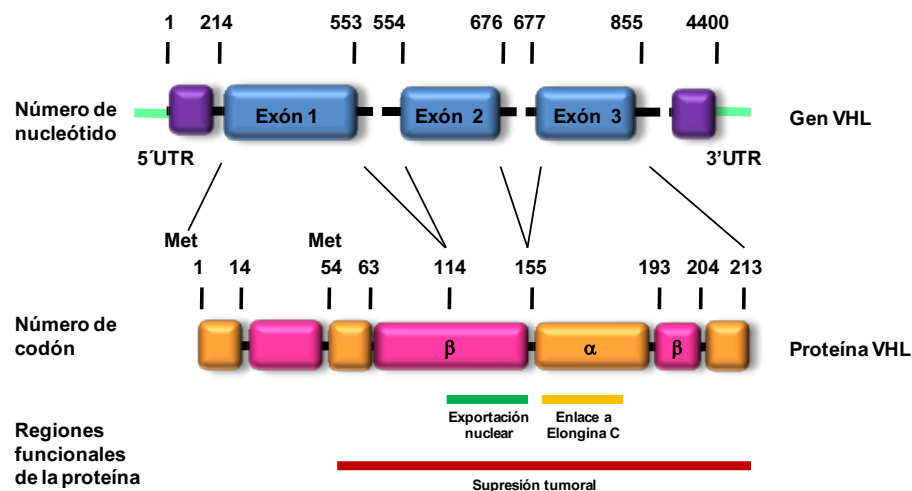
## 1.2 ALTERACIONES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES ASOCIADAS CON EL SUBTIPO HISTOLÓGICO DE CÉLULAS CLARAS

Existen alteraciones asociadas a los diferentes subtipos histológicos de CCR, sin embargo, son todavía muy escasos los marcadores que permiten diferenciarlos. En el caso del CCRcc, la inactivación genética y epigenética de VHL conduce a la desregulación de HIF- $\alpha$ , dando como resultado la activación de los genes inducibles por hipoxia como los factores de crecimiento VEGF, EGF, TGF $\alpha$  e IGF, el transportador de glucosa GLUT1, EPO, enzimas de la glucólisis y CAIX, los cuales, a su vez, pueden contribuir al desarrollo tumoral (Pantuck, *et al.*, 2003). De hecho, la sobrerregulación del eje HIF- $\alpha$ -VEGF conduce a un alto nivel de actividad angiogénica, particularidad que distingue al CCRcc como uno de los tipos de cáncer con mayor vascularización en el humano (Lorincz, *et al.*, 2004).

### 1.2.1 von Hippel Lindau (VHL)

El gen *VHL* contiene 3 exones los cuales codifican para dos proteínas debido a la existencia de un sitio de iniciación de traducción alternativo en el codón 54. La proteína más grande está formada por 213 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 24-30 kDa (pVHL30), y la proteína más pequeña está formada por 160 aminoácidos y tiene un peso molecular de 18-19 kDa (pVHL19). Ambos productos del gen VHL, llamados en conjunto pVHL, actúan como supresores de tumores (Blankenship, *et al.*, 1999). En su estructura presentan un dominio alfa y uno beta (Figura 4). El dominio alfa de pVHL se asocia con elongina C, elongina B, culina 2 y Rbx1 para actuar como ubiquitin E3 ligasa. Este complejo, mediante el dominio  $\beta$  de pVHL, reconoce a los factores inducibles por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  o HIF-3 $\alpha$ ) después de su hidroxilación, y mediante poliubiquitinación los conduce a su degradación proteosomal. HIF-1 $\alpha$  es el sustrato mejor conocido de este complejo, cuyas funciones se revisan en la siguiente sección; sin embargo, se han reportado otros sustratos de pVHL que son sujetos a degradación como la proteína cinasa C (Okuda, *et al.*, 2001) y el VEGF. Otras de las funciones de pVHL que se cree que también son importantes para su acción como supresor de tumores, son el mantenimiento del cilio primario, el enlace a fibronectina y el ensamblaje de la matriz extracelular (Ohh, *et al.*, 1998), el control de la dinámica de los microtúbulos (Hergovich, *et al.*, 2003), la regulación de la apoptosis y de la transcripción (Gnarra,

*et al.*, 1996; Levy, *et al.*, 1996; Knebelmann, *et al.*, 1998), la regulación de la diferenciación de células epiteliales y la salida del ciclo celular (Pause, *et al.*, 1998). Esto último, al parecer por su participación en la regulación a la baja a ciclina D1 y posiblemente la estabilización de p53. pVHL también regula a la baja al receptor de quimiocinas CXCR4 que está involucrado en la metástasis órgano-específica (Staller, *et al.*, 2003). No obstante, todas estas funciones se encuentran menos caracterizadas que aquellas que involucran a HIF.



**Figura 4. Estructura del gen de VHL y dominios de la proteína.** pVHL está codificada en tres exones localizados en el cromosoma 3p25-p26. El producto proteico de 213 aminoácidos se origina por la activación del sitio de inicio de la traducción (Met 1). La activación de un inicio de la traducción interno en Met 54 codifica para una proteína más pequeña de 160 aminoácidos. pVHL puede dividirse estructuralmente en los dominios alfa y beta. El dominio alfa se asocia con elongina C, mientras que los dominios beta cuentan con un sitio de exportación nuclear y uno de reconocimiento de HIF (Modificado de Arjumad, *et al.*, 2012).

Otros estudios sugieren que pVHL regula al factor de transcripción nuclear (NF- $\kappa$ B), al actuar como molécula adaptadora que promueve la fosforilación inhibitoria por la caseína cinasa II del agonista de NF- $\kappa$ B, Card9, aumentando de esta forma la actividad de NF- $\kappa$ B (Yang, *et al.*, 2007). En el CCRcc, la actividad de NF- $\kappa$ B se ha visto incrementada lo que puede contribuir, por consiguiente, a la resistencia del tumor a la terapia por supresión de la apoptosis inducida por fármacos. Además de la regulación de HIF y NF- $\kappa$ B, pVHL también regula la vía de señalización de Wnt y, por tanto, la actividad del factor de transcripción pro-oncogénico  $\beta$ -catenina (Berndt, *et al.*, 2009; Li, *et al.*, 2011). Se han propuesto varios mecanismos para la supresión de la vía de Wnt por pVHL. Esta proteína promueve la ubiquitinación de la proteína dishevelled (dvl), conduciendo a su subsecuentemente degradación por la vía autofagia-lisosoma (Gao, *et al.*, 2012), y estabiliza a la proteína candidato supresora de tumores Jade-1, la cual ubiquitina a  $\beta$ -catenina para su degradación proteosomal (Chitalia, *et al.*, 2008).

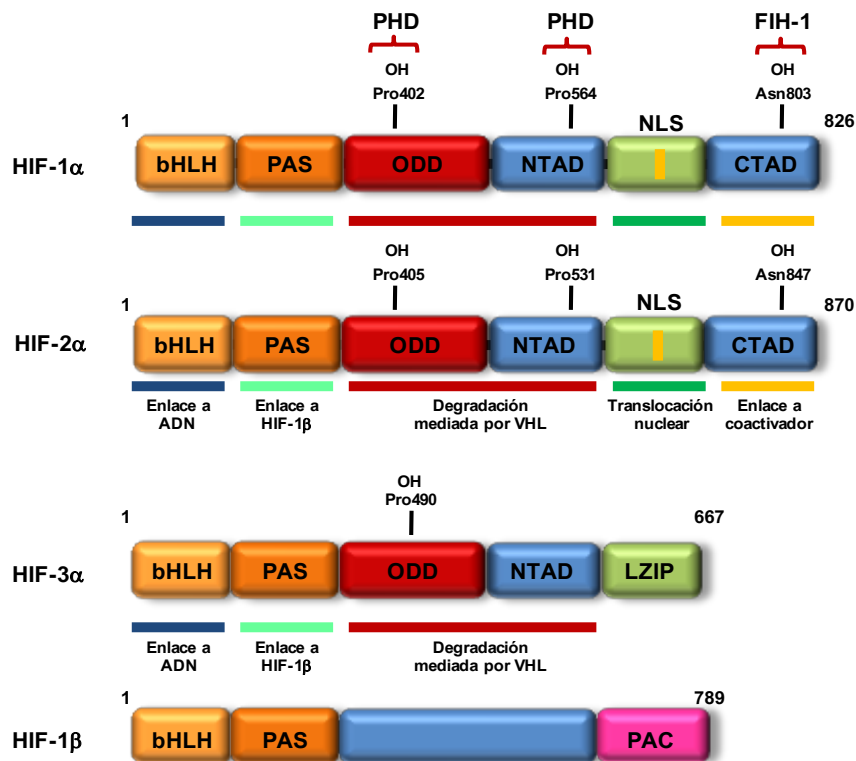
### 1.2.1 Factor inducible por hipoxia (HIF)

Este factor tiene impacto en un amplio rango de procesos celulares y fisiológicos como la eritropoyesis, metabolismo energético, supervivencia celular, apoptosis, adhesión y motilidad celular, vascularización,

resistencia a fármacos, regulación del pH, entre otros (Semenza, *et al.*, 2012). En el cáncer, la proliferación celular elevada resulta en un incremento dramático en la demanda de oxígeno provocando que las células tumorales permanezcan en condiciones de hipoxia y, contrario a lo que se esperaría en una célula normal, esta condición constituye una ventaja para estas células. La inhibición de la respiración parece bloquear la senescencia y activar la vascularización, por lo que la depleción de oxígeno promueve la supervivencia de las células cancerosas, y redirige la formación de nuevos vasos sanguíneos para promover el crecimiento tumoral. Aunque algunos de los mecanismos permanecen sin elucidarse, HIF juega un papel importante en la integración de la mayoría de las vías de señalización implicadas.

El HIF es un complejo heterodimérico compuesto por dos proteínas de la familia PAS: la subunidad constitutiva no dependiente de oxígeno HIF-1 $\beta$  y una de las subunidades  $\alpha$  inducibles por hipoxia: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  o HIF-3 $\alpha$  (Figura 5). Las subunidades  $\alpha$  de HIF se degradan rápidamente en condiciones de normoxia, pero son altamente inducibles en hipoxia. En condiciones de normoxia, la subunidad HIF- $\alpha$  se hidroxila en dos residuos de prolina localizados en el dominio de degradación dependiente de oxígeno. Esta hidroxilación dependiente de oxígeno regula la interacción de HIF- $\alpha$  con el dominio  $\beta$  de pVHL, para su ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma. En condiciones de hipoxia, la activación de las enzimas que modifican a HIF, denominadas prolihidroxilasas (PHD por sus siglas en inglés) se suprime, evitando de esta forma la hidroxilación de HIF- $\alpha$ , su ubiquitinación y degradación proteosomal, lo que lleva a su acumulación, a que se transloque al núcleo y se dimerize con HIF-1 $\beta$  para la posterior activación de la expresión de los genes inducibles por hipoxia.

Las PHDs son dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe (II) que escinden el oxígeno molecular y, de este modo, las prolinas de HIF permanecen sin modificaciones en ausencia de oxígeno. Los efectos de la hipoxia pueden ser simulados con quelación del hierro con el uso de análogos de 2-oxoglutarato o con la sustitución del Fe (II) por otros iones metálicos como el cobalto (Haase, *et al.*, 2013). La actividad transcripcional de HIF- $\alpha$  también se regula por hidroxilación de un residuo de asparragina localizado en el dominio de transactivación carboxilo terminal (CTAD por sus siglas en inglés), la cual es catalizada por una asparagil hidroxilasa, denominada factor inhibidor de HIF (FIH por sus siglas en inglés), y esta modificación evita la interacción de HIF- $\alpha$  con los coactivadores transcripcionales p300 y CBP (proteína de unión a CREB por sus siglas en inglés) (Stolze, *et al.*, 2004) (Figura 6). Aunque ambas subunidades de HIF- $\alpha$  son capaces de unirse a las secuencias consenso de los elementos inducibles por hipoxia (HRE por sus siglas en inglés), al parecer regulan conjuntos de genes blanco diferentes dependiendo del contexto celular y la concentración de oxígeno; por ejemplo, los genes que codifican para proteínas que intervienen en la vía glucolítica parecen ser regulados de manera predominante por HIF-1 $\alpha$ , mientras que se ha sugerido que HIF-2 $\alpha$  es el principal regulador de la expresión de genes como VEGF y EPO (Warnecke, *et al.*, 2004), sin embargo los factores y los mecanismos moleculares que determinan esta selectividad específica de cada isoforma permanece pobremente definida hasta el momento (Patel y Simon, *et al.*, 2008).

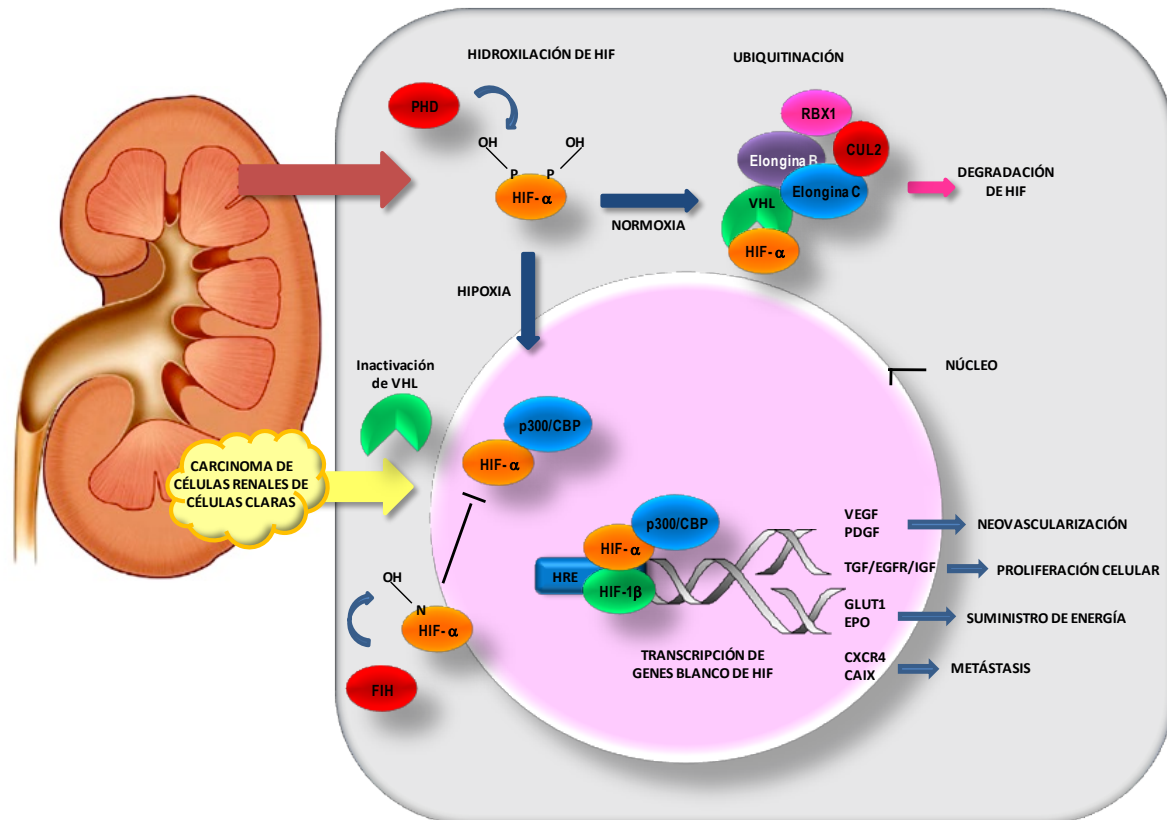


**Figura 5. Dominios estructurales de las proteínas de la familia HIF.** Se señalan las modificaciones de residuos de aminoácidos específicos. Las barras en colores indican interacciones particulares dentro de la familia de proteínas de HIF. CTAD: Dominio de transactivación terminal C; LZIP: Zipper de leucina; NLS: Señal de localización nuclear; NTAD: Dominio de transactivación terminal N; PAS: Dominio Per/ARNT/Sim; PAC: Dominio terminal C asociado a PAS; PHD: Prolilhidroxilasa; Sitio de unión de FIH-1: Factor inhibidor de HIF; bHLH: Hélice bucle hélice básica; ODD: Dominio de degradación dependiente de oxígeno. Modificado de Kenneth, et al., 2008.

Las variantes en las mutaciones de VHL pueden contribuir a un desbalance en la regulación de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ , conduciendo a distintos efectos en el crecimiento celular (Lee, *et al.*, 2009; Rathmell, *et al.*, 2004). Diversos estudios han demostrado que tumores que tienen mutado al gen de VHL y que presentan niveles elevados de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ , presentan a su vez, sobreactivada la vía de Akt/mTOR, mientras que tumores con la mutante de VHL y que expresan únicamente a HIF-2 $\alpha$  proliferan mucho más rápido (Vindrieux, *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que ambas isoformas tienen propiedades antagónicas; por ejemplo, HIF-2 $\alpha$  promueve la actividad de c-myc mientras que HIF-1 $\alpha$  la suprime; también HIF-1 $\alpha$  incrementa la función de p53 y HIF-2 $\alpha$  la suprime (Gordan, *et al.*, 2010). De este modo, el CCRcc podría caracterizarse de acuerdo a la expresión de HIF con efectos dramáticamente diferentes en la regulación y proliferación de las células tumorales (Gordon, *et al.*, 2008). HIF-2 $\alpha$  parece ser el factor que conduce predominantemente la oncogénesis en líneas celulares de CCR deficientes de VHL. Por ejemplo, la expresión de la proteína VEGF en células de cáncer renal deficientes de VHL se induce predominantemente por la actividad de HIF-2 $\alpha$ , entre otras moléculas blanco como el receptor activador de plasminógeno tipo urocinasa (u-PAR) y el inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1). Así mismo, se ha sugerido que la expresión de la proteína que HIF-2 $\alpha$  puede ser la principal isoforma que conduce a



la expresión de EPO en riñón (Rosenberger, *et al.*, 2002), por lo que estos eventos sugieren un papel importante de HIF-2 $\alpha$  en la tumorigénesis mediada por la pérdida en la función de VHL.



**Figura 6. Regulación de HIF $\alpha$  en el CCR.** En condiciones fisiológicas HIF1 $\alpha$  se hidroxila en los residuos de prolina 402 y 564 por las prolihidroxilasas (PHD), esta hidroxilación es reconocida por pVHL, la cual forma parte del complejo ubiquitin ligasa E3 formado por RBX1, CUL2 y Elonginas B y C. Este complejo conduce a la degradación de HIF1 $\alpha$  vía proteosomal. En el CCRcc, las mutaciones en el gen de VHL inactivan a la proteína (pVHL), inhibiendo de esta forma la degradación de HIF1 $\alpha$ . Otros procesos que también pueden estar involucrados en el desarrollo de CCR y que mimetizan las condiciones de hipoxia al igual que las mutaciones inactivantes de la proteína de VHL, son aquellos que aumentan los niveles de óxido nítrico, de EROs, metabolitos del ciclo de Krebs como el succinato y el fumarato, así como el uso cloruro de cobalto y quelantes de hierro como la deferoxamina ya que inhiben las prolihidroxilasas de HIF en presencia de oxígeno. Bajo estas condiciones HIF1 $\alpha$  se transloca al núcleo en donde forma un heterodímero donde forma un heterodímero con HIF1 $\beta$ . Este heterodímero se enlaza al elemento de respuesta a hipoxia (HRE) y recluta a los co-transactivadores (p300/CBP) para inducir la expresión de los genes blanco de HIF (v.g. VEGF, PDGF, EPO, CAIX, etc), los cuales pueden contribuir a la malignización celular. La actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  también se regula por hidroxilación del residuo de asparagina 803, catalizada por una asparagil hidroxilasa, denominada también factor inhibidor de HIF (FIH por sus siglas en inglés), y esta modificación evita la interacción de HIF1 $\alpha$  con los coactivadores transcripcionales p300 y CBP (proteína de unión a CREB por sus siglas en inglés). Modificado de Pavlovich, *et al.*, 2004.

El papel de HIF-3 $\alpha$  en la señalización por hipoxia todavía no está del todo claro; se han descrito variantes por splicing alternativo, muchas de las cuales pueden interferir con la función de HIF-1 $\alpha$  y 2 $\alpha$  (Makino, *et al.*, 2001).

Por otro lado, la eliminación de HIF-2 $\alpha$  en líneas celulares VHL -/-, así como la restauración de VHL por sí misma, suprime la formación de tumores en ratones desnudos. HIF-2 $\alpha$  parece ser necesario y suficiente para la patología descrita en modelos de ratones modificados genéticamente en los que se ha silenciado VHL. De hecho, los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés) de HIF-2 $\alpha$  se han relacionado con el riesgo de desarrollar cáncer en la población general (Purdue, *et al.*, 2011). La importancia de HIF-2 $\alpha$  en la

patogénesis de CCR (VHL -/-) puede deberse, al menos en parte, a la habilidad para evadir la acción de proteínas como FIH1. Así mismo, es posible que algunos genes que se activan preferencialmente por HIF-2 $\alpha$  en vez de HIF-1 $\alpha$  sean particularmente oncogénicos (Shen, *et al.*, 2013) como es el caso de ciclina D1, c-myc y la vía TGF $\alpha$  /receptor de EGF (Gordan, *et al.*, 2007; Bindra, *et al.*, 2002; Smith, *et al.*, 2005).

HIF también puede regularse por otras vías de señalización; por ejemplo, la unión de factores de crecimiento a receptores con actividad de tirosin cinasa, incrementan los niveles de la proteína HIF como consecuencia de la activación de las vías de PI3K-mTOR y Ras/Raf/MEK/MAPK (Hudson, *et al.*, 2002), vías que también parecen ser críticas para el crecimiento y supervivencia celular (Averous, *et al.*, 2006).

### 1.2.2 Anhidrasa carbónica IX (CAIX)

Entre las moléculas cuya expresión se encuentra sobrerregulada por HIF en el CCR, está CAIX, que es uno de los marcadores más prometedores, ya que la contribución de esta enzima para mantener las condiciones de hipoxia en el microambiente tumoral está correlacionada altamente con el pronóstico clínico del paciente. Asimismo, la expresión mínima de CAIX en tejidos normales y su expresión alta en tumores sólidos así como su localización en la interface externa de las células tumorales hacen que CAIX se considere también como un blanco terapéutico atractivo.

Esta enzima en humanos se encuentra normalmente presente en algunos tejidos como el epitelio del tracto gastrointestinal y páncreas aunque también se ha encontrado expresión en epitelio del ovario, células de los folículos pilosos y células de la rete testis fetal. En tejido embrionario de pulmón, músculo esquelético e intestino, los niveles de CAIX son altos mientras que estos disminuyen en tejido adulto.

La función de CAIX en tejido normal no está bien definida, sin embargo, su expresión se ha encontrado asociada principalmente en áreas de bajo pH y alta tasa de proliferación celular, no obstante, el que esta enzima se considere como un elemento regulatorio aún no ha sido confirmado. Asimismo, la expresión de CAIX en la superficie basolateral de los enterocitos de la cripta del duodeno, yeyuno e íleon, sugiere que podría estar involucrada en la proliferación de las células madre del intestino y regulación de algunas funciones metabólicas.

En células tumorales, CAIX está implicada en la supervivencia, proliferación, migración, crecimiento, adhesión, regulación de pH y en vías de señalización (Svastova *et al.*, 2012). Esta proteína se expresa ectópicamente en carcinomas de pulmón, colon, páncreas, epitelio gástrico, cérvico uterino, cavidad oral (cabeza/cuello), vesícula biliar, hígado y cerebro, así como en neoplasmas renales, particularmente de CCRcc (Li, Cuilleron *et al.*, 2003; Pastoreková, *et al.*, 2004; Xu, *et al.*, 2010, Nihan, *et al.*, 2011).

La CAIX es una glicoproteína transmembranal homodimérica, cuya región extracelular (DEC) contiene un dominio péptido señal (SP) el cual se remueve antes de la maduración de esta enzima (Mahon, *et al.*, 2015), un

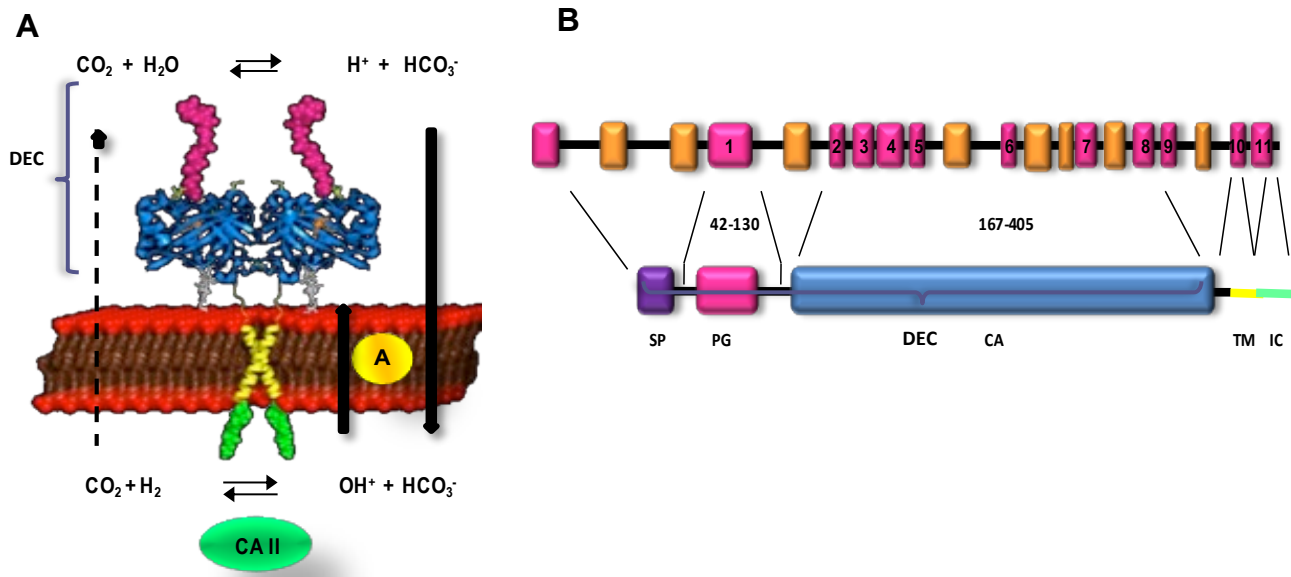
dominio tipo proteoglicano (PG) crucial para los procesos de adhesión en los cuales la proteína está involucrada y un dominio catalítico (CA); tiene, además, un dominio transmembranal (TM) asociado a un segmento intracitosólico (IC) (Pastorek, *et al.*, 1994; Opavsky, *et al.*, 1996) (Figura 7). Asimismo, se ha confirmado la presencia de un puente disulfuro intermolecular entre los residuos adyacentes Cys137 del homodímero maduro y con sitios de glicosilación en Asn309 y Thr78.

El dominio PG de la región extracelular tiene la capacidad de disminuir la interacción entre E-cadherina y  $\beta$ -catenina desestabilizando las uniones adherentes, el cual es un evento característico de las células tumorales, por lo que puede tener un papel importante en la progresión tumoral inducida por hipoxia (Beavon, *et al.*, 1999; Genda, *et al.*, 2000; Svastova, *et al.*, 2003).

El dominio CA de esta enzima produce iones bicarbonato a partir de la hidratación reversible de dióxido de carbono, los cuales, al ser transportados por intercambiadores de iones, neutralizan el pH del espacio intracelular requerido para la supervivencia de las células cancerosas (Potter, *et al.*, 2004). Al mismo tiempo, los protones, como subproducto de la reacción, permanecen en el exterior e incrementan la acidosis extracelular, la cual a su vez, se ha asociado con la transformación tumorigénica e invasividad de las células tumorales, ya que se ha visto que un pH extracelular bajo favorece la activación de proteasas de la superficie celular como la catepsina B y la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9 por sus siglas en inglés), así como la liberación de factores de crecimiento y la supresión de la respuesta inmune de las células T efectoras (Rohzim, *et al.*, 1994; Shi, *et al.*, 2001; Lardner, *et al.*, 2001). Este dominio catalítico, además de poseer actividad enzimática, puede jugar un papel importante en la regulación de las interacciones célula-célula, ya que se ha visto que su conformación es muy similar a la de un dominio extracelular del receptor tipo fosfatasa de tirosina (RPTP- $\beta$  por sus siglas en inglés) (Barnea, *et al.*, 1993; Beltrán, *et al.*, 2003), el cual actúa como ligando de la molécula de adhesión contactina y participa en la regulación de la adhesión célula-célula de agregados y moléculas similares (Peles, *et al.*, 1995; Potter, *et al.*, 2003).

El dominio extracelular DEC de CAIX, también conocido como proteína soluble s-CAIX o ectodominio, puede detectarse en suero y orina en niveles extremadamente bajos en individuos sanos o in vitro en medios de cultivo debido al rompimiento proteolítico que separa a la región extracelular del resto de la molécula (Opavsky, *et al.*, 1996). Zatovicova y cols. (2005) demostraron que la escisión es regulada por la actividad de las metaloproteasas de matriz (MMP) o de adamalinas (ADAMs). La liberación del ectodominio es un fenómeno biológico importante que afecta el destino, localización, niveles y funciones de ciertas citocinas, factores de crecimiento, receptores, moléculas de adhesión, etc. (Werb y Yan, *et al.*, 1998; Schlondorff y Blobel, *et al.*, 1999). En pacientes con CCR sólo se ha encontrado correlación entre los niveles de este dominio en suero con el tamaño del tumor, (Zhou, *et al.*, 2010), ya que no es posible detectarse en sangre pocos días después de la nefrectomía (Zavada, *et al.*, 2003).

El dominio intracitosólico IC de CAIX está involucrado en vías de señalización celular que caracterizan al CCRcc. Se ha reportado que CAIX se fosforila en el residuo de tirosina 449 del segmento intracitosólico y se asocia con la subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K por sus siglas en inglés) de manera dependiente de EGF en líneas celulares de CCR (SKRC-01, 08 y 17) (Dorai, *et al.*, 2005).



**Figura 7. Modelo de la estructura del dímero de CAIX en la membrana celular (A). Estructura del gen de CAIX y dominios de la proteína (B).** El gen de CAIX, localizado en el cromosoma 17, contiene 11 exones (color rosa), los cuales codifican para el péptido señal (SP), dominio proteoglicano (PG), dominio catalítico (CA) que en conjunto forman el dominio extracelular (DEC), así como el dominio transmembranaral (TM) y el segmento intracitosólico (IC). CAIX cataliza la hidratación de  $\text{CO}_2$  pericelular asegurando la producción elevada de iones bicarbonato los cuales están disponibles para la entrada directa a la célula por los transportadores. Esto permite la neutralización intracelular del pH requerida para la supervivencia de las células tumorales. Al mismo tiempo, la acidificación del pH extracelular por los protones producidos en la reacción de hidratación del  $\text{CO}_2$  que permanecen en el espacio pericelular, favorecen el crecimiento y la invasividad de las células tumorales. A=Intercambiadores de aniones y/o co-transportadores  $\text{Na}^+$ -bicarbonato, CA II: Anhidrasa carbónica II (Pastorek *et al.*, 1994; Opavsky, *et al.*, 1996).

La sobreexpresión de CAIX en la mayoría de los tipos de cáncer, se ha asociado con la agresividad del tumor y con un pronóstico clínico pobre, en cambio, en el CCRcc si existe o no una correlación entre su expresión y el pronóstico clínico aún es controversial. Algunos estudios sugieren que CAIX podría ser un biomarcador razonable de pronóstico ya que la expresión de esta proteína se ha detectado en el 70-96% de las muestras de CCRcc estudiadas y se ha demostrado que es una de las consecuencias directas de la mutación del gen VHL. De hecho, se ha utilizado una combinación de los niveles de expresión de CAIX y el status mutacional de VHL para dividir a los pacientes con CCRcc en tres grupos con pronóstico diferente: a) los pacientes que presentan mutaciones en VHL y una expresión alta de CAIX que tienen un pronóstico favorable (supervivencia de 2 años del 86%), b) aquéllos que presentan mutaciones en VHL o una expresión alta en CAIX se relacionan con un pronóstico clínico intermedio (supervivencia de 2 años del 69%), y c) los pacientes en los que existe ausencia de mutaciones en VHL y niveles bajos de CAIX que tienen un pronóstico clínico pobre (supervivencia de 2 años de 45%) (Patard, *et al.*, 2008).

### 1.3 ESTRÉS OXIDANTE Y CÁNCER

---

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) tienen diversas funciones esenciales en el organismo como la regulación de varias vías de señalización, inflamación, eliminación de patógenos y metabolismo de xenobióticos, etc. Existen varios mecanismos endógenos que generan EROs, ya sea por reacciones que forman parte de la cadena respiratoria o como subproductos del metabolismo y síntesis de ácidos grasos y reacciones biosintéticas incluyendo aquéllas del complejo NADPH oxidasa, del citocromo P-450, de la lipooxigenasa, de ciclooxigenasa, de xantina oxidasa, entre otras. En condiciones fisiológicas, los niveles de EROs se mantienen bajos y en equilibrio con moléculas reductoras, no obstante, cuando se altera este equilibrio, ya sea por elevación de la producción de EROs o por disminución de las defensas antioxidantes, esta condición es conocida como estrés oxidante. Un incremento moderado en las EROs cambia el potencial redox de la célula, y puede modificar la expresión génica promoviendo la proliferación y diferenciación, mientras que cantidades excesivas de estas moléculas ocasionan daño al ADN, lípidos y proteínas conduciendo muerte celular (Cairns, *et al.*, 2011).

El daño oxidante al ADN incluye el rompimiento de una o ambas cadenas, modificaciones a las bases y desoxirribosas y entrecruzamiento. Las modificaciones al ADN pueden conducir cambios en la información genética, los cuales incluyen mutaciones puntuales, deleciones, inserciones o translocaciones cromosomales que pueden causar la activación oncogénica y la inactivación de genes supresores de tumores conduciendo al proceso de carcinogénesis (Toyokuni, *et al.*, 2006). Así mismo, las EROs pueden reaccionar directamente con los lípidos, generando productos que, a su vez, reaccionan con las proteínas y el ADN. Por ejemplo, en los ácidos grasos poliinsaturados los dobles enlaces pueden ser oxidados por las EROs para producir radicales peróxilos e hidroperóxidos, proceso conocido como peroxidación lipídica (Rice-Evans, *et al.*, 1993). Una vez que la lipoperoxidación se inicia, se da una reacción en cadena mediada por radicales libres y dividida en iniciación, propagación y terminación (Gago-Dominguez, *et al.*, 2005). Los productos finales de la lipoperoxidación resultan en la formación de varios aldehídos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE).

Las EROs alteran directamente la función y estructura de las proteínas mediante la modificación de aminoácidos críticos, induciendo la dimerización de polipéptidos y/o interactuando con grupos prostéticos como los Fe-S u otros complejos metálicos. La modificación de estos aminoácidos dentro del dominio funcional de proteínas puede ocurrir de diferentes maneras. El mecanismo mejor descrito son las modificaciones que involucran los residuos de cisteína, cuyo grupo sulfhidrilo puede oxidarse a la forma sulfénica, sulfínica, sulfónica o derivados S-glutationilados. Estas alteraciones pueden modificar la habilidad de los factores de transcripción a enlazarse al ADN ó la actividad de una enzima sobretodo si el residuo de cisteína se encuentra localizado en el dominio catalítico. Así mismo, dos o más residuos de cisteína dentro de la misma proteína pueden oxidarse para formar puentes disulfuro intra o intermoleculares alterando la conformación de la proteína. Este daño a proteínas puede tener también otras consecuencias biológicas significativas, como la alteración en la homeostasis iónica y la concentración de calcio y potasio intercelular si el daño es en las proteínas transportadoras de membrana o

bien modificar la transducción de señales si se alteran proteínas receptoras ó de uniones comunicantes. En otros casos la alteración en la estructura de la proteína puede hacerlas susceptibles a la ubiquitinación y degradación.

La mayoría de los tipos celulares generan bajas cantidades de EROs cuando reciben estímulos de citocinas, factores de crecimiento u hormonas, como por ejemplo, de IL1, 3, 6, TNF, angiotensina II, PDGF, TGF-1GM-CSF y FGF-2, entre otros. Con esto se asume que la iniciación y/o el funcionamiento apropiado de varias vías de señalización, depende de la acción de las EROs a diferentes niveles en las cascadas de transducción de señales, por lo que las EROs pueden jugar un papel importante a nivel fisiológico como segundos mensajeros.

Las EROs promueven el desarrollo tumoral de diversas maneras: mediante la activación de factores de transcripción como AP-1 y NF- $\kappa$ B, fosfatasa de tirosina, cinasas de las familias Src, JNK y p38 MAPK y la actividad de la cinasa del receptor de insulina. Probablemente los efectos de los metales y EROs mejor estudiados sobre las vías de señalización se han observado en las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPK): el estado redox de los grupos tiol puede regular la fosforilación de EGFR, el cual inicia la activación de la cascada de señalización de Ras que a su vez activa la cascada de las MAPK. La activación de MAPK induce la activación de factores de transcripción, que controlan la expresión de genes protectores que reparan el daño al ADN, ponen en marcha la acción del sistema inmune, provocan la inhibición de la proliferación en células dañadas y la apoptosis inducida.

### **1.3.1 Estrés oxidante en el CCR**

Como en muchas neoplasias, el estrés oxidante está implicado en la patogénesis del CCR. Entre los estudios que han evaluado el estrés oxidante en pacientes con este cáncer, se ha observado un incremento significativo de EROs y NO en sangre respecto a los encontrados en sujetos normales o con tumores benignos. Así mismo, en tejido tumoral se han encontrado niveles aumentados de MDA como marcador de peroxidación lipídica comparado con los encontrados en tejido renal sano. Además, se ha observado una correlación entre los niveles de estrés oxidante tanto en tejido tumoral como a nivel sistémico con el grado y estadio tumoral y estos disminuyen después de la resección del tumor, en cambio, en pacientes con metástasis se ha encontrado que los niveles de estrés oxidante se encuentran aumentados de manera persistente (Ganesamoni, *et al.*, 2012). En otro estudio se reportó el incremento en los niveles de 3-nitrotirosina en el 77.6% de las muestras de tumores de CCR analizadas lo que se asoció con tumores renales de alto grado (Soini, *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha observado que los pacientes que han recibido diálisis renal durante periodos largos, tienen una incidencia anual promedio sustancialmente mayor de presentar CCR que la población en general, y el riesgo parece incrementarse con el aumento de los tratamientos de diálisis. (Brennan, *et al.*, 1991; Chadhoke, *et al.*, 1992). Estos pacientes muestran una sobreexpresión de iNOS, COX-2 y 8-OHdG lo cual indica que la presencia de estrés oxidante, y sugiere fuertemente que este juega un papel importante en la génesis del CCR inducido por diálisis (Hori, *et al.*, 2007).

#### 1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESIS RENAL

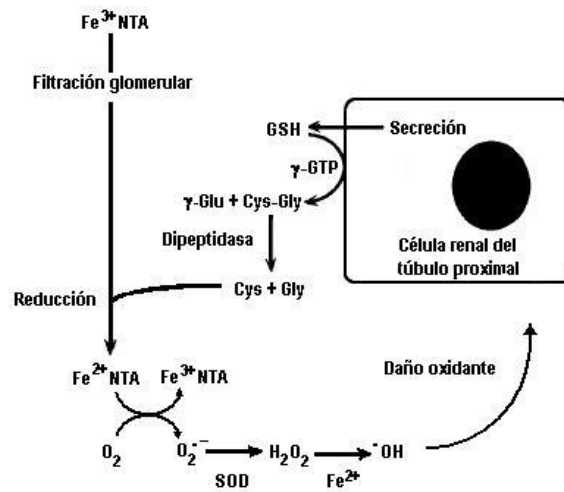
---

Los estudios en modelos animales pueden ser muy valiosos para lograr un entendimiento significativo de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de una enfermedad bajo condiciones controladas y para identificar factores responsables de resistencia a la terapia, ya que es difícil realizar este tipo de estudios en los pacientes. Así mismo, pueden ser utilizados para la identificación y validación de biomarcadores, lo cual es de gran trascendencia para lograr un diagnóstico oportuno y más exacto, así como para establecer un pronóstico más acertado. Sin embargo, es ideal que los modelos imiten el comportamiento clínico y biológico tanto como sea posible para poder extrapolar los hallazgos al paciente.

Uno de los modelos utilizados para el estudio de carcinogénesis renal, y en donde se ha encontrado la participación del estrés oxidante, es el modelo de carcinoma de túbulo proximal renal inducido por el compuesto nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). Este compuesto formado por complejación del ácido nitrilotriacético con  $Fe^{3+}$ , se utilizó originalmente en modelos experimentales de hemocromatosis (Awai *et al.*, 1979). Estos autores encontraron que este compuesto se transporta eficientemente a las células del parénquima de varios órganos como el riñón y el páncreas. Un año después Okada y Midorikawa (1982) descubrieron que el FeNTA también inducía cáncer renal, encontrando que varios animales morían de hemorragia peritoneal, de CCR o por metástasis pulmonar. En estudios posteriores se observó que este compuesto induce necrosis tubular proximal renal aguda y subaguda con la incidencia subsecuente del 60-92% de adenocarcinoma en ratas y ratones (Hamazaki, *et al.*, 1986). Otros estudios realizados con ratas macho y hembra han demostrado que las ratas macho son más susceptibles a la toxicidad subaguda y efectos carcinogénicos del FeNTA, lo que coincide con la mayor incidencia de CCR en hombres que en mujeres (Deguchi *et al.*, 1995). Por otro lado, en estudios en donde se administra una dosis única de N-dietilnitrosamina (DEN) como iniciador tumoral en el protocolo de inducción de cáncer renal por FeNTA, se ha visto que se requiere menor tiempo de tratamiento para inducir el cáncer y el número de animales con CCR aumenta (Athar *et al.*, 1998). Las nitrosaminas se han reconocido como moléculas inductoras de cáncer y son compuestos N-alquilados que requieren de activación enzimática para transformarse en compuestos carcinógenos que actúen sobre el ADN. Estas biotransformaciones generalmente involucran reacciones de oxidación mediadas por el citocromo P450. La activación de este tipo de compuestos da lugar a moléculas como el diazometano, el cual se considera como intermediario en la acción de estos compuestos sobre el ADN al transferir directamente un grupo metilo a esta molécula (Bansal *et al.*, 2005).

Aunque este modelo de carcinogénesis renal inducido por DEN+FeNTA es un modelo aceptado, no está bien caracterizado. La mayoría de las investigaciones realizadas se han enfocado en estudios a corto plazo, y en aquellas que involucran el tratamiento crónico no se han determinado las alteraciones a nivel molecular que ocurren durante el proceso de carcinogénesis, las etapas de desarrollo del cáncer no están definidas e, incluso, existen discrepancias entre los autores sobre el subtipo histológico de CCR que se induce.

Los mecanismos específicos de nefrotoxicidad y carcinogenicidad inducidos por FeNTA no están claros hasta el momento, sin embargo, se sabe que la generación de EROs mediante la reacción de Fenton-Haber Weiss también está involucrada. Se ha sugerido, que II FeNTA, como molécula de bajo peso molecular, se filtra fácilmente a través del glomérulo hacia el lumen de los túbulos proximales renales (Toyokuni, *et al.*, 1996). En este compartimento el  $\text{Fe}^{3+}\text{NTA}$  se reduce a  $\text{Fe}^{2+}\text{NTA}$  por los productos de degradación del glutatión como la cisteína o la cisteinglicina. En la superficie del túbulo proximal, la enzima  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa hidroliza al glutatión a cisteinilglicina, la cual es degradada rápidamente a cisteína y glicina mediante una dipeptidasa. Se ha propuesto que los grupos tiol de estos aminoácidos actúan como reductores del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . La oxidación del FeNTA genera radicales superóxido que potencian las reacciones de Haber-Weiss catalizadas por hierro para producir radicales hidroxilo, conduciendo a la peroxidación lipídica, daño a proteínas y al ADN (Tsuchiya, *et al.*, 2005) (Figura 8).



**Figura 8. Mecanismo propuesto de toxicidad renal inducida por FeNTA (Modificado de Toyokuni, *et al.*, 1996)**  
 GSH: Glutatión, SOD: Superóxido dismutasa,  $\gamma$ -GTP:  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa

Entre los efectos oxidativos que se han demostrado en riñón se incluyen alteraciones de bases del ADN como la 8-hidroxidesoxiguanosina, entrecruzamientos timina-tirosina, generación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, aldehídos mutagénicos saturados e insaturados como el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y malondialdehído (MDA) y proteínas modificadas por HNE o MDA (Aruoma, 1989; Toyokuni, 1994). Por otra parte, también se ha demostrado que el FeNTA disminuye la actividad de la NADPH quinona oxidoreductasa renal y hepática lo cual produce un incremento en el contenido de proteínas carboniladas (Iqbal, *et al.*, 1997) e induce la producción de un metabolito clastogénico del ácido araquidónico, la prostaglandina  $\text{F}2\alpha$  en el riñón, el cual, a su vez, ayuda mantener la hiperplasia del tejido (Iqbal, *et al.*, 1997).

Uno de los productos de la peroxidación lipídica, considerado como el más citotóxico (Iqbal, *et al.*, 1999), es el hidroxinonenal (HNE). Este metabolito muestra varios efectos genotóxicos y mutagénicos debido a su fácil



reactividad con moléculas biológicas, incluyendo proteínas, las cuales se han observado principalmente en los túbulos proximales renales de ratas tratadas con FeNTA (Uchida, *et al.*, 1993). Así mismo, se ha demostrado que la peroxidación lipídica induce la formación de 8-hidroxiguanosina (8-OhG) (Park, *et al.*, 1992), e interesadamente, se ha reportado que el FeNTA incrementa la formación de 8-OhG sólo en el riñón, lo que abre la posibilidad de que la formación de HNE pueda proveer una relación entre la peroxidación lipídica y el daño oxidante al DNA (Toyokuni, *et al.*, 1994).

En cuanto a los análisis moleculares en este modelo, Nishiyama y cols. (1995) encontraron una baja incidencia de mutaciones en los oncogenes H-, K- y N ras y en el gen supresor de tumores p53; lo cual sugiere que no son los principales participantes en la carcinogénesis inducida por FeNTA. Posteriormente Toyokuni y cols. (1998) reportaron que tampoco existían mutaciones en el gen de VHL (comúnmente mutado en el CCR humano) en ninguna de las muestras de tumores que analizaron, y que los tumores con histología de células claras fueron poco frecuentes, y que cuando se presentaban, se encontraban con otras variantes histológicas, y que el 17.6% de los tumores estudiados se encontraba mezclado con un subtipo de morfología granular. Por otro lado, se ha demostrado que el estrés oxidante crónico puede inducir la sobreexpresión del receptor de fosfatasa de residuos de tirosina  $\beta$  (ptprz1), la cual induce la expresión de ciclina D1 y c-myc a nivel de ARNm y proteína a través de la vía de  $\beta$ -catenina.

## 1.5 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

---

La participación del estrés oxidante en el cáncer ha conducido al uso de compuestos antioxidantes para su prevención o como alternativa de tratamiento. Entre los compuestos que presentan estas propiedades, existe evidencia que ha demostrado una relación inversa entre el consumo de alimentos derivados de plantas ricos en fitoquímicos y la incidencia de cáncer (Miller *et al.*, 2014). Los fitoquímicos son compuestos naturales sintetizados como metabolitos secundarios en las plantas, representando una fuente importante de moléculas con un amplio rango de implicaciones terapéuticas. Estos compuestos son reguladores importantes de procesos patológicos clave incluyendo el cáncer, debido a que son capaces de modular la inactivación o activación funcional de oncogenes y genes supresores de tumores. Otros eventos celulares y moleculares regulados por estos fitoquímicos quimiopreventivos también incluyen apoptosis, ciclo celular, proliferación celular, reparación del ADN, diferenciación, destoxificación por enzimas xenobióticas metabólicas, angiogénesis y metástasis (Chikara *et al.*, 2018). Aunado a esto, en particular, la mitigación de la tumorigénesis mediada por estrés oxidante es uno de los mecanismos por los cuales estos compuestos ejercen su efecto potencial contra el cáncer.

Entre los fitoquímicos que han tenido una mayor atención considerando que tienen un gran efecto antioxidante se encuentran los polifenoles, estas moléculas pueden actuar como antioxidantes ya sea por atrapamiento directo de las especies reactivas de oxígeno o por quelación de metales de transición; o indirectamente sobrerregulando la actividad de las enzimas antioxidantes. Los compuestos polifenólicos se han considerado como las responsables de la actividad antiinflamatoria y quimiopreventiva de fuentes naturales

incluyendo la eliminación de agentes carcinogénicos, la modulación de las vías responsables en la señalización de células cancerosas, en la progresión del ciclo celular y en la promoción de la apoptosis (Grosso *et al.*, 2018).

## 1.6 GENERALIDADES SOBRE LA ESPECIE *Tamarindus indica*

---

El tamarindo (*Tamarindus indica* L) es una planta que pertenece a la familia *Leguminosae caesalpinaceae* y se considera especie nativa de África, pero se ha naturalizado al norte y sur de América desde Florida hasta Brasil. Es un recurso importante en varias partes del mundo por sus usos culinarios, como planta ornamental o como árbol de sombra. En la medicina tradicional de India, África, Pakistán, Bangladesh, Nigeria y en la mayoría de los países tropicales, diferentes partes del tamarindo se han utilizado para aliviar el dolor abdominal, diarrea, disentería, malaria, fiebre, enfermedades oculares, inflamación, u otros usos como digestivo, carminativo, laxante, expectorante, etc. (Bhadoriya, *et al.*, 2011). En estudios biológicos, los extractos elaborados a partir de la semilla de tamarindo han mostrado una mayor actividad antioxidante que aquéllos preparados a partir del pericarpio comparados con el ácido ascórbico en diferentes sistemas (Tsuda, *et al.*, 1993; Siddhuraju, *et al.*, 2007; Havinga, *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que extractos acuosos de la semilla de tamarindo presentan potentes propiedades antidiabéticas y antiinflamatorias (Maiti, *et al.*, 2004 y 2005), y disminuyen significativamente los niveles de colesterol total y triacilgliceroles, y la producción de óxido nítrico inducida por lipopolisacárido (LPS) e IFN- $\gamma$  tanto *in vitro* como *in vivo* (Komutarin, *et al.*, 2004).

Así mismo, se ha visto que la semilla de tamarindo es capaz de neutralizar los efectos causados por el veneno de la serpiente (*V. russelli*) como la degradación de la cadena Bb de fibrinógeno humano y la hemólisis indirecta, y se considera como fuente potencial de inhibidores de la fosfolipasa A2 (PLA2), metaloproteinasas, serin proteasas, hialuronidasas y 5'-nucleotidasas, enzimas presentes en el veneno de serpiente y que son responsables de ocasionar daño tisular local, inflamación e hipotensión (Ushanandini, S., *et al.*, 2006).

Las propiedades antioxidantes del pericarpio y semillas de tamarindo reportadas en la literatura se han atribuido al alto contenido de compuestos polifenólicos (Sudjaroen, *et al.*, 2005). Tsuda y cols. reportaron en 1994 que la cáscara de semilla contiene antioxidantes polifenólicos como 2-hidroxi-3',4'-dihidroxiacetofenona, metil 3,4-dihidroxibenzoato, 3,4-dihidroxifenilacetato y epicatequina. Posteriormente, en otros estudios se reveló la presencia de otros compuestos principalmente en la semilla entre los que destacan la procianidina B2, epicatequina, taninos y procianidinas oligoméricas. Así mismo, se demostró que las semillas tienen un mayor contenido de polifenoles respecto al pericarpio (Pumthong, *et al.*, 1999; Sudjaroen, *et al.*, 2005) (Figura 9).

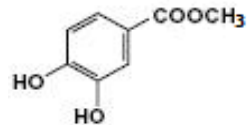
Por otra parte, algunos de los compuestos polifenólicos mencionados han demostrado tener propiedades anticancerígenas. Por ejemplo, la procianidina B2 inhibe la oxidación del ADN en presencia de Fe<sup>2+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sakano, *et al.*, 2005), promueve la apoptosis en células de carcinoma de mama y próstata (Agarwal, *et al.*, 2007) y activa la producción de caspasa-3 en células de melanoma (Sakano, *et al.*, 2005). También se ha encontrado

que esta procianidina puede regular negativamente a algunas cinasas como ERK, JNK y p38MAPK, evitando la activación de oncogenes relacionados; además, puede estabilizar a IκB, regulador de la actividad del factor de transcripción NF-κB vinculado con carcinogénesis (Zhang, *et al.*, 2006). Otro de los principales polifenoles contenidos en la semilla del tamarindo es la catequina, y se ha demostrado que disminuye los niveles intracelulares de OH· y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y promueve la estabilización de IκB (Agarwal, *et al.*, 2006); también se sabe que puede inducir la activación de p53 permitiendo que se lleve a acabo la apoptosis en células malignas de cerebro N9 (Huang, *et al.*, 2004; Mackenzie, *et al.*, 2005).

En estudios agudos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio con un extracto etanólico de semilla de tamarindo (EST) se demostró que posee un alto contenido de compuestos polifenólicos y una notable inactivación del radical superóxido, además de que presenta una buena estabilidad a largo plazo. Asimismo, en estudios agudos *in vivo* se encontró que el extracto administrado durante 15 días a las dosis de 100 mg de fenoles totales/kg/día no tiene efectos pro-oxidantes o antinutricionales, y disminuye el aumento en los niveles de peróxido de hidrógeno en riñón inducido una hora después de la administración de FeNTA, tiempo en el que se ha encontrado mayor estrés oxidante (Vargas-Olvera, 2009).

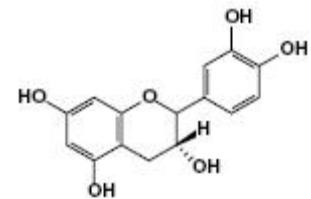


2-hidroxi-3'4' –  
dihidroxiacetofenona  
(Tsuda *et al.*, 1994)

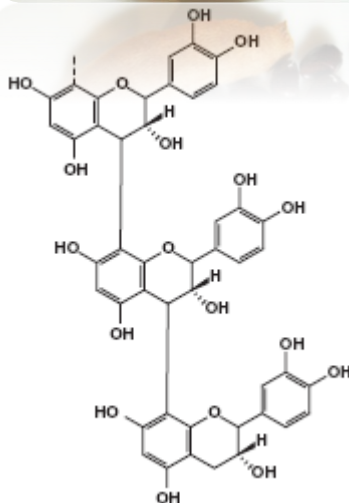


metil 3'4'-dihidroxibenzoato  
(Tsuda *et al.*, 1994)

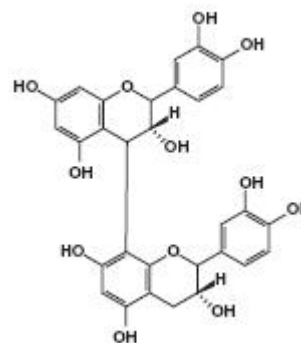
3'4' –dihidroxifenilacetato  
(Tsuda *et al.*, 1994)



(-) Epicatequina  
(Sudjaroen *et al.*, 2005;  
Tsuda *et al.*, 1994)



Polímero de procianidinas  
(Sudjaroen *et al.*, 2005)



Procianidina B2  
(Sudjaroen *et al.*, 2005)

Figura 9. Compuestos presentes en la semilla de *Tamarindus indica* L.

## II. JUSTIFICACIÓN

El CCR presenta varias complicaciones como gran dificultad de diagnóstico en etapas tempranas, heterogeneidad de subtipos histológicos, ausencia de marcadores específicos, así como una terapia ineficiente hasta el momento y, como consecuencia, este cáncer cursa con una alta mortalidad.

En este contexto, el contar con un modelo experimental de carcinogénesis renal puede ser muy valioso, ya que, por ejemplo, podría conducir a la elucidación de mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de esta neoplasia y permitiría encontrar marcadores exclusivos, los cuales podrían asociarse con el subtipo histológico y monitorearse en diferentes etapas de desarrollo del CCR. Lo anterior, ayudaría a aumentar la posibilidad de un diagnóstico oportuno, a identificar nuevos blancos terapéuticos que lleven a un tratamiento más eficaz, a lograr una predicción de la supervivencia más exacta, e idealmente, aumentar la calidad de vida del paciente con CCR. Por lo anterior, es importante caracterizar las alteraciones histológicas y moleculares que ocurren en el modelo experimental y evaluar si existe similitud con aquéllas que se han reportado en el CCR humano, lo que llevaría a determinar la pertinencia del modelo como una herramienta para el estudio de esta neoplasia.

Uno de los modelos experimentales de carcinogénesis renal es el modelo de carcinoma de túbulo proximal renal inducido por FeNTA. Una administración intraperitoneal de este compuesto produce necrosis tubular aguda, pero exposiciones repetidas llevan al desarrollo de cáncer renal. Se ha demostrado que en la carcinogenicidad del FeNTA está involucrada la generación de EROs, lo cual también ocurre con los principales factores de riesgo del CCR (tabaquismo, obesidad e hipertensión); sin embargo, el modelo no está bien caracterizado considerando por ejemplo, que no se han establecido los mecanismos moleculares que participan en la carcinogénesis, no está claro el subtipo histológico de CCR que se desarrolla y no se ha estudiado el comportamiento del estrés oxidante provocado por el FeNTA durante la carcinogénesis. Más aún, el hecho de que el estrés oxidante esté implicado en el desarrollo de cáncer renal por exposición a FeNTA, al igual que en muchos tipos de neoplasias en el humano, hace que el modelo adquiera mayor relevancia para elucidar mecanismos celulares que relacionan el estrés oxidante con la carcinogénesis en general.

Por otro lado, la demostración de la participación del estrés oxidante en el cáncer ha conducido al uso de compuestos antioxidantes para su prevención o como alternativa de tratamiento. Los compuestos polifenólicos han mostrado tener gran capacidad antioxidante y propiedades anticancerígenas. Entre las plantas que presentan un alto contenido de compuestos polifenólicos se encuentra la especie *Tamarindus indica* L., conocida popularmente como tamarindo. Aunque esta planta se utiliza en la medicina tradicional, los estudios científicos sobre sus aplicaciones terapéuticas son escasos y no se han investigado sus posibles propiedades preventivas del desarrollo de cáncer. En nuestro laboratorio hemos preparado un extracto en polvo de semillas tamarindo (EST) con un alto contenido de fenoles y gran capacidad antioxidante. Así mismo, consideramos que las semillas, en vez de eliminarse como producto de desecho, podrían constituir un recurso importante de agentes antioxidantes con potencial quimiopreventivo y de muy bajo costo.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **Hipótesis**

- El CCR inducido en el modelo de carcinogénesis renal por DEN+FeNTA presentará características histológicas y moleculares similares a las encontradas en el CCR humano, y las alteraciones moleculares se observarán desde etapas tempranas.
- Un extracto de semillas de tamarindo ofrecerá protección contra las alteraciones observadas.

#### **Objetivos**

- Preparar un extracto de semillas de tamarindo (EST) y confirmar su capacidad antioxidante.
- Determinar si el EST protege contra la nefrotoxicidad aguda inducida por FeNTA.
- Establecer el subtipo histológico de CCR de los tumores inducidos en el modelo de carcinogénesis renal por exposición a FeNTA.
- Identificar el tiempo de exposición del carcinógeno para poder estudiar etapas tempranas de la carcinogénesis renal.
- Evaluar el comportamiento del estrés oxidante y de la función renal en diferentes etapas del desarrollo del CCR en este modelo.
- Dependiendo del subtipo histológico de CCR identificado, analizar si el comportamiento de moléculas que se han visto alteradas en tumores humanos es similar en los tumores experimentales.
- Dar seguimiento a las alteraciones de las moléculas anteriores en diferentes etapas de la carcinogénesis.
- Investigar si el EST puede prevenir o disminuir el desarrollo del cáncer renal y si tiene efecto sobre las alteraciones moleculares que se encuentren durante el desarrollo del CCR.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

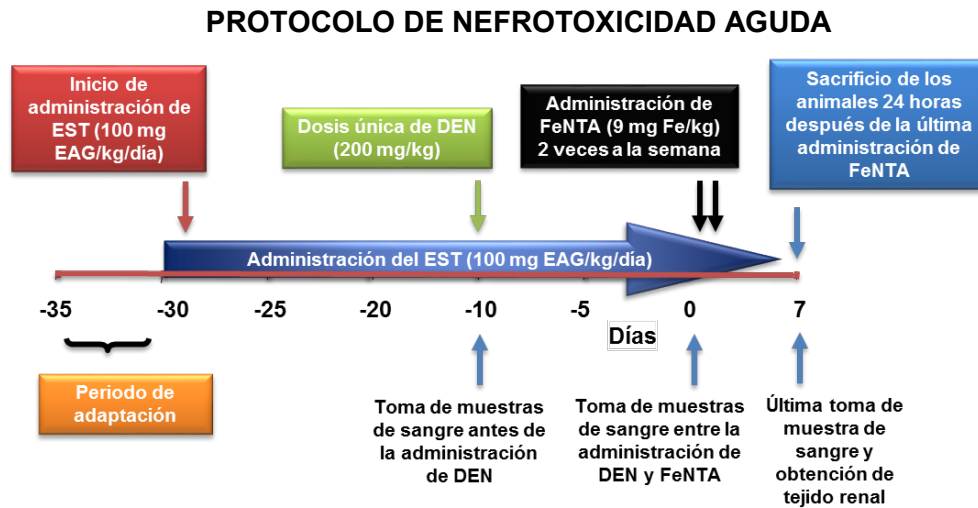
#### 4.1.1 Protocolo de nefrotoxicidad aguda

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (106-112 g) alimentadas con dieta estándar y agua *ad libitum*. Los grupos experimentales se describen en la Tabla 2. El EST se disolvió en el agua de beber en la cantidad necesaria para administrar una dosis de 100 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/kg/día desde 16 días previos a la administración de DEN y durante todo el estudio. La dosis del EST utilizada se estableció con base en resultados previos en nuestro laboratorio (Vargas-Olvera, 2009). La DEN se utilizó como iniciador tumoral, ya que se ha visto que con el uso de este compuesto se requiere menor tiempo de tratamiento para inducir el cáncer y aumenta el número de animales con CCR que con la administración únicamente del promotor tumoral FeNTA (Athar, *et al.*, 1998; Jahangir, *et al.*, 2006). Catorce días después del tratamiento con DEN (200 mg/kg i.p.), se administraron 2 dosis de 9 mg Fe/Kg de FeNTA con 72 horas de diferencia entre ellas vía intraperitoneal. Las ratas se sometieron a eutanasia 24 horas después de la segunda administración de FeNTA y se obtuvieron las muestras de corteza renal y suero para la evaluación histológica y determinación marcadores de estrés oxidante y de función renal (Figura 10). El procesamiento de las muestras se describe en el apartado de cada técnica.

**Tabla 2. Grupos de estudio y esquema de tratamiento del protocolo de nefrotoxicidad aguda**

Grupo	No. de animales	Esquema de tratamiento
Control	10	Vehículos
EST	10	Dosis diarias de EST (100 mg de EAG/kg/día) en el agua de beber durante todo el estudio
DEN	10	Dosis única de DEN i.p. (200 mg/kg) 14 días antes de la primera administración del FeNTA
DEN+FeNTA	24	Dosis única de DEN i.p. (200 mg/kg) 14 días antes de la primera administración del FeNTA Dos dosis de FeNTA i.p. (9 mg Fe/kg) con 72 horas de diferencia entre estas
EST+DEN+FeNTA	24	EST (100 mg de EAG/kg/día) 16 días antes de la administración de DEN y durante todo el estudio Dosis única de DEN i.p. (200 mg/kg) 14 días antes de la primera administración del FeNTA Dos dosis de FeNTA i.p. (9 mg Fe/kg) con 72 horas de diferencia entre estas

DEN: N-dietilnitrosamina, EST: extracto de semillas de tamarindo, FeNTA: nitrilotriacetato de hierro, EAG: equivalentes de ácido gálico (Ver sección 4.2.2), i.p. intraperitoneal.



**Figura 10. Esquema de tratamiento del protocolo de nefrotoxicidad aguda.** EST: extracto de semillas de tamarindo, EAG: equivalentes de ácido gálico, DEN: N-dietilnitrosamina, FeNTA: nitrilotriacetato de hierro. El día de la primera administración de FeNTA se consideró como el día cero.

#### 4.1.2 Protocolo de carcinogénesis renal

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (70-80g) alimentadas con dieta estándar y agua ad libitum, y los grupos experimentales se describen en la Tabla 3. El esquema de desarrollo de cáncer renal en ratas comprendió los mismos esquemas de tratamiento descritos en el protocolo de nefrotoxicidad aguda a excepción del tratamiento con FeNTA, el cual se administró durante 4 meses dos veces a la semana con aumentos graduales en la dosis cada semana (desde 3 mg Fe/kg hasta 9 mg Fe/kg) y las ratas recibieron la eutanasia por decapitación 8 semanas después de haber terminado el esquema de tratamiento con FeNTA, es decir 6 meses después de la primera administración del FeNTA (Figura 11). Con la finalidad de identificar etapas tempranas del proceso carcinogénico, algunos animales se sometieron a eutanasia después de 1 y 2 meses de tratamiento con el carcinógeno, y al final de cada tiempo de estudio se obtuvieron muestras de tejido renal, sangre y orina para realizar los análisis histológicos y determinar alteraciones moleculares, marcadores de estrés oxidante y función renal.

#### 4.1.3 Análisis histológicos

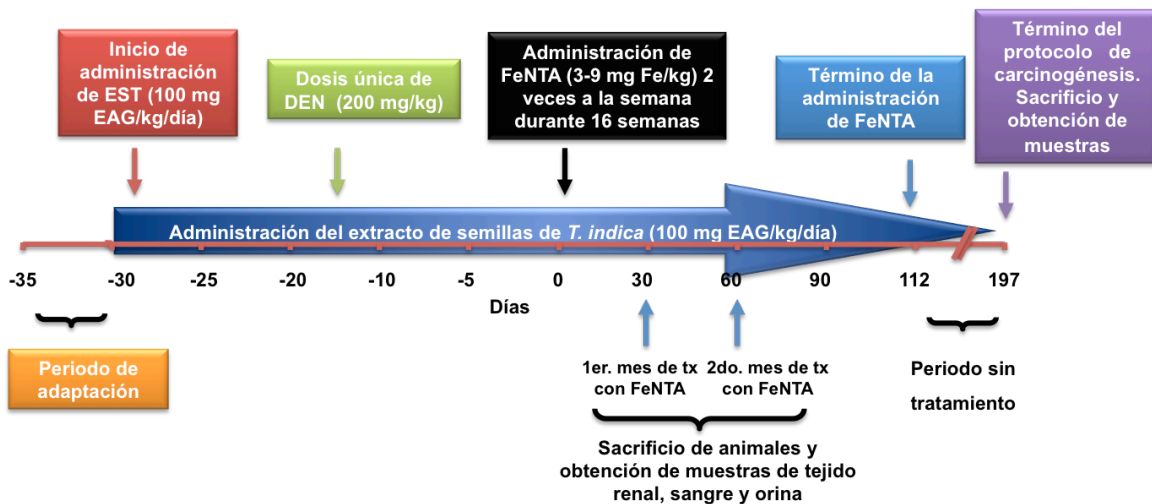
Los análisis histológicos se realizaron al final del protocolo de nefrotoxicidad aguda y en todos los tiempos de estudio del protocolo de carcinogénesis renal. En las muestras obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal se determinó el subtipo histológico en los tumores de CCR con base en la apariencia macroscópica así como en la morfología presentada en las células tumorales teñidas con hematoxilina-eosina (OMS, 2004; Mancini *et al.*, 2008). El grado de avance de los tumores se evaluó utilizando el sistema de grado nuclear Fuhrman descrito en la figura 12 (Thomas *et al.*, 2008; Fuhrman, *et al.*, 1982; Skinner, *et al.*, 1971), así como el tamaño del tumor, el cual se evaluó utilizando una escala del 1 al 5, en la que los números 1,2,3,4,5 representan tumores con un diámetro máximo de 0.5-2mm, 2.5-3mm, 4-5mm, 6mm y 15-45 mm respectivamente.

**Tabla 3. Grupos de estudio y esquema de tratamiento del protocolo de carcinogénesis renal**

Grupo	No. de animales	Esquema de tratamiento
Control	6	Vehículos
EST	5	Dosis diarias de EST (100 mg de EAG/kg/día) en el agua de beber durante todo el estudio
DEN	5	Dosis única de DEN i.p. (200 mg/kg) 14 días antes de la primera administración del FeNTA
FeNTA	8	FeNTA i.p. 2 veces por semana durante 16 semanas con aumento gradual en la dosis*
DEN+FeNTA	24	Dosis única de DEN i.p. (200 mg/kg) 14 días antes de la primera administración del FeNTA FeNTA i.p. 2 veces a la semana durante 16 semanas con aumento gradual en la dosis*
EST+DEN+FeNTA	24	EST (100 mg de EAG/kg/día) en el agua de beber 16 días antes de la administración de DEN y durante todo el estudio Dosis única de DEN i.p. (200 mg/kg) 14 días antes de la primera administración del FeNTA FeNTA i.p. 2 veces a la semana durante 16 semanas con aumento gradual en la dosis*

\*Primera semana: 3 mg Fe/Kg, segunda semana: 5 mg Fe/Kg, tercera semana: 7 mg Fe/Kg, cuarta semana y hasta las 16 semanas: 9 mg Fe/Kg. DEN: N-dietilnitrosamina, EST: extracto de semillas de tamarindo, FeNTA: nitrilotriacetato de hierro, EAG: equivalentes de ácido gálico (Ver sección 4.2.2) i.p. intraperitoneal.

### PROTOCOLO DE CARCINOGENESIS RENAL



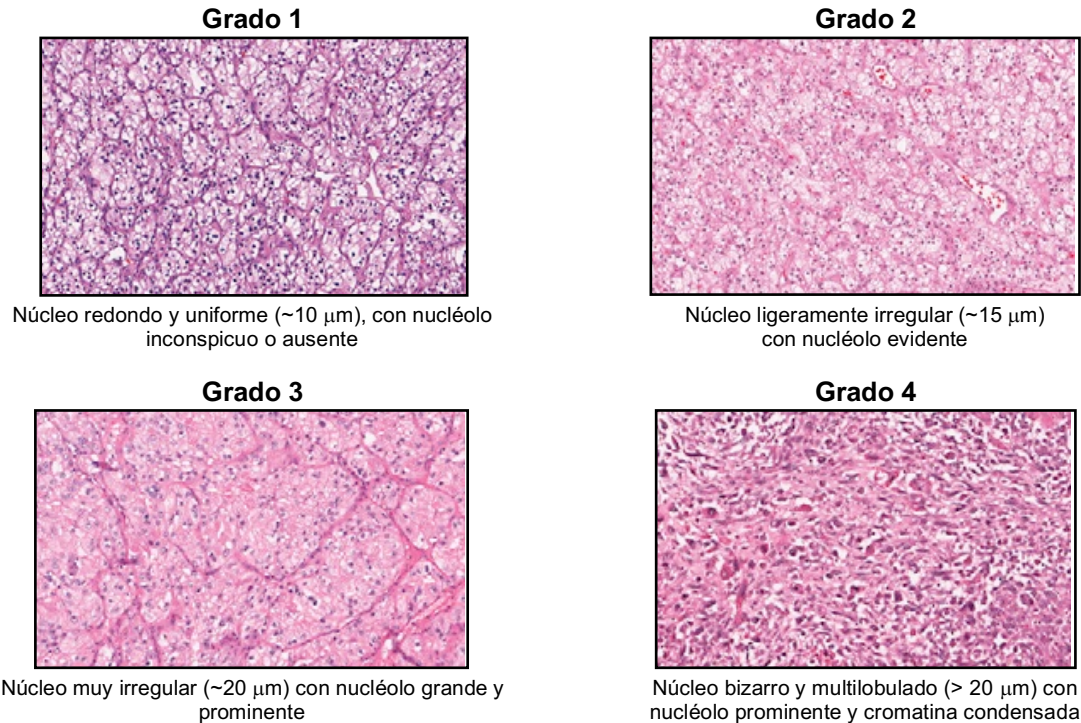
**Figura 11. Esquema de tratamiento del protocolo de carcinogénesis renal.** EST: extracto de semillas de tamarindo, EAG: equivalentes de ácido gálico, DEN: N-dietilnitrosamina, FeNTA: nitrilotriacetato de hierro. El día de la primera administración de FeNTA se consideró como el día cero.

#### 4.1.4 Determinación de marcadores de función renal

Una de las consecuencias más comunes de la deficiencia en la función renal es la excreción incorrecta de diversos metabolitos entre los que encuentran la creatinina y la urea. La excreción inadecuada de urea provoca el aumento de la cantidad de nitrógeno en sangre (nitrógeno ureico sanguíneo o BUN por sus siglas en inglés), y



la creatinina es un producto final del metabolismo de la creatina. Por lo anterior, tanto el BUN como la creatinina se determinaron bajo los procedimientos descritos en la sección de técnicas (4.2.5).



**Figura 12. Clasificación Fuhrman basada en la morfología del núcleo así como contenido y prominencia de nucleólos.** Fotomicrografías de CCRcc humano teñidas con hematoxilina-eosina (10X) tomadas de Thomas, *et al.*, 2008.

#### 4.1.5 Evaluación de marcadores de estrés oxidante

Las determinaciones que se consideraron para evaluar el estrés oxidante en tejido renal en el protocolo de nefrotoxicidad aguda fueron la cuantificación de peróxido de hidrógeno, de peroxidación lipídica y de proteínas oxidadas. La cuantificación de peróxido de hidrógeno se llevó a cabo mediante el método de naranja de xilenol-hierro<sup>3+</sup> (FOX) (Long, *et al.*, 1999), el daño a proteínas se determinó mediante la cuantificación de grupos carbonilo (Barrera, *et al.*, 2003) y el daño a lípidos mediante la determinación de malondialdehído (Gerard-Monnier, *et al.*, 1998) (sección 4.2.7). Para evaluar el comportamiento del estrés oxidante en tejido renal, durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis, se midieron marcadores de peroxidación lipídica y de proteínas oxidadas (4-hidroxinonal (4-HNE) y nitrotirosina (3-NT)), respectivamente, mediante inmunohistoquímica (IHQ) por tratarse de una técnica más sensible.

#### 4.1.6 Evaluación de alteraciones asociadas al CCRcc humano

Para evaluar la similitud que pudiera existir entre las alteraciones moleculares en tumores de CCR inducidos por FeNTA con las reportadas en tumores de pacientes, y aportar así evidencias que establezcan sus alcances como herramienta de estudio para este tipo de cáncer, se propuso evaluar principalmente aquellas alteraciones relacionadas con el subtipo histológico de células claras como pVHL, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , CAIX en muestras obtenidas después de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA así como en los tumores obtenidos.

Las técnicas de detección a utilizar se eligieron de acuerdo a las propiedades de cada proteína (v.g. IHQ, Western blot y ELISA).

## 4.2 TÉCNICAS

### 4.2.1 Preparación del EST

Veinticinco gramos de la cubierta café-rojiza de semillas de tamarindo se maceraron durante 24 horas en 500 mL de etanol anhidro a temperatura ambiente. El extracto resultante se separó de las semillas por decantación y se concentró al vacío hasta la evaporación completa del etanol obteniéndose aproximadamente 8 g de un residuo seco de color café claro. El polvo obtenido con este procedimiento se denominó extracto de semillas de tamarindo (EST) (Vargas-Olvera, 2009).

### 4.2.2 Análisis del EST

#### ➤ Cuantificación de fenoles totales (FT)

Fundamento

En la técnica de Folin Ciocalteu, los compuestos polifenólicos se oxidan por el reactivo de Folin, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, los cuales se reducen por acción de los fenoles, formando una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno que pueden detectarse espectrofotométricamente a 765 nm (Soares, 2006).

#### Preparación de las muestras

Para la determinación de fenoles totales se prepararon dos soluciones “stock” con concentraciones diferentes del EST:

- Solución stock 1 de EST.  
0.015 g de polvo de extracto se disuelven en 5 mL de agua y realizaron las diluciones de la tabla 4.

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

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

- Solución “stock” 2 de EST.  
0.08 g de polvo de extracto se disuelven en 5 mL de agua y se realizaron las diluciones de la tabla 5.

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

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

## Procedimiento

A 50  $\mu\text{L}$  del estándar de ácido gálico (10 mg/mL) y cada una de las diluciones del extracto preparadas de acuerdo a las tablas 4 o 5 se les agregaron 400  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio 1M y 500  $\mu\text{L}$  de Folin 0.2 N. Se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro a 765 nm 15 minutos después de adicionar el Folin. La concentración de fenoles totales del extracto se calculó interpolando la absorbancia obtenida de cada dilución en la curva patrón de ácido gálico que se describe en la tabla 7, y los resultados se expresaron en microgramos de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL de extracto.

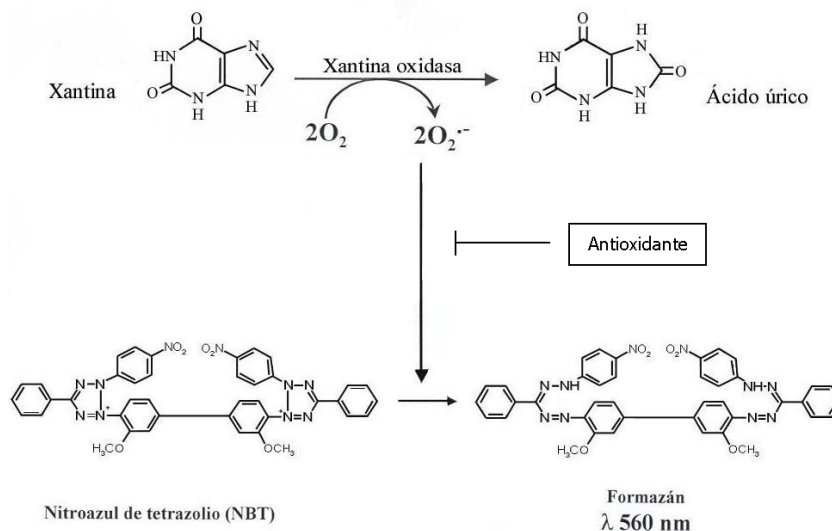
**Tabla 6. Curva patrón de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.**

[Ácido gálico] $\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{L}$ de estándar	mL $\text{H}_2\text{O}$ destilada
50	5	995
100	10	990
150	15	985
200	20	980
250	25	975

### ➤ Inactivación del radical superóxido

#### Fundamento

La inactivación del radical superóxido se midió indirectamente con base en la capacidad del antioxidante para evitar la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los radicales superóxido generados *in vitro* en el sistema xantina-xantina oxidasa (Figura 13). La reducción del NBT por efecto del radical superóxido se determinó midiendo la producción de formazán que se detecta espectrofotométricamente a 560 nm (Parejo *et al.*, 2002). Los resultados se expresarán como porcentaje de la capacidad de inactivación del radical superóxido en función de los  $\mu\text{g}$  EAG/mL de extracto.



**Figura 13. Fundamento para la determinación del radical superóxido y evaluación de la capacidad antioxidante del EST.**

### Preparación de las muestras

Las diluciones del extracto polifenólico se realizaron en agua como se indica en la tabla 7 a partir de las soluciones “stock” descritas en la sección 4.2.2. La preparación de estas dos soluciones “stock” permitió cubrir un rango amplio para expresar el porcentaje de inactivación del radical superóxido en función de concentración de fenoles totales presentes en los extractos.

**Tabla 7. Diluciones realizadas a cada una de las soluciones stock del extracto polifenólico para la determinación de inactivación del radical superóxido.**

Diluciones	Agua ( $\mu\text{L}$ )	Extracto polifenólico ( $\mu\text{L}$ )
1:50 <sup>a</sup>	1960	40
1:75 <sup>b</sup>	1480	20
1:100 <sup>c</sup>	1000	1000 de 1:50 <sup>a</sup>
1:150 <sup>d</sup>	1000	1000 de 1:75 <sup>b</sup>
1:200 <sup>e</sup>	1000	1000 de 1:100 <sup>c</sup>
1:250 <sup>f</sup>	1494	6
1:300 <sup>g</sup>	1000	1000 de 1:150 <sup>d</sup>
1:400	1000	1000 de 1:200 <sup>e</sup>
1:500	500	500 de 1:250 <sup>f</sup>
1:600	500	500 de 1:300 <sup>g</sup>

### Procedimiento

Por cada determinación se agregaron 815  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción (ver apéndice, sección B) y se añadieron los reactivos como se indica en la tabla 8 preparando un C-100%, el cual corresponde a la cantidad total de radical superóxido generado por el sistema xantina-xantina oxidasa, un blanco de cada muestra problema y la muestra problema por cada dilución de extracto polifenólico. Los tubos se incubaron 15 min en un baño a 27°C, y la reacción se detuvo adicionando 330  $\mu\text{L}$  de cloruro de cobre. El tiempo de incubación se contabilizó desde que se agregaron los reactivos de manera simultánea en el primer tubo. La cuantificación se realizó espectrofotométricamente a 560 nm y los resultados se expresaron como porcentaje de inactivación del radical superóxido en función de la cantidad de fenoles totales presentes en los 165  $\mu\text{L}$  de muestra para cada una de las diluciones utilizadas.

**Tabla 8. Preparación de C-100%, el blanco y la muestra problema para cada dilución de extracto polifenólico presentada en la tabla 8 para la determinación de la capacidad de inactivación del radical superóxido.**

C-100%*	Blanco problema	Problema
165 $\mu\text{L}$ amortiguador de fosfatos	165 $\mu\text{L}$ dilución extracto polifenólico	165 $\mu\text{L}$ dilución extracto polifenólico
20 $\mu\text{L}$ xantina oxidasa	20 $\mu\text{L}$ amortiguador de fosfatos	20 $\mu\text{L}$ xantina oxidasa

\*C 100%: Cantidad total del radical superóxido generada por el sistema xantina-xantina oxidasa.

## 4.2.3 Estudios de histología e inmunohistoquímica

### Fundamento

En los estudios de histología, la tinción con hematoxilina-eosina (H&E) permite diferenciar los componentes ácidos y básicos de la célula generando un contraste de las estructuras celulares facilitando de esta

forma su observación. La hematoxilina, por su carácter básico, tiñe estructuras ácidas en azul y púrpura, como los ácidos nucleicos presentes en el núcleo, y la eosina, por su naturaleza ácida, tiñe componentes básicos en color rosa, como el citoplasma.

La inmunohistoquímica es un método basado en las reacciones inmunoenzimáticas para visualizar la distribución y localización de componentes específicos dentro de una célula o un tejido utilizando anticuerpos mono o policlonales acoplados a un sistema de detección.

### **Obtención y preparación de las muestras de tejido renal**

Las ratas se anestesiaron con una dosis de pentobarbital sódico de 0.025 g/kg y los riñones se perfundieron con solución Krebs Ringer y EDTA 250 mM (ver apéndice, sección K), para lo cual se empleó un catéter semirígido para canular la arteria renal por donde se pasó un volumen promedio de 40 mL con un flujo constante de 2.2 centímetros cúbicos/minuto con la ayuda de una bomba peristáltica. Posteriormente los riñones se fijaron pasando una solución de formalina, se deshidrataron con una serie de soluciones alcohólicas de concentración creciente, se aclararon con xileno y se embebieron en parafina para su preservación, corte y tinción.

### **Procedimiento**

Para el análisis histológico, se realizaron cortes de de las muestras de tejido renal 5  $\mu$ m de espesor embebidas en parafina y se montaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-Lisina; posteriormente las preparaciones se desparafinaron con xilol y se tiñeron con H&E (ver apéndice, sección L).

Para la determinación de los marcadores relacionados con el subtipo histológico y de estrés oxidante mediante IHQ, los cortes ya desparafinados se hirvieron con solución Declere® (Sigma-Aldrich) para exponer los sitios antigénicos. La inhibición de la peroxidasa endógena se realizó mediante incubación con peróxido de hidrógeno al 30% en metanol en proporción 34:6 durante dos horas; las muestras se lavaron con amortiguador de fosfatos (PBS) y se bloquearon los sitios libres antigénicos con suero de burro al 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente el exceso de reactivo se decantó. La incubación con los anticuerpos primarios: HNE, NT, pVHL, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y CAIX (en las diluciones descritas en el apéndice, sección L), se realizó durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C, y al término de la incubación las laminillas se lavaron dos veces con PBS con agitación a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo secundario (ver apéndice, sección L) se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante, y nuevamente se efectuaron 2 lavados con PBS con agitación a 100 rpm. Las muestras se colocaron en la cámara húmeda durante 30 minutos en contacto con el complejo avidina-biotina ABC-kit Vectastain® (Vector Laboratories, E.U.A.). Para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo se agregó el cromógeno diaminobencidina (DAB) (ver apéndice, sección L); las laminillas se lavan con agua y se tiñeron con hematoxilina. La examinación de los tejidos se realizó con un invertoscopio Axiovert 200M (Carl Zeiss) y las imágenes se capturaron con el software KS-300 version 3.0 (Carl Zeiss).

#### 4.2.4 Obtención de muestras de suero y orina

Las muestras de sangre se obtuvieron el día en que las ratas recibieron la eutanasia por decapitación al final de cada protocolo o bien por punción retro-orbital en los diferentes tiempos de estudio. En este último caso, las ratas se anestesiaron por inhalación de éter en una cámara, se colocaron sobre una superficie sólida y se introdujo un capilar (tubo de hematocrito) no heparinizado justo detrás del ojo y la muestra de sangre (aproximadamente 1 mL) se recolectó por capilaridad y se colocó en un tubo eppendorf. Minutos después de la formación del coágulo, la muestra de sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El suero se separó en alícuotas de 200  $\mu$ L, las cuales se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para la obtención de las muestras de orina las ratas se colocaron en jaulas metabólicas y se recolectó la orina durante 24 horas; se midió el volumen de la orina y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ ; el sobrenadante se separó en alícuotas de 1 mL y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.5 Determinación de la función renal

##### ➤ Cuantificación de creatinina

La creatinina es un producto final del metabolismo de la creatina del músculo; la velocidad de producción de creatinina está relacionada con la actividad y la masa muscular, así como con la ingesta total de proteínas. Este metabolito se excreta por filtración a través del glomérulo y en menor proporción por secreción tubular, y su determinación es ampliamente aceptada como un indicador de la función renal.

##### **Fundamento**

Esta determinación está basada en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino para formar un complejo estable colorido que puede medirse espectrofotométricamente a 510 nm. El desarrollo del color es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra (Murray, 1984).

##### **Preparación de las muestras**

Las muestras de sangre se recolectaron siguiendo el mismo procedimiento descrito en la preparación de las muestras en la sección 4.2.4.

##### **Procedimiento**

La determinación de creatinina se hizo utilizando un estuche comercial Creatinine-J, Spinreact® (Girona, España). Brevemente, el reactivo de trabajo se preparó mezclando volúmenes iguales de una solución de ácido pícrico 17.5 mM con hidróxido de sodio 0.29 M. 50  $\mu$ L de muestra o estándar de creatinina se colocaron en un tubo de reacción que contiene 500  $\mu$ L del reactivo de trabajo, el cronómetro se puso en marcha en el momento de adicionar la muestra y se leyó la absorbancia a 492 nm a los 30 y 90 segundos de la adición de la muestra.

La concentración de creatinina en la muestra se calculó dividiendo la  $\Delta A$  de la muestra entre la  $\Delta A$  del patrón primario; este resultado se multiplicó por la concentración del estándar de creatinina (2 mg/dL) y los valores

se expresaron en mg de creatinina/dL. El intervalo de valores de referencia de creatinina en sangre en ratas es: 0.39-2.29 mg/dL (Krinke, *et al.*, 2000).

➤ **Cuantificación de nitrógeno ureico sanguíneo**

La urea es un producto final del metabolismo de las proteínas y es excretada por el riñón. El nitrógeno ureico sanguíneo es inversamente proporcional a la tasa de excreción de urea, por lo que su acumulación en sangre indica que la urea no está siendo excretada de manera eficiente y por tanto se usa como marcador de función renal.

**Fundamento**

La urea presente en la muestra reacciona con el o-ftalaldehído en medio ácido resultando en la formación de isoindolina, un compuesto colorido que puede detectarse espectrofotométricamente a 510 nm. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la cantidad de urea presente en la muestra (Kaplan, 1984).

**Preparación de las muestras**

Las muestras de sangre se recolectaron siguiendo el mismo procedimiento descrito en la preparación de las muestras en la sección 4.2.4.

**Procedimiento**

Para la determinación de BUN se utilizó un estuche comercial Urea-37, Spinreact® (España). Brevemente, 25  $\mu$ L de muestra o patrón primario del kit se colocaron en tubo de reacción que contiene 500  $\mu$ L de o-ftalaldehído 4.8 mM; inmediatamente después se agregaron 500  $\mu$ L de la solución de borato 87 mM, se agitó la mezcla de reacción y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 510 nm.

La concentración de urea en la muestra se calcula dividiendo la absorbancia de la muestra entre la absorbancia del patrón primario, y este resultado se multiplica por la concentración del estándar de urea (50 mg/dL). Para obtener la concentración de nitrógeno ureico sanguíneo en mg de urea/dL, el valor obtenido se divide entre el factor 2.14. Este factor está basado en la relación del peso molecular de la urea (60 g/mol) y el peso molecular de los átomos de nitrógeno presentes en la molécula de urea (28 g/mol). El intervalo de valores de referencia de nitrógeno ureico sanguíneo en ratas es de 12.0-25.8 mg/dL (Krinke, *et al.*, 2000).

**4.2.6 Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry**

**Fundamento**

Los enlaces peptídicos forman un complejo con el sulfato de cobre en condiciones alcalinas el cual reacciona con el reactivo de Folin para formar un compuesto colorido que puede medirse espectrofotométricamente a 660 nm (Lowry *et al.*, 1951).

**Preparación de la muestra**

Esta determinación se realizó en muestras utilizadas en diferentes técnicas por lo que la preparación de las muestras se describe en los apartados correspondientes.

### Procedimiento

En el ensayo se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar de albúmina sérica bovina (ASB) al 0.05% por cada tubo. Posteriormente se adicionó a todas las muestras 1 mL de la solución C (ver apéndice, sección F), se incubaron durante 10 minutos y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución D con agitación simultánea. La absorbancia de las muestras se obtuvo espectrofotométricamente a 660 nm, 30 minutos después de la adición de la solución D. La concentración de proteínas totales se calculó interpolando la absorbancia obtenida en la curva patrón de albúmina sérica bovina (Tabla 9), y los resultados se expresaron en mg de proteína/mL de muestra.

**Tabla 9. Curva patrón de albúmina sérica bovina para la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry.**

[ASB] $\mu\text{g}/0.2 \text{ mL}$	ASB al 0.05% ( $\mu\text{L}$ )	H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )
Blanco	0	200
5	10	190
10	20	180
15	30	170
25	50	150
35	70	130
50	100	100

#### 4.2.7 Determinación de marcadores de estrés oxidante mediante técnicas espectrofotométricas

##### ➤ Evaluación de la peroxidación lipídica

### Fundamento

Los componentes lipídicos de las membranas celulares son vulnerables a la oxidación debido a la presencia de dobles enlaces en sus estructuras. El ataque de los radicales libres a estos compuestos conduce a la formación de hidroperóxidos en los lípidos, lo cual puede dar como resultado cambios en la permeabilidad de las membranas y alterar las interacciones lípido-proteína. El daño a lípidos por oxidación puede determinarse midiendo los productos finales de la lipoperoxidación, y uno de los productos clásicos es el malondialdehído (MDA), el cual reacciona con el N-metil-2-fenilindol en medio ácido a 45°C, generando un compuesto colorido que puede medirse espectrofotométricamente a 586 nm (Gérard-Monnier *et al.*, 1998).

### Preparación de las muestras

Para este ensayo, la preparación de los homogenados de corteza renal se realizó en el momento en que los animales recibieron la eutanasia. El riñón extraído se lavó rápidamente en solución salina isotónica estéril en baño de hielo, se separaron aproximadamente 300 mg de corteza y se homogenizaron en 3 mL de amortiguador de fosfatos (20 mM, pH: 7.4, en baño de hielo). El homogenado resultante se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 1 mL hasta la realización de la determinación. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción retro-orbital como se describe en la sección 4.2.4.



### Procedimiento

El día del ensayo se descongelaron las muestras de suero u homogenado de corteza renal, y se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C por 10 min y se separó el sobrenadante obtenido. Posteriormente, a 200 µL del sobrenadante o 160 µL de suero se les agregó 650 µL de mezcla 1-metil-2-fenilindol 10 mM/metanol proporción 1:3 y 150 µL de HCl al 37%. Los tubos se incubaron en un baño a 45°C durante 1 hora y se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min para obtener un sobrenadante claro que se lee a 586 nm. Por otro lado, la concentración de proteínas se cuantificó mediante el método de Lowry (sección 4.2.6). La concentración de MDA de las muestras se calculó interpolando la absorbancia obtenida en la curva patrón de tetrametoxipropano (TMPO) (Tabla 10), y los resultados se expresaron en nmol de MDA por miligramo de proteína.

**Tabla 10. Curva patrón de tetrametoxipropano para la cuantificación de MDA presente en las muestras.**

[TMPO] µM	µL de estándar (TMPO 20 µM)	µL H <sub>2</sub> O destilada
Blanco	0	200
0.5	25	175
1.0	50	150
2.0	100	100
3.0	150	50
4.0	200	0

### ➤ Cuantificación de peróxido de hidrógeno

#### Fundamento

Esta determinación se basa en la oxidación de Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> por el peróxido de hidrógeno en condiciones ácidas. El ión férrico se une al naranja de xilenol (3,3'-bis[N,N-di(carboximetil)-aminometil]-o-cresolsulfona-fenoltaleína, sal sódica) para formar un complejo estable colorido que puede medirse espectrofotométricamente a 560 nm (Long, *et al.*, 1999).

#### Preparación de las muestras

El riñón recién extraído se lavó en solución isotónica estéril (en baño de hielo), se separaron aproximadamente 100 mg de corteza y se homogenizaron en 900 µL de amortiguador de fosfatos (100 mM, pH: 7.4, en baño de hielo). El homogenado resultante se centrifugó a 15000 rpm, a 4°C durante 20 min, se separó el sobrenadante y se congeló a -80°C en alícuotas no menores de 200 µL.

#### Procedimiento

El día del ensayo, los homogenados de riñón se descongelaron y se colocaron 90 µL de la muestra o del estándar de peróxido de hidrógeno 100 µM en los tubos de reacción. Posteriormente, se agregaron simultáneamente 900 µL del reactivo de FOX (ver apéndice, sección D) y 10 µL de metanol tanto a las muestras como a los estándares, e inmediatamente después se agitaron y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo, sólo los tubos de las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min, y se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro a 586 nm. La concentración de peróxido de hidrógeno se calculó interpolando la absorbancia obtenida de cada muestra en la curva patrón de peróxido de hidrógeno descrita en la tabla 11, la concentración de proteínas totales se cuantificó mediante el método de Lowry (sección 4.2.6) y los resultados se expresaron en nmol de peróxido de hidrógeno por mg de proteína.

**Tabla 11. Curva patrón de peróxido de hidrógeno para su cuantificación en homogenados de tejido renal mediante el método de FOX.**

[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] µg/mL	µL de estándar de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100µM)	µL H <sub>2</sub> O destilada
<b>Blanco</b>	0	1000
<b>2.5</b>	25	975
<b>5.0</b>	50	950
<b>10.0</b>	100	900
<b>25.0</b>	250	750
<b>50.0</b>	500	500
<b>75.0</b>	750	250

### ➤ Cuantificación de proteínas oxidadas

#### Fundamento

Las EROs reaccionan con los aminoácidos de las proteínas formando grupos carbonilo como producto de la oxidación, los cuales también pueden originarse por rompimiento de enlaces peptídicos o por interacción de cadenas laterales de algunos aminoácidos (grupos sulfhidrilo e imidazol) con productos de la peroxidación lipídica. Esta determinación de daño por oxidación a proteínas se lleva a cabo basándose en la reactividad de los grupos carbonilo con dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas de proteína, las cuales absorben a una longitud de onda de 370 nm (Nyström, *et al.*, 2005).

#### Preparación de las muestras

El riñón recién extraído, se lavó en solución salina isotónica estéril (en baño de hielo), se separaron fragmentos de aproximadamente 100 mg de corteza, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. La preparación de los homogenados se realizó el día anterior al ensayo colocando 100 mg de tejido de cada muestra en 900 µL de amortiguador de fosfatos en baño de hielo (50 mM, pH: 7.4) con inhibidores de proteasas (véase apéndice, sección E), EDTA 1mM y Tritón 0.1%. Los homogenados resultantes se centrifugaron a 15,300 rpm a 4°C durante 20 minutos y posteriormente se trataron con sulfato de estreptomycin (Sigma, Aldrich) al 10% durante 12 horas, colocando 200 µL del antibiótico más 600 µL del sobrenadante del homogenado.

#### Procedimiento

Las muestras tratadas con sulfato de estreptomycin se centrifugaron a 5000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se hizo un blanco y un problema por muestra (Tabla 12).

**Tabla 12. Reactivos que deben agregarse al blanco y a las muestras problema para la determinación de grupos carbonilo en las proteínas.**

Blanco	Problema
150 µL homogenado	150 µL homogenado
600 µL HCl 2.5 M	600 µL DNPH 10 mM

Después de agregar los reactivos citados en la tabla 13, las muestras problema y blanco se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente protegidas de la luz agitando los tubos cada 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se adicionaron 750 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% a las muestras, se incubaron a 4°C durante 10 min y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido

se descartó y el botón se resuspendió con 600 $\mu$ L de TCA al 10%. Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4°C, se descartó nuevamente el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con 600  $\mu$ L de mezcla etanol/acetato de etilo (1:1), centrifugando en cada lavado a 7000 rpm durante 15 min. En el último lavado se dejó que la mezcla de etanol/acetato de etilo (1:1) se evaporara a temperatura ambiente y el botón se resuspendió con 1 mL de guanidina 6 M. La concentración de carbonilos se determinó restando la absorbancia de los tubos blanco a las muestras problema a 370 nm y multiplicando por el factor 45.45 obtenido a partir del coeficiente de extinción molar del DNPH (0.022  $\mu$ M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). La concentración de proteínas en las muestras se calculó por interpolación de las absorbancias obtenidas a 280 nm en una curva patrón de albúmina (Tabla 13). Los resultados se expresaron en nmol de carbonilos por miligramo de proteína.

**Tabla 13. Curva patrón de albúmina sérica bovina para la obtención de la curva patrón para la cuantificación de proteínas totales.**

ASB[mg/mL]	$\mu$ L de ABS (4mg ABS/mL de guanidina)	$\mu$ L Guanidina
0.25	65	935
0.5	125	875
1.0	250	750
2.0	500	500

#### 4.2.8 Western blot de las diferentes proteínas estudiadas

##### Fundamento

El Western blot, o inmunoblot, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, tal como un homogenado tisular. Mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) las proteínas se separan con base en su peso molecular. Posteriormente son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilo (PVDF)) para identificar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra esta (Towbin *et al.*, 1979).

##### Preparación de las muestras

En el momento en que los animales recibieron la eutanasia, el riñón se lavó en solución salina isotónica estéril (en baño de hielo), se separaron fragmentos de aproximadamente 100 mg de corteza, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. La preparación de los homogenados se realizó el día del ensayo colocando 100 mg de tejido de cada muestra en 600  $\mu$ L de amortiguador de lisis con inhibidores de proteasas (pH: 7.4, en baño de hielo) (véase apéndice, sección M). Los homogenados resultantes se centrifugaron a 13500 rpm a 4°C durante 30 minutos, se separó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta su uso.

##### Procedimiento

Con base en la determinación de proteínas totales por el método de Lowry, se calculó el volumen de homogenado de corteza renal necesario para cargar 50  $\mu$ g de proteína en cada pozo de los geles de poliacrilamida. El voltaje utilizado en la electroforesis en condiciones desnaturizantes fue de 100 Volts hasta que las proteínas terminaron de migrar a través del gel concentrador y posteriormente a 85 Volts aproximadamente

de dos a dos horas y media. Posteriormente se realizó la transferencia semiseca (Transblot SD semidry Transfer Cell, BioRad, E.U.A.) de las proteínas a una membrana de PVDF (Immobilion-P, Millipore Corporation, E.U.A.) durante 1 h y media a 300 mA. Una vez terminada la transferencia, la membrana se bloqueó con leche descremada al 1% en PBS-Tween durante 1 h. Después se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal, específico para la proteína de interés (ver apéndice, sección M). Al día siguiente, se retiró la solución con el anticuerpo primario y las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.1% durante 15 min cada vez. Posteriormente se incubaron una hora con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, EUA). Transcurrido ese tiempo se eliminó la solución con el anticuerpo secundario y se realizaron tres lavados con PBS de 15 min cada uno. Por último, se adicionaron los sustratos de la peroxidasa (luminol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Millipore Immobion™ Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore Corporation, MA, USA) y se expusieron las membranas a una placa de rayos X. Las placas obtenidas de la proteína de interés y del control de carga se analizaron por densitometría utilizando el programa Image J (Broken Symmetry Soft). Posteriormente, se ajustaron los valores de densitometría obtenidos para la proteína de interés de cada grupo estudiado con sus respectivos valores del control de carga vs los del grupo control por lo que los datos se expresaron como unidades relativas de densitometría (URD) y se graficaron con el programa “Graphpad Prism” versión 5.

#### 4.2.9 ELISA directo

##### Fundamento

El ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) se utiliza para la cuantificación de biomoléculas basándose en la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo y en la sensibilidad de las pruebas enzimáticas. El método directo permite la detección del complejo antígeno-anticuerpo con un anticuerpo secundario específico conjugado con una enzima como sistema de detección. La reacción enzimática puede detectarse espectrofotométricamente con un lector de ELISA.

##### Procedimiento

Se agregaron 200 µL de muestra de orina o estándar de CAIX disuelto en amortiguador de bicarbonato 0.1 M pH: 8.2 a los pozos de la placa de ELISA y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se descartó la solución de estándar o la muestra y se realizaron 3 lavados (15 min c/u en agitación) con la solución PBS/Tween (ver apéndice, sección N) agregando 250 µL por pozo. En cada lavado se descartó la solución. Posteriormente se agregan 200 µL por pozo de la solución de bloqueo al 1% (ver apéndice, sección N) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se descartó la solución de bloqueo, se agregó el anticuerpo secundario policlonal anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano disuelto en PBS a una concentración de 2 µg/mL y se incubó toda la noche a 4°C. Al terminar la incubación se realizaron 3 lavados con 250 µL de PBS/Tween (15 min c/u) y se agregaron 200 µL del segundo anticuerpo secundario disuelto en PBS a una concentración de 0.25 µg/mL a cada pozo, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y se realizaron 6 lavados con 250 µL de PBS/Tween en agitación (5 min c/u). Por último, se adicionó el sustrato ABTS (ver apéndice, sección N) y se incubó durante 40

min a temperatura ambiente cubriendo la placa con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. Una vez transcurrido este tiempo, la placa se leyó a 405 nm. La concentración de CAIX presente en las muestras se calculó interpolando la absorbancia obtenida en la curva patrón de CAIX (Tabla 14) y los resultados se expresaron en ng de CAIX/0.2 mL de orina.

**Tabla 14. Curva patrón de CAIX para la cuantificación de esta molécula en muestras de orina.**

[CAIX] ng/0.2mL	μL de estándar de CAIX	μL amortiguador de bicarbonato
<b>Blanco</b>	0 μL	200
<b>14.28</b>	3 μL	417
<b>7.1</b>	160 μL de la solución previa	160
<b>3.6</b>	100 μL de la solución previa	100
<b>5.0</b>	0.7 μL	279.3
<b>0.5</b>	60 μL de la solución previa	540
<b>0.05</b>	60 μL de la solución previa	540

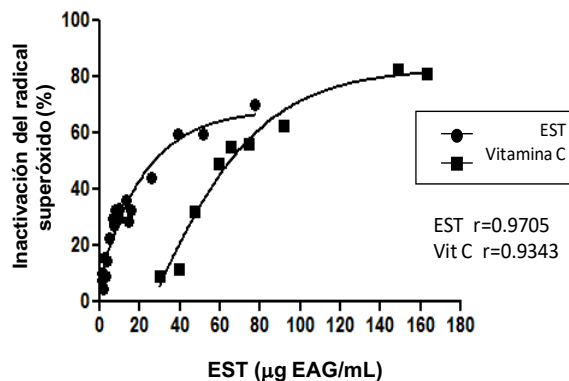
#### 4.2.10 Análisis estadístico de los datos

A menos de que se especifique otra cosa, los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (EE) y las diferencias estadísticamente significativas se identificaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se complementaron con la prueba Newman-Keuls. Las diferencias en la incidencia y grado de avance de los tumores entre los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA se analizaron con la prueba de Fisher. En todos los casos se utilizó el software Graph Pad 5.0 (San Diego CA, EUA) y un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró significativo.

## V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 5.1 Contenido de fenoles totales y evaluación de la capacidad antioxidante del EST

Con la finalidad de evaluar el potencial del EST como agente contra el estrés oxidante se determinó su contenido de compuestos polifenólicos así como su capacidad de inactivación del radical superóxido por ser una de las EROs que se ha demostrado que se producen por la administración del FeNTA. El contenido de equivalentes de ácido gálico (EAG) por miligramo de EST fue de  $1.28 \pm 0.11$ , lo que indica que el extracto presenta una cantidad considerable de compuestos polifenólicos. Por otro lado, la capacidad del EST para inactivar el radical superóxido *in vitro*, se determinó realizando una curva con diferentes concentraciones del extracto, a partir de la cual se calculó la concentración de EAG necesaria para inhibir un 50% la producción *in vitro* del radical superóxido ( $CI_{50}$ ) que fue de  $30.7 \pm 0.51$   $\mu\text{g}$  EAG/mL (Figura 14). Estos resultados demuestran que la capacidad de inactivación del radical superóxido del EST es muy buena, incluso mayor que la de la vitamina C, un antioxidante comúnmente utilizado, que en nuestro ensayo presentó una  $CI_{50}$  de  $66.0 \pm 0.4$   $\mu\text{g}$ /mL. Es conveniente aclarar que en experimentos paralelos se demostró que el EST no interfiere con el sistema xantina-xantina oxidasa utilizado para producir el anión superóxido.



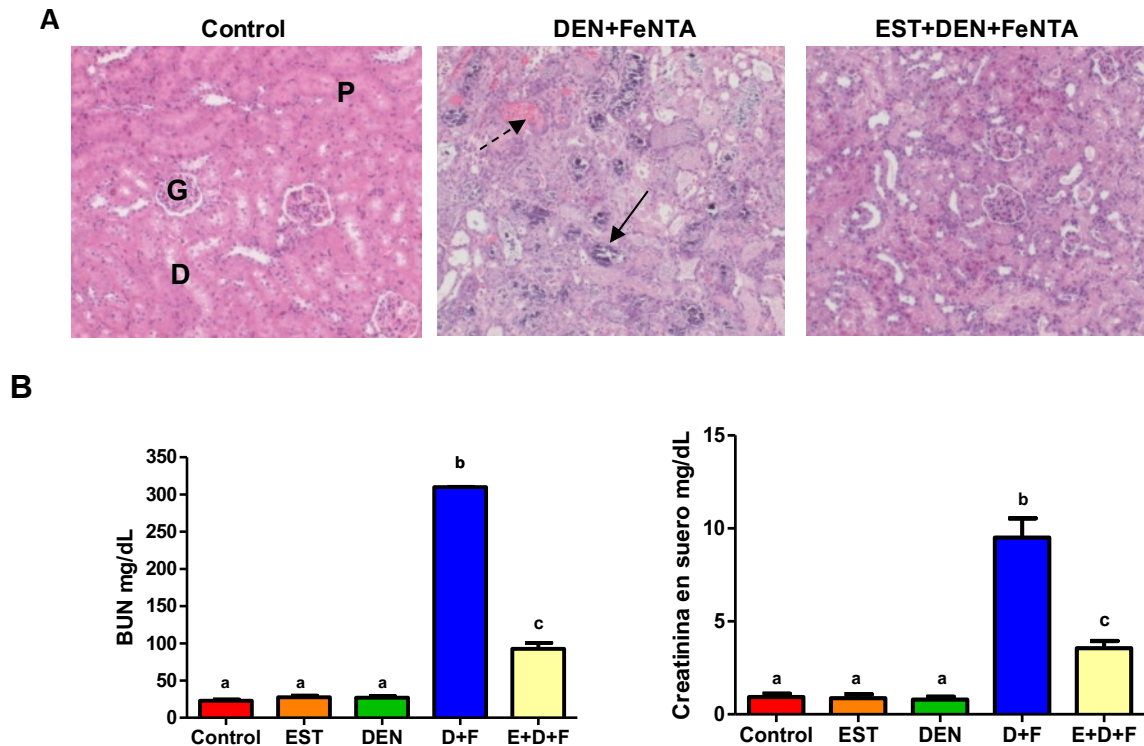
**Figura 14. Evaluación de la capacidad antioxidante del EST mediante la determinación de la inactivación del radical superóxido.** La actividad antioxidante del EST ( $CI_{50} = 30.7 \pm 0.5$   $\mu\text{g}$  EAG/mL), fue mayor que la de la vitamina C ( $CI_{50} = 66.0 \pm 0.4$   $\mu\text{g}$ /mL). Los resultados se expresan como porcentaje de la capacidad de inactivación del radical superóxido. EAG: equivalentes de ácido gálico.

De acuerdo con estos resultados, se decidió evaluar el EST como agente preventivo contra la nefrotoxicidad y carcinogénesis inducidos por FeNTA. Durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal fue necesario preparar en varias ocasiones el EST, y en todos los casos se obtuvieron resultados muy similares del contenido de fenoles totales e inactivación del radical superóxido.

### 5.2 Protocolo de nefrotoxicidad aguda

El protocolo de nefrotoxicidad aguda se realizó para evaluar el efecto del EST en este órgano *in vivo*. En la Figura 15, se muestran fotografías representativas de los análisis histológicos realizados en riñones de los grupos Control, DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA (Panel A), así como las determinaciones de marcadores de

función renal en todos los grupos de estudio (Panel B). En el panel A, se observa que el grupo control presenta la arquitectura histológica normal del riñón, en cambio, el tratamiento con DEN+FeNTA indujo necrosis y proteinuria, y la administración del EST disminuyó notoriamente este daño histológico ( $p < 0.0029$ ). La función renal se analizó mediante la determinación de los niveles de BUN y creatinina en sangre. En el panel B se aprecia que el tratamiento únicamente con EST o DEN no indujo cambios en estos marcadores, mientras que el tratamiento con DEN+FeNTA aumentó sus niveles aproximadamente 10 veces por encima del valor del grupo control, lo que indica una insuficiencia renal severa, la cual disminuyó notablemente por el pretratamiento con el EST en el grupo EST+DEN+FeNTA ( $p < 0.0001$ ).



**Figura 15. Estudio de nefrotoxicidad aguda.** Panel A. Fotografías representativas de la histología renal. El grupo control ( $n=5$ ) presentó una arquitectura histológica normal, el grupo tratado con DEN+FeNTA ( $n=3$ ) presentó necrosis severa (flecha sólida) y proteinuria (flecha discontinua) después de dos administraciones de FeNTA (9 mg Fe/Kg) y el grupo tratado con el EST+DEN+FeNTA ( $n=3$ ) muestra un menor daño en los túbulos renales así como menos signos de necrosis y proteinuria respecto al grupo tratado con DEN+FeNTA ( $p < 0.0029$  de acuerdo al análisis de las áreas dañadas por campo). La apariencia microscópica de los riñones de los grupos EST y DEN es similar a la observada en el grupo control (imágenes no mostradas) HE, x400. G, glomérulo; P, túbulo proximal; D, túbulo distal. Panel B. Nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) y niveles de creatinina en suero. En el grupo tratado con DEN+FeNTA se observó insuficiencia renal severa y el EST la disminuyó considerablemente el valor de ambos marcadores ( $p < 0.0001$ ). Control, EST y DEN ( $n=5$ ), DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA ( $n=3$ ). Cada valor representa la media  $\pm$  EE. Columnas con letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.0001$ ). Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

Cabe resaltar que en este protocolo se presentó un alto índice de mortalidad (88%) después de la segunda administración de FeNTA, lo que concuerda con otro estudio realizado en ratones, en el cual los animales fallecieron antes desarrollar cáncer a causa de la nefrotoxicidad severa inducida con la dosis de FeNTA utilizada en nuestro protocolo (9 mg Fe/kg) (Kimoto, *et al.*, 2000); sin embargo, otros autores reportan que utilizan esta dosis para el protocolo de carcinogénesis renal (Jahangir, *et al.*, 2006; Khan, *et al.*, 2005). Así mismo, las alteraciones histológicas encontradas en el presente estudio con el tratamiento con DEN+FeNTA como la

necrosis y la proteinuria, coinciden con las observaciones de Toyokuni, *et al.*, (1994). Por otra parte, los niveles notablemente elevados de BUN y creatinina en suero del grupo DEN+FeNTA indican una insuficiencia renal severa, que concuerda con el daño observado a nivel histológico, y estos resultados también coinciden con datos reportados en la literatura (Iqbal, *et al.*, 1998; Jahangir, *et al.*, 2006); sin embargo, estos autores encontraron un aumento de 3 veces con respecto al control, y en el presente trabajo el incremento fue mucho mayor (alrededor de 10 veces), lo que podría deberse a que la DEN tenga un efecto sinérgico sobre la insuficiencia renal aguda provocada por FeNTA ya que los otros autores no utilizaron este iniciador tumoral. El pre-tratamiento con el EST disminuyó de manera importante el daño renal histológico y funcional probablemente a causa de sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias previamente reportadas (Komutarin, *et al.*, 2004; Siddhuraju, *et al.*, 2007; Suksomtip, *et al.*, 2008 y 2010), no obstante, el mecanismo por el cual el EST ofrece protección aún requiere elucidarse. La notoria protección inducida por el EST observada en este protocolo lo cataloga como potente agente preventivo muy prometedor contra la insuficiencia renal severa inducida por estrés oxidante. Además, estos resultados confirmaron los efectos benéficos del extracto en el riñón *in vivo*.

En cuanto al estrés oxidante, medido como lipoperoxidación, niveles de peróxido de hidrógeno y contenido de carbonilos en proteínas no hubo diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los grupos estudiados con este esquema de tratamiento (Figura 16). La ausencia de cambios en estas determinaciones respecto al grupo control pueden deberse al hecho de que la mayor producción de estrés oxidante se da una hora después de la administración del FeNTA, la cual disminuye considerablemente a las 3 horas y llega a niveles normales después de las 6 horas (Tsuda, *et al.*, 1994; Dávalos-Salas, 2006; Cruz-White, 2007; He, *et al.*, 2007), por lo que estos marcadores de estrés oxidante en nuestras muestras pueden haber regresado a valores normales ya que se tomaron 24 horas después de la segunda administración de FeNTA.

### 5.3 Protocolo de carcinogénesis renal

Durante el desarrollo del protocolo se evaluó el comportamiento del peso corporal de las ratas en los diferentes grupos de estudio (Figura 17). Esto se realizó con la finalidad de monitorear el estado general de los animales que fueron sometidos al tratamiento con el carcinógeno, así como para evaluar los posibles efectos antinutricionales del EST que pudiera presentar, ya que se ha reportado que los polifenoles pueden tener estos efectos cuando se administran a largo plazo (Fujimoto, *et al.*, 2009). Los animales del grupo tratado con EST crecieron de manera similar a los del grupo control, por lo que podemos decir que la dosis utilizada del EST (100 mg EAG/kg/día) no tiene efectos antinutricionales. Por otra parte, el tratamiento con DEN indujo una disminución en el peso corporal de las ratas estadísticamente significativa casi inmediatamente después de su administración, pero el crecimiento de los animales se reestableció en los días subsecuentes, y al final del protocolo alcanzaron el mismo peso que las ratas del grupo control. En cambio, en los grupos tratados con FeNTA el crecimiento de las ratas se detuvo y el peso corporal no llegó a restablecerse al final del estudio, lo que indica un deterioro en la salud de estos animales. El tratamiento con EST no previno el efecto en el peso corporal provocado por el iniciador tumoral y el carcinógeno (grupo EST+DEN+FeNTA).



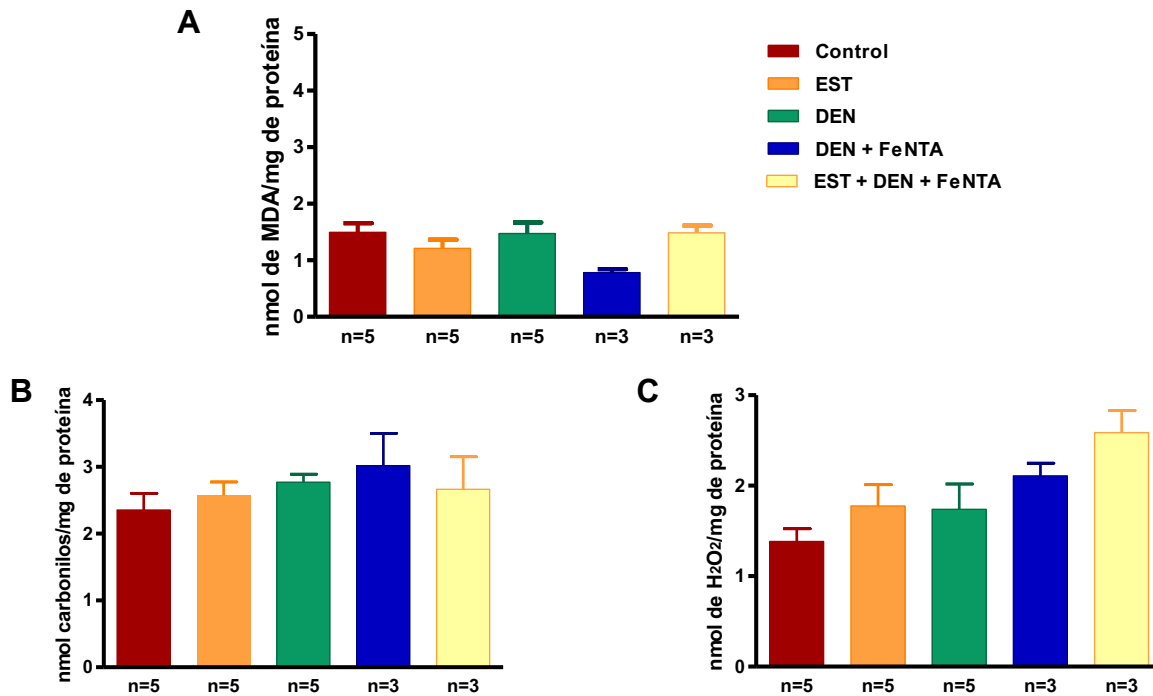


Figura 16. Marcadores de estrés oxidante en riñón en el protocolo de nefrotoxicidad aguda: malondialdehído (MDA) (Panel A), proteínas oxidadas (Panel B) y niveles de peróxido de hidrógeno (Panel C). Las muestras de corteza renal se obtuvieron 24 horas después de la segunda administración de FeNTA (9 mg de Fe/kg). No hubo cambios estadísticamente significativos en ningún marcador ( $p > 0.05$ ). Cada valor representa la media  $\pm$  EE del número de animales indicados en la parte inferior de cada columna.

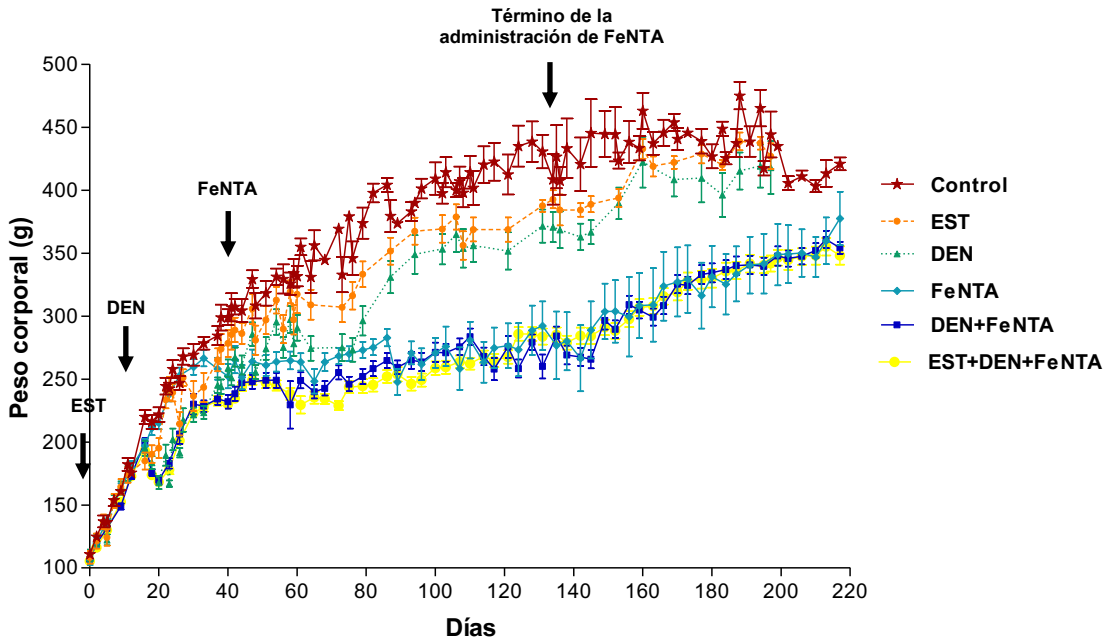
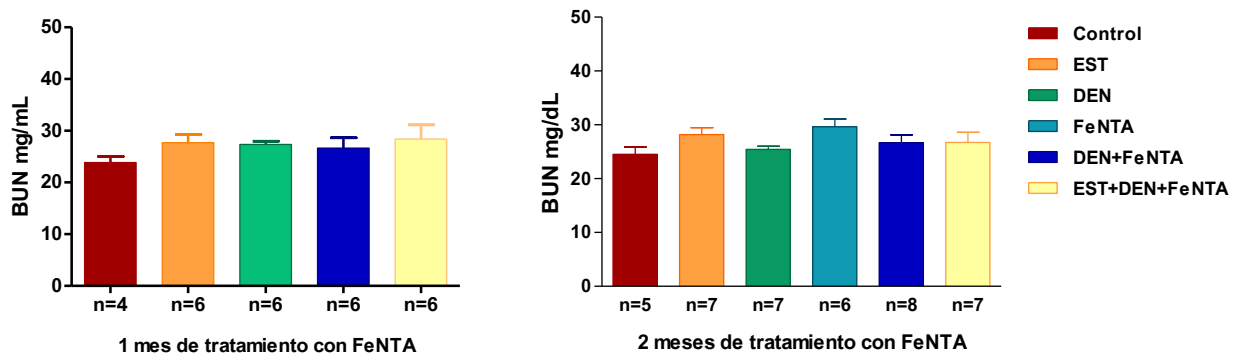


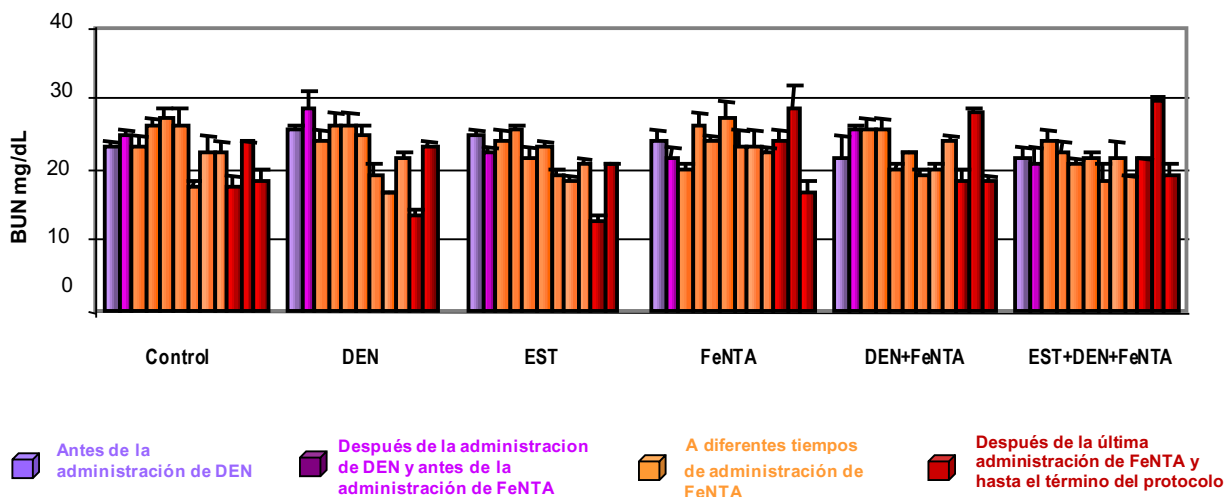
Figura 17. Peso corporal de las ratas de los diferentes grupos de estudio durante el protocolo de carcinogénesis renal. El EST no tuvo efectos antinutricionales ya que los animales presentaron un crecimiento similar al del grupo control. La exposición a N-dietilnitrosamina (DEN) indujo una disminución del peso casi inmediatamente después de su administración, pero se reestableció en los días subsiguientes alcanzando al mismo peso que las ratas del grupo control al final del protocolo. La exposición a FeNTA también disminuye el peso corporal, el cual no se reestablece al final del estudio y el EST no protegió contra este efecto del carcinógeno. Cada punto representa la media  $\pm$  EE. El número de animales fue variando en función de la mortalidad presentada (de 10 a 25).

### 5.3.1 Función renal

Se determinaron los niveles de BUN como marcador de función renal en muestras de los animales estudiados después de uno y dos meses de exposición a FeNTA (Figura 18), así como en muestras tomadas a diferentes tiempos a lo largo del protocolo de carcinogénesis (Figura 19). Como se puede observar en ambas figuras, no se encontraron cambios a ningún tiempo estudiado en ningún grupo de estudio. Es importante resaltar que este comportamiento es similar al curso de la enfermedad en el humano, es decir, el cáncer se desarrolla sin que se altere la función renal (Cohen, *et al.*, 2005).



**Figura 18. Determinación de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) a un mes y dos meses de tratamiento con FeNTA.** Ningún grupo de estudio presentó alteraciones indicando que a uno y dos meses de tratamiento con FeNTA no se induce insuficiencia renal. Las barras representan la media  $\pm$  EE.  $p > 0.05$ .

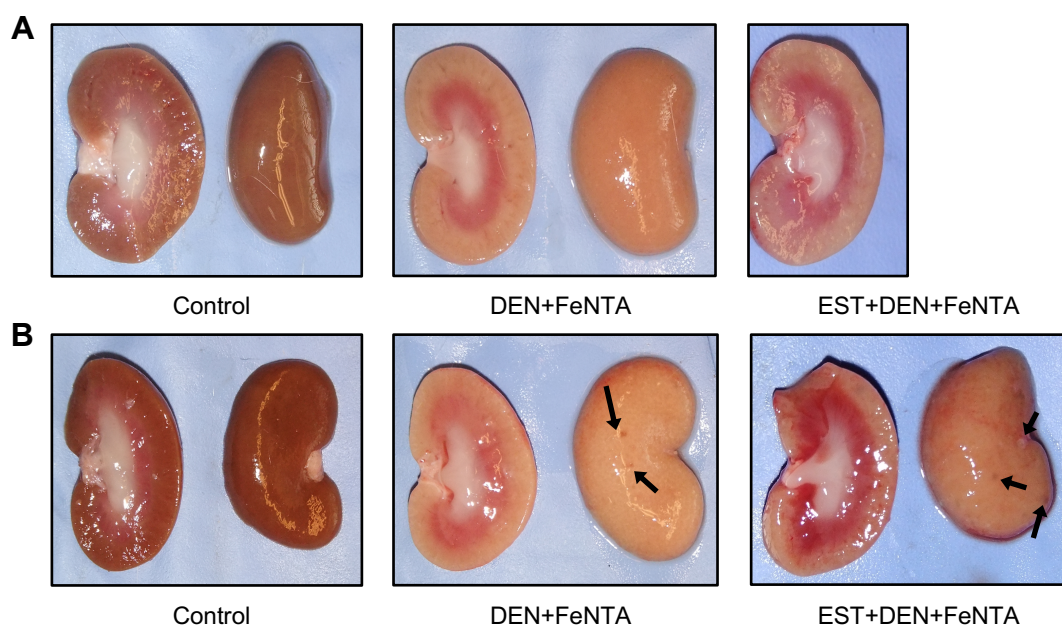


**Figura 19. Determinación de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal.** No se presentó diferencia estadísticamente significativa a ningún tiempo estudiado en ninguno de los grupos ( $p > 0.05$ ). Las barras representan la media  $\pm$  EE.

### 5.3.2 Apariencia macroscópica de los riñones

La apariencia macroscópica de los riñones obtenidos al primer mes de tratamiento con FeNTA, evidenció el daño inducido en los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA, ya que mostraron cambios en la coloración de

la corteza renal, así como edema e inflamación de la médula (Figura 20, Panel A) y este daño fue similar en ambos grupos. El tratamiento con EST no disminuyó el daño macroscópico observado en el grupo DEN+FeNTA. Los riñones de los grupos tratados únicamente con EST o DEN tuvieron una apariencia similar a los del grupo control. En los riñones extraídos a los 2 meses de tratamiento con FeNTA (Figura 20, Panel B), además de las alteraciones presentadas en el primer mes, se observó la presencia de quistes en los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA cuya importancia se discute más adelante en los resultados de los análisis histológicos. Cabe señalar que en ninguna de las muestras analizadas se detectó el desarrollo evidente de tumores.



**Figura 20. Fotografías representativas de los riñones después de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA.** Al primer mes de tratamiento (Panel A), el grupo tratado con DEN+ FeNTA mostró cambios en la coloración de la corteza renal, edema e inflamación de la médula, y en el grupo tratado también con EST el daño fue similar. A los dos meses de tratamiento (Panel B), en los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA se observa, además, la presencia de quistes renales (flechas).

En cambio, al final del protocolo de carcinogénesis renal, se observó claramente la presencia de tumores en los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA. En el panel A de la figura 21, se muestra la fotografía de una rata que presentó tumores de CCR pero cuya apariencia es sana, lo cual es un comportamiento similar al que ocurre en el humano en donde este tipo de cáncer se desarrolla sin presentar sintomatología en la mayoría de los casos. En el panel B, se muestran fotografías representativas de la apariencia macroscópica de los riñones de los grupos control, DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA. Los riñones de los grupos tratados únicamente con EST o DEN mostraron una apariencia idéntica a aquéllos del grupo control (imágenes no mostradas). Los tumores que se observan en la fotografía del grupo DEN+FeNTA representan tamaños 2, 3 y 5 de acuerdo a la escala establecida (2.5-3 mm, 4-5 mm y 15-45 mm respectivamente), y el tumor en la fotografía del grupo EST+DEN+FeNTA representa un tamaño dos. Las características de todos los tumores obtenidos para ambos grupos se detallan en la tabla 15, en donde se puede observar que el tratamiento con EST disminuye la bilateralidad, el tamaño de los tumores e incidencia de CCR en el grupo tratado con EST, así mismo la metástasis presentada en el grupo EST+DEN+FeNTA (11.1%) fue menor a la presentada en el grupo DEN+FeNTA (46.15%).

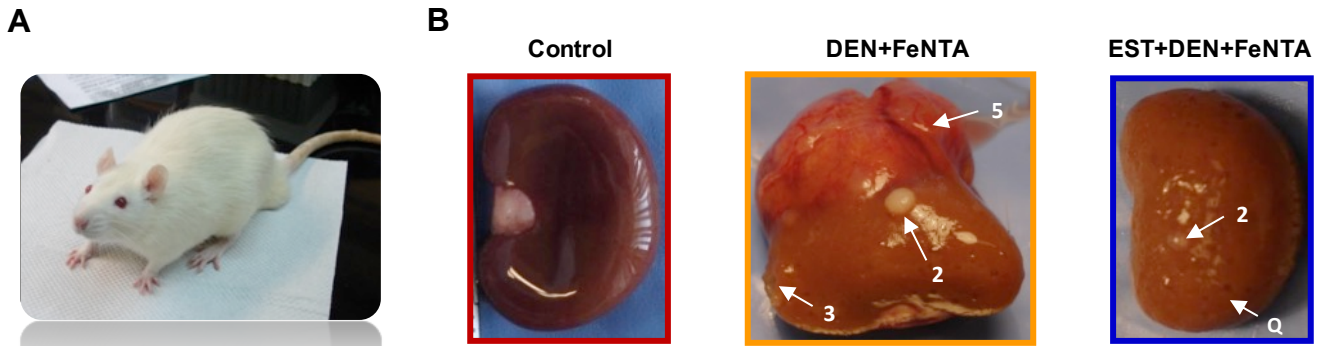


Figura 21. Fotografía de una rata que a pesar de que presentó tumores avanzados de CCR tiene una apariencia sana (Panel A) y fotografías representativas de los riñones al final del protocolo de carcinogénesis renal (Panel B). Los tumores de la fotografía del grupo DEN+FeNTA representan los tamaños 2, 3 y 5 (2.5-3 mm, 4-5 mm y 15-45 mm respectivamente) y el tumor de la fotografía del grupo EST+DEN+FeNTA representa el tamaño 2. La presencia de un mayor número de quistes en el grupo EST+DEN+FeNTA respecto a la presentada en el grupo DEN+FeNTA es evidente.

Tabla 15. Características de los tumores de carcinoma de células renales

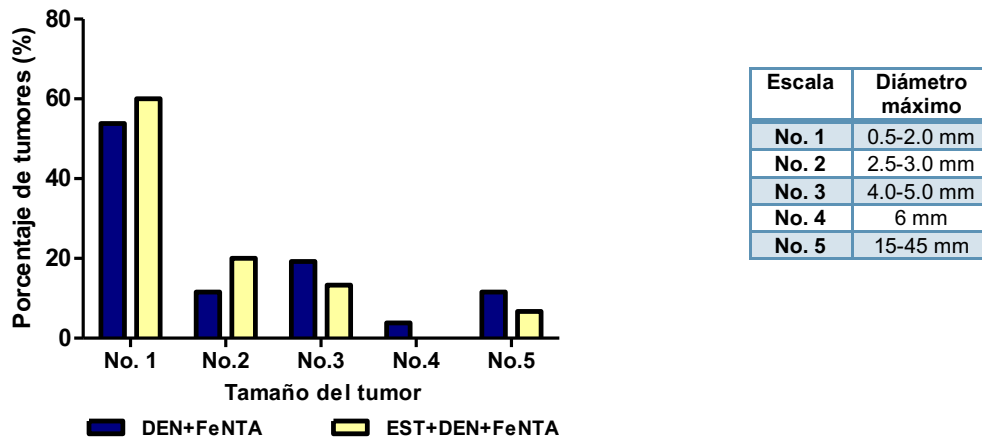
Identificación del animal	Número de tumores	Tamaño del tumor en mm (escala de tumor)		Metástasis
		Riñón izquierdo	Riñón derecho	
<b>DEN+FeNTA</b>				
1	1	4(3)		No detectada
2	1		2(1)	Pulmones
3	1		0.5(1)	Pulmones
4	4	45(5),3(2)	5(3),3(2)	Pulmones
5	4	3(2),4(3)	2.5(1),5(3)	Pulmones
6	2		3(2),6(4)	Pulmones
7	2	1(1)	3(2)	No detectada
8	3	1.5(1),1(1)	1.5(1)	No detectada
9	1	0.5(1)		No detectada
10	2	2(1)	2.5(2)	Pulmones
11	1		23(5)	No detectada
12	3	3(2),2.5(2)	2.5(3)	No detectada
13	1	11(5)		No detectada
<b>EST+DEN+FeNTA</b>				
14	1	2(1)		No detectada
15	1		1(1)	No detectada
16	2		1.5(1), 1(1)	No detectada
17	1		15(5)	No detectada
18	3	2.5(2)	3(2),1.5(1)	No detectada
19	1		2.5(2)	Pulmones
20	1	4(3)		No detectada
21	3	2.5(2), 2(1)	1(1)	No detectada
22	2	6(4)		No detectada

Para evaluar la incidencia de CCR se determinó la cantidad de animales con esta patología así como el número total de tumores en los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA. En la Tabla 16 se presentan estos resultados, además de la proporción de animales con tumores unilaterales o bilaterales. Como se puede apreciar, el EST disminuyó un 21% la incidencia de CCR considerando el número de animales con CCR en los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA. Asimismo, el EST disminuyó en un 27% el número total de tumores presentados, aunque, de acuerdo con la prueba estadística de Fisher, no hay diferencias significativas en ninguno de estos dos casos.

**Tabla 16. Incidencia de CCR**

Tratamiento	No. de animales tratados	No. de animales con CCR	No. de animales unilaterales	No. de animales bilaterales	No. total de tumores
<b>DEN+FeNTA</b>	19	13 (68.42%)	8 (61.54%)	5 (38.46%)	26
<b>EST+DEN+FeNTA</b>	19	9 (47.37%)	6 (66.67%)	3 (33.33%)	15

Además de la evaluación del efecto del EST sobre la incidencia de CCR, se determinó el tamaño del tumor como factor pronóstico de esta patología. En la Figura 22 se muestra el porcentaje de tumores que presentaron los diferentes tamaños con respecto al número total de tumores analizados en los grupos tratados con FeNTA. Respecto a este parámetro, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ) no obstante, el EST parece disminuir la progresión del CCR ya que el porcentaje de tumores con tamaños más grandes (3, 4 y 5) fue mayor en el grupo DEN+FeNTA que el presentado en el grupo EST+DEN+FeNTA.



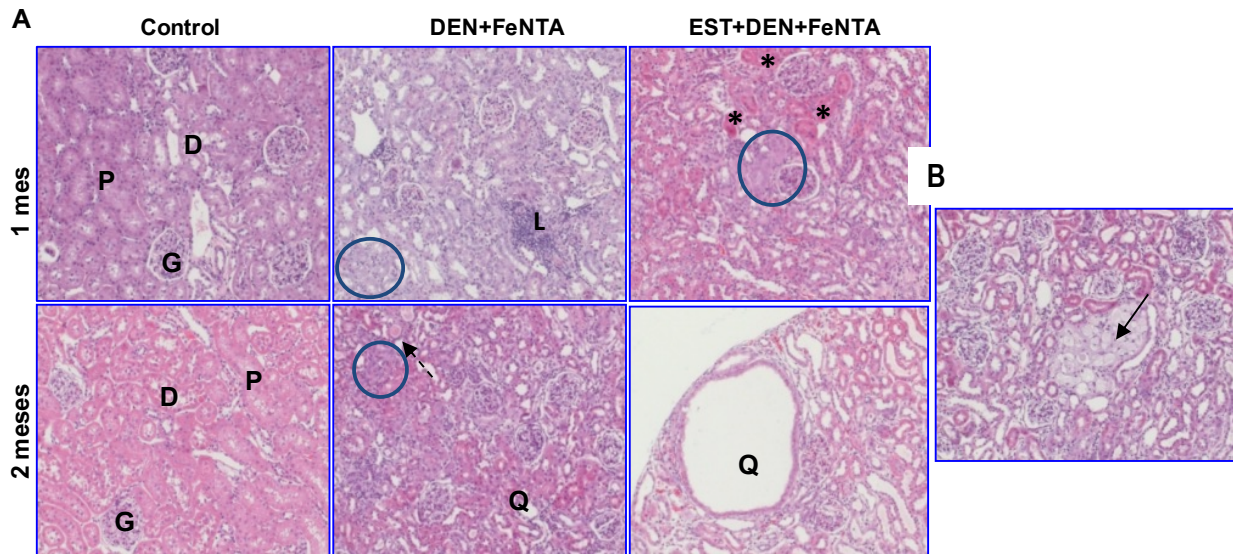
**Figura 22. Efecto del EST sobre el tamaño de los tumores de CCR.** Las barras representan el porcentaje de tumores con los diferentes tamaños en escala del 1 al 5 con respecto a los tumores totales donde el número 1 representa el tumor más pequeño y el número 5 representa el tumor más grande. El tratamiento con el EST tiende a disminuir la proporción de tumores con tamaños más avanzados.

### 5.3.3. Análisis histológicos

En la figura 23 se muestran imágenes representativas de los análisis histológicos del tejido renal obtenido después de uno y dos meses de tratamiento con FeNTA (Panel A). En las imágenes de los grupos control de ambos tiempos de estudio se pueden apreciar las estructuras histológicas características de la corteza renal:

glomérulos y túbulos proximales y distales. En cambio, en las muestras de los grupos tratados con DEN y FeNTA se observan alteraciones histológicas como la infiltración de linfocitos que evidencía una respuesta inflamatoria y displasia de origen multicéntrico o multifocal en los túbulos proximales. Los túbulos con displasia a diferencia de los sanos, se caracterizan porque sus paredes están constituidas por varias capas de células las cuales presentan agrandamiento del núcleo, nucléolo prominente en algunos casos e irregularidad en la envoltura nuclear, y esta atrofia en las estructuras típicas del riñón fue mayor después de dos meses de exposición al carcinógeno que a un mes. Además, a los dos meses ya se observaron signos de proteinuria así como el desarrollo de quistes, los cuales pueden identificarse por tener una dilatación marcada del espacio glomerular o tubular y sin ninguna estructura en su interior. Por otro lado, a pesar de que a nivel macroscópico no se evidenciaron tumores, con los análisis histológicos se detectó la presencia de tejido tumoral en una de las muestras de una rata expuesta durante dos meses a FeNTA que se distingue claramente en el panel B de la Figura 23, y cuyas características se detallan más adelante. Bahnemann y cols. (1998) también encontraron lesiones histológicas al primer mes de tratamiento con FeNTA, no obstante, estos autores describen hiperplasia en los túbulos proximales en vez de displasia, y esta discrepancia podría deberse a que en ese trabajo se utilizó un esquema de tratamiento con FeNTA diferente al nuestro y no se administró el DEN. Por otro lado, en el grupo tratado con EST (EST+DEN+FeNTA) se observó una mayor proporción de túbulos proximales sanos (29%) ( $p < 0.0022$ ) como indicio de que no han cedido al daño por el tratamiento carcinogénico y una menor incidencia de displasia lo que pone de manifiesto la protección del EST contra el daño por FeNTA, aunque no lo previene totalmente. Los resultados obtenidos dan una idea del tiempo en que las lesiones pre-neoplásicas comienzan a presentarse y sugieren que la exposición a FeNTA durante 1 y 2 meses representan diferentes etapas tempranas del proceso carcinogénico, por lo que el análisis de alteraciones moleculares a estos tiempos puede ser útil para identificar mecanismos involucrados en la malignización de las células renales en este modelo experimental y que puede ser razonable estudiar tiempos aún más cortos para identificar los eventos iniciales que conducen a la carcinogénesis. En conjunto, estos hallazgos resultan relevantes ya que la identificación de los tiempos necesarios de exposición al carcinógeno donde comienzan a presentarse lesiones pre-neoplásicas y las alteraciones histológicas inducidas en estas etapas nunca habían sido descritas, y es prácticamente imposible realizar este tipo de estudios en el humano ya que el CCR comúnmente se diagnostica en etapas avanzadas.

Por otra parte, la presencia de quistes al segundo mes de tratamiento nos hace cuestionar su posible papel en el desarrollo del cáncer. Algunas evidencias sugieren que el CCR ocasionalmente proviene de las células que forman la pared de los quistes (Taide, *et al.*, 1993; Montani, *et al.*, 2010); por ejemplo, se han identificado factores de crecimiento y citocinas como EGF y EPO en los quistes que se presentan en los pacientes (Taide, *et al.*, 1993; Lee, *et al.*, 2005). Por el contrario, otras evidencias apuntan a que los quistes son parte de un cambio benigno, cuya etiología difiere de los eventos que conducen al cáncer (Lin, *et al.*, 2008). De acuerdo con nuestros resultados, la displasia, que sí es una lesión preneoplásica, se detectó desde el primer mes de tratamiento con FeNTA, y no se observaron quistes hasta los dos meses, lo que podría sugerir que estos últimos no son precursores de las alteraciones que conducen al desarrollo de CCR.

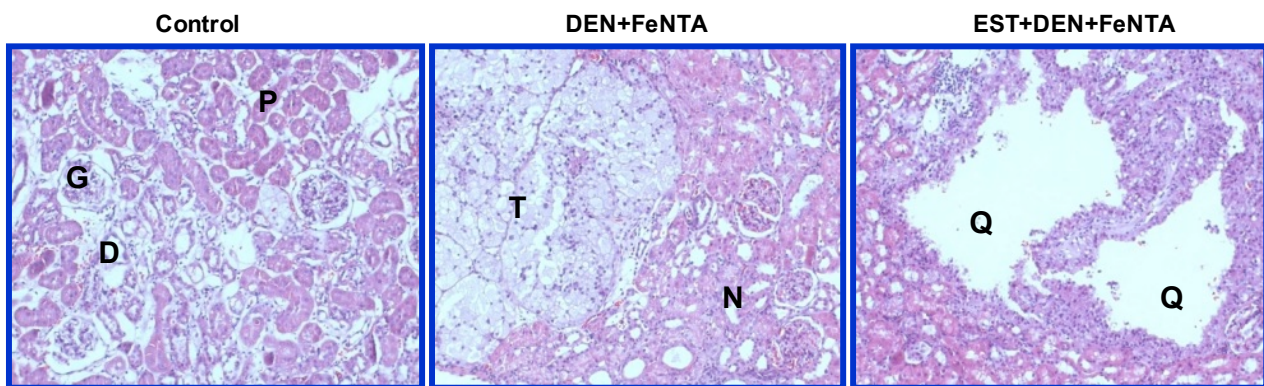


**Figura 23. Alteraciones histológicas después de 1 mes y 2 meses de tratamiento con FeNTA y efecto del EST.** Fotomicrografías representativas de tejido renal de los grupos control, DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA. En el Panel A se aprecia que al primer mes el grupo DEN+FeNTA presenta displasia de origen multifocal en los túbulos proximales (círculo) e infiltración de linfocitos (L). El tratamiento con EST indujo protección parcial debido a que se observó una mayor proporción de túbulos no dañados (\*), sin embargo no es capaz de inhibir totalmente la displasia presentada a los 2 meses de tratamiento con FeNTA. En el grupo DEN+FeNTA se encontró mayor atrofia en las estructuras típicas del riñón, la displasia fue más evidente y la proteinuria (flecha punteada) y los quistes renales (Q) comenzaron a aparecer. En el Panel B se presenta una micrografía de carcinoma de células renales de células claras (CCRcc) encontrado en una muestra obtenida al segundo mes de tratamiento con FeNTA (flecha sólida). (H&E, 400X). G=glomérulo, P = túbulo proximal, D= túbulo distal. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

En cuanto a los hallazgos histológicos al final del protocolo de carcinogénesis, en la figura 24 se muestran fotomicrografías representativas donde se puede observar una apariencia normal del tejido renal en el grupo control, en cambio en el grupo DEN+FeNTA es evidente la presencia de tejido tumoral (T) con una estructura totalmente diferente a la del tejido renal normal adyacente (N). Asimismo, en los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA se observaron quistes renales (Q), al igual que en las muestras de 2 meses de tratamiento con el carcinógeno. Los quistes presentados en esta etapa final fueron más grandes que aquellos en etapas tempranas. Así mismo, se encontró una mayor proporción de quistes en el grupo EST+DEN+FeNTA (3:1) respecto al grupo DEN+FeNTA ( $p < 0.0025$ ) y una menor incidencia de cáncer en los riñones del grupo tratado con EST+DEN+FeNTA que en aquellos del grupo DEN+FeNTA, lo cual sugiere que el EST probablemente está induciendo vías de señalización que conducen a la formación del quiste evitando o retardando así el desarrollo de cáncer y apoya la hipótesis de que los quistes representan más bien lesiones benignas como se discutió anteriormente.

La determinación del subtipo histológico es básica como primer paso en la caracterización del modelo, ya que existen algunas discrepancias en la literatura al respecto. Los resultados de los análisis histológicos de los tumores obtenidos en el presente trabajo mostraron que el subtipo histológico fue de células claras en todos los casos. De hecho, la masa tumoral observada en una de las muestras después de dos meses de exposición a FeNTA también corresponde al subtipo histológico de células claras. Toyokuni y cols. (1998) reportaron que los tumores con histología del subtipo de células claras eran raros en el modelo, y que cuando se presentaban, el

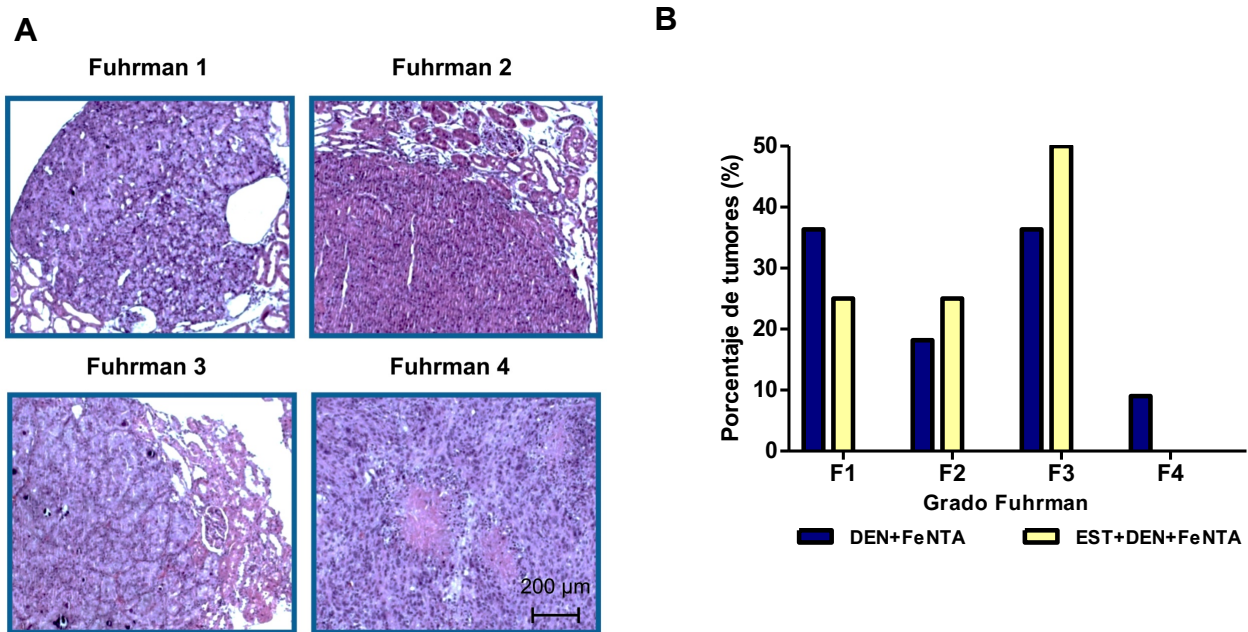
17.6% de los tumores que estudiaron se encontraba mezclado con un subtipo de morfología granular. Otro estudio de histopatología en tumores de cáncer renal inducidos con DEN+FeNTA revelaron adenocarcinoma con un patrón de crecimiento acinar o papilar en el 40% de los animales (Athar *et al.*, 1998). De acuerdo con la clasificación de los subtipos histológicos (OMS, 2004; UICC/AJCC), la morfología granular encontrada por Toyokuni (1998) podría corresponder al subtipo cromóforo, en cambio, el patrón de crecimiento papilar encontrado en los estudios por Athar (1998) correspondería al subtipo papilar, y el acinar al subtipo de células claras. La diferencia entre nuestros resultados y aquéllos publicados por otros autores puede deberse a que en esa época la clasificación histológica no estaba totalmente definida. Por esta razón se consideró importante reevaluar el subtipo de CCR en los tumores inducidos por DEN+FeNTA de acuerdo a la clasificación actual. La gran similitud en la apariencia histológica entre los tumores obtenidos experimentalmente y los del humano sugiere que probablemente estén implicadas las mismas alteraciones moleculares. Esto también puede fundamentarse por el hecho de que el CCR hereditario y esporádico con el mismo subtipo histológico comparten las mismas alteraciones histológicas y moleculares, aunque su etiología es diferente (Foster, *et al.*, 1994; Gnarra, *et al.*, 1994).



**Figura 24. Análisis histológicos de los tumores obtenidos al final del protocolo de carcinogénesis renal.** Microfotografías representativas donde se puede apreciar la arquitectura histológica normal en el grupo control, tejido tumoral en el grupo DEN+FeNTA y quistes renales en el grupo EST+DEN+FeNTA. El subtipo histológico de CCR fue de células claras en todos los casos. La apariencia microscópica de los grupos EST o DEN fue similar a la del grupo control (datos no mostrados). G, glomérulo. P, túbulo proximal. D, túbulo distal. N, tejido normal. T, tejido tumoral. Q, quistes renales. Tinción H&E (100X). Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

Además de la determinación del subtipo histológico, se evaluó el grado de avance de los tumores utilizando el criterio de grado nuclear propuesto por Fuhrman y descrito en la sección 4.1.3. (Thomas, *et al.*, 2008). En la Figura 25, se muestran imágenes histológicas representativas de los tumores con diferentes grados Fuhrman del grupo DEN+FeNTA (Panel A), así como la gráfica del porcentaje de tumores de cada grado respecto al número total de tumores analizados en los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA (Panel B). Como se puede observar, en el grupo DEN+FeNTA se obtuvieron tumores con grados Fuhrman F1 a F4 mientras que el grupo EST+DEN+FeNTA solo presentó tumores hasta grado F3, lo que sugiere que el EST retarda la progresión del CCR.

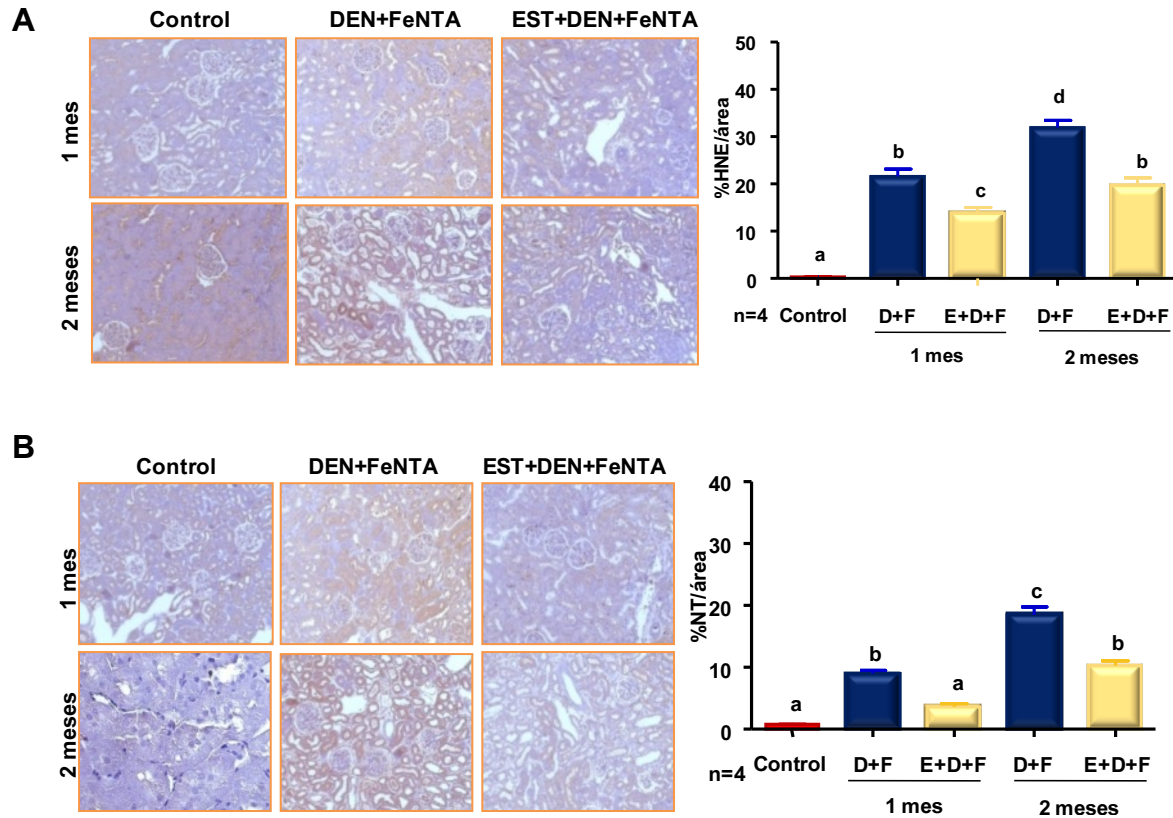




**Figura 25. Efecto del extracto sobre el grado Fuhrman presentado en los tumores obtenidos al final del protocolo de carcinogénesis renal.** Panel A. Fotomicrografías representativas de los diferentes grados Fuhrman en los tumores obtenidos en el grupo DEN+FeNTA. Tinción H&E (100X). Panel B. Porcentaje de tumores con los diferentes grados Fuhrman presentados en los grupos de estudio DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA. En el grupo DEN+FeNTA se obtuvieron tumores con grado Fuhrman 1-4 y con el tratamiento con el EST sólo se obtuvieron tumores hasta el grado Fuhrman 3. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

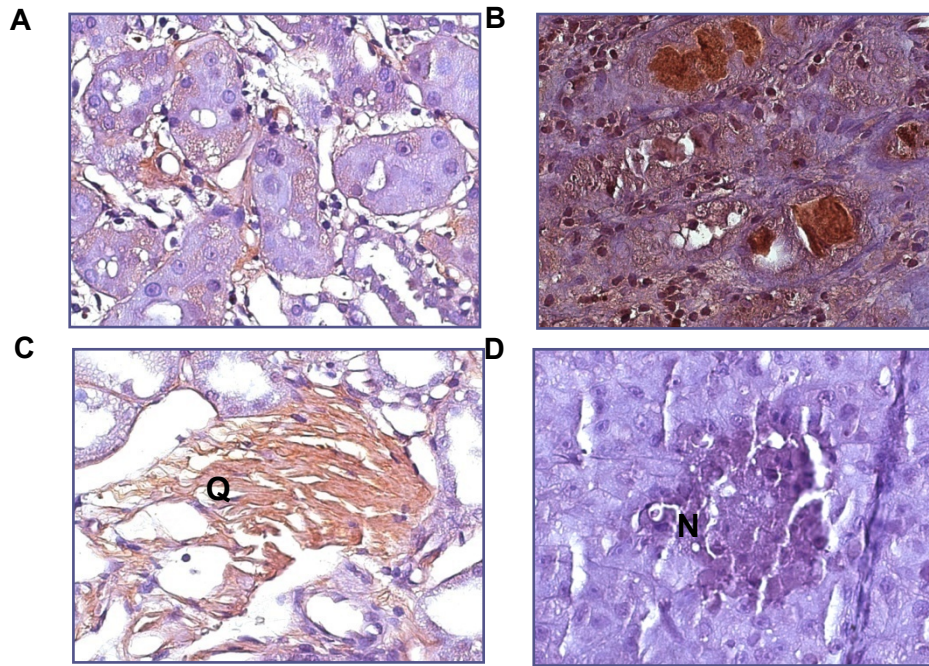
### 5.3.4 Evaluación de marcadores de estrés oxidante por inmunohistoquímica

Dado que en el protocolo de nefrotoxicidad aguda no se encontraron cambios en los niveles renales de marcadores de estrés oxidante por técnicas espectrofotométricas, se decidió evaluar los niveles de 4-HNE y 3-NT en tejido renal mediante IHQ para determinar la extensión de la peroxidación lipídica y oxidación de proteínas respectivamente. En la figura 26 se muestran fotomicrografías representativas así como las gráficas de la cuantificación de 4-HNE mostrando su distribución en tejido tumoral (Paneles A y B) y 3-NT (panel B) en muestras obtenidas después de uno y dos meses de tratamiento con FeNTA. En el grupo tratado con DEN+FeNTA se presentó un incremento significativo en ambos marcadores a los dos tiempos, sin embargo, el estrés oxidante generado a los dos meses fue mayor que el presentado a un mes. En ambos casos el tratamiento con EST (grupo EST+DEN+FeNTA) disminuyó el daño oxidativo de manera parcial, lo que coincide con estudios previos de nuestro laboratorio, donde se vió que el EST disminuye de manera significativa aunque parcialmente los niveles renales de malondialdehído (MDA) una hora después de una de las administraciones de FeNTA (Vargas-Olvera, 2009).

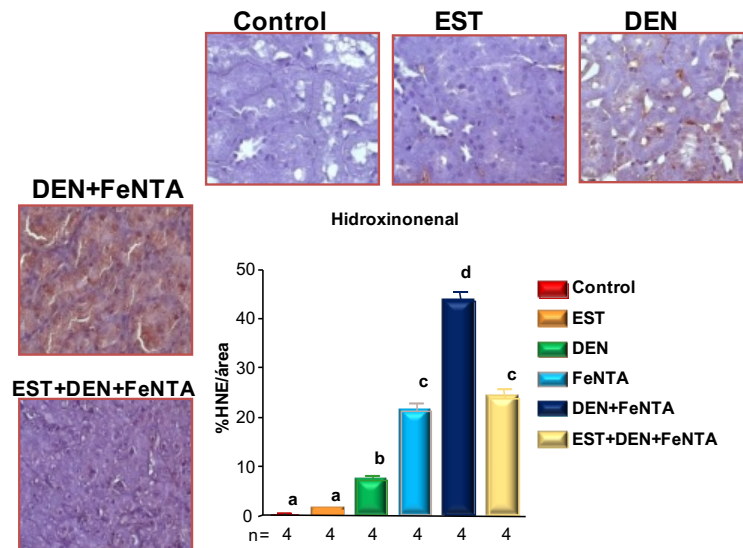


**Figura 26. Inmunohistoquímica de marcadores de daño por estrés oxidante a lípidos y proteínas en muestras de tejido renal después de 1 mes y 2 meses de tratamiento con FeNTA.** La tinción positiva de 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Panel A) y nitrotirosina (3-NT) (Panel B) se observa en café en las fotomicrografías (400X). El tratamiento con DEN+FeNTA incrementa los niveles de ambos marcadores respecto al grupo control y el pre-tratamiento con EST lo disminuye significativamente para ambos meses. Se analizaron cuatro campos por riñón y los resultados se expresan como porcentaje de área teñida respecto al total del área analizada. Las columnas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ). Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar

La presencia de los marcadores de estrés oxidante también se evaluó en muestras obtenidas al término del protocolo de desarrollo de cáncer renal. En la figura 27 se muestran imágenes representativas de la IHQ de 4-HNE mostrando su distribución en tejido tumoral (Páneos A y B), tejido con quiste renal en formación (Panel C) y tejido con necrosis (Panel D). En el tejido tumoral, la tinción positiva se encontró tanto en el núcleo como en el citoplasma (Panel A), y esta tinción fue más intensa en tumores con mayor grado de avance (Panel B). En áreas de formación de quistes también se presentaron aductos de 4-HNE, sin embargo, en áreas de necrosis su presencia fue prácticamente nula. Por otro lado, en la figura 28 se muestran fotomicrografías representativas de la IHQ en tejido renal de los diferentes grupos estudiados así como la gráfica de la cuantificación. Los resultados muestran una elevación clara de los niveles de este marcador en el tejido tumoral respecto al grupo control, y que el tratamiento con EST disminuye significativamente el daño oxidativo. Así mismo, se puede ver que el EST *per se* no generó estrés oxidante y que en los grupos DEN y FeNTA sí se observa este marcador pero muy moderadamente.

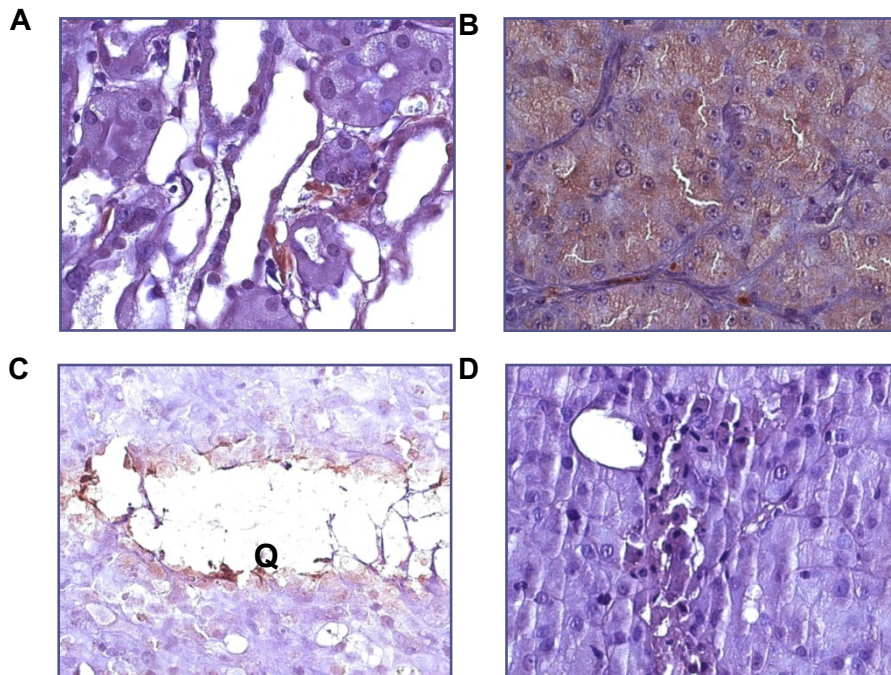


**Figura 27. Inmunohistoquímica de 4-hidroxinonal (4-HNE) en diferentes lesiones de muestras obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal.** La tinción positiva se observa en café (400X). Tejido tumoral (A y B), tejido con quiste renal en formación (C), tejido con necrosis (D). El 4-HNE en tejido tumoral puede observarse en el núcleo, áreas adyacentes a la membrana celular y en el citoplasma. En áreas de formación de quistes (Q) también se presentaron aductos de 4-HNE y en áreas de necrosis (N) su presencia fue prácticamente nula. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

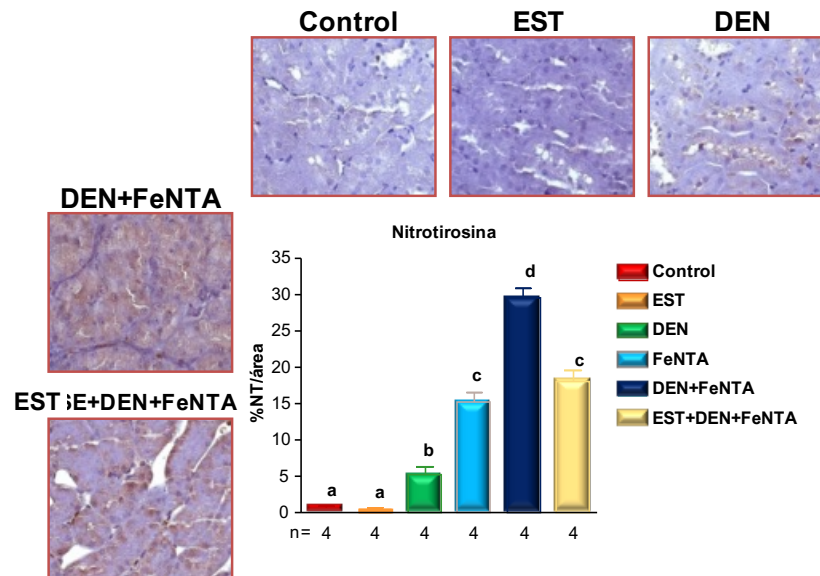


**Figura 28. Cuantificación de 4-hidroxinonal (4-HNE) en todos los grupos estudiados al término del protocolo de carcinogénesis renal.** Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica de HNE (en color café) en cada grupo de estudio (400X). La tinción de 4-HNE en el EST es similar a la presentada en el grupo control, el grupo tratado con DEN muestra estrés oxidante moderado y el tratamiento con DEN+FeNTA induce estrés oxidante notable y el pre-tratamiento con EST lo disminuye significativamente. Las barras representan la media ± EE del porcentaje de tinción en 4 campos microscópicos representativos. Columnas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ). Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

Los resultados de la IHQ de 3-NT, marcador de daño a proteínas por estrés oxidante, al final del protocolo de carcinogénesis se presentan en las figuras 29 y 30. La distribución tisular se puede apreciar en la figura 29 donde se muestran fotomicrografías representativas de tejido tumoral (Imágenes A y B), tejido con quiste (Imagen C) y tejido con necrosis (Imagen D). En el tejido tumoral, la tinción de nitrotirosina predominó en el citoplasma, y, al igual que con 4-HNE, esta tinción se incrementó en tumores con mayor grado de avance (Imagen B). En los quistes, la tinción positiva se presentó en la periferia (Imagen C), y en áreas de necrosis la tinción fue mínima (Imagen D). Los niveles de nitrotirosina en los diferentes grupos de estudio, presentados en la Figura 30, tuvieron un comportamiento similar a los obtenidos para 4-HNE. Estos resultados coinciden con lo reportado en CCR humano en donde se ha demostrado la presencia de nitrotirosina en tejido tumoral la cual correlaciona con el grado Fuhrman (Soini, 2006), y en el presente trabajo los niveles de 4-HNE y 3-NT mostraron una correlación directa con el tamaño del tumor en el 65% de las muestras, y en una menor proporción de las muestras se encontró correlación con el grado Fuhrman (aproximadamente un 30%).



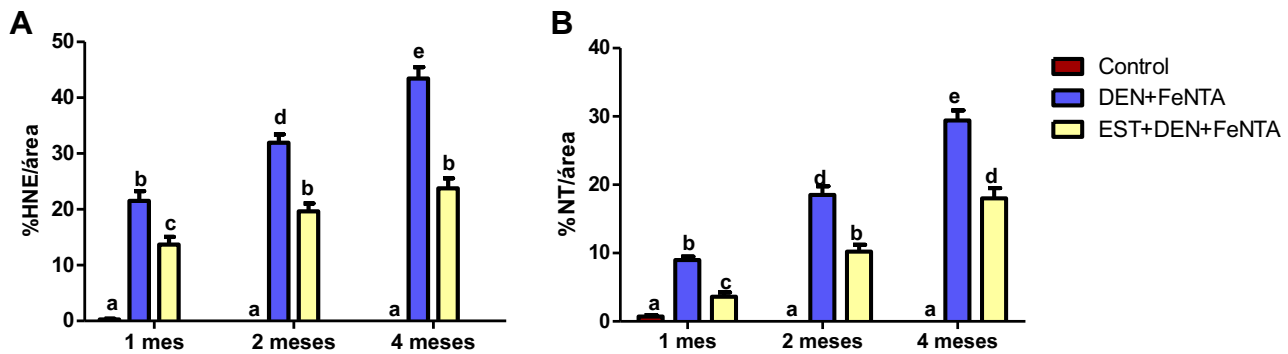
**Figura 29. Inmunohistoquímica de nitrotirosina (3-NT) en muestras con diferentes lesiones obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal.** La tinción positiva de 3-NT se observa en café en las fotomicrografías (400X). Tejido tumoral (A y B), tejido con quiste renal en formación (C), tejido con necrosis (D). La nitrotirosina en tejido tumoral puede observarse en el núcleo, áreas adyacentes a la membrana celular y en el citoplasma. En áreas de formación de quistes también se presentaron nitrotirosina en la periferia del quiste y en áreas de necrosis su presencia fue prácticamente nula. Q: Quiste. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.



**Figura 30. Cuantificación de 3-nitrotirosina (3-NT) en todos los grupos estudiados al término del protocolo de carcinogénesis renal.** Fotomicrografías representativas de la inmunohistoquímica de 3-NT (en color café) en cada grupo de estudio (400X). La tinción de 3-NT en el EST es similar a la presentada en el grupo control, el grupo tratado con DEN muestra estrés oxidante moderado y el tratamiento con DEN+FeNTA induce estrés oxidante notable y el pre-tratamiento con EST lo disminuye significativamente. Las barras representan la media  $\pm$  EE del porcentaje de tinción en 4 campos microscópicos representativos. Las columnas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ). Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

Interesantemente, los niveles de estrés oxidante en los diferentes tiempos estudiados en los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA, aumentan gradualmente conforme avanza el desarrollo del protocolo de inducción de cáncer renal (Figura 31); sin embargo, si consideramos que las muestras obtenidas al final del protocolo pertenecen a ratas que no recibieron el carcinógeno durante los dos últimos meses, parece que el estrés oxidante no sólo es generado por el FeNTA per se, sino que también podría originarse por eventos intrínsecos del metabolismo de las células malignas. De hecho, se ha demostrado que cambios pequeños en los niveles de estrés oxidante pueden estimular vías de señalización como la inducción de factores de crecimiento o del factor inducible por hipoxia, y de esta forma promover el desarrollo tumoral. En estudios previos realizados en CCR humano se ha sugerido que los tumores con un metabolismo alto presentan marcadores de estrés oxidante (Kinula, *et al.*, 2004; Soini, *et al.*, 2006).

Entonces, la disminución en la incidencia de CCR por el tratamiento con EST podría atribuirse a la protección parcial que ejerce éste contra el estrés oxidante producido por FeNTA lo cual está soportado por el hecho de que los factores de riesgo como la obesidad, hipertensión y tabaquismo están relacionados con la inducción de estrés oxidante (Ferlay, *et al.*, 2006). Por lo tanto, se podrían evaluar diferentes dosis de EST para determinar si se puede lograr una mayor protección contra el daño por oxidación producido por el carcinógeno, y en consecuencia una mayor disminución en la incidencia de CCR. Por otro lado, cabe enfatizar que se requieren estudios para identificar qué compuestos están presentes, cuáles son los que tienen mayor efecto o si una combinación particular de éstos pudiera tener mayor efecto benéfico.



**Figura 31. Cuantificación de marcadores de daño de estrés oxidante a lípidos y proteínas durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal. 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Panel A) y 3-nitrotirosina (3-NT) (Panel B).** En el grupo DEN+FeNTA se observa un aumento gradual del estrés oxidante durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal para ambos marcadores. El pre-tratamiento con EST disminuye los niveles de estos marcadores respecto al grupo DEN+FeNTA a los diferentes tiempos de manera parcial. Las barras representan la media  $\pm$  EE del porcentaje de tinción en 4 campos microscópicos representativos. Columnas con letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

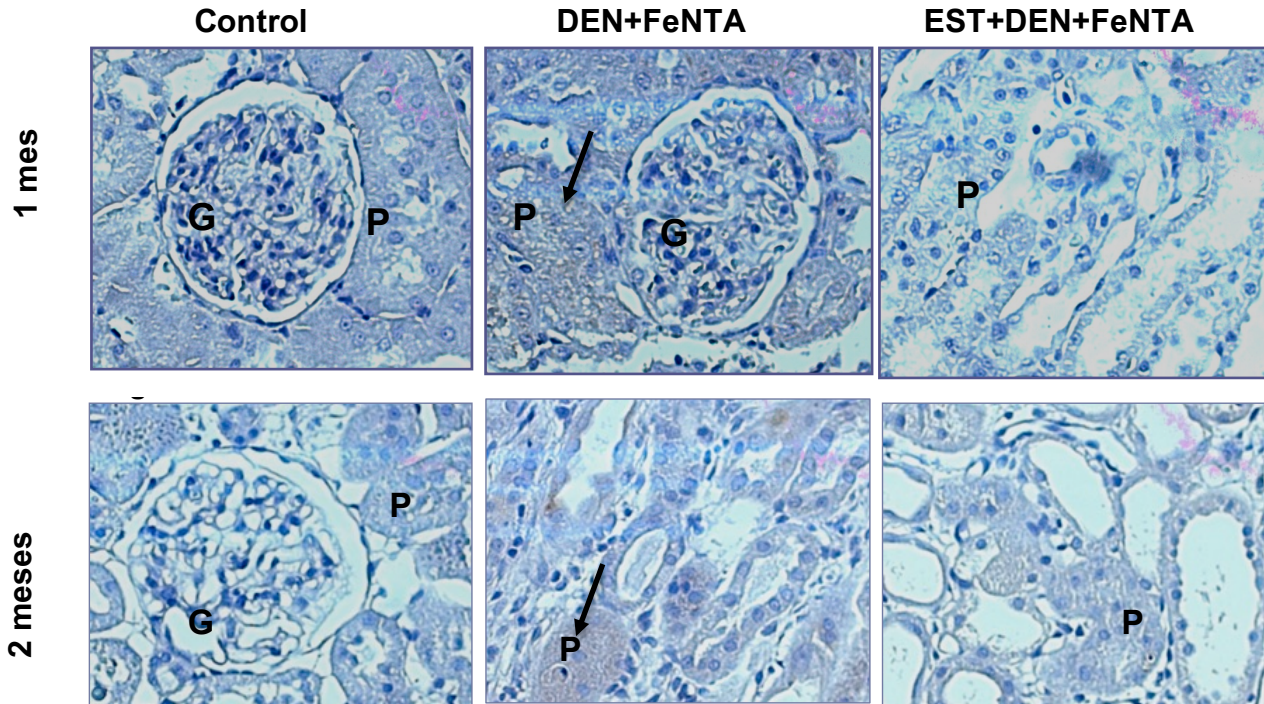
## 5.4 Marcadores moleculares de CCRcc

### 5.4.1 Evaluación de la proteína von Hippel-Lindau (pVHL)

Una de las alteraciones más comunes del CCRcc en el humano es la pérdida de la función de la proteína supresora de tumores pVHL (70-80%) (Patrick, *et al.*, 2007). En el presente trabajo el comportamiento de esta proteína se determinó tanto en etapas tempranas del modelo como en los tumores obtenidos al final del protocolo experimental. En la figura 32 se muestran imágenes representativas de la IHQ en tejido renal de etapas tempranas. En los grupos control no se observó la presencia de la proteína y en los grupos tratados con DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA se detectó sólo en una o dos de las muestras analizadas, observándose predominantemente en el citoplasma de las células de los túbulos proximales y en el 10% del área total analizada. Con base en estos resultados se puede decir que no hay cambios en la expresión de pVHL en los grupos tratados con FeNTA durante 1 y 2 meses, en las que tampoco se observaron cambios en esta proteína por la técnica de western blot (datos aún no publicados). La tinción predominantemente citoplasmática en las células epiteliales tubulares y la ausencia de ésta en los glomérulos en las escasas muestras que presentaron tinción positiva coincide con los reportes en el humano (Shiao, *et al.*, 2003), sin embargo, es importante hacer notar que una menor proporción de túbulos presentaron tinción positiva en las muestras de rata con respecto a lo que se observa en el humano. Asimismo, nuestros resultados concuerdan con otro estudio en el que se reporta que la expresión de pVHL está presente en sólo 5% de las células, principalmente de los túbulos proximales en el riñón de rata (Shiao, *et al.*, 2000).

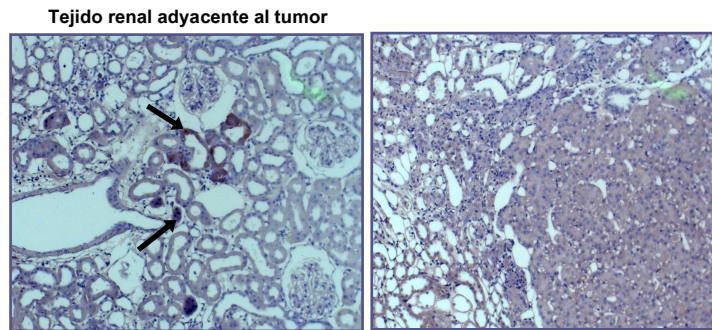
En la figura 33, se muestran fotografías representativas del comportamiento de pVHL en las muestras obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal. En tejido renal adyacente al tumor se observó la presencia de pVHL en los túbulos proximales y distales, en cambio, en tejido tumoral no se observó tinción en ninguna de las muestras analizadas. Este comportamiento coincide con los reportes de CCR humano donde se observa una regulación notoria a la baja de pVHL (Shiao, *et al.*, 2003). Los tumores que presentan mutaciones en el gen de

VHL inducen la producción de la proteína VHL truncada, por lo que la ausencia de tinción en las muestras obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal puede ser resultado del pobre reconocimiento de la proteína por el anticuerpo, que realmente haya ausencia de pVHL en los tumores sugiriendo que estos ya presentan mutaciones en el gen o por regulación negativa epigenética (Pantuck, *et al.*, 2003).



**Figura 32. Inmunohistoquímica de pVHL en muestras de tejido renal después de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA.** La tinción de pVHL se aprecia en color café en las fotomicrografías (400X). En los grupos control no se observó expresión de pVHL. En los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA se encontró tinción en los túbulos proximales, la cual fue escasa y presente sólo en una o dos muestras del número total analizado. Las flechas indican las áreas de tinción positiva en los túbulos proximales. G: glomérulo P: túbulo proximal. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

En otro estudio, en el que se les administró N-nitrosodimetilamina a las ratas, una nitrosamina análoga al iniciador que utilizamos en el presente trabajo, se reportaron mutaciones en el gen de VHL y los tumores inducidos presentaban histología de células claras. Previamente, Toyokuni y cols. (1998) reportaron la ausencia de mutaciones en el gen de VHL en las muestras de tumores que analizaron en el modelo carcinogénesis renal con FeNTA, no obstante, a diferencia de nuestro protocolo estos investigadores no utilizaron la DEN como iniciador, más aún en los tumores que se indujeron con ese modelo la histología de células claras fue poco frecuente. Se podría pensar que el inductor de mutaciones en VHL en este modelo sea la DEN; de hecho, se sabe que uno de los principales factores de riesgo en el CCR esporádico en el humano es el tabaquismo, cuyo efecto carcinogénico se ha demostrado que se debe en parte a las nitrosaminas presentes en el humo del tabaco (Hard, *et al.*, 1990), sin embargo, aún no se ha encontrado una correlación directa entre el tabaquismo y la presencia de mutaciones en el gen de VHL en el humano (Dijk, *et al.*, 2006).



**Figura 33. Inmunohistoquímica de pVHL en muestras de tejido renal obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal.** La tinción de pVHL se aprecia en color café en las fotomicrografías (400X). En tejido renal adyacente al tumor entre 5-10% de los túbulos proximales analizados presentaron tinción positiva. En tejido tumoral no se detectó la presencia de pVHL, únicamente en la periferia del tumor (flechas) AD: Tejido adyacente, T: Tejido tumoral. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

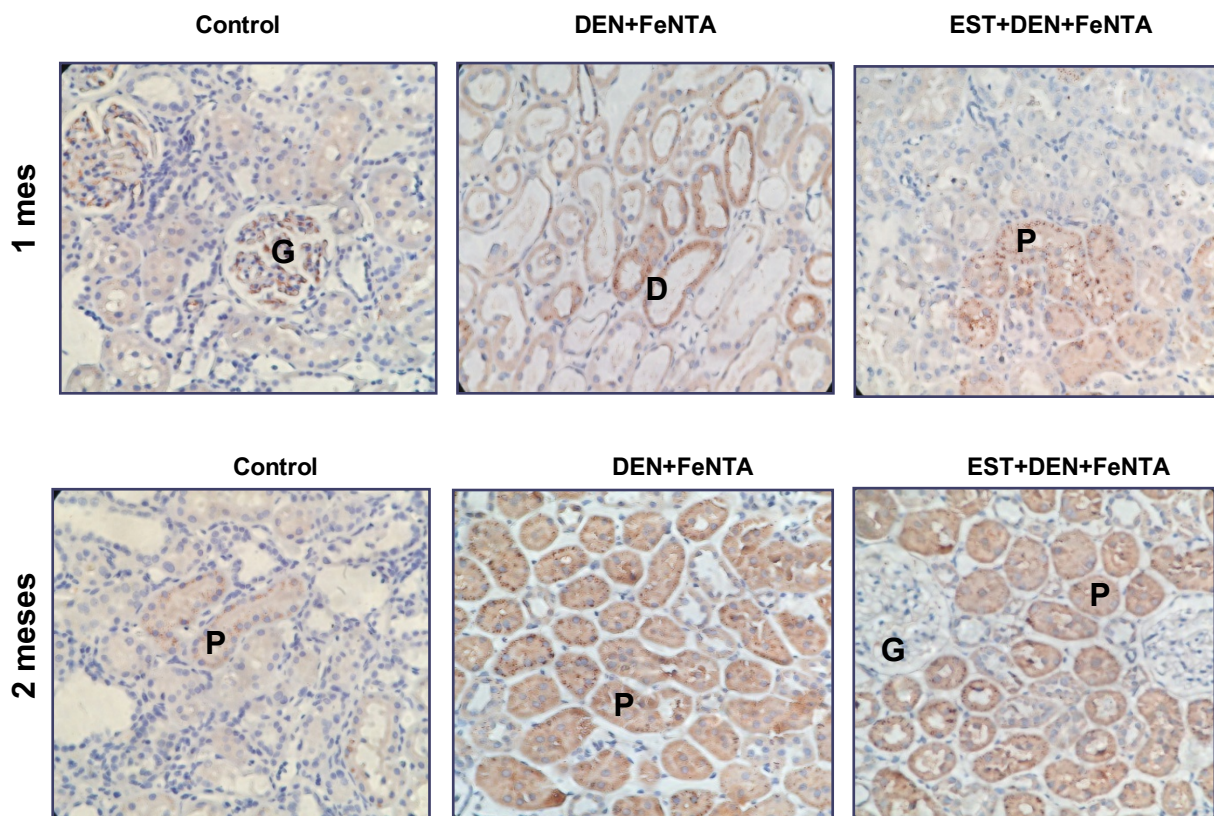
Por otro lado, como ya se mencionó anteriormente, tanto en los pacientes con CCR como en el modelo experimental, se presentan un gran número de quistes renales, los cuales, de acuerdo con los resultados obtenidos se sugiere que no son lesiones precursoras del desarrollo del CCR, ya que estos se manifestaron después del desarrollo de displasia. De hecho, los cientos de quistes renales que los pacientes frecuentemente albergan, sólo unos pocos llegan a ser carcinomas renales malignos (Mandriota, *et al.*, 2002; Montani, *et al.*, 2010). Al respecto, se ha propuesto que la relación de VHL con el desarrollo de estos quistes en este escenario refleja la pérdida estocástica del alelo remanente de VHL tipo salvaje, sugiriendo que la inactivación bialélica es suficiente para causar quistes pero no CCRcc. Esto último requiere presumiblemente la acumulación de mutaciones adicionales que afectan genes diferentes a los de VHL. En este contexto, se han documentado cambios cromosomales recurrentes tanto en el CCRcc hereditario como en el esporádico incluyendo la pérdida del cromosoma 14q y la ganancia del cromosoma 5q (Pei, *et al.*, 2010; Klatte, *et al.*, 2009; Chen, *et al.*, 2009; Beroukhim, *et al.*, 2009; Yoshimoto, *et al.*, 2007).

#### 5.4.2 Evaluación del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ y HIF-2 $\alpha$ )

HIF es un factor transcripcional que está relacionado con la expresión de varios genes que se han vinculado con el desarrollo de CCR. En este trabajo se decidió analizar ambas isoformas de HIF debido a que se ha sugerido en diversos estudios que tanto su regulación como su participación en la expresión de algunos genes es diferente (Hu *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003). En el caso de HIF-1 $\alpha$  se ha demostrado que en líneas de CCR induce la sobreexpresión de genes que codifican enzimas que participan en el metabolismo energético, como hexocinasa, lactato deshidrogenasa, y aldolasa, entre otras (Hu *et al.*, 2003); esto confiere a las células la ventaja de tener un metabolismo típico de “glucólisis aeróbica” (efecto Warburg) y obtener la energía necesaria para realizar diferentes procesos celulares. En el caso de HIF-2 $\alpha$ , se ha demostrado que regula genes que no regula HIF-1 $\alpha$ , entre los que destacan el de TGF- $\alpha$ , el de ciclina D1 y el de EPO (Gunaratnam *et al.*, 2003; Raval *et al.*, 2005; Scortegagna *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2007; Rankin *et al.*, 2007).



En el presente trabajo, no se logró identificar la presencia de HIF-1 $\alpha$  en las muestras de riñón mediante la técnica de IHQ en ninguno de los grupos y tiempos estudiados, en cambio, HIF-2 $\alpha$  sí se detectó en todas las etapas del desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal analizadas. En la Figura 34 se pueden apreciar fotografías representativas de la IHQ de HIF-2 $\alpha$  de tejido renal obtenido después de uno y dos meses de tratamiento con FeNTA. Al primer mes, el grupo control presentó tinción escasa en la mayor parte de las estructuras del riñón y en los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA se observó un ligero aumento; el cual fue más notorio a los dos meses. Estos resultados concuerdan con la cuantificación de HIF-2 $\alpha$  por Western blot realizada de manera paralela en el laboratorio, en donde se pudo apreciar que no existen cambios en los niveles de esta subunidad en ninguno de los grupos de estudio después de un mes de tratamiento con FeNTA, en cambio, a los dos meses se encontró un aumento significativo en los grupos tratados con FeNTA, y que el EST no protege significativamente en ninguno de estos tiempos (Curiel-Muñiz, 2014).



**Figura 34. Inmunohistoquímica de HIF-2 $\alpha$  en muestras de tejido renal después de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA.** La tinción de HIF-2 $\alpha$  se puede apreciar en las fotomicrografías en color café (400X). Los niveles de HIF-2 $\alpha$  incrementan notoriamente a los dos meses respecto al grupo control, las muestras con el pre-tratamiento con EST presentan un comportamiento similar al observado con DEN+FeNTA para ambos meses. G, Glomérulo. P, Túbulo proximal. D, Túbulo Distal. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

Resulta interesante hacer notar que una de las alteraciones moleculares que se presenta con mayor frecuencia en tumores de CCR de células claras, es la pérdida de la función de la proteína VHL (70-80%) (Patrick et al., 2007), que es la principal reguladora de la degradación de HIF en condiciones de normoxia (Iwai et al., 1999). Esta pérdida de la función de VHL está asociada a mutaciones o silenciamiento epigenético (Kim et al.,

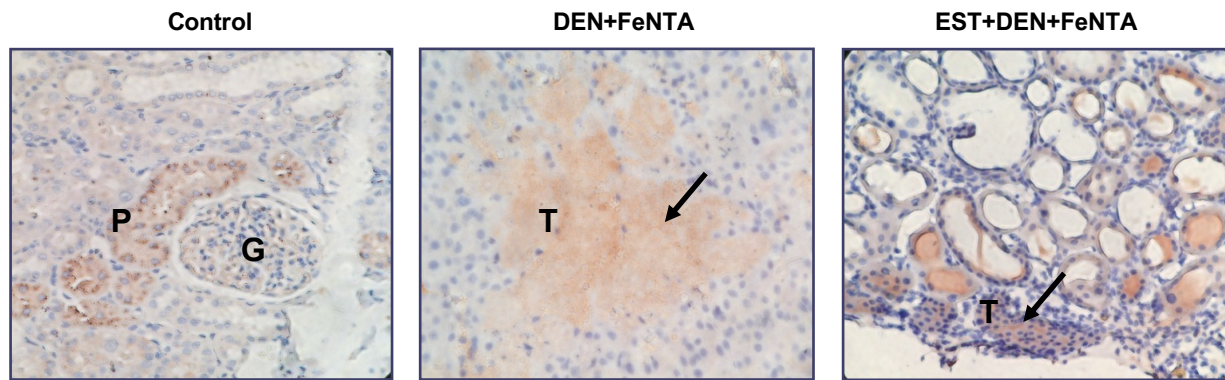
2004); sin embargo, en un 20% de los casos de CCR de células claras no se encuentran alteraciones en esta proteína. Particularmente, en los tumores inducidos por exposición a FeNTA, Toyokuni et al., (1998) reportó que el gen de VHL no está mutado, y en nuestro laboratorio observamos que tampoco se alteran los niveles de la proteína en etapas tempranas ni en los tumores, lo que sugiere que existen otros mecanismos que regulan los niveles de HIF, entre los cuales podría estar involucrado el estrés oxidante.

Asimismo, en líneas de carcinoma renal deficientes de pVHL, la restauración de la función de pVHL suprime la habilidad de formar tumores en ratones inmunocomprometidos y la actividad de pVHL puede anularse restaurando la actividad de HIF2 $\alpha$ . Además, eliminando HIF2 $\alpha$  se inhibe el crecimiento celular de este tipo de células, indicando que la regulación a la baja de HIF2 $\alpha$  es también suficiente para la supresión tumoral por pVHL. La desregulación de HIF2 $\alpha$  también parece ser necesaria y suficiente para el desarrollo de esta patología en ratones modificados genéticamente para que carezcan de pVHL (Kondo, *et al.*, 2003). El riesgo de cáncer renal asociado con diferentes alelos de VHL correlaciona con el grado de que estos alelos desregulan a HIF2 $\alpha$  (así como HIF1 $\alpha$ ) y el polimorfismo en la línea germinal de HIF2 $\alpha$  ha sido relacionada con el riesgo de cáncer renal esporádico.

Por último, respecto al efecto del EST, no se encontraron diferencias entre las alteraciones del grupo DEN+FeNTA y aquéllas del grupo EST+DEN+FeNTA, lo que indica que con el esquema de tratamiento utilizado el EST no tuvo efecto protector sobre las determinaciones realizadas. Sin embargo, como ya se mencionó, en este protocolo de carcinogénesis por FeNTA, el EST disminuyó la incidencia y retardó el grado de avance de los tumores, lo que sugiere que la protección observada por el tratamiento con el extracto contra el desarrollo de la neoplasia parece no darse a través de la modulación de VHL-HIF; sin embargo, no podemos descartar que el EST pueda tener efecto sobre esta vía a otros tiempos o bien sobre otras moléculas o vías de señalización.

En la Figura 35, se presentan muestras representativas de tejido renal obtenidas al final del protocolo. En tejido sano (grupo control) la tinción de HIF-2 $\alpha$  se pudo apreciar predominantemente en los túbulos proximales, y en los grupos tratados con DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA la tinción se presentó predominantemente en tejido tumoral aunque algunos de los túbulos renales presentaron tinción.

Estos resultados concuerdan con lo declarado en la literatura ya que se ha encontrado que la expresión de HIF1 $\alpha$  se pierde en el 30-40% de los ccRCC manifestados (Meléndez-Rodríguez, *et al.*, 2018), debido a que se ha visto que HIF1 $\alpha$  actúa como supresor tumoral promoviendo la progresión de este cancer por atenuación de la proliferación celular de células tumorales autónomas deficientes de VHL. Por el contrario, HIF2 $\alpha$  actúa como oncoproteína en ccRCC (Raval, *et al.*, 2005). De este modo, este subtipo puede subdividirse en aquellos casos donde tanto HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  son expresados, y en aquellos donde solo se muestra expresión de HIF2 $\alpha$  caracterizada por un incremento en la proliferación celular de ccRCC y una prognosis adversa (Meléndez-Rodríguez, *et al.*, 2018).



**Figura 35. Inmunohistoquímica de HIF-2 $\alpha$  en muestras de tejido renal obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal.** La tinción de en HIF-2 $\alpha$  se puede apreciar en las fotomicrografías en color café (400X). HIF-2 $\alpha$  se presenta en tejido tumoral obtenido al final del protocolo de carcinogénesis renal (flechas) G, Glomérulo. P, Túbulo proximal. T, tumor. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

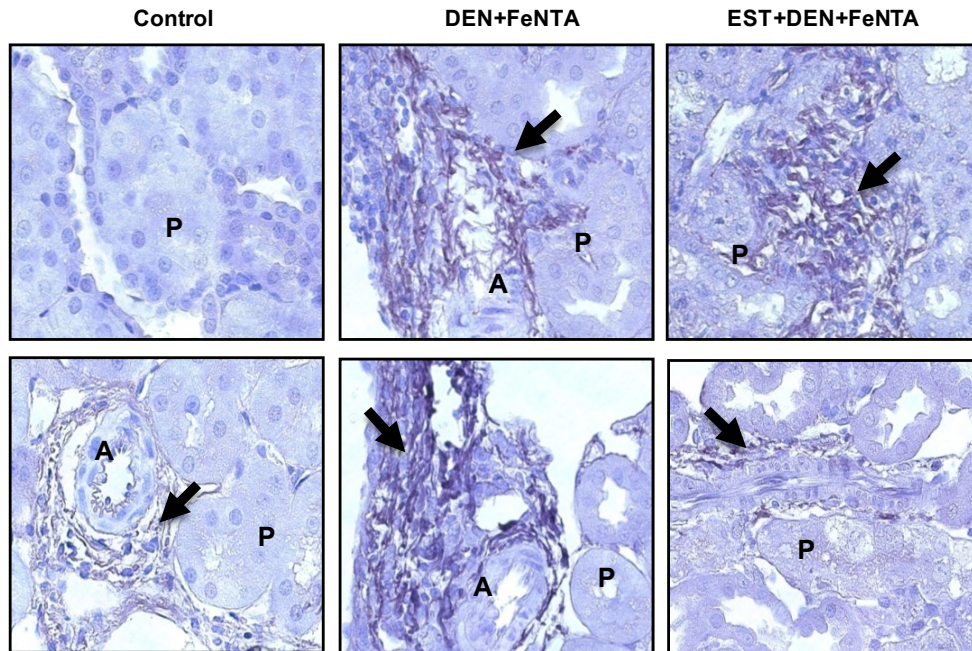
De acuerdo a nuestros resultados la desregulación de HIF2 $\alpha$  parece ser la fuerza motriz en CCRcc deficiente de pVHL (Li, *et al.*, 2012). Un modelo convincente es que la pérdida del cromosoma 14q está asociada con la disminución en la expresión del ARNm mensajero de HIF1 $\alpha$  y disminuye los niveles de la proteína HIF1 $\alpha$  en el CCRcc (Shen, *et al.*, 2013). La interrupción en el balance de HIF1 $\alpha$  y 2 $\alpha$  dentro de la célula, conduce a la expresión desproporcional de HIF2 $\alpha$  y la formación de tumores conducido por HIF2 $\alpha$ . En otros estudios, de hecho, se ha encontrado un switch aparente de la expresión de HIF1 $\alpha$  a HIF2 $\alpha$  en lesiones preneoplásicas provenientes de riñones humanos VHL-/+ junto con incremento en displasia y atipia celular.

Los efectos opuestos de HIF1 $\alpha$  y 2 $\alpha$  no están del todo entendidos. Se sabe, que el conjunto de genes que regulados por HIF1 $\alpha$  y 2 $\alpha$  se sobreponen pero no son enteramente redundantes por lo que quizás uno o más genes que son regulados preferencialmente por HIF1 $\alpha$  pueden suprimir el crecimiento de carcinoma renal. Además, HIF1 $\alpha$ , en mucho menor grado que HIF2 $\alpha$ , es sujeto a una segunda etapa de regulación dependiente de oxígeno. Específicamente, en la presencia de oxígeno, HIF1 $\alpha$  se hidroxila en el residuo de asparragina por la enzima FIH-1, la cual disminuye la habilidad de HIF1 $\alpha$  para activar la transcripción mientras que HIF2 $\alpha$  es relativamente insensible a FIH-1. En consecuencia, el desplazamiento de HIF2 $\alpha$  de los genes blanco de HIF1 $\alpha$  en un tumor oxigenado, deficiente de pVHL puede conducir a la disminución de la transcripción debido a que el primero es más efectivo que el segundo como un activador transcripcional. Finalmente, los efectos diferentes de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  con respecto a la supresión renal pueden relacionarse con las interacciones diferenciales con otros factores de transcripción como c-Myc y Notch.

#### 5.4.3 Evaluación de anhidrasa carbónica IX (CAIX)

El comportamiento de CAIX se evaluó en tejido renal mediante IHQ y Western blot, así como en orina mediante ELISA con el objetivo de determinar su potencial como marcador de etapas tempranas del CCR.

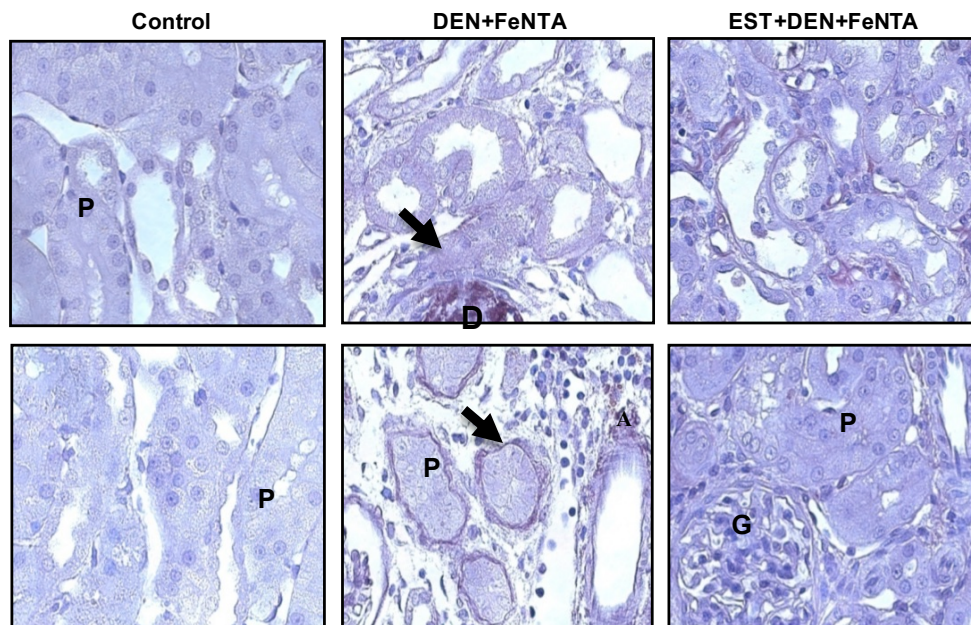
En las figuras 36 y 37 se muestran fotomicrografías representativas de la IHQ de CAIX en tejido renal obtenido después de 1 y 2 meses de exposición a FeNTA, respectivamente. En el grupo control esta proteína fue muy escasa o ausente en la mayoría de las estructuras típicas del riñón, y cuando se presentó, se observó en tejido perivascular; en el grupo DEN+FeNTA la enzima aumentó en la misma zona después de los dos tiempos estudiados; pero a los dos meses de exposición a FeNTA, además, se advirtió una tinción intensa en áreas de displasia así como en la periferia de los túbulos proximales. En el caso del grupo EST+DEN+FeNTA, la tinción en el área perivascular fue menor que la encontrada en el grupo DEN+FeNTA en ambos tiempos.



**Figura 36. Inmunohistoquímica de anhidrasa carbónica IX en muestras de tejido renal después de un mes de tratamiento con FeNTA (400X).** Las flechas señalan regiones con tinción positiva a CAIX. El grupo control al primer mes de estudio presentó tinción escasa en tejido perivascular, la cual aumentó en los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA. En el grupo tratado con EST+DEN+FeNTA la tinción fue menor que la observada en el grupo DEN+FeNTA. P, Túbulo proximal. A, Arteria. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

Nuestros resultados en el grupo control concuerdan con lo descrito en tejido renal sano de humano, donde también se han encontrado niveles bajos o nulos de CAIX (Bui, *et al.*, 2003; Patard, *et al.*, 2008), sin embargo, la presencia de esta proteína en tejido perivascular del riñón ileso no había sido previamente documentada, y esto puede deberse a que las muestras de humano generalmente se obtienen mediante biopsia por lo que el área puede ser analizada es muy pequeña en comparación con la que se puede analizar en la muestra de tejido renal de rata, y en los estudios que reportan una tinción escasa no describen su localización. Por otro lado, en estudios que reportan una tinción positiva aunque escasa en humano, no describen su localización. En general, se ha sugerido que CAIX puede tener una participación importante en la formación de vasos sanguíneos, ya que la expresión de CAIX está relacionada con hipoxia tisular, la cual es el principal activador de angiogénesis debido a la acumulación de HIF $\alpha$ . Así mismo, la acidificación del microambiente tumoral inducida por CAIX puede estimular la expresión de factores angiogénicos como IL-8. Otras evidencias que apoyan esta hipótesis es que se ha

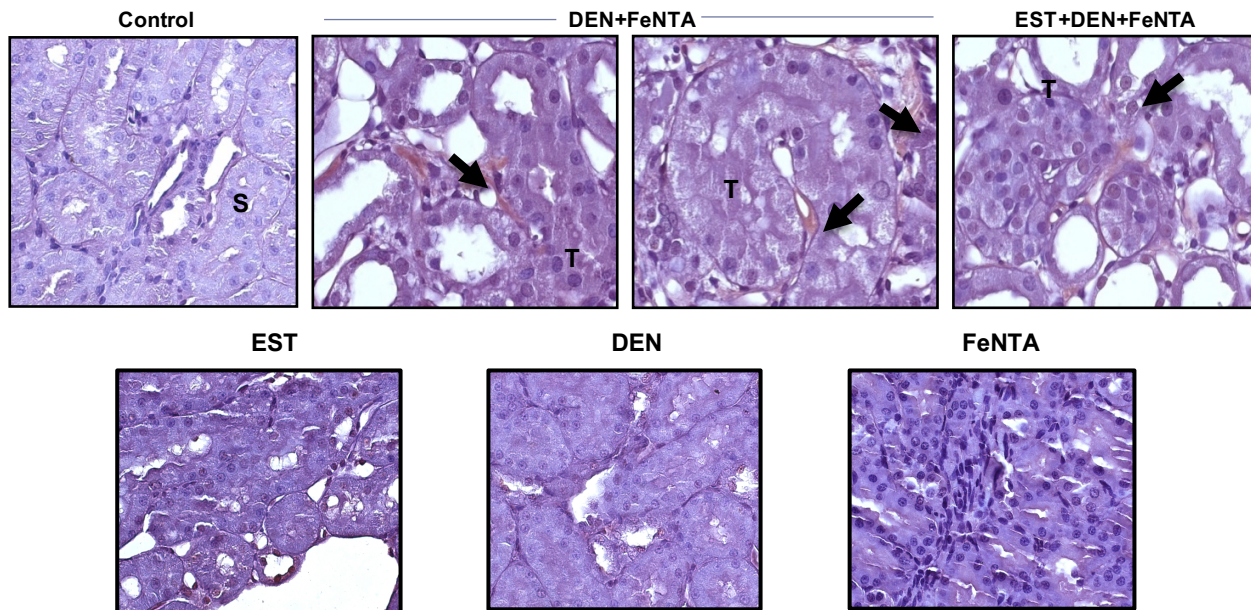
encontrado que la expresión de CAIX se asocia fuertemente con la densidad microvascular (MVD por sus siglas en inglés) en el CCR (Rubio-Briones, *et al.*, 2011), y que en otros tipos de cáncer la tinción de CAIX y del marcador de transdiferenciación endotelial CD31 frecuentemente se encuentra adyacente a zonas que muestran una neovascularización intensa (Dungwa, *et al.*, 2011). De hecho, algunos estudios reportan la presencia de CAIX en tejido perivascular de muestras de tumor humano (Triodi, S. *et al.*, 2004; Rubio-Briones, *et al.*, 2011). En el CCR se ha encontrado que CAIX fosforilada puede interactuar con la subunidad reguladora de PI3K, contribuyendo a la activación de Akt (Dorai, *et al.*, 2005), la cual, a su vez, induce transformación celular y neovascularización (Nicholson, *et al.*, 2002). En estudios más recientes realizados en células endoteliales malignizadas como C33A y HeLa, se demuestra que CAIX promueve la angiogénesis a través de la activación de la vía c-Src/FAK/mTOR. Según estos estudios, la sobreexpresión de CAIX aumenta los niveles de FAK fosforilado y c-Src vía interacción con VEGF y subsecuentemente la formación de c-Src/FAK en la angiogénesis tumoral (Kim, *et al.*, 2012). En este contexto, el hecho de haber encontrado tinción positiva para CAIX en zonas perivascularas en tejido renal sano, y que la tinción en estas mismas áreas haya aumentado en los grupos tratados con el carcinógeno durante el desarrollo del protocolo de cáncer renal sugiere que, en condiciones normales, CAIX podría tener un papel en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, y que cuando su expresión se ve aumentada puede estar participando en otros eventos relacionados con la carcinogénesis.



**Figura 37. Inmunohistoquímica de anhidrasa carbónica IX en muestras de tejido renal después de dos meses de tratamiento con FeNTA.** Las flechas señala regiones con tinción de CAIX en las fotomicrografías (400X). El grupo control al segundo mes de estudio presentó escasa tinción, en el grupo DEN+FeNTA la tinción predominó en áreas de displasia y en la periferia de los túbulo proximales. En el grupo tratado con EST+DEN+FeNTA la tinción fue menor que la observada en el grupo DEN+FeNTA. G, Glomérulo. P, Túbulo proximal. D, Displasia. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

En la figura 38 se muestra la distribución de CAIX en todos los grupos de estudio al final del protocolo de carcinogénesis renal (Figura 38). En los grupos control y tratados únicamente con EST o DEN, la tinción positiva fue mínima, en cambio, en los grupos tratados con FeNTA, la presencia de CAIX predominó en las zonas

periféricas de los tumores, sobretodo en células que se desprenden de los mismos, y, en algunos casos, se encontró de manera uniforme en el citoplasma de las células tumorales.

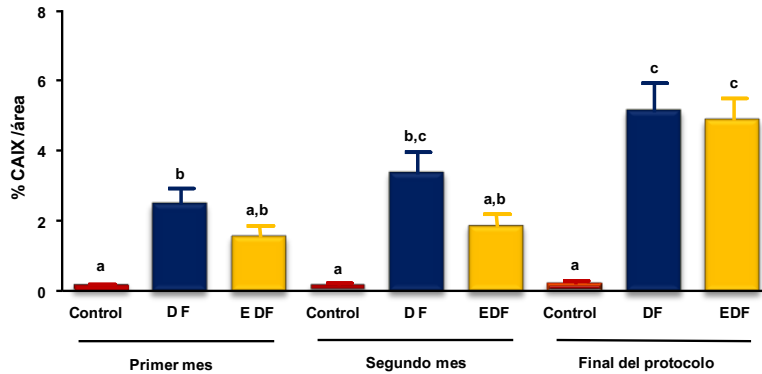


**Figura 38. Inmunohistoquímica de anhidrasa carbónica IX en muestras de tejido renal obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis.** Fotomicrografías representativas de tejido sano del grupo control, tejido de los grupos EST, DEN y FeNTA y en tejido tumoral de los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA (400X). En el grupo control la tinción es escasa, en los tumores, la tinción predominó en las zonas periféricas sobretodo en células que se desprenden. Flechas: Tinción positiva de CAIX. T= tejido tumoral S=Tejido sano. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

La presencia de CAIX en células que se están desprendiendo de los tumores puede estar relacionada con su función como molécula que afecta en procesos de adhesión. Algunos reportes han sugerido el efecto de disminución en la adhesión inducido por CAIX ya que se ha visto que un pH extracelular ácido por CAIX puede conducir a la activación de metaloproteinasas de matriz (Mc Cawley, *et al.*, 2000). Otro mecanismo, que incluso está más documentado, es que la sobreexpresión de CAIX en células normales de epitelio renal canino (MDCK) reduce la interacción de E-caderina con  $\beta$ -catenina lo cual desestabiliza la adhesión intercelular (Svastova, *et al.*, 2003). Por otro lado, también se ha sugerido que la sobreexpresión de CAIX en una línea celular de carcinoma cervical humano (C33A) interfiere con la vía de señalización Rho/ROCK la cual está involucrada en cambios morfológicos y migratorios celulares, facilitando de esta forma la invasión y la metástasis (Shin, *et al.*, 2010). Con base en lo anterior, es muy probable que la CAIX también esté disminuyendo la adhesión celular al final del protocolo de carcinogénesis en nuestro modelo; de hecho, se observó la presencia de metástasis en pulmón en esta etapa.

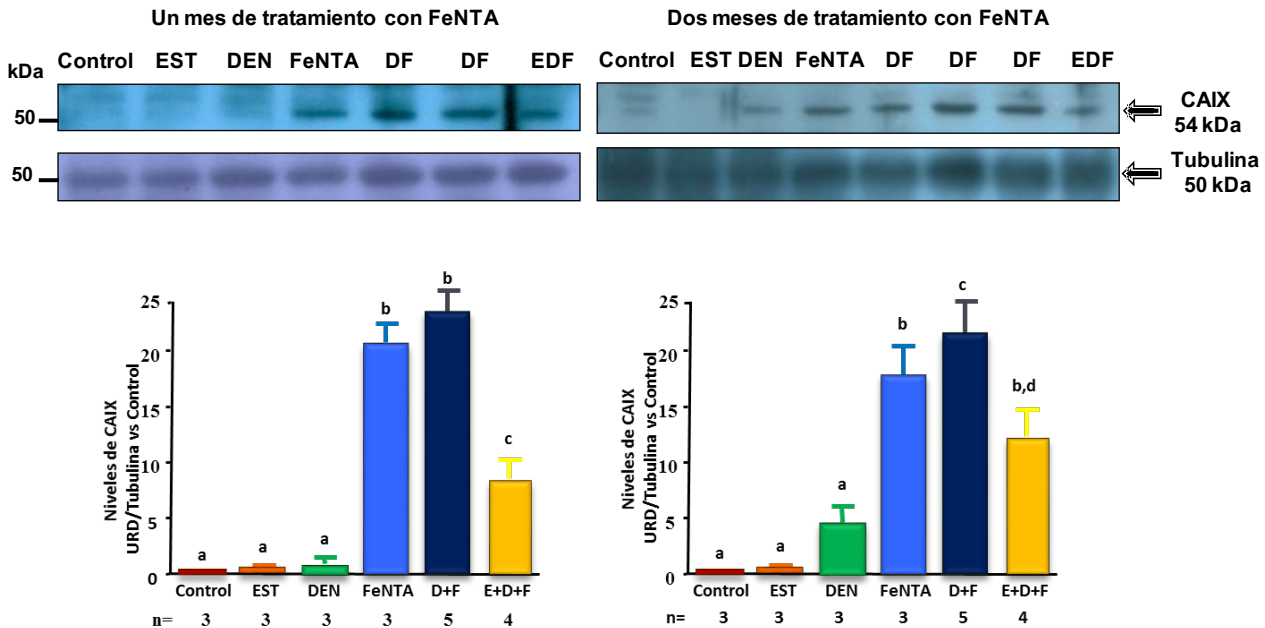
Por otro lado, para analizar el comportamiento general de la proteína a lo largo del protocolo de carcinogénesis se realizó la cuantificación de CAIX a los 3 tiempos estudiados comparando en cada muestra el área que presentó tinción positiva con respecto al área total examinada y la gráfica se muestra en la figura 39. Los niveles de CAIX incrementaron con el tratamiento con DEN+FeNTA en todos los tiempos de estudio, y este incremento fue progresivo ya que los niveles de CAIX al final del protocolo fueron mayores respecto a los

encontrados al segundo mes de tratamiento, los cuales, a su vez, fueron mayores que aquéllos observados a un mes. Aunque la final del protocolo el efecto del EST sobre los niveles de CAIX fue nulo, el pre-tratamiento con el EST disminuyó parcialmente los niveles de CAIX en etapas tempranas del protocolo, lo cual coincide con la disminución de la incidencia de cáncer previamente observada.



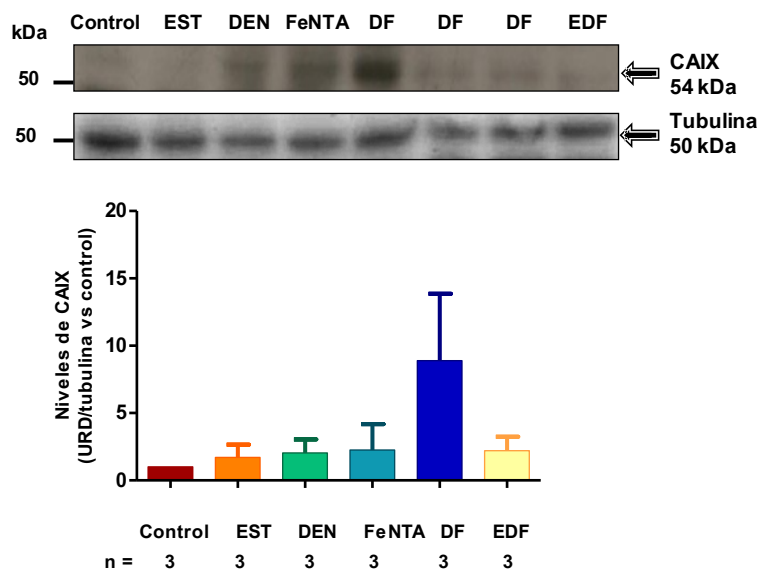
**Figura 39. Cuantificación por inmunohistoquímica de anhidrasa carbónica después de uno y dos meses de tratamiento con FeNTA y al final del protocolo de carcinogénesis renal.** Las barras representan la media  $\pm$  EE del porcentaje de área con tinción positiva en 4 campos microscópicos representativos de acuerdo al patrón de tinción observado y representado en las figuras 36, 37 y 38. Columnas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa. Estudios realizados en colaboración con el Dr. Dolores Javier Sánchez González de la Escuela Médico Militar.

Por otra parte, los niveles de CAIX determinados por Western blot al primer y segundo mes de tratamiento con FeNTA mostraron el mismo comportamiento que el obtenido mediante IHQ (Figura 40), es decir, se observa una mayor expresión de CAIX a ambos tiempos en los grupos tratados con DEN+FeNTA respecto a la obtenida en el grupo control, y el pretratamiento con EST disminuye significativamente, aunque no totalmente, los niveles en el grupo EST+DEN+FeNTA respecto a los encontrados en el grupo DEN+FeNTA.



**Figura 40. Western blot de anhidrasa carbónica IX (54 kDa) en muestras de tejido renal después de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA.** Las barras representan la media  $\pm$  EE. Columnas con letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa. URD: Unidades relativas de densitometría.

Los resultados obtenidos por IHQ se corroboraron mediante western blot en etapas tempranas (Figura 40) como al final del protocolo (Figura 41) a excepción de que el aumento en los niveles de CAIX en el grupo DEN+FeNTA en esta última etapa no fue estadísticamente significativa. Esto puede deberse a que el análisis cuantitativo por IHQ se realizó tanto en tejido tumoral como adyacente mientras que por Western blot se realizó específicamente en tejido tumoral. En los resultados obtenidos por Western blot, los tumores analizados no presentaron un comportamiento homogéneo por lo que el error estándar en el grupo DEN+FeNTA fue muy grande y por ende no se alcanzó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control. Por lo tanto, se analizó la correlación de la expresión de CAIX con el tamaño del tumor como indicador del grado de avance del CCR. Los resultados se presentan en la Figura 42 en donde se observó una tendencia en el aumento de la expresión de este marcador en función del tamaño del tumor.

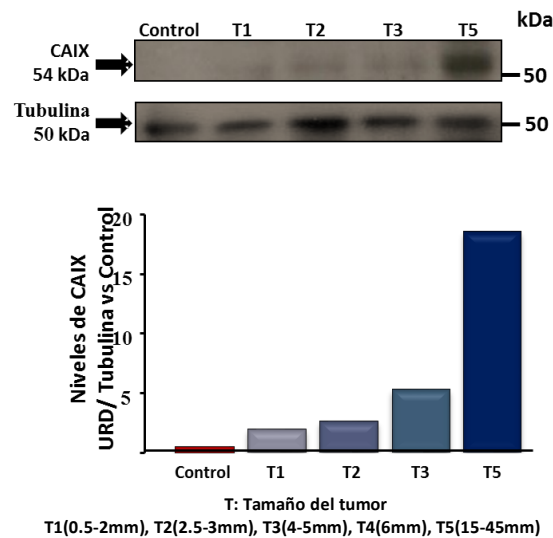


**Figura 41. Niveles de anhidrasa carbónica IX (54 kDa) determinados por western blot en muestras de tejido renal obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal.** Grupos Control, EST, DEN y FeNTA y en el caso de los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA se tomó únicamente tumoral. Ningún grupo de estudio presentó alteraciones en los niveles de CAIX. Las barras representan la media  $\pm$  EE. URD: Unidades relativas de densitometría.

Ahora bien, en cuanto a las posibles causas del aumento de CAIX, se ha reportado una correlación positiva entre la presencia de las mutaciones en el gen de VHL en el humano con una alta expresión de CAIX (Patard, *et al.*, 2008), y se ha observado que esta expresión disminuye por la reintroducción del gen de VHL (Ivanov, *et al.*, 1998). En nuestro estudio no se encontraron cambios en los niveles de pVHL al primer y segundo mes de tratamiento con FeNTA, por lo que parece ser que en estas etapas aún no se han inducido mutaciones en el gen de VHL; en cambio, sí se observó un aumento significativo en los niveles de CAIX desde etapas tempranas, lo que sugiere que la inducción de CAIX podría conducirse por eventos río abajo independientes de VHL. Asimismo, en otros estudios, se ha visto que en otros subtipos de CCR la expresión de CAIX es dependiente únicamente de hipoxia, por lo que se sugiere que existe un factor adicional que está involucrado en la regulación de CAIX. Por lo tanto, parece que el aumento gradual en la expresión de CAIX durante el protocolo de carcinogénesis renal podría explicarse más bien en función de su principal regulador que es HIF, cuya actividad,



puede ser modulada por las EROs. En un estudio realizado por Sumbayev y cols. se demuestra que HIF es un blanco de la S-nitrosilación por NO producido de manera endógena o exógena, por lo que el NO puede actuar como inductor de HIF; así mismo, niveles elevados de EROs pueden estabilizar a HIF al inactivar a las prolihidroxilasas (HPH) o bien mediante la activación de NFkB involucrando a  $IKK\alpha$  e  $IKB\alpha$ , lo que conduce a un aumento en la transcripción de HIF (Bonello, *et al.*, 2007), y de esta forma CAIX puede responder al estrés oxidante a través de HIF, sin la inactivación de pVHL debida a mutaciones en el gen. Además, el aumento observado en los niveles de CAIX coincide con el comportamiento del estrés oxidante durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal (el cual aumentó significativamente desde el primer mes de tratamiento con FeNTA), por lo que el estrés oxidante podría estar induciendo a esta proteína a través de HIF.

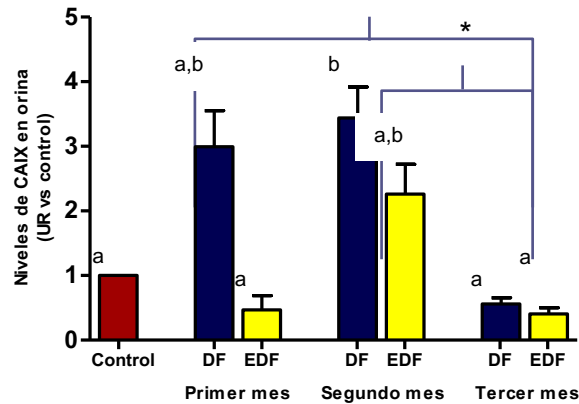


**Figura 42. Niveles de anhidrasa carbónica IX (54 kDa) determinada mediante western blot en tumores de diferentes tamaños obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis renal.** T: tamaño del tumor de acuerdo a la escala indicada. Los resultados sugieren que los niveles de CAIX correlacionan con el grado de avance del tumor. URD: Unidades relativas de densitometría.

#### 5.4.4 Evaluación de CAIX en orina mediante ELISA directo

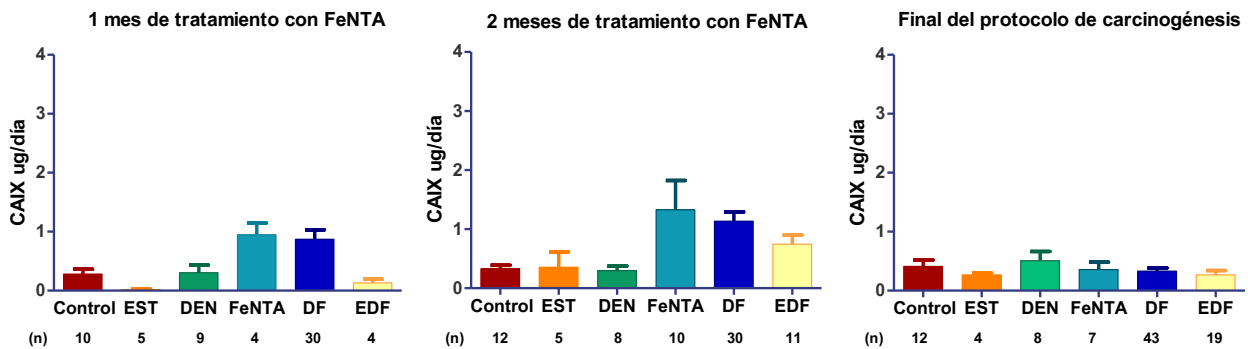
Una de las principales razones para determinar los niveles de CAIX en el presente trabajo es que esta proteína puede medirse en suero u orina como resultado de la liberación del dominio extracelular de CAIX conocido también como proteína soluble ó s-CAIX. Se ha reportado una correlación directa entre los niveles de CAIX en suero de pacientes y el tamaño del tumor; sin embargo, hasta donde sabemos no se ha realizado ningún estudio que analice una correlación entre los niveles de CAIX en orina con la progresión del CCR ni con el grado de avance del tumor, por lo que se decidió determinar la excreción urinaria de CAIX durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal mediante ELISA directo. Los resultados se muestran en la Figura 43 donde se aprecia que hay un aumento en la excreción de esta proteína en el grupo DEN+FeNTA con respecto al grupo control, al primer y segundo mes de tratamiento con FeNTA, siendo en el segundo mes estadísticamente significativa, y en ambos casos el pretratamiento con EST disminuyó de manera parcial la excreción de CAIX. Interesantemente, al final del protocolo, cuando los tumores están desarrollados, no se encontraron cambios en

la excreción urinaria de CAIX en ningún grupo de estudio. Si se comparan los datos de s-CAIX con los niveles de CAIX totales obtenidos por IHQ de la Figura 39 al primer y segundo mes de tratamiento, el comportamiento es muy similar, sin embargo, al final del protocolo los niveles en tejido renal se elevan en los grupos DEN+FeNTA y EST+DeN+FeNTA, y los de s-CAIX en estos grupos se reestablecen a los niveles observados en el grupo control.



**Figura 43. Excreción urinaria de CAIX después de uno y dos meses de tratamiento con FeNTA y al final del protocolo de carcinogénesis renal.** La determinación se realizó mediante la técnica de ELISA directo. La excreción urinaria de CAIX en ug/día de los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA (véase anexo A) se ajustó con los valores correspondientes del grupo control. Columnas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa (a excepción de los grupos indicados con asterisco). Las barras representan la media  $\pm$  EE.  $P < 0.05$ .

Esto último puede indicar que CAIX puede tener efectos potenciales sobre el tumor y por lo tanto no es escindida para su liberación en la orina. La medición de CAIX en orina representa la ventaja de ser un procedimiento de toma de muestra no invasivo que incluso permite muestreos seriales para realizar el diagnóstico un durante el periodo de monitoreo. Aunque, CAIX ha ganado atención como marcador molecular para malignidades urogenitales, se han realizado pocos estudios en donde detecten esta molécula en orina. Hasta el momento se han determinado los niveles de ARN mensajero de CAIX total encontrando una expresión más baja en pacientes con cáncer renal vs control.



**Anexo A. Excreción urinaria de CAIX en los diferentes grupos experimentales a los 3 tiempos estudiados durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal.** La determinación se realizó mediante la técnica de ELISA directo. Las barras representan la media  $\pm$  EE.  $p > 0.05$ .

## VI. RESUMEN DE RESULTADOS

### Análisis del extracto de semillas de tamarindo

- El extracto de semillas de *Tamarindus indica* L. (EST) presentó un alto contenido de compuestos polifenólicos y una notable capacidad de inactivación del radical superóxido.

### Protocolo de nefrotoxicidad aguda

- La notoria nefrotoxicidad inducida por las dos administraciones de FeNTA (9 mg Fe/Kg) se abate por el EST de manera significativa.

### Protocolo de carcinogénesis renal

- La dosis única de DEN no altera los parámetros estudiados en riñón (función renal y estrés oxidante).
- El EST administrado de manera crónica no tiene efectos pro-oxidantes, antinutricionales o sobre la función renal.
- Se comprobó la producción de estrés oxidante y que este va aumentando durante el desarrollo de este protocolo y la protección parcial pero notoria por parte del EST. Los niveles de los marcadores de estrés oxidante como 3-NT y 4-HNE incrementaron de manera progresiva durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal. El EST disminuyó los niveles de 3-NT y 4-HNE de manera parcial en todos los tiempos estudiados.

#### *Etapas tempranas*

- Al primer mes de tratamiento con FeNTA, se encontró displasia multifocal en los túbulos proximales. El EST disminuye significativamente la presencia de displasia aunque no la previene totalmente.
- A los dos meses de tratamiento con FeNTA la displasia fue más evidente, hubo mayor atrofia en las estructuras típicas del riñón, comenzaron a presentarse signos de proteinuria y ya se detectaron quistes renales e incluso un caso de CCR ya fue detectado.

#### *Final del protocolo*

- Al término del protocolo se encontró una mayor proporción de quistes y menor incidencia de cáncer en los riñones del grupo tratado con EST+DEN+FeNTA que en aquéllos del grupo DEN+FeNTA.
- El desarrollo del CCR se presentó sin cambios en la función renal lo cual es característico de la enfermedad en el humano.
- El subtipo histológico de todos los tumores analizados fue de células claras.
- El EST disminuyó la incidencia de ratas con cáncer en un 21.05% aunque la disminución no fue estadísticamente significativa.
- Con base en el tamaño de los tumores y el grado Fuhrman se puede decir que el EST a una dosis de 100 mg EAG/Kg/día retardó el avance del CCR.

En cuanto a las diferentes proteínas analizadas:

### **Proteína von Hippel Lindau (pVHL)**

- No se presentaron alteraciones en los niveles de pVHL determinados por IHQ a uno y dos meses de exposición al carcinógeno. En los grupos control no se detectó la presencia de la proteína y en los grupos tratados con DEN+FENTA y EST+DEN+FeNTA se detectó sólo en una o dos de las muestras examinadas y en el 10% del área total analizada.
- La tinción de pVHL es predominantemente citoplasmática en las células epiteliales tubulares y la ausencia de ésta en los glomérulos en nuestras muestras coincide con los reportes en el humano, sin embargo, una menor proporción de túbulos presentaron tinción positiva en las muestras de rata con respecto a lo que se observa en el humano.
- Al final del protocolo se observa la presencia de pVHL en tejido renal adyacente al tumor y la ausencia de esta proteína en tejido tumoral, este comportamiento coincide con los reportes de CCR humano donde se observa una regulación notoria a la baja de pVHL.

### **Factores inducibles por hipoxia 1 $\alpha$ y 2 $\alpha$**

- La detección de HIF-1 $\alpha$  no fue posible mediante IHQ a ninguno de los tiempos estudiados.
- El aumento en los niveles de HIF-2 $\alpha$  en los grupos tratados con FeNTA respecto al grupo control se dió de manera progresiva, detectándose ligeramente este aumento después de 1 mes de exposición al carcinógeno, el cual fue más evidente a los 2 meses y en tejido tumoral obtenido al final del protocolo.
- Respecto al efecto del EST, no se encontraron diferencias entre las alteraciones del grupo DEN+FeNTA y aquéllas del grupo EST+DEN+FeNTA, lo que indica que con el esquema de tratamiento utilizado el EST no tuvo efecto protector sobre las determinaciones realizadas. Sin embargo, como ya se mencionó, en este protocolo de carcinogénesis por FeNTA, el EST disminuyó la incidencia y retardó el grado de avance de los tumores, lo que sugiere que la protección observada por el tratamiento con el extracto contra el desarrollo de la neoplasia parece no darse a través de la modulación de VHL-HIF; sin embargo, no podemos descartar que el EST pueda tener efecto sobre esta vía a otros tiempos o bien sobre otras moléculas o vías de señalización.

### **Anhidrasa carbónica IX**

#### *Inmunohistoquímica*

- CAIX se detectó de manera escasa en tejido sano, sin embargo, cuando se presenta, se observa principalmente en tejido perivascular. En los grupos tratados con FeNTA esta tinción aumenta en tejido perivascular a uno y dos meses, siendo mayor el incremento a los dos meses, además de observarse en zonas de displasia y regiones peritubulares en este tiempo. En el caso del grupo EST+DEN+FeNTA, la tinción en el área perivascular fue menor a la presentada en el grupo DEN+FeNTA en ambos tiempos.
- La tinción en tejido perivascular del riñón sano no había sido previamente reportada.
- La expresión de CAIX, al igual que el estrés oxidante, incrementó de manera progresiva durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal. El tratamiento con el EST al final del protocolo no

previene la expresión de CAIX, pero sí disminuyó parcialmente los niveles de esta proteína en etapas tempranas del protocolo.

- Al final del protocolo, CAIX se detectó en zonas adyacentes al tumor incluyendo regiones cercanas a las células tumorales con propiedades de migración y, en algunos casos, se encontró de manera uniforme en el citoplasma de las células tumorales.

#### *Western blot*

- Los niveles de CAIX determinados por Western blot al primer y segundo mes de tratamiento con FeNTA mostraron el mismo comportamiento que el obtenido mediante IHQ, es decir se observa una mayor expresión de CAIX en ambos tiempos en los grupos tratados con DEN+FeNTA respecto a la obtenida en el grupo control y el pretratamiento con EST los disminuye significativamente, aunque no totalmente.
- Al final del protocolo, aunque el comportamiento de CAIX por Western blot fue similar al obtenido por IHQ, es decir se observó un aumento en los niveles de CAIX en el grupo DEN+FeNTA, no hubo diferencia estadísticamente significativa.

#### *ELISA*

- Durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal hay un aumento en la excreción urinaria de s-CAIX en el grupo DEN+FeNTA con respecto al grupo control al primer y segundo mes de tratamiento con FeNTA, siendo en el segundo mes estadísticamente significativa y en ambos casos el pretratamiento con EST disminuyó de manera parcial.
- Al final del protocolo, cuando los tumores están desarrollados, no se encontraron cambios en la excreción urinaria de CAIX en ambos grupos de estudio.
- Los niveles presentados de s-CAIX tuvieron un comportamiento similar a los niveles de CAIX totales obtenidos por IHQ, al primer y segundo mes de tratamiento, sin embargo, al final del protocolo los niveles de CAIX en tejido renal se elevan en los grupos DEN+FeNTA y EST+DeN+FeNTA y los de s-CAIX en estos grupos se reestablecen a los niveles observados en el grupo control.

## VII. CONCLUSIONES

- Se confirma la actividad antioxidante del EST mediante la demostración de su capacidad para inactivar el radical superóxido *in vitro*, así como la reproducibilidad en su preparación de acuerdo a los resultados similares observados en cuanto el contenido de fenoles totales.
- El EST a una dosis de 100 mg EAG/kg/día disminuye notoriamente la nefrotoxicidad aguda inducida por FeNTA.
- Se logra implementar un esquema de tratamiento de exposiciones repetidas a FeNTA con el que se desarrolló CCR sin alterar la función renal, comportamiento similar al curso de la enfermedad en el humano.
- El subtipo histológico de CCR que se induce en el modelo experimental desarrollado corresponde al de células claras.
- Las lesiones preneoplásicas se observan desde etapas tempranas del desarrollo de CCR.
- El estrés oxidante incrementa progresivamente durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal, lo cual demuestra su participación en el modelo y los resultados obtenidos sugieren que no sólo es causado por el FeNTA, sino que también es producido por otros eventos moleculares que conducen la progresión y mantenimiento del cáncer.
- En tejido renal adyacente al tumor se observó la presencia de pVHL en los túbulos proximales y distales, en cambio, en tejido tumoral no se observó tinción en ninguna de las muestras analizadas. Este comportamiento coincide con los reportes de CCR humano donde se observa una regulación notoria a la baja de pVHL
- Los niveles de HIF2 $\alpha$  aumentan durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal por lo que la desregulación de HIF2 $\alpha$  sugiere ser la fuerza motriz en CCRcc.
- Los niveles de CAIX van incrementando conforme avanza el protocolo de carcinogénesis renal lo que sugiere que CAIX puede jugar un papel durante el desarrollo y evolución del tumor. La disminución en la expresión de CAIX en etapas tempranas por el EST puede representar un mecanismo por el cual el EST induce una disminución en la incidencia y progresión del cáncer observada.
- El EST a una dosis de 100 mg EAG/kg/día disminuyó la incidencia y progresión del CCR, lo que establece su potencial como agente renoprotector. La protección parcial obtenida por el EST contra el cáncer puede explicarse por la protección parcial observada contra el estrés oxidante.

VIII. ARTÍCULO PUBLICADO

Mol Cell Biochem  
DOI 10.1007/s11010-012-1373-0

## Characterization of *N*-diethylnitrosamine-initiated and ferric nitrilotriacetate-promoted renal cell carcinoma experimental model and effect of a tamarind seed extract against acute nephrotoxicity and carcinogenesis

Chabetty Y. Vargas-Olvera · Dolores Javier Sánchez-González · José D. Solano · Francisco A. Aguilar-Alonso · Fernando Montalvo-Muñoz · Claudia María Martínez-Martínez · Omar N. Medina-Campos · María Elena Ibarra-Rubio

Received: 2 March 2012 / Accepted: 20 June 2012  
© Springer Science+Business Media, LLC. 2012

**Abstract** Renal cell carcinoma (RCC), the commonest malignancy in adult kidney, lacks of early signs, resulting often in metastasis at first diagnosis. *N*-Diethylnitrosamine (DEN)-initiated and ferric nitrilotriacetate (FeNTA)-promoted RCC may be a useful experimental model, but it is not well characterized. In this study, histological alterations and oxidative stress markers were analyzed at different times throughout RCC development, histological subtype was re-evaluated in the light of current classification, and a tamarind seed extract (TSE) effect was examined. Male Wistar rats experimental groups were control, TSE, DEN, DEN+FeNTA, and TSE+DEN+FeNTA. TSE was given 2 weeks before DEN administration (200 mg/kg) and throughout the experiment. Fourteen days after DEN treatment, two FeNTA doses (9 mg Fe/kg) for acute nephrotoxicity study, and increasing FeNTA doses (3–9 mg Fe/kg) twice a week for 16 weeks for carcinogenesis protocol, were administered. In

acute study, necrosis and renal failure were observed and TSE ameliorated them. Throughout carcinogenesis protocol, pre-neoplastic lesions were observed since 1 month of FeNTA treatment, which were more evident at 2 months, when also renal cysts and RCC were already detected. RCC tumors were obtained without changes in renal function, and clear cell histological subtype was identified in all cases. 4-Hydroxy-2-nonenal and 3-nitro-L-tyrosine levels increased progressively throughout protocol. TSE decreased both oxidative stress markers and, although there was no statistical difference, it delayed RCC progress and decreased its incidence (21 %). This study brings an insight of the time course events in this carcinogenesis model, identifies clear cell subtype and establishes TSE renoprotective effects.

**Keywords** Renal cell carcinoma · Ferric nitrilotriacetate · Oxidative stress · *Tamarindus indica* · Carcinogenesis · Acute nephrotoxicity

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11010-012-1373-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Y. Vargas-Olvera · J. D. Solano · F. A. Aguilar-Alonso · F. Montalvo-Muñoz · M. E. Ibarra-Rubio (✉)  
Departamento de Biología, Facultad de Química, Edificio F, Laboratorio 120, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico, D.F., Mexico  
e-mail: meir@unam.mx

C. Y. Vargas-Olvera  
e-mail: iqluna@yahoo.com

J. D. Solano  
e-mail: jsolanob2000@yahoo.com

F. A. Aguilar-Alonso  
e-mail: fco\_aguilara@yahoo.com.mx

F. Montalvo-Muñoz  
e-mail: qfbmontalvo@gmail.com

D. J. Sánchez-González · C. M. Martínez-Martínez  
Departamento de Biología Celular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 11200 Mexico, D.F., Mexico  
e-mail: javiersglez@yahoo.com

C. M. Martínez-Martínez  
e-mail: claudia\_dealvarado@yahoo.com.mx

O. N. Medina-Campos  
Departamento de Biología, Facultad de Química, Edificio F, Laboratorio 209, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico, D.F., Mexico  
e-mail: omamoelmedina@gmail.com

**Abbreviations**

BUN	Blood urea nitrogen
ccRCC	Clear cell RCC
DEN	<i>N</i> -Diethylnitrosamine
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FOX	Ferrous ion oxidation-xylenol orange
FeNTA	Ferric nitrilotriacetate
4-HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
H&E	Hematoxylin and eosin
MDA	Malondialdehyde
3-NT	3-Nitro- <i>L</i> -tyrosine
PBS	Phosphate buffered saline
RCC	Renal cell carcinoma
ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive nitrogen species
TSE	Tamarind seed extract
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WHO	World Health Organization

**Background**

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common malignancy of the adult kidney, but it is not well understood; it accounts for 3 % of all adult malignancies and comprises 90 % of kidney neoplasms [1]. Worldwide incidence has been estimated to account for 209,000 cases and 102,000 deaths per year [2]. In the European Union and in the United States, incidence rates have been rising steadily every year in over the past three decades [3, 4].

RCC is a histologically diverse disease with an often unpredictable course, its diagnosis is difficult at early stages because it is generally asymptomatic, and metastatic disease at presentation is very common [5]. In addition, prognosis and therapies currently available have still limited success since different RCC histological subtypes exhibit different molecular alterations and therefore different responses to therapy [6].

Current histological RCC classification was described since the 1996 Heidelberg/Rochester consensus conference. The main histological subtypes are clear cell, papillary, chromophobe, collecting duct, and unclassified [7, 8]. Thereafter, however, additionally other histological subtypes have been incorporated [9]. Since RCC subtypes have been associated with distinct genetic and molecular alterations [8], accurate subtyping of renal tumors is critical for prognosis and proper design of patient's treatment. Clear cell RCC (ccRCC) is the most common histological subtype, comprising up to 80 % of all renal neoplasms, is typically unilateral and unifocal, and is thought to originate in the proximal tubule epithelium [7, 10, 11].

RCC induced by ferric nitrilotriacetate (FeNTA) is a used experimental model of renal carcinogenesis, but it is

not well characterized. FeNTA is a potent nephrotoxic agent, which leads to renal failure or RCC with acute or chronic treatments, respectively, in rodents [12–16]. It has also been demonstrated that *N*-diethylnitrosamine (DEN) pretreatment increases tumor incidence and reduces the time of treatment necessary to induce cancer as compared with FeNTA-alone-treated animals [16, 17]. Oxidative stress is involved in FeNTA-induced renal tumorigenesis. DNA, lipid and protein oxidative damage have been widely documented as well as high levels of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species [18–20].

The participation of oxidative stress in cancer has led to the use of antioxidant compounds, such as phytochemical phenols, to protect against this disease. *Tamarindus indica* L. is a food resource and is used as herbal medicine in many countries [21]. Particularly, tamarind seeds exhibit a high content of phenolic antioxidants such as 2-hydroxy-3',4'-dihydroxyacetophenone, methyl 3,4-dihydroxybenzoate, 3,4-dihydroxyphenylacetate, and (–)-epicatechin, as well as tannins, anthocyanidin(s) and oligomeric proanthocyanidins [22, 23]. Several studies have described biological activities of tamarind seed coat extracts; for example, its antioxidant potential by reducing lipid peroxidation and inhibiting nitric oxide production has been reported [24, 25], as well as its potent antidiabetic and antihyperlipidemic effects [26, 27]. However, their chemopreventive potential remains unexplored.

Therefore, in this study, we have analyzed histological alterations and oxidative stress markers at different times throughout RCC development, re-evaluated histological subtype in the light of current classification, and prepared a tamarind seed extract (TSE) to examine its effects on oxidative stress, acute nephrotoxicity, and carcinogenesis.

**Methods****Reagents and antibodies**

All used chemicals were of analytic grade and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) or J.T. Baker (Mexico City, Mexico), unless otherwise indicated. Mouse anti-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) monoclonal antibody was from Oxis International Inc. (Portland, OR, USA). Mouse anti-3-nitro-*L*-tyrosine (3-NT) polyclonal antibody was from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA). Biotinylated goat anti-IgG was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Declere was from Cell Marque (Hot Springs, AR, USA). ABC-kit Vectastain for immunohistochemistry was from Vector Laboratories (Orton Southgate, Peterborough, UK). Diaminobenzidine substrate and Mayer's Hematoxylin (Lillie's modification) were from DAKO Corporation (Carpinteria, CA, USA).



## TSE

Fresh tamarind fruits were purchased from a local market in Mexico City. Tamarind seeds were cracked to separate brown–red seed coats. Approximately 25 g were placed in a conical flask and soaked in 500 mL of anhydrous ethanol for 3 days at room temperature, shaking periodically. This process was repeated until the solvent became colorless. The resulting extract was filtered through a sieve and then completely roto-evaporated. TSE was diluted in water in all experiments.

## TSE total phenolic content

Total phenolic content of TSE was determined according to the Folin–Ciocalteu method [28]. 0.5 mL of 0.2 N Folin–Ciocalteu reagent and 400  $\mu$ L of 1 M sodium carbonate were added to 1 mL of TSE aqueous solutions with different concentrations. The absorbance was recorded at 765 nm 15 min after. Total phenols were determined from a standard curve of gallic acid prepared at the same time. Phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of dry extract.

## TSE superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) scavenging activity

TSE  $O_2^{\cdot-}$  scavenging activity was measured by the xanthine/xanthine oxidase method [29]. TSE concentrations from 1.2 to 454.5  $\mu$ g GAE were used, and  $O_2^{\cdot-}$  was measured as NBT reduction at 560 nm. The reaction mixture was used as blank and L-ascorbic acid as positive standard. Superoxide anion scavenging activity was calculated by the following equation: Scavenging activity (%) =  $[1 - (A_i/A_0)] \times 100$ , where  $A_i$  is the absorbance of TSE solutions and  $A_0$  is the absorbance of the blank.

## FeNTA solution

FeNTA solution was prepared just before use by the method of Awai [30] with slight modifications. Ferric nitrate and nitrilotriacetic disodium salt were both dissolved in 120 mM sodium bicarbonate separately to form 160 and 320 mM solutions, respectively. These solutions were mixed at 1:2 ratio v/v (molar ratio 1:4) with constant magnetic stirring at room temperature, and pH was adjusted to 7.4 with sodium bicarbonate. Administered FeNTA doses were calculated according to the Fe-content present in FeNTA compound.

## Acute nephrotoxicity protocol

Experimental protocols were followed as per the Norma Oficial Mexicana guidelines for the use and care of

laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999). Male Wistar rats (Harlan Laboratories S.A. de C.V., Mexico City, Mexico) weighing 106–112 g were randomly distributed into five groups ( $n = 5$ –25): Control, TSE, DEN, DEN+FeNTA, and TSE+DEN+FeNTA. Control group was treated with vehicles. TSE (100 mg GAE/kg bw/day) was given to corresponding groups in drinking water 2 weeks before DEN administration and throughout the study. To maintain TSE dose along protocol, body weight as well as the volume of TSE solution consumed by rats were monitored, and TSE solution concentration was adjusted. TSE dose was chosen according to previous studies in our laboratory and confirmed by measuring TSE solution volume consumed by rats the day after. Corresponding animals received a single i.p. injection of DEN (200 mg/kg bw), and, 14 days later, two i.p. doses of FeNTA (9 mg Fe/kg bw) 2 days apart. Some animals were sacrificed by decapitation 24 h after the second FeNTA administration, and kidneys were quickly resected to obtain cortex samples, which were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-70^\circ\text{C}$  for oxidative stress determination by measuring malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide, and protein carbonyl content. Other animals were anesthetized with sodium pentobarbital (0.025 g/kg bw), and kidneys were perfused with pH 7.4 Krebs–Ringer solution with 250 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and prepared for histological examination. Blood samples were also obtained after animals were euthanized for evaluation of renal function markers.

## Carcinogenesis protocol

This protocol was an adaptation of those from other authors [13, 16, 17]. Male Wistar rats weighing 70–80 g were randomly divided into the five experimental groups previously described following the same treatment schemes, except that in this protocol increasing doses of FeNTA (3–9 mg Fe/kg bw) were intraperitoneally injected twice a week for 16 weeks. Rats were euthanized 8 weeks after the last FeNTA injection. Kidney samples were obtained as described in acute nephrotoxicity protocol. For evaluation of renal function, blood samples were obtained every 3 weeks by a retro-orbital bleeding technique under total anesthesia with diethyl ether or after the animals were euthanized.

## Tissue homogenates

Renal cortex was homogenized in a Brinkman Polytron (PT 10/35 GT) in cold phosphate buffer pH 7.4, 20 mM for lipid peroxidation, 100 mM for hydrogen peroxide and 50 mM for protein carbonyl determinations. Homogenates were centrifuged also according to the determination

(1,000, 21,300, and 22,200  $\times g$ , respectively) at 4 °C for 20 min. Supernatant was used for further analysis. Protein concentration in these supernatants was determined by the Lowry method [31].

#### Lipid peroxidation

MDA was determined spectrophotometrically in renal tissue and serum samples as described by Gerard-Monnier [32]. The reaction was started by adding 650  $\mu\text{L}$  of a mixture of 10 mM 1-methyl-2-phenylindole and 37 % HCl to 200  $\mu\text{L}$  of kidney cortex homogenate or 160  $\mu\text{L}$  of serum. Absorbance at 586 nm was measured after incubation of the reaction mixture at 45 °C for 60 min and centrifugation at 1,000 $\times g$  at 4 °C for 10 min. MDA concentration was determined from a standard curve of 1,1,3,3-tetramethoxypropane prepared at the same time. Results were expressed as nmol MDA/mg protein.

#### Hydrogen peroxide

Ferrous ion oxidation-xylenol orange (FOX) assay was used to determine peroxide hydrogen levels in renal tissue. Working FOX reagent was prepared as follows: 2 mg of  $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$  and 1.52 mg of xylenol orange (3,3-bis[*N,N*-Di(carboxymethyl)aminomethyl]-*o*-cresol-sulphonaphthalein) were dissolved in 2 mL of 250 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . This solution was mixed with 4 mM 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol in methanol (18 mL) just before use. Tissue samples or hydrogen peroxide standard (90  $\mu\text{L}$ ) were mixed with FOX reagent (900  $\mu\text{L}$ ) and methanol (10  $\mu\text{L}$ ) followed by vortexing and 30 min incubation. Solutions were then centrifuged at 10,800 $\times g$  for 10 min at room temperature, and absorbance was read at 586 nm against a methanol blank. Results were expressed as nmol of hydrogen peroxide/mg protein [33].

#### Protein carbonyl content

Protein carbonyl groups were detected by its reactivity with 2,4-dinitrophenylhydrazine to form protein hydrazones which were detected at 370 nm [34]. Protein concentration in samples was determined at 280 nm. Results were expressed as nmol carbonyl/mg of protein.

#### Renal function

Serum creatinine and blood urea nitrogen (BUN) were measured using commercial diagnostic kits (Creatinine-J and Urea-37, Spinreact®, Spain) according to manufacturer's instructions, and results were expressed as mg/dL.

#### Histological and immunohistochemical analyses

For histological and immunohistochemical analyses, kidneys were formalin fixed and paraffin embedded following standard tissue processing and sections of 5  $\mu\text{m}$  of thickness were obtained. For histological examination, kidney sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). When appropriate, damaged area was quantified per field. For immunohistochemistry, kidney sections were boiled in Declere to unmask antigen sites; the endogenous activity of peroxidase was quenched with 0.03 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in absolute methanol. Kidney sections were incubated with donkey serum-blocking reagent for 30 min to block nonspecific bindings and subsequently with primary antibody overnight at 4 °C (1:200 and 1:70 dilutions in phosphate buffered saline (PBS) for anti 4-HNE and anti 3-NT antibodies, respectively). After primary antibodies removal and repetitive rinsing with PBS, slides were incubated with a 1:500 dilution of biotinylated goat anti-IgG secondary antibody. Bound antibodies were detected by means of avidin-biotinylated peroxidase complex ABC-kit Vectastain and diaminobenzidine substrate. After appropriate washing with PBS, slides were counterstained with hematoxylin. For negative control, preimmune goat serum was used instead of the primary antibodies. All specimens were examined by light microscopy Axiovert 200 M (CarlZeiss, Germany) at 200 $\times$  and 400 $\times$  magnifications. Stained area was quantified by using a computerized image analyzer KS-300 version 3.0 (CarlZeiss, Jena, Germany). Five random fields per kidney were studied comparing the different experimental groups, and the results were expressed as percentage of the stained area with respect to the total area analyzed [35].

#### Staging and grading of RCC

Staging was done based on tumor size assigning scores on a scale from 1 to 5 in which the numbers 1, 2, 3, 4, and 5 represents tumors with maximum diameters of 0.5 to 2 mm, 2.5–3 mm, 4–5 mm, 6 mm, and 15–45 mm respectively. Grading was performed according to Fuhrman grade which is dependent solely on nuclear morphology, content, and prominence of nucleoli [36].

#### Statistics

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM, and one-way variance analysis was used to establish statistical differences. Post ANOVA Newman–Keuls method was used to identify differences among groups, and Fisher's exact test to establish differences in tumor incidences, Fuhrman grades and tumor sizes between DEN+FeNTA and TSE+DEN+FeNTA groups, with all these being performed by means of a 5.0 software (GraphPad, San Diego,

CA, USA).  $p$  values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

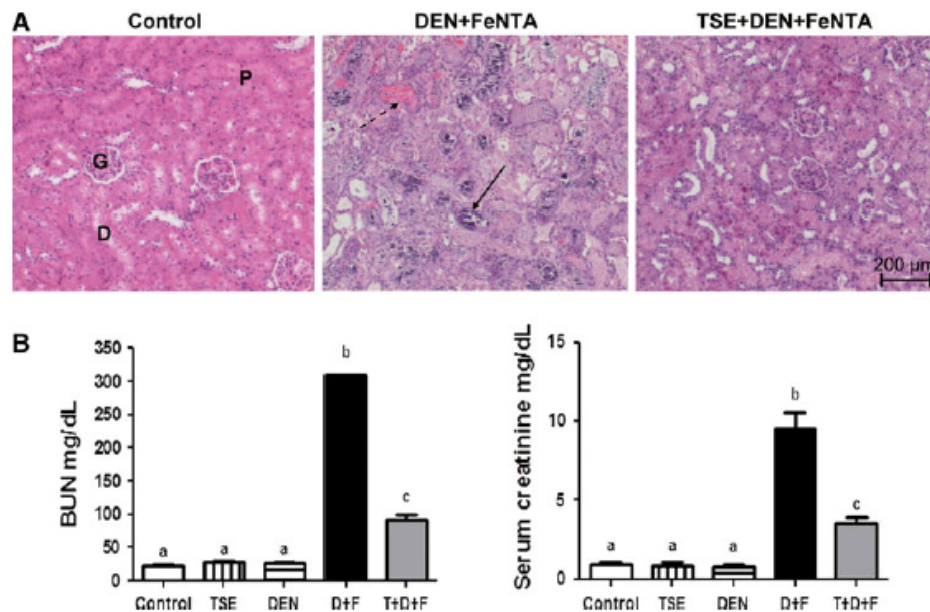
## Results

### TSE total phenolic content and antioxidant activity

A high polyphenolic content was found in TSE since it contains  $1.28 \pm 0.11$  mg of total phenols (expressed as GAE) per mg of TSE. In order to evaluate TSE as antioxidant agent, its superoxide radical scavenging activity was investigated (Online Resource 1). We demonstrated that TSE was able to scavenge superoxide anion with an  $IC_{50} = 30.7 \pm 0.5$   $\mu$ g GAE/mL. This antioxidant activity was greater than that of vitamin C used as reference compound ( $IC_{50} = 66.0 \pm 0.4$   $\mu$ g/mL). Also, to establish its *in vivo* antioxidant capacity and to find optimal dose, a previous acute study was done. This study revealed that TSE at doses of 50 and 100 mg GAE/kg bw/day during 14 days diminishes renal hydrogen peroxide levels 1 h after FeNTA administration, when maximum oxidative stress was reached (data not shown).

### Acute nephrotoxicity protocol

To determine TSE effect on renal failure, an acute nephrotoxicity protocol was performed by administering two large doses of FeNTA (9 mg Fe/kg bw) 2 days apart. Figure 1a shows histological images of rat kidneys from control and DEN + FeNTA-treated groups with and without TSE pre-treatment. Control group showed a normal architecture, treatment with DEN+FeNTA induced a strong necrosis and proteinuria, and TSE administration notably ameliorated the renal histological damage which was quantified as described in “Methods” section ( $p < 0.0029$ ). In order to analyze renal function, BUN and serum creatinine levels were measured (Fig. 1b). Treatment with TSE or DEN alone did not induce changes in these markers, while DEN+FeNTA treatment markedly increased both (about ten folds) compared with control group, and TSE pre-treatment decreased notably this renal failure ( $p < 0.0001$ ). In contrast, oxidative stress measured as lipid peroxidation, protein carbonyl content, and hydrogen peroxide levels, was not present in any experimental group with this scheme of treatment (Online Resource 2).



**Fig. 1** Acute nephrotoxicity study. **a** Representative histological images of kidneys. Control group ( $n = 5$ ) presented normal architecture; DEN + FeNTA-treated group ( $n = 3$ ) showed necrosis (solid arrow) and proteinuria (dashed arrow) after two FeNTA administrations (9 mg Fe/kg bw) 2 days apart; and TSE + DEN + FeNTA-treated rats ( $n = 3$ ) exhibited improved histology. Damaged area was quantified as described in “Methods” section ( $p < 0.0029$ ). Microscopic appearance of kidneys from TSE and DEN groups was similar to that from control one (images not shown) (H&E,  $\times 400$ ). G,

glomerulus. P, proximal tubule. D, distal tubule. **b** Blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine levels. Severe renal failure was observed in DEN+FeNTA group, and TSE diminished it considerably in TSE+DEN+FeNTA group ( $p < 0.0001$ ).  $n = 5$  in control, TSE and DEN groups, and  $n = 3$  in DEN+FeNTA and TSE+DEN+FeNTA groups. This value changed because of mortality. Each value represents the mean  $\pm$  SEM. Columns with different letters exhibit statistical difference. (Color figure online)

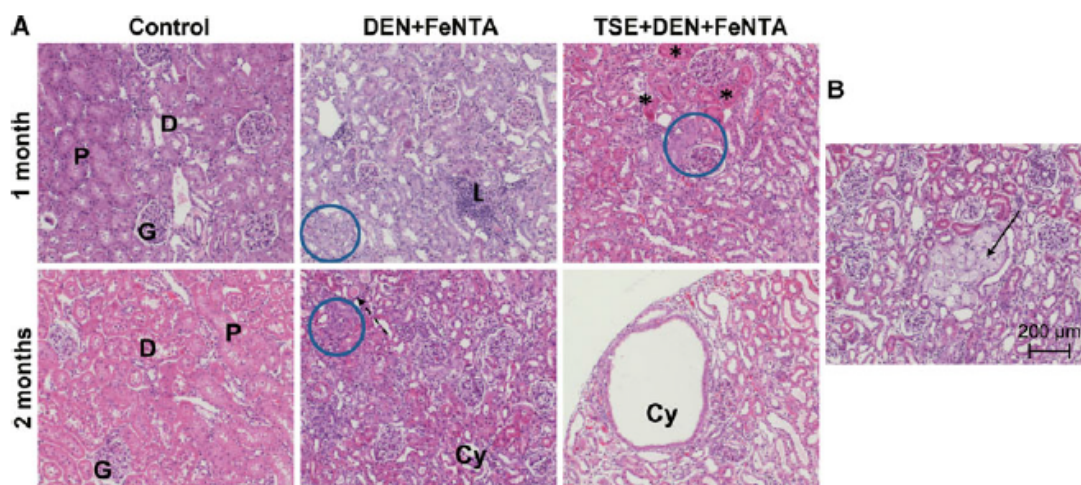
### Carcinogenesis protocol

During the development of this protocol, some animals were euthanized after 1 and 2 months of FeNTA treatment and the rest of them at the end of the protocol, when RCC tumors were obtained. Body weight was recorded on weekly basis throughout the protocol (Online Resource 3A). No effect was observed with TSE treatment, whereas a significant decrease was induced in FeNTA-treated groups suggesting health impairment ( $p < 0.05$ ). Renal function was also evaluated throughout the study. There were no significant changes in BUN levels in any group at any time studied as shown in Online Resource 3B ( $p > 0.05$ ).

Macroscopic appearance of kidneys from TSE and DEN groups was similar to that from control group at all times studied along carcinogenesis protocol. At 1 month, kidneys from DEN+FeNTA and TSE+DEN+FeNTA groups showed changes in renal cortex such as edema and paleness as well as medulla inflammation. At 2 months, additionally to these alterations, kidneys presented cysts. No kidney showed evident tumors at these stages of the protocol. When tissues were examined at microscopic level, control, TSE and DEN groups showed a normal architecture at all the times of the study. In contrast, at first month, in DEN+FeNTA group, multifocal dysplasia was observed in proximal tubules characterized by nuclear enlargement and

prominent crowding of cells, as well as a generalized inflammatory lymphocytic infiltrate (Fig. 2a). Structural renal atrophy increased 2 months after FeNTA treatment, when proteinuria and renal cysts appeared. Also, dysplasia was more evident than that observed at 1 month, and it was commonly localized near to cysts. Moreover, although tumors were not evident macroscopically, ccRCC was already identified in one of all samples analyzed, as clear cytoplasm cells clustered in small groups were observed (Fig. 2b). Pretreatment with TSE in TSE+DEN+FeNTA group partially decreased FeNTA-induced damage, since the proportion of undamaged renal tubules determined as described in "Methods" section was greater by 29 % than that observed in DEN+FeNTA group ( $p < 0.0022$ ).

At the end of carcinogenesis protocol, RCC was clearly developed in DEN+FeNTA and TSE+DEN+FeNTA groups. Features of tumors are described in Table 1. Figure 3a shows representative photographs of kidneys from control, DEN+FeNTA, and TSE+DEN+FeNTA groups. Tumors in DEN+FeNTA photograph represent sizes 2, 3, and 5, and tumor in TSE+DEN+FeNTA photograph represents size 2. The presence of a larger number of cysts in TSE+DEN+FeNTA than in DEN+FeNTA group is also evident in these photographs. Figure 3b shows histopathological findings. In control group, no alterations were seen, and glomerulus, proximal, and distal tubules were clearly observed. Likewise, no particular histological



**Fig. 2** Histological alterations after 1 and 2 months of FeNTA treatment. **a** Representative histological images of kidneys from control, DEN+FeNTA, and TSE+DEN+FeNTA groups at 1 and 2 months of FeNTA treatment. At 1 month, DEN+FeNTA group showed multifocal dysplasia in renal tubules (circle) and lymphocyte infiltration (L). Treatment with TSE induced an improved histology, with a greater proportion of undamaged tubules (29 %) (asterisks), quantified as described in methods ( $p > 0.0022$ ); however, there was still some dysplasia. At 2 months, in DEN+FeNTA and TSE+DEN+FeNTA groups, there was more atrophy of kidney

typical structure than that observed at 1 month, and dysplasia was more evident; also, proteinuria (dashed arrow) and renal cysts (Cy) were detected.  $n = 4$  for control,  $n = 6$  for DEN+FeNTA and TSE+DEN+FeNTA groups. Histological appearance of kidneys from TSE and DEN groups was similar to that from control group in both stages (images not shown). G, glomerulus. P, proximal tubule. D, distal tubule. **b** Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) observed in one sample from second month of FeNTA treatment (solid arrow). (H&E,  $\times 400$ ) (Color figure online)

**Table 1** Features of renal cell carcinoma tumors

Animal identification number	No. tumors	Tumor size in mm (tumor scale) <sup>a</sup>		Metastasis
		Left kidney	Right kidney	
<b>DEN+FeNTA</b>				
1	1	4(3)		No detected
2	1		2(1)	Lung
3	1		0.5(1)	Lung
4	4	45(5), 3(2)	5(3), 3(2)	Lung
5	4	3(2), 4(3)	2.5(1), 5(3)	Lung
6	2		3(2), 6(4)	Lung
7	2	1(1)	3(2)	No detected
8	3	1.5(1), 1(1)	1.5(1)	No detected
9	1	0.5(1)		No detected
10	2	2(1)	2.5(2)	Lung
11	1		23(5)	No detected
12	3	3(2), 2.5(2)	2.5(3)	No detected
13	1	11(5)		No detected
<b>TSE+DEN+FeNTA</b>				
14	1	2(1)		No detected
15	1		1(1)	No detected
16	2		1.5(1), 1(1)	No detected
17	1		15(5)	No detected
18	3	2.5(2)	3(2), 1.5(1)	No detected
19	1		2.5(2)	Lung
20	1	4(3)		No detected
21	3	2.5(2), 2(1)	1(1)	No detected
22	2	6(4)	3(2)	No detected

<sup>a</sup> Refer to "Methods" section

changes or tumors were observed in groups treated with TSE or DEN alone (data not shown). Sections from DEN+FeNTA group showed inflammatory lymphocytic infiltrate and cysts, as well as an evident presence of renal tumors. Histological analysis revealed ccRCC in all cases, since, as described in one sample at 2 months, clear cytoplasm cells clustered in small groups were observed. In TSE+DEN+FeNTA group, tumors and cysts were also observed; nevertheless, contrary to DEN+FeNTA group, the number of cysts was higher than the number of tumors by a ratio of 3:1 ( $p < 0.0025$ ). Actually, a higher proportion of cysts in TSE+DEN+FeNTA group compared with DEN+FeNTA group was also detected at 2 months of FeNTA treatment. In addition, to evaluate TSE effect at the end of carcinogenesis protocol, RCC incidence was estimated by determining the number of animals with neoplasia as well as the number of renal tumors in DEN+FeNTA-treated groups with and without TSE (Table 2). Although there were no statistical differences in

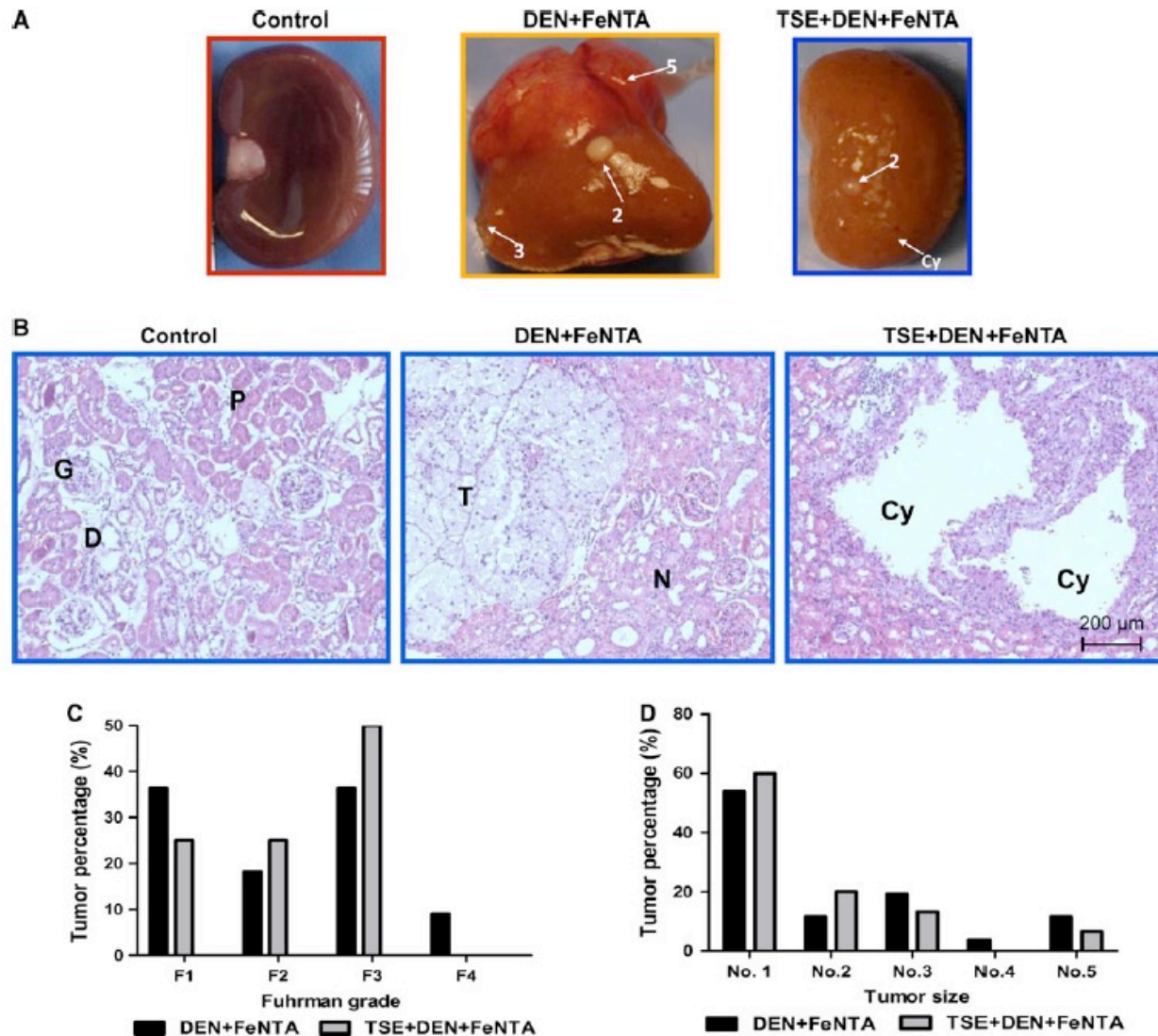
these determinations ( $p > 0.05$ ), treatment with DEN+FeNTA induced the development of renal tumors in 68.4 % of treated rats, and tumor incidence in TSE+DEN+FeNTA group was 47.4 %, which represents a 21 % incidence decrease. With respect to total number of tumors obtained, 63 % were present in DEN+FeNTA group and 37 % in TSE+DEN+FeNTA group representing a decrease of 27 % due to TSE treatment, although there was no statistical difference either ( $p > 0.05$ ).

Besides evaluating RCC incidence, prognostic factors in RCC, such as Fuhrman grade and tumor size, helped us to evaluate the effect of TSE treatment on RCC progression. Online Resource 4 shows representative histological images of tumors with different Fuhrman grades, where histological description is also detailed. In Fig. 3c, the percentage of tumors of different Fuhrman grades with respect to the total number of tumors analyzed in DEN+FeNTA and TSE+DEN+FeNTA groups is represented. Fuhrman grades from F1 to F4 were found in DEN+FeNTA group, whereas the highest Fuhrman grade (F4) was not present in TSE+DEN+FeNTA group. With regard to tumor size, there were no differences between DEN+FeNTA and TSE+DEN+FeNTA groups ( $p > 0.05$ ) (Fig. 3d); however, percentage of tumors with big sizes (3, 4, 5) was higher in DEN+FeNTA group than that in TSE+DEN+FeNTA group.

MDA, protein carbonyl content, and peroxide hydrogen levels were measured to evaluate oxidative stress at 1 and 2 months. No significant changes were found in any group compared with control one (data not shown). However, by measuring 4-HNE and 3-NT levels by immunohistochemistry, we did find alterations. Treatment with DEN+FeNTA increased both markers at 1 and 2 months (Fig. 4), and in tumors at the end of the protocol (Fig. 5). This increment was higher in tumors than that at 2 months, and, in turn, it was higher than that at 1 month. At all the times studied, TSE pre-treatment decreased these markers in TSE+DEN+FeNTA group compared with DEN+FeNTA group ( $p < 0.0001$ ). Normal renal tissue adjacent to the tumors exhibited a similar staining to control group. In Addition, to confirm acute oxidative stress induced by FeNTA, serum MDA levels were determined 1 h after 26th FeNTA administration (Online Resource 5). We found that DEN+FeNTA treatment increased them compared with control group, and TSE treatment significantly decreased them, although they did not reach control levels ( $p < 0.0262$ ).

## Discussion

Oxidative stress has been linked with cancer, and polyphenols have been proposed as preventive agents [37]. It



**Fig. 3** Carcinogenesis protocol. **a** Representative photographs of kidneys at the end of carcinogenesis protocol from control, DEN+FeNTA, and TSE+DEN+FeNTA groups. Tumors in DEN+FeNTA photograph represent sizes 2, 3, and 5, and tumor in TSE+DEN+FeNTA photograph represents size 2. Tumor size was assigned using scores on a scale from 1 to 5 where number 1 represents the smallest tumor and number 5 represents the biggest one (see “Methods” section). The presence of a larger number of cysts in TSE+DEN+FeNTA group than those in DEN+FeNTA group is evident. **b** Representative histological images of kidneys. RCC in DEN+FeNTA group (*T*) and renal cysts in TSE+DEN+FeNTA group (*Cy*) are observed. RCC histological subtype was clear cell in all cases. Macro and microscopic appearances of kidneys from TSE

and DEN groups was similar to that from control group (images not shown). *D*, distal tubule. *G*, glomerulus. *P*, proximal tubule. *N*, adjacent normal tissue. (H&E,  $\times 100$ ). **c** Percentage of tumors with different Fuhrman grades with respect to total number of tumors analyzed, and **d** percentage of tumors with corresponding tumor size with respect to total number of tumors analyzed in DEN+FeNTA and TSE+DEN+FeNTA groups. Although there were no statistical differences ( $p > 0.05$ ), TSE seems to delay RCC progression as all Fuhrman grades were observed in DEN+FeNTA group, while the highest Fuhrman grade (F4) was not obtained in TSE+DEN+FeNTA group; and percentage of tumors with big sizes (3, 4, 5) was higher in DEN+FeNTA group than that in TSE+DEN+FeNTA group. (Color figure online)

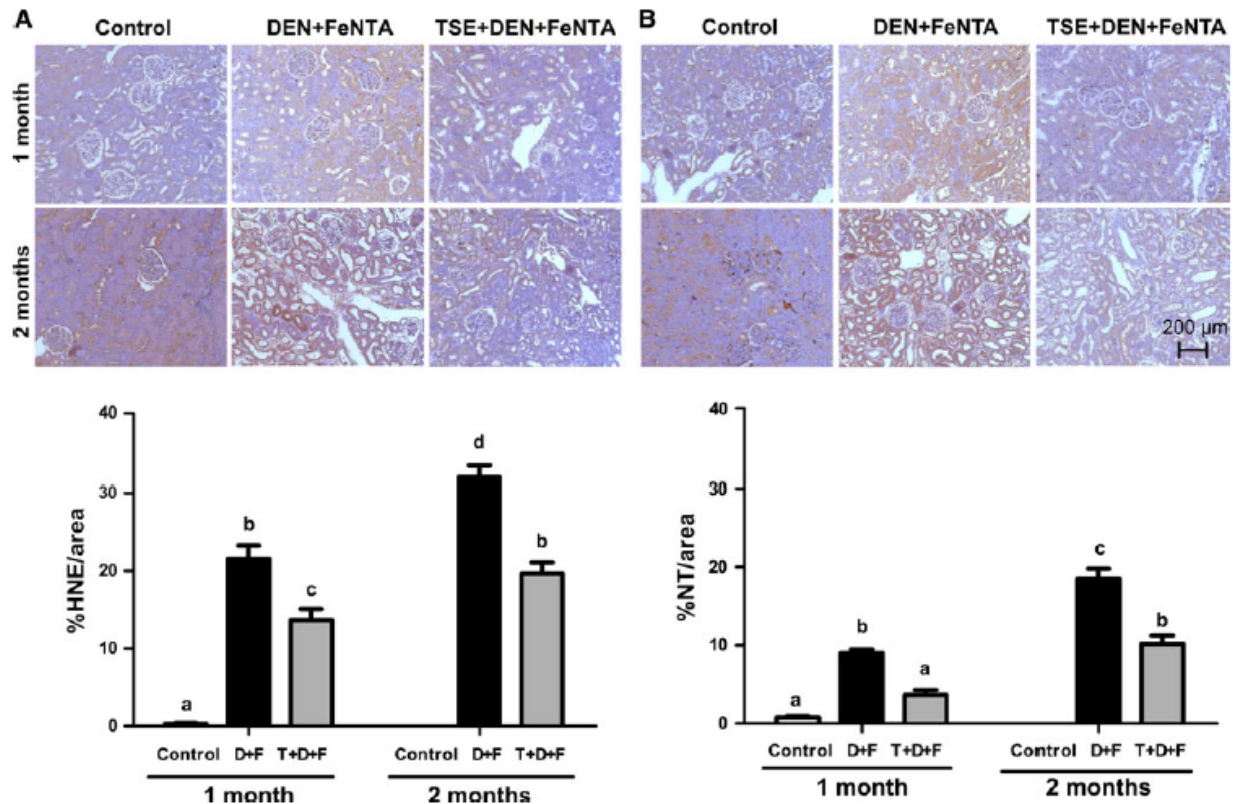
has been demonstrated that polyphenols, besides their antioxidant properties, may inhibit signaling pathways involved in carcinogenesis and induce the activity and expression of antioxidant enzymes [38]. Therefore, tamarind seed coat was chosen as an accessible and rich source

of polyphenols, to evaluate its potential as preventive agent against oxidative stress, nephrotoxicity, and carcinogenesis induced by FeNTA.

A high polyphenolic content was determined in our TSE which may be due to good ethanol efficiency for extraction

**Table 2** Renal cell carcinoma incidence in carcinogenesis protocol

Experimental group	No. animals studied	No. animals with RCC	No. animals with unilateral tumors	No. animals with bilateral tumors	No. total tumors
DEN+FeNTA	19	13	8	5	26
TSE+DEN+FeNTA	19	9	6	3	15

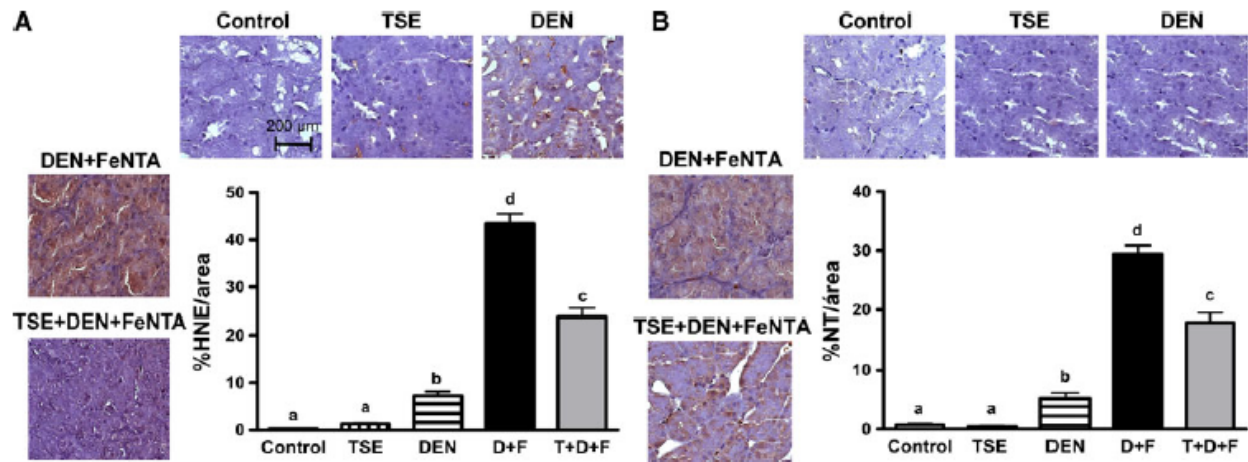


**Fig. 4** Immunohistochemical detection of oxidative stress markers at 1 and 2 months of FeNTA treatment. **a** 4-hydroxynonenal (4-HNE) and **b** nitrotyrosine (3-NT). DEN+FeNTA treatment significantly increased both markers compared with control group, and TSE pre-treatment induced a significant attenuation of this oxidative stress. Columns represent the mean  $\pm$  SEM,  $n = 2$  for control and  $n = 4-6$

for DEN+FeNTA and TSE+DEN+FeNTA groups. Four random fields per kidney were studied, and the results were expressed as percentage of stained area with respect to total area analyzed.  $\times 400$ . Columns with *different letters* exhibit statistical difference ( $p > 0.0001$ ). (Color figure online)

of some polyphenols [39], although this value may be overestimated because of interferences with the technique. TSE's *in vitro* antioxidant capacity was evaluated by measuring superoxide scavenging activity. It was relevant to measure this ROS, as ferrous ions such as those found after FeNTA reduction may generate it [15, 40], and this radical is the major initiator of biological damage inducing the formation of more reactive species [41–43]. Our results revealed that TSE has an effective  $O_2^{\cdot -}$  scavenging activity *in vitro*, even greater than vitamin C, a common antioxidant. This finding is consistent with other studies where its great antioxidant activity was demonstrated even against other reactive species [24, 44].

Acute nephrotoxicity was induced by two high doses of FeNTA (9 mg Fe/kg bw) administered to DEN-initiated rats. A high mortality rate was found (88 %) after the second FeNTA injection. This observation is in concordance with another study in which mice died before developing cancer because of the severe nephrotoxic changes induced with the same doses of this carcinogen [45]. Histological alterations observed in DEN+FeNTA group were notable necrosis and proteinaceous casts which coincide with other reports [19]. TSE pre-treatment efficiently ameliorated histological renal damage probably because of its antioxidant and anti-inflammatory properties as previously reported [24, 25, 44, 46, 47]; however, the



**Fig. 5** Immunohistochemical detection of oxidative stress markers at the end of renal carcinogenesis protocol. **a** 4-hydroxynonenal (4-HNE), and **b** nitrotyrosine (3-NT). Staining for both markers in TSE group was similar to control group; DEN treated group showed mild oxidative stress; DEN+FeNTA treatment induced a notable oxidative stress; and TSE pre-treatment partially decreased it. Columns in

graphs represent the mean  $\pm$  SEM,  $n = 2$  for control and  $n = 8$  for DEN+FeNTA and TSE+DEN+FeNTA groups. Four random fields per kidney were studied, and the results were expressed as percentage of stained area with respect to total area analyzed.  $\times 400$ . Columns with different letters exhibit statistical difference ( $p < 0.0001$ ). (Color figure online)

exact mechanism responsible for this protection remains to be elucidated. Serum creatinine and BUN levels were measured to evaluate renal function. In DEN+FeNTA group, both markers were notably elevated compared with control one, which indicates severe renal failure and correlates with the observed histological damage. This result is in concordance with other studies performed 12 and 18 h after FeNTA administration, in which elevation of these markers is also observed [17, 48]. TSE markedly decreased renal failure as serum creatinine and BUN levels reduced significantly, as well as histological renal damage, which led us to propose TSE as a novel preventive agent against oxidative stress-induced renal failure, although studies with other experimental models are required. The absence of changes with respect to control group in renal oxidative stress markers, such as MDA, protein carbonyls, and hydrogen peroxide in this acute study, may be explained by the fact that oxidative stress, determined by these markers, is maximum at 1 h after FeNTA administration, but it considerably diminishes 3 h later and reaches normal levels at 6–12 h, as previous studies in our laboratory (unpublished data) and other authors' observations indicate [22, 49]; therefore, oxidative stress in our samples may have already remitted as they were taken 24 h after the second FeNTA administration.

Animals were weighed on weekly basis throughout carcinogenesis protocol. TSE administration did not have anti-nutritional effects as there were no alterations in body weight in TSE-treated group. This is important because it has been reported that polyphenols may induce anti-nutritional effects [50]. On the contrary, DEN+FeNTA treatment induced a clear decrease in body weight, which

suggests health deterioration, and TSE administration could not prevent it. On the other hand, evaluation of BUN all along protocol was performed to investigate renal function behavior and to assure that it was not a renal failure-inducing scheme of treatment. There were no alterations in this marker at any time. This behavior resembles human RCC development, in which there is no renal failure until reaching very advanced stages [51]. Histological alterations as well as long-term oxidative stress induced by FeNTA along this carcinogenesis protocol had not been previously described. Therefore, some animals were sacrificed 1 and 2 months after initial FeNTA injection. Histological kidney evaluation of DEN + FeNTA-treated animals showed dysplastic changes of multifocal origin since the first month of FeNTA treatment, and, at the second month, ccRCC was already found in one sample. Bahnemann and collaborators [52] also found histological lesions after 1 month of FeNTA administration; these authors, however, described hyperplastic cells in proximal tubules instead of dysplastic changes, but this discrepancy may be explained by the different schemes of treatment with FeNTA and the no administration of DEN in that study. These findings give us an insight about the time in which these alterations begin, and suggest that analyses at these times of treatment are adequate to search for molecular mechanisms involved in carcinogenesis, and that it may be reasonable to study even shorter times to identify initial events that led to malignization. This kind of studies is practically impossible in human disease which makes the experimental model a valuable tool. On the other hand, TSE induced an improved histology, but it could not totally prevent the dysplasia. Besides the described



histological alterations, at 2 months of FeNTA treatment but not at the first one, renal cysts were detected. The role of cysts in human cancer development is controversial; some evidences suggest that RCC occasionally arises from the cells lining the cyst wall [53, 54], and several growth factors and cytokines have been identified in human cysts, such as epidermal growth factor (EGF) and erythropoietin [53, 55], while other evidences support renal cysts as benign changes, which biological etiology may differ from the events that led to cancer [56]. According to our results, pre-neoplastic changes (dysplasia) were observed at 1 month of FeNTA treatment, but no cysts; this suggests that renal cysts are not precursors of alterations that led to cancer. Moreover, a bigger proportion of renal cysts and less cancer incidence were found in kidneys from TSE+DEN+FeNTA group than in those from DEN+FeNTA group, which may suggest that TSE could ameliorate RCC incidence inducing signaling pathways that led to cyst formation and avoiding or retarding cancer development.

Few studies have described histopathological changes in tumors induced by FeNTA, and in most of them histological subtype is not clearly identified, describing only gross morphology of these tumors. Li and collaborators [14] reported that the appearance of renal tumors induced only with FeNTA was variable in mice; other authors pointed out that ccRCC histological subtype was rare, and, when present, it was mixed with other morphologies such as the granular one [57]. On the other hand, in carcinogenesis model induced with DEN + FeNTA, acinar and papilar patterns have been described by Athar and coworkers [16]; however, acinar description may correlate with ccRCC subtype. Different morphological patterns reported among these studies, including ours, may be due to the use of different experimental animals and/or strains, to the use of different schemes of treatment to induce renal cancer, and/or to current histological classification by the Union Internationale Contre le Cancer (UICC, 1996) and the World Health Organization (WHO), (2002) is posterior or contemporary to the performance of those publications. For this reason, it was important to re-evaluate the histological subtype of tumors induced in male Wistar rats with DEN+FeNTA in light of recent RCC histological classification. In the present study, all tumors exhibited characteristic histology of human ccRCC, which is the most frequent histological subtype in humans. This similarity may suggest that probably same molecular alterations are implicated in FeNTA-induced and human ccRCC. This is supported by the fact that human hereditary and sporadic RCC with same histological subtype share molecular alterations although their etiology is different [58, 59].

Tumor grade and tumor size are regarded as the major pathomorphological prognostic factors of survival in RCC. For this reason, we analyzed them, to evaluate the effect of

TSE on renal cancer progression. Although there was no statistical difference between groups treated with or without TSE, the extract clearly decreased RCC incidence (21 %) and the number of tumors developed (27 %). Also, TSE pre-treatment seems to delay RCC progression, as the percentage of tumors with the biggest tumor sizes (3, 4, 5) was higher in DEN+FeNTA group than that in TSE+DEN+FeNTA group. Likewise, in DEN+FeNTA group, renal tumors presented all Fuhrman grades, whereas in TSE+DEN+FeNTA group tumors, the most advanced Fuhrman grade (F4) was not observed.

In relation to oxidative stress, when renal MDA, protein carbonyls, and hydrogen peroxide levels were determined at 1 and 2 months of FeNTA treatment, no changes were observed, but when serum MDA levels were analyzed 1 h after the 26th FeNTA injection during week 13, oxidative stress induced by FeNTA was demonstrated. This may be explained by the oxidative stress remission shortly after each FeNTA injection as we previously mentioned; and hence, the need of repeated FeNTA injections to produce the oxidative stress insults required to induce cancer. The antioxidant effect of TSE *in vivo* became evident by the decrease in serum MDA levels in TSE+DEN+FeNTA group compared with DEN+FeNTA group. On the other hand, when immunohistochemical analyses of 4-HNE and 3-NT were done, renal oxidative stress was evident, and we found that the increase in these markers was higher in tumors than that at 2 months and, in turn, it was higher than that at 1 month. The renal oxidative stress detections by 4-HNE and 3-NT, but not by MDA, protein carbonyls, and hydrogen peroxide, may be explained by the higher sensitivity of immunohistochemical techniques compared with spectrophotometric ones. These findings provide an insight about oxidative stress behavior in cancer development in this model, suggesting an increase dependent on time of exposition to FeNTA. The oxidative stress found in tumors at the end of carcinogenesis protocol, which probably participate in cancer progression and maintenance, is more likely produced by other molecular events than by FeNTA treatment *per se*, since tumor samples were obtained 2 months after last FeNTA treatment. 3-NT increase has also been reported in human RCC, where staining was seen in 77.6 % of the cases studied, and it was significantly associated with high grade renal tumors [60]. In our study, 65 % of samples showed a clear direct correlation between oxidative stress and tumor size; however, a lesser proportion of samples correlated with Fuhrman grade (around 30 %). TSE partially protected against oxidative stress at all times studied. Therefore, TSE protection against FeNTA-induced RCC development may be explained, at least in part, by its protection against oxidative stress. Further studies of TSE are required, such as the analysis of the effects of different TSE schemes of treatment, the

determination of specific TSE composition, and the evaluation of chemopreventive properties of its isolated compounds as well as their combination in this experimental RCC model and others.

## Conclusions

In conclusion, preneoplastic lesions were observed since 1 month of FeNTA treatment, these histological lesions were more evident at 2 months, and RCC was already detected at this time. Clear cell histological subtype was identified in this DEN-initiated and FeNTA-promoted RCC model, which is the most frequent in human tumors. Renal oxidative stress increased progressively throughout carcinogenesis protocol, and our study suggests that it is not only caused by FeNTA, but is also produced by other molecular events that led to cancer progression and maintenance. TSE notoriously ameliorated FeNTA-induced acute nephrotoxicity and decreased RCC incidence and progress. This protection may be explained, at least in part, by the partial decrease in oxidative stress. This study brings an insight of the time course events in this carcinogenesis model, identifies clear cell subtype in all tumors developed, and establishes TSE renoprotective effects.

**Acknowledgments** This study was supported by Universidad Nacional Autónoma de México-Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT) under projects IN214307 and IN227010; by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 81026 and PAIP 6190-10 given to MEIR. CYVO and FAAA received a fellowship from CONACYT. The authors appreciate the collaboration of M. V. Z. Lucía Macías Rosales for her valuable assistance in animal care and treatment. The funding sponsors had no involvement in this study design, the data collection, analysis and interpretation, the manuscript writing, or the decision to submit the manuscript for publication.

**Competing interests** The authors declare that they have no competing interests.

## References

- Jemal A, Siegel R, Ward E (2007) Cancer statistics 2006. *CA Cancer J Clin* 56:106–130
- Gupta K, Miller JD, Li JZ, Russell MW, Charbonneau C (2008) Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer Treat Rev* 34:193–205
- Mathew A, Devesa SS, Fraumeni JF Jr, Chow WH (2002) Global increases in kidney cancer incidence, 1973–1992. *Eur J Cancer Prev* 11:171–178
- Chow WH, Dong LM, Devesa SS (2010) Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol* 7:245–257
- Weiss RH, Lin P-Y (2006) Kidney cancer: identification of novel targets for therapy. *Kidney Int* 69:224–232
- Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R (2009) Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms. *Hum Pathol* 40:10–29
- Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert CS, Cooper B, Delahunt JN, Eble S, Fleming B, Ljungberg LJ, Medeiros H, Moch VE, Reuter E, Ritz G, Roos D, Schmidt JR, Srigley S, Storkel E, Van der Berg E, Zbar B (1997) The Heidelberg classification of renal cell. *Am J Surg Pathol* 133:131–133
- Mancini V, Battaglia M, Ditunno P (2008) Current insights in renal cell cancer pathology. *Urol Oncol* 26:225–238
- Algaba F, Akaza H, López-Beltrán A (2011) Current pathology keys of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 60:1–10
- Storkel S, Eble JN, Adlakha K (1997) Classification of renal cell carcinoma: workgroup no. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80:987
- Pavlovich CP, Schmidt LS (2004) Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 4:381–393
- Okada S, Midorikawa O (1982) Induction of the rat renal adenocarcinoma by Fe-nitritriacetate (Fe-NTA). *Jpn Arch Intern Med* 29:485–491
- Ebina Y, Okada S, Hamasaki S, Ogino F, Li JL, Midorikawa O (1986) Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of iron- and aluminum-nitritriacetate complexes in rats. *J Natl Cancer Inst* 76:107–113
- Li JL, Okada S, Hamazaki S, Ebina Y, Midorikawa O (1987) Subacute nephrotoxicity and induction of renal cell carcinoma in mice treated with ferric nitritriacetate. *Cancer Res* 47:1867–1869
- Toyokuni S (1996) Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic Biol Med* 20:553–566
- Athar M, Iqbal M (1998) Ferric nitritriacetate promotes *N*-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis* 19:1133–1139
- Jahangir T, Sultana S (2006) Modulatory effects of *Pluchea lanceolata* against chemically induced oxidative damage, hyperproliferation and two-stage renal carcinogenesis in Wistar rats. *Mol Cell Biochem* 291:175–185
- Umamura T, Sai K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y (1990) Oxidative DNA damage, lipid peroxidation and nephrotoxicity induced in the rat kidney after ferric nitritriacetate administration. *Cancer Lett* 54:95–100
- Toyokuni S, Uchida K, Okamoto K (1994) Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitritriacetate. *Natl Acad Sci* 91:2616–2620
- Chen L, Wang Y, Kairaitis LK, Wang Y, Zhang BH, Harris DC (2001) Molecular mechanisms by which iron induces nitric oxide synthesis in cultured proximal tubule cells. *Exp Nephrol* 9:198–204
- Ross IA (2003) Medicinal plants of the world, chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. Humana Press, Totowa
- Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Yamamoto A, Kawakishi S, Osawa T (1994) Antioxidative components isolated from the seed of tamarind (*Tamarindus indica* L.). *J Agric Food Chem* 42:2671–2674
- Sudjaroen Y, Haubner R, Würtele G (2005) Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food Chem Toxicol* 43:1673–1682
- Komutarin T, Azadi S, Butterworth L (2004) Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 42:649–658

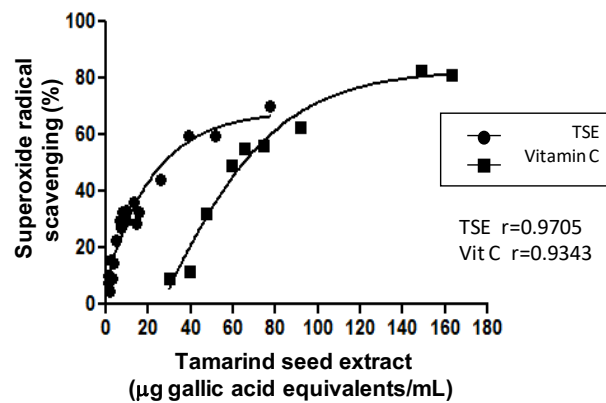
25. Tsuda T, Makino Y, Kato H, Osawa T, Kawakishi S (1993) Screening for antioxidative activity of edible pulses. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:1606–1608
26. Maiti R, Jana D, Das UK, Ghosh D (2004) Antidiabetic effect of aqueous extract of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 92:85–91
27. Maiti R, Das UK, Ghosh D (2005) Attenuation of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats by aqueous extract of seed of *Tamarindus indica*. *Biol Pharm Bull* 28:1172–1176
28. Singleton VL, Rossi JA Jr (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Vitic* 16:144–158
29. Bielski BHJ, Schlue GG, Bajuk S (1980) Reduction of nitro blue tetrazolium by CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> radicals. *J Phys Chem* 84:830–833
30. Awai M, Narasiki M, Yamanoi Y, Seno S (1979) Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Am J Pathol* 95:663–673
31. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
32. Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K (1998) Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 11:1176–1183
33. Long LH, Evans PJ, Halliwell B (1999) Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 262:605–609
34. Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J (2003) HO-1 induction attenuates renal damage and antioxidative stress induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. *Free Rad Biol Med* 34:1390–1398
35. Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ONJ, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Floriano-Sánchez E, Santamaría A, Ramírez V, Bobadilla NA, Pedraza-Chaverri J (2007) Evaluation of oxidative stress in D-serine induced nephrotoxicity. *Toxicology* 229:123–135
36. Jaiyeola T, Ossama T (2008) Recent advances in the diagnosis of renal cell carcinoma. *Diagn Histopathol* 14:157–163
37. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen M, Heliövaara A, Reunanen T, Hakulinen A, Aromaa A (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 76:560–568
38. Kang NJ, Lee KW, Kim BH, Bode AM, Lee HJ, Heo YS, Boardman L, Limburg P, Lee HJ, Dong Z (2011) Coffee phenolic phytochemicals suppress colon cancer metastasis by targeting MEK and TOPK. *Carcinogenesis* 32:921–928
39. Luengthanaphol S (2004) Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat—preliminary experiments. *J Food Eng* 63:247–252
40. Jomova K, Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283:65–87
41. Fridovich I (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23:239–257
42. Ryan TP, Aust SD (1992) The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit Rev Toxicol* 22:119–241
43. Fukuzawa K, Fuji T, Mukai K (1991) Peroxide-dependent and -independent lipid peroxidations catalyzed by chelated iron. *Arch Biochem Biophys* 290:489–496
44. Suksomtip M, Ukrisdawithid S, Bhusawang P, Pongsamart S (2010) Phenolic compound content, antioxidant and radical-scavenging properties of methanolic extracts from the seed coat of certain Thai tamarind cultivars. *J Food Biochem* 34:916–931
45. Kimoto T, Koya S, Hino K, Yamamoto Y, Nomura Y, Micallef MJ, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M (2000) Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. *Pathol Int* 50:679–689
46. Suksomtip M, Pongsamart S (2008) Protective effect against oxidation of human low-density lipoprotein and plasmid DNA strand scission of tamarind seed coat extract in vitro. *LWT Food Sci Technol* 41:2002–2007
47. Siddhuraju P (2007) Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *LWT Food Sci Technol* 40:982–990
48. Iqbal M, Athar M (1998) Attenuation of iron-nitrilotriacetate (Fe-NTA)-mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil. *Food Chem Toxicol* 36:485–495
49. He Q, Lv Y, Yao K (2007) Effects of tea polyphenols on the activities of  $\alpha$ -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chem* 101:1178–1182
50. Fujimoto A, Sakanashi Y, Matsui H (2009) Cytometric analysis of cytotoxicity of polyphenols and related phenolics to rat thymocytes: potent cytotoxicity of resveratrol to normal cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 104:455–462
51. Cohen HT, McGovern FJ (2005) Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 353:2477–2490
52. Bahnemann R, Leibold E, Kittel B, Mellert W, Jäckh R (1998) Different patterns of kidney toxicity after subacute administration of Na-nitrilotriacetic acid and Fe-nitrilotriacetic acid to wistar rats. *Toxicol Sci* 46:166–175
53. Taide M, Kanda S, Eguchi J (1993) A study of growth factors in human renal cysts with or without renal cell carcinoma. *Clin Chim Acta* 217:199–203
54. Montani M, Heinemann H, von Teichman A, Rudolph T, Perren A, Moch H (2010) VHL-gene deletion in single renal tubular epithelial cells and renal tubular cysts: further evidence for a cyst-dependent progression pathway of clear cell renal carcinoma in von Hippel-Lindau disease. *Am J Surg Pathol* 34:806–815
55. Lee Y-S, Vortmeyer AO, Lubensky I (2005) Coexpression of erythropoietin and erythropoietin receptor in von Hippel-Lindau disease-associated renal cysts and renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11:1059–1064
56. Lin C-J, Chen Y-C, Chen HH, Wu CJ, Hsu JM (2008) Renal cell carcinoma presenting as a huge simple renal cyst. *Med Oncol* 25:104–106
57. Toyokuni S, Okada K, Kondo S, Nishioka H, Tanaka T, Nishiyama Y, Hino O, Hiai H (1998) Development of high-grade renal cell carcinomas in rats independently of somatic mutations in the Tsc2 and VHL tumor suppressor genes. *Jpn J Cancer Res* 89:814–820
58. Foster K, Prowse A, van den Berg A, Fleming S, Hulsbeek MM, Crossey PA, Richards FM, Cairns P, Affar NA, Ferguson-Smith MA (1994) Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet* 3:2169–2173
59. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh M, Lubensky I, Duan DR, Florence C, Pozzatti R, Walther MM, Bander NH, Grossman HB, Braich H, Pomer S, Brooks JD, Isaacs WB, Lerman MI, Zbar B, Linehan WM (1994) Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 7:85–90
60. Soini Y, Kallio JP, Hirvikoski P (2006) Oxidative/nitrosative stress and peroxiredoxin 2 are associated with grade and prognosis of human renal carcinoma. *APMIS* 114:329–337

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

- [11010\\_2012\\_1373\\_MOESM1\\_ESM.pptx](#) (74KB)

Online Resource 1:

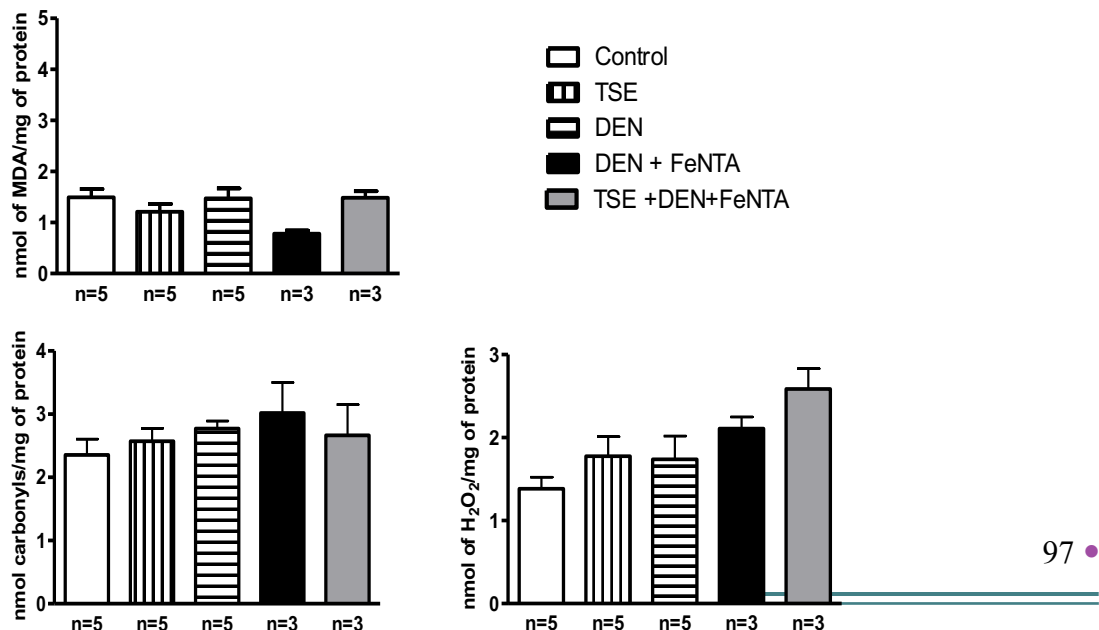
Concentration response curve for superoxide radical scavenging activity of tamarind seed extract (TSE). Tamarind seed extract scavenging capacity ( $IC_{50} = 30.7 \pm 0.5 \mu\text{g}$  gallic acid equivalents/mL), determined by xanthine/xanthine oxidase method, was greater than Vitamin C used as reference compound ( $IC_{50} = 66.0 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ ). Data are expressed as percentage of superoxide radical scavenging activity (PPTX 74 kb)



- [11010\\_2012\\_1373\\_MOESM2\\_ESM.pptx](#) (133KB)

Online Resource 2:

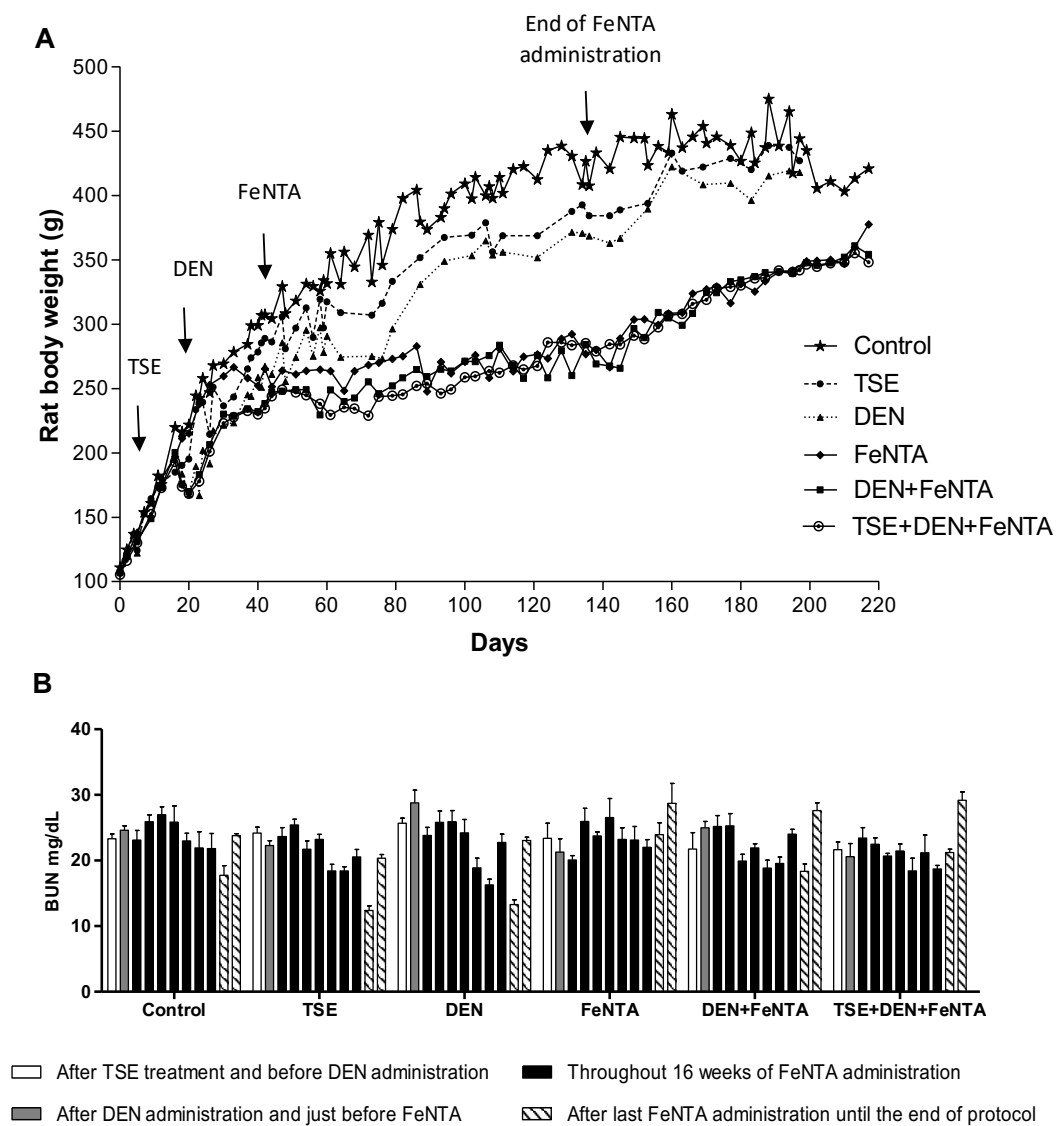
Malondialdehyde (MDA), protein carbonyl content and hydrogen peroxide levels from acute nephrotoxicity study. Renal cortex samples were obtained 24 h after second 9 mg Fe/kg bw FeNTA injection. There were no statistical changes ( $p > 0.05$ ). Columns represent the mean  $\pm$  SEM of number of animals indicated below columns (PPTX 133 kb)



- [blah11010\\_2012\\_1373\\_MOESM3\\_ESM.pptx \(225KB\)](#)

Online Resource 3:

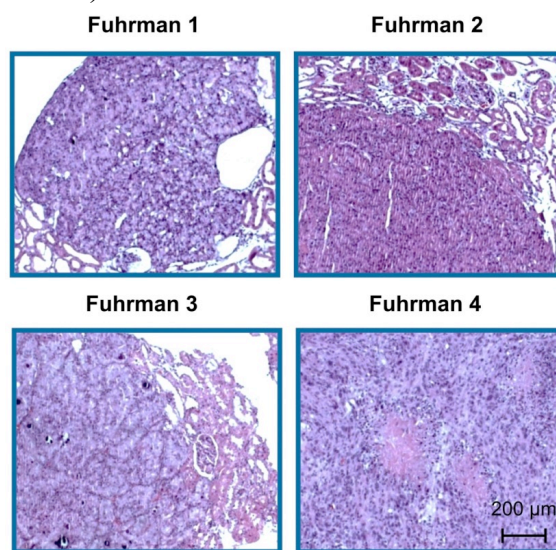
Determinations along carcinogenesis protocol. **a** Body weight. Similar increases were observed in control and TSE groups. In DEN group this parameter decreased immediately after its administration but it was reestablished thereafter. Groups treated with FeNTA showed also a decrease but they did not reach control values at the end of the study ( $p < 0.05$ ). Each point represents the mean value; SEM was omitted to appreciate clearly the behavior of the different groups. Number of animals (from 10 to 25) changed due to mortality. **b** Renal function evaluation as blood urea nitrogen (BUN) levels throughout carcinogenesis protocol. Several serum samples were taken as described in the text. There were no statistical changes in any group at any time ( $p > 0.05$ ). Columns in graphs represent the mean  $\pm$  SEM (PPTX 224 kb)



- [blah11010\\_2012\\_1373\\_MOESM4\\_ESM.pptx](#) (615KB)

Online Resource 4:

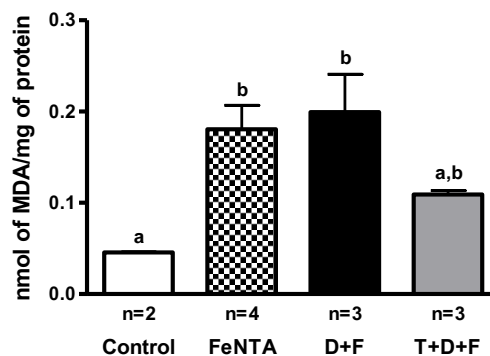
Representative kidney sections with tumor exhibiting different Fuhrman grades induced in DEN+FeNTA group. Grading is dependent solely on nuclear morphology and content and prominence of nucleoli: Grade 1, nuclei are similar to those of normal proximal tubular epithelia and sometimes show pyknosis (with small lymphocyte-like nuclei); grade 2, nuclei are larger than those of grade 1, sometimes show irregularity or slight pleomorphism, often have prominent nucleoli, but are neither evidently atypical nor bizarre; grade 3, nuclei reveal prominent irregularity and pleomorphism and many bizarre or giant nuclei are observed; grade 4, large and pleomorphic nuclei as well as sarcomatoid features are present (description from Thomas, 2008). (H&E,  $\times 100$ ) (PPTX 615 kb)



- [blah11010\\_2012\\_1373\\_MOESM5\\_ESM.pptx](#) (87KB)

Online Resource 5:

Serum lipid peroxidation 1 h after the 26th injection of FeNTA treatment (9 mg Fe/kg bw). These results suggest that oxidative stress is induced after each FeNTA administration during the development of carcinogenesis protocol and that TSE partially diminishes this parameter in TSE+DEN+FeNTA group. Columns in graphs represent the mean  $\pm$  SEM. Columns with different letters exhibit statistical difference ( $p < 0.0262$ ) (PPTX 87 kb)



**A. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES**

- **Carbonato de sodio 1M**  
Pesar 26.5g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , disolver en agua destilada y aforar a 250 mL.
- **Estándar ácido gálico para la curva patrón [10 mg/mL]**  
Pesar 50 mg de ácido gálico y disolver en 5 mL de metanol al 50% en agua destilada.
- **Folin 2N**  
Hacer una dilución 1:10 con agua destilada.

**B. INACTIVACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO****Soluciones para la preparación de la mezcla de reacción**

- **Xantina 0.3 mM**  
Pesar 0.023g de xantina, agregar 4-5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  400 mM y aforar con 500 mL de agua destilada.
- **EDTA 0.6 mM**  
Pesar 0.112 g de EDTA y disolverlos en 500 mL de agua destilada con agitación.
- **Azul de nitrotetrazolio (NBT) 150  $\mu\text{M}$**   
Pesar 0.037g de NBT y disolverlos en 300 mL de agua destilada con agitación.
- **$\text{Na}_2\text{CO}_3$  400 mM**  
Pesar 21.2 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y disolver en 500 mL de agua destilada con agitación.
- **Albúmina sérica bovina 0.1 %**  
Pesar 0.25 g de albúmina y disolver en 250 mL de agua destilada.

**Mezcla de reacción**

Mezclar las soluciones en el volumen indicado a continuación:

Reactivo	Volumen
• Xantina	30 mL
• EDTA	15 mL
• NBT	15 mL
• $\text{Na}_2\text{CO}_3$	9 mL
• ABS	4.5 mL
<b>Total</b>	<b>73 mL</b>

- **Amortiguador de fosfatos 50mM pH: 7.4**  
Pesar 1.05g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.67g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  para preparar 250 mL de solución.
- **Sulfato de amonio 2M**  
Pesar 66g de sulfato de amonio y aforar en 250 mL de agua destilada.
- **Xantina oxidasa 168 U/L**  
Para preparar 1mL de xantina oxidasa 168U/L a partir de un lote de 0.09U/mg de sólido:  

$$0.096 \text{ U} \text{-----} 1\text{mg} \qquad 1750 \text{ mg} \text{-----} 1000\text{mL}$$

$$168\text{U} \quad x = 1750\text{mg} \qquad x = 1.75 \text{ mg} \qquad 1 \text{ mL}$$
Disolver la cantidad calculada (1.75 mg) de xantina oxidasa en 1 mL de sulfato de amonio 2M.
- **Cloruro de cobre  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.8 mM**  
Pesar 0.07 g de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y disolver en 500 mL de agua destilada.

### C. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

➤ **Amortiguador de fosfatos (20 mM, pH:7.4)**

Pesar 0.027g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.043 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  para preparar 25 mL de solución.

➤ **Tris HCl 20 mM pH:7.4**

Pesar 0.158 g de Tris-HCl disolver en agua desionizada, ajustar el pH y aforar a 50mL.

➤ **Estándar de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMPO) 10 mM en Tris-HCl 20 mM pH: 7.4**

Tomar 16.47  $\mu\text{L}$  de TMPO y aforar a 10 mL con Tris-HCl 20 mM pH:7.4.

➤ **Estándar de TMPO 20  $\mu\text{M}$**

Diluir el estándar de TMPO 10 mM en Tris-HCl 20 mM en proporción 1/500 en agua destilada (0.1 mL de TMPO 10 mM en 50 mL de agua destilada).

➤ **1-metil-2-fenilindol 10 mM en acetonitrilo**

Disolver 0.020728g de 1-metil-2- fenilindol en 10 mL de acetonitrilo.

➤ **Mezcla 1-metil-2-fenilindol 10 mM/metanol proporción 1:3**

Mezclar 6 mL de metanol con 19 mL de estándar de 1-metil-2-fenilindol 10 mM.

### D. CUANTIFICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

➤ **Amortiguador de fosfatos (100 mM, pH:7.4)**

Pesar 5.37g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  y 1.35 de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  disolver en agua desionizada y aforar a 250 mL.

➤ **Peróxido de hidrógeno 25 mM**

Diluir 285  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% de agua destilada

➤ **Peróxido de hidrógeno 100  $\mu\text{M}$**

Hacer una dilución 1:250 del estándar de peróxido de hidrógeno 25 mM (tomar 200  $\mu\text{L}$  y diluirlos en 50 mL de agua destilada).

➤ **Reactivo de Fox**

**Naranja de xilenol (3,3'-bis[N, N-di(carboximetil)-aminometil]-o-cresolsulfona-fenolftaleína, sal sódica)**

**Solución 1. Hidroxitolueno butilado (BHT) 4mM en metanol**

Pesar 0.0157g de BHT y disolver en 18 mL de MeOH

**Solución 2. Naranja de xilenol 1mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56mM**

Pesar 1.52 mg de naranja de xilenol y 2 mg de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$  y disolverlos en 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  250 mM

Mezclar las soluciones 1 y 2 (proporción 9:1 (v/v) respectivamente)

➤ **Ácido sulfúrico 250 mM**

Tomar 0.7 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y aforar en 50 mL de agua.

### E. PROTEÍNAS OXIDADAS

➤ **Amortiguador de fosfatos (50 mM, pH:7.4 con inhibidores de proteasas, EDTA 1mM y Tritón 0.1%).**

Pesar la cantidad de cada reactivo descrita a continuación:

Para 100mL	Peso
• $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.278 g
• $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.419 g
• EDTA	0.372 g
• $\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.0005 g
• Leupeptina*	0.0005 g
• Aprotinina*	0.0005g



• <b>Pepstatina*</b>	0.0007 g
• <b>Tritón</b>	0.1 mL

Ajustar a pH:7.4 y aforar a 100mL con agua destilada o disolver una tableta (Protease inhibitor cocktail tablets, Complete® mini Roche; Mannheim, Alemania) por cada 10 mL de solución.

➤ **Sulfato de estreptomicina al 10% en amortiguador de fosfatos 50mM con inhibidores de proteasas, EDTA, tritón**

Pesar 1 g de sulfato de estreptomicina y disolver en 10 mL del amortiguador de fosfatos 50mM con inhibidores de proteasas, EDTA, y tritón.

➤ **Ácido tricloroacético al 20%**

Pesar 20 g de TCA y disolverlos en 100 mL de agua destilada.

➤ **Ácido tricloroacético al 10%**

Pesar 10 g de TCA y disolverlos en 100 mL de agua destilada.

➤ **Guanidina 6M en amortiguador de fosfatos 20mM pH 2.3**

Pesar 11.4636 g de guanidina HCl y aforar a 20mL con amortiguador de fosfatos 20 mM pH 2.3

➤ **Amortiguador de fosfatos 20mM pH2.3**

Pesar 0.7584 g de  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  y 0.092 g de  $KH_2PO_4$ . Ajustar al pH indicado y aforar con 200 mL de agua destilada.

➤ **Dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM**

Pesar 0.0495 g DNPH y disolver en 25 mL de HCl 2.5M

➤ **HCl 2.5M**

Adicionar 10 mL de HCl concentrado a 40 mL de agua destilada.

➤ **Mezcla etanol-acetato de etilo (1:1)**

Mezclar proporciones iguales de etanol y acetato de etilo.

➤ **Albúmina sérica bovina (4mg/mL de guanidina)**

Pesar 4 mg de ABS y disolver en guanidina 6M

## F. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE LOWRY

➤ **Estándar albúmina sérica bovina al 0.05%**

Pesar 0.05 g de ABS y aforar con 100 mL de agua destilada.

➤ **Solución A**

Preparar una solución con  $Na_2CO_3$  al 2%, NaOH al 0.4% y tartrato de sodio al 0.02% en agua destilada.

➤ **Solución B**

Preparar una solución con sulfato de cobre al 0.5% en agua destilada.

➤ **Solución C**

Mezclar la solución B y la solución A en proporción 1:50 respectivamente.

➤ **Solución D**

Diluir Folin 1N con agua destilada en proporción 1:2.

## G. CUANTIFICACIÓN DE CREATININA

➤ **Reactivo de trabajo**

Se prepara mezclando volúmenes iguales de una solución de ácido pícrico 17.5 mM con una de hidróxido de sodio 0.29 M.

## H. CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO UREICO SANGUÍNEO

➤ **Reactivo de trabajo**

Mezclar volúmenes iguales de o-ftaladehído 4.8 mM y de la solución de borato 87 mM.

**I. PREPARACIÓN DE N-DIETILNITROSAMINA (DEN)**

La solución de N-dietilnitrosamina se prepara disolviendo la cantidad requerida de acuerdo a la dosis 200 mg/Kg en solución salina.

**J. PREPARACIÓN DE NITRILOTRIACETATO DE HIERRO (FeNTA)**

La solución de nitrilotriacetato de hierro se prepara en el momento del ensayo de acuerdo al método descrito en la literatura (Awai *et al.*, 1979) siguiendo una relación molar 1:4 de las soluciones nitrato de hierro y nitrilotriacetato de sodio respectivamente. En nuestro laboratorio se utilizó el doble de la concentración de nitrilotriacetato de sodio para hacer la solución de FeNTA en proporción 1:2 y la solución se ajustó a pH: 7.4 con bicarbonato de sodio 120 mM.

**Reactivos**

➤ **Nitrato de hierro  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  160 mM**

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

➤ **Nitrilotriacetato de sodio  $\text{Na}_2\text{NTA}$  320 mM**

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

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

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

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

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 300 mM, y se agregan 0.2 g de bicarbonato de sodio 120 mM lentamente y con agitación para ajustar a pH 7.4. Una vez obtenido el pH deseado, se interrumpe la agitación con la finalidad de mantener constante este pH por mayor tiempo.

**Ajuste del pH de la solución de FeNTA durante el transcurso de los ensayos**

El ajuste de pH debe realizarse con un potenciómetro con la modalidad que permita medir los cambios de pH durante todo el tiempo, ya que la solución nunca se mantendrá a pH constante, esta solución presenta variaciones pequeñas de pH que se incrementan con la agitación durante el transcurso del ensayo. Para evitar la preparación de una nueva solución de FeNTA durante el ensayo (en caso de que este sobrepase el pH de 7.4), se debe preparar otra solución de FeNTA sin agregar bicarbonato de sodio, para poder disminuir el pH de la primera solución de FeNTA.

## Precauciones:

Para preparar la solución de nitrato de hierro 160 mM, disolver lentamente el nitrato de hierro en bicarbonato de sodio 120 mM ya que la efervescencia de este reactivo puede ocasionar derrame de la solución antes de completar el aforo. La solución de FeNTA debe protegerse de la luz.

**K. PERFUSIÓN**➤ **Solución Krebs-Ringer**

Reactivos	
• Cloruro de sodio (NaCl)	128 mM
• Cloruro de potasio (KCl)	5 mM
• Fosfato monobásico de potasio anhidro (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.3 mM
• Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> )	1.3 mM
• Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	2.1 mM
• Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	14 mM
• Glucosa	10 mM
• Albúmina sérica bovina (ABS)	1 mg/mL

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

➤ **EDTA 250 mM**

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

**L.INMUNOHISTOQUÍMICA**➤ **Desparafinación y rehidratación de las muestras**

Solución		Tiempo
• Xilol	100%	5 min, 2 veces
• Etanol	100%	1 min
• Etanol en agua	95%	1 min
• Etanol en agua	70%	1 min
• H <sub>2</sub> O	100%	5 min

➤ **Solución de peróxido de hidrógeno en metanol al 3%**

Mezclar 3 mL de peróxido de hidrógeno al 30% con 27 mL de metanol.

➤ **Amortiguador de citratos 25 mM pH:6.2**

Pesar 7.25 g de citrato de sodio dihidratado granular HOC (COONa)(CH<sub>2</sub>COONa)<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O y disolver en 1L de agua destilada.

➤ **Amortiguador de fosfato salino 1X (PBS)**

Pesar la cantidad de cada reactivo descrita a continuación:

Para 1L	Peso
• NaCl	8 g
• KCl	0.2 g
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,42 g

• <b>KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.27 g
• <b>H<sub>2</sub>O</b>	cbp 1L

Ajustar a pH: 7.4 y aforar a 1L con agua destilada.

## M. WESTERN BLOT

### Buffer de lisis

Reactivo	Concentración	Vol. para preparar 10 ml de solución
• <b>DTT</b>	100 mM	100 µL
• <b>Tris HCl</b>	100 mM	1000 µL
• <b>Glicerol</b>		3000 µL
• <b>EDTA</b>	100 mM	100 µL
• <b>Tritón</b>		100 µL
• <b>Ortovanadato</b>	100 mM	100 µL
• <b>Azida de sodio</b>	1.5 M	100 µL
• <b>PMSF</b>	100 mM	100 µL

Agregar PBS pH:7.4 cbp 10 mL. Disolver una tableta (Protease inhibitor cocktail tablets, Complete® mini Roche; Mannheim, Alemania)) por cada 10 mL de solución.

#### ➤ **Mix acrilamida al 30%**

Pesar 29 g Acrilamida y 1 g de N,N-metilbisacrilamida y disolver en 60 mL de agua destilada estéril, atemperada, ajustar a 100 mL. Esterilizar por filtración aproximadamente entre 250-500 mL

#### ➤ **Tris-Base 1.5M pH:8.8**

Pesar 181.71g de Tris-Base, ajustar a pH:8.8 y aforar con 1L de agua destilada.

#### ➤ **Tris-Base 1.0M pH:6.8**

Pesar 121.4g de Tris-Base, ajustar a pH:8.8 y aforar con 1L de agua destilada.

#### ➤ **SDS al 10%**

Pesar 10g de SDS y disolver en 100 mL de agua destilada.

#### ➤ **Persulfato de amonio al 10%**

Disolver 10 mL de persulfato de amonio en 100 ml de agua destilada.

#### ➤ **Amortiguador para electroforesis**

	Para 1L	Peso
• <b>Tris-Base</b>		3.02 g
• <b>Glicina</b>		18.8 g
• <b>SDS</b>		1 g

#### ➤ **Amortiguador para transferencia**

	Para 1L	Peso
• <b>Tris-Base</b>		5.8 g
• <b>Glicina</b>		2.9 g
• <b>SDS</b>		0.37 g
• <b>Metanol</b>		200 mL

➤ **Amortiguador de fosfato salino con Tween (PBS 1X-Tween)**

Para 1L	Peso
• NaCl	8 g
• KCl	0.2 g
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,42 g
• KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.27 g
• Tween 20	0.5 mL
• H <sub>2</sub> O	cbp 1L

Adicionar 0.5 mL antes de aforar la solución.

➤ **Preparación de los geles de acrilamida**

Gel separador		Gel de carga	
• H <sub>2</sub> O	7.9 mL	• H <sub>2</sub> O	8.2 mL
• 30% acrilamida mix	6.7 mL	• 30% acrilamida mix	2.0 mL
• 1.5 M Tris-Base (pH:8.8)	5.0 mL	• 1.5 M Tris-Base (pH:8.8)	1.5 mL
• SDS al 10%	0.2 mL	• SDS al 10%	0.12 mL
• Persulfato de amonio al 10%	0.2 mL	• Persulfato de amonio al 10%	0.12 mL
• TEMED	0.008 mL	• TEMED	0.012 mL

**Gel separador**

Para hacer 4 geles preparar aproximadamente 20 mL de mezcla

**Gel de carga**

Para hacer 4 geles preparar aproximadamente 12 mL de mezcla

➤ **Buffer de streeping**

Mezclar 12.5 mL de Tris-Base 1.5M pH.8.8 con 20 mL de SDS al 10% y aforar a 100mL. Añadir 140 µL de β-mercaptoetanol por cada 20 mL de solución. Usar 20 mL de la solución por membrana de PVDF.

➤ **Diluciones de anticuerpos**

Diluir los anticuerpos en la proporción deseada con PBS-Tween.

- **VHL** (FL-181) No. de catálogo sc-5575
- **HIF1α** No. de catálogo sc-53546
- **HIF2α** (EPAS-1) No. de catálogo sc-28706
- **CAIX** (M-100) No. de catálogo sc-25600

➤ **Solución de bloqueo**

Solución de leche Svelty® en PBS-Tween al 1 o 5%.

**N. ELISA directo**

**6 Amortiguador de bicarbonato 0.1 M pH:8.2**

Pesar 4.2 g de bicarbonato de sodio NaHCO<sub>3</sub> y disolver con agua destilada, ajustar el pH:8.2 y aforar a 500 mL.

**7 Solución PBS pH:7.0**

Para 1L	Peso
• NaCl	8 g
• KCl	0.2 g
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.16 g
• KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
• H <sub>2</sub> O	cbp 1L

**8 Solución PBS/Tween**

Agregar 0.5 mL de Tween-20 a 1L de PBS pH:7.0

**9 Solución de bloqueo al 1%**

Pesar 0.1 g de Leche Svelty® y disolver en 10 mL de PBS.

**10 Solución de ácido cítrico 0.1M pH. 4.35**

Pesar 1.92 g de ácido cítrico, disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar a 100 mL.

**11 Sustrato ABTS**

Agregar 30 mg de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotrazolin-6-sulfónico (ABTS) a 100 mL de ácido cítrico 0.1 M en agua pH: 4.35. Realizar alícuotas en viales de 11 mL y almacenar a -20°C. Agregar 10 µL de peróxido de hidrógeno al 30% antes de usar.

## X. REFERENCIAS

- Aguilar-Barradas J, Aguilar-Moreno JP, Sánchez-Alvarado RA, et al. Carcinoma de células claras metastásico a piel: reporte de un caso. *Revista Mexicana de Urología*, 2009;69(1):25-27.
- Arai E, Kanai Y. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2011;4(1):58-73.
- Argani P, Antonescu CR, Illei PB, et al. Primary renal neoplasm with the ASPL-TFE3 gene fusion of alveolar soft part sarcoma: a distinctive tumor entity previously included among renal cell carcinomas of children and adolescents. *American Journal of Pathology*, 2001;159(1):179-192.
- Argani P, Antonescu CR, Couturier J, et al. PRCC-TFE3 renal carcinomas: morphologic, immunohistochemical, ultrastructural and molecular analysis of an entity associated with t(X;1) (p11.2; q21). *American Journal of Surgical Pathology*, 2002;26(12):1553-1566.
- Athar M, Iqbal M. Ferric nitrilotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis*, 1998;19(6):1133-1139.
- Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, et al. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II)-iron (III) complex. *Biochemical Journal*, 1989;258(2):617-620.
- Averous J, Proud CG. When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene*, 2006;25(48): 6423-6435.
- Avery RA, Harris JE, Davis CJ Jr, et al. Renal medullary carcinoma. *Cancer*, 1996;78(1):128-132.
- Awai M, Narasaki M, Yamanoi Y, et al. Induction of Diabetes in Animals by Parenteral Administration of Ferric Nitrilotriacetate. *American Journal of Pathology*, 1979;95(3):663-674.
- Baba M, Hong SB, Sharma N, et al. Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2006;103(42):15552-15557.
- Bahnemann R, Leibold E, Kittel B, et al. Different patterns of kidney toxicity after subacute administration of N-nitrilotriacetic acid and Fe-nitrilotriacetic acid to wistar rats. *Toxicological Sciences*, 1998;46(1):166-175.
- Bansal AK, Bansal M, Soni G, et al. Protective role of vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 2005;156(2-3):101-111.
- Barnea G, Silvennoinen O, Shaanan B, et al. Identification of a carbonic anhydrase like domain in the extracellular region of RPTP-g defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. *Molecular Cell of Biology*, 1993;13(3):1497-1506.
- Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, et al. HO-1 induction attenuates renal damage and antioxidative stress induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003;34(11):1390-1398.
- Beavon IR. Regulation of E-cadherin: does hypoxia initiate a metastatic cascade? *Journal of Clinical and Molecular Pathology*, 1999;52(4):179-187.
- Berndt JD, Moon RT, Major MB. Beta-catenin gets jaded and von Hippel-Lindau is to blame. *Trends in Biochemical Sciences*, 2009;34(3):101-104.
- Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature*, 2011;480(7375):94-98.

- Bielecka ZF, Czarnecka AM, Szczlik C, et al. Genomic analysis as the first step toward personalized treatment in renal cell carcinoma, *Frontiers in Oncology*, 2014;4:194.
- Bindra RS, Vaselli JR, Stearman R, et al. VHL-mediated hypoxia regulation of cyclin D1 in renal carcinoma cells. *Cancer Research*, 2002;62(11):3014-3019.
- Biswas S, Eisen T. Immunotherapeutic strategies in kidney cancer-when TKIs are not enough. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2009;6(8):478-487.
- Bjornsson J, Short MP, Kwiatkowski DJ, et al. Tuberous sclerosis-associated renal cell carcinoma. Clinical, pathological and genetic features. *American Journal of Pathology*, 1996;149(4):1201-1208.
- Blankenship C, Naglich JG, Whaley JM, et al. Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity. *Oncogene*, 1999;18(8):1529-1535.
- Brauch H, Weirich G, Brieger J, et al. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and novel hot spot mutation. *Cancer Research*, 2000;60(7):1942-1948.
- Brennan JF, Stilmant MM, Babayan RK, et al. Acquired renal cystic disease: implications for the urologist. *British Journal of Urology*, 1991;67(4):342-348.
- Bui MH, Seligson D, Han KR, et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: Implications for prognosis and therapy, *Clinical Cancer Research*, 2003;9(2):802-811.
- Burrows AE, Smogorzewska A, Elledge SJ, et al. Polybromo-associated BRG1-associated factor components BRD7 and BAF180 are critical regulators of p53 required for induction of replicative senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2010;107(32):14280-14285.
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW, et al. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 2011; 11(2):85-95.
- Campbell SC, Flanigan RC, Clark JI, et al. Nephrectomy in metastatic renal cell carcinoma. *Current Treatment Options of Oncology*, 2003;4(5):363-372.
- Castellano-Orozco M, Vázquez-Ortega L, Camarena-Reynoso H, et al. Características clínico-patológicas asociadas al tamaño y metástasis en tumores de células renales. *Revista Mexicana de Urología*, 2008; 68(4):207-214.
- Chen J, Futami K, Petillo D, et al. Deficiency of FLCN in mouse kidney led to development of polycystic kidneys and renal neoplasia. *PLoS One*, 2008;3(10):e3581.
- Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, et al. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2003;27(5):612-624.
- Chikara S, Dalasanur L, Singhal J, et al. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*, 2018;413:122-134.
- Chitalia VC, Foy RL, Bachschmid MM, et al. Jade-1 inhibits Wnt Signalling by ubiquitylating beta-catenin and mediates Wnt pathway inhibition by pVHL. *Nature Cell Biology*, 2008;10(10):1208-1216.
- Cho D, Signoretti S, Regan M, et al. The role of mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 2007;13(2 Pt 2):758s-763s.



- Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF Jr, et al. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *The New England Journal of Medicine*, 2000;343(18):1305-1311.
- Cohen HT, McGovern FJ. Renal cell carcinoma, *The New England Journal of Medicine*, 2005;353(23):2477-2490.
- Corgna E, Betti M, Gatta G, et al. Renal Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2007;64(3):247-262.
- Dabney R, Devine R, Sein N, et al. New agents in renal cell carcinoma. *Target Oncology*. 2014;9(3):183-193.
- Dall'Oglio MF, Ribeiro-Filho LA, Antunes AA, et al. Microvascular tumor invasion, tumor size and Fuhrman grade: a pathologic triad for prognostic evaluation of renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 2007;178(2):425-428.
- Davis CJ, Mostofi FK, Sesterhenn IA. Renal medullary carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 1995;19(1):1-11.
- Deguchi J, Miyamoto M, Okada S. Sex Hormone –dependent Renal Cell Carcinogenesis Induced by Ferric Nitrosylacetate in Wistar Rats. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1995;86(11):1068-1071.
- Delahunt B, Eble JN, McCreddie MR, et al. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Human Pathology*, 2001;32(6):590-595.
- Deng FM, Melamed J. Histologic variants of renal cell carcinoma: does tumor type influence outcome? *Urologic Clinics of North America*, 2012;39(2):119-132.
- Díaz de León Nevárez CA, Priego Niño A, Ángeles Hernández JC, et al. Lesion tumoral en pene como manifestación inicial de carcinoma de células renales. *Revista Mexicana de Urología*, 2007;67(4):215-218.
- Dorai T, Sawczuk IS, Pastorek J, et al. The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer. *European Journal of Cancer*, 2005;41(18):2935-2947.
- Eichelberg C, Junker K, Ljungberg B, et al. Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. *European Urology*, 2009;55(4):851-863.
- Ellinger J, Kahl P, Mertens C, et al. Prognostic relevance of global histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 2010;127(10):2360-2366.
- Escudier B, Szczylik C, Eisen T, et al. Randomized phase III trial of the Raf kinase and VEGFR inhibitor sorafenib (BAY 43-9006) in patients with advanced renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2005; 23(16S):LBA4510.
- Escudier B, Albiges L, Sonpavde G. Optimal management of metastatic renal cell carcinoma: current status. *Drugs*, 2013;73(5):427-438.
- Rice-Evans C, Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipid Reserach*, 1993;32(1):71-110.
- Ferlay J, Shin JR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 2010;127(12):2893-2917.
- Ferlicot S, Lupo A, Lazure T, et al. A novel entity: low-grade mucinous tubular renal carcinoma. *Histopathology*, 2005;47(2):218-219.
- Fiala, A., Importance of early detection of renal carcinoma with regard to the prognosis. *Prakt Lék*. 2001; 4: 197-198.

- Foster, K., Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor genes. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1998; 89: 814-820.
- Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 1982;6(7):655-663.
- Fujimoto A, Sakanashi Y, Matzui H, et al. Cytometric analysis of cytotoxicity of polyphenols and related phenolics to rat thymocytes: potent cytotoxicity of resveratrol to normal cells. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, 2009;104(6):455-462.
- Furge KA, Chen J, Koeman J, et al. Detection of DNA copy number changes and oncogenic signaling abnormalities from gene expression data reveals MYC activation in high-grade papillary renal cell carcinoma. *Cancer Research*, 2007;67(7):3171-3176.
- Gago-Domínguez M, Castelao JE, Pike MC, et al. Role of lipid peroxidation in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 2005;14(12):2829-2839.
- Ganesamoni R, Battacharyya S, Kumar S, et al. Status of oxidative stress in patients with renal cell carcinoma. *Journal of Urology*, 2012;187(4):1172-1176.
- Gao C, Chen YG. Dishevelled: the hub of Wnt signaling. *Cell Signal*. 2012;22(5):717-727.
- Genda T, Sakamoto M, Ichida T, et al. Loss of cell-cell contact is induced by integrin-mediated cell substratum adhesion in highly motile and highly metastatic hepatocellular carcinoma cells. *Laboratory Investigation*, 2000;80(3):387-394.
- Gérard-Monnier, D., Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology*, 1998; 11:1176-1183.
- Gill IS, Novik AC, Meraney AM, et al. Laparoscopic renal cryoablation in 32 patients. *Urology*, 2000;56(5):748-753.
- Gnarra JR, Tory K, Weng Y, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nature Genetics*, 1994;7(1):85-90.
- Gnarra JR, Zhou S, Merrill MJ, et al. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1996;93(20):10589-10594.
- Gordan JD, Thompson CB, Simon MC, et al. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*. 2007;12(2):108-113.
- Gordon MS, Ebbinghaus SW. Antiangiogenic Therapy of Renal Cell Carcinoma. In: Teicher BA, Ellis LM (eds) *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy*. Cancer Drug discovery and Development. Humana Press. 2008;427-439.
- Greef B, Eisen T. Medical treatment of renal cancer: new horizons. *British Journal of Cancer*, 2016;115(5):505-516.
- Grosso G. Effects of polyphenol-rich foods on human health. *Nutrients*, 2018;10(1089):1-6.
- Gudas LJ, Fu L, Minton DR, et al. The role of HIF1 $\alpha$  in renal cell carcinoma tumorigenesis. *Journal of Molecular Medicine (Berl.)*. 2014; 92(8):825-836.

- Haase VH. Mechanism of hypoxia responses in renal tissue. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2013;24(4):537-541.
- Haddad JJ, Land SC. A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha. *FEBS Letters*, 2001;505(2):269-274.
- Hafron J, Kaouk JH. Ablative techniques for the management of kidney cancer. *National Clinical Practice*, 2007;4(5):261-269.
- Harshman LC, Choueiri TK. Targeting the Hepatocyte Growth Factor/C-Met Signaling Pathway in Renal Cell Carcinoma, *The Cancer Journal*, 2013;19(4):316-323.
- Hartman TR, Nicolas E, Klein-Szanto SA, et al. The role of the Birt-Hogg-Dubé protein in mTOR activation and renal tumorigenesis. *Oncogene*, 2009; 28(13):1594-1604.
- Henderson A, Douglas F, Perros P, et al. SDHB-associated renal oncocytoma suggest a broadening of the renal phenotype in hereditary paragangliomatosis. *Familial Cancer*, 2009;8(3):257-260.
- He L, Fan C, Gillis A, et al. Co-existence of high levels of the PTEN protein with enhanced Akt activation in renal cell carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007;1772(10):1134-1142.
- Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D. The Ras-raf-MEK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie*, 2002;25(6):511-518.
- Hino O. Studies of familial tumors using models: genotype, phenotype, and dramatype in carcinogenesis. *International Journal of Clinical Oncology*, 2004;9(4):257-261.
- Hong SB, Oh H, Valera VA, et al. Inactivation of the FLCN Tumor Suppressor Gene Indicates TFE3 Transcriptional Activity by Increasing Its Nuclear Localization. *Plos One*, 2010;5(12):e15793.
- Hori Y, Oda Y, Kiyoshima K, et al. Oxidative stress and DNA hypermethylation status in renal cell carcinoma arising in patients on dialysis. *Journal of Pathology*, 2007;212(2):218-226.
- Huang SP, Wu JW, Chang WS, et al. p53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms in prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2004;13(12):2217-2224.
- Hudon V, Sabourin S, Dydensborg AB, et al. Renal tumour suppressor function of the Birt-Hogg-Dubé syndrome gene product folliculin. *Journal of Medical Genetics*, 2010;47(3):182-189.
- Hudson CC, Liu M, Chiang GG, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Molecular and Cellular Biology*, 2002;22(20):7004-7014.
- Igarashi H, Isumi M, Ishida H, et al. Vascular endothelial growth factor overexpression is correlated with von Hippel-Lindau tumor suppressor gene inactivation in patients with sporadic renal cell carcinoma. *Cancer* 2002;95(1):47-53.
- Iqbal M, Athar M. Attenuation of iron-nitritotriacetate (Fe-NTA)-mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil. *Food and Chemical Toxicology*, 1998;36(6):485-495.
- Iqbal M, Giri U, Giri DK, et al. Age-Dependent renal accumulation of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-modified proteins following parenteral administration of Ferric Nitritotriacetate commensurate with its differential toxicity: implications for the involvement of HNE-protein adducts in oxidative stress and carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999;1(1):101-112.
- Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, et al. Expression of hypoxia-inducible transmembrane cell-surface carbonic anhydrases in human cancer. *American Journal of Pathology*, 2001;158(3):905-919.

- Jahangir T, Sultana S. Modulatory effects *Pluchea lanceolata* against chemically induced oxidative damage, hyperproliferation and two-stage renal carcinogenesis in Wistar rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2006;291(1-2):175-185.
- Jasso RV, Bramblia SE Alcaraz ME. Prognostic factors in localized and regionally advanced renal cell carcinoma. *Actas Urológicas Españolas*, 2008;32(3):320-324.
- Jocham D, Richter A, Hoffmann L, et al. Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomized controlled trial. *Lancet* 2004;363(9409):594-599.
- Jones J, Otu H, Spentzos D, et al. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clinical Cancer Research*, 2005;11(16):5730-5739.
- Jones J, Libermann TA. Genomics of renal cell cancer: The biology behind and the therapy ahead. *Clinical Cancer Research*, 2007;13(2 Pt 2):685-692.
- Kaplan, A., Urea. *Clinical Chemistry*. The C.V. Mosby Co. st. Louis. Toronto. Princeton 1984;1257-1260 y 437 y 418.
- Kashyap MK, Kumar A, Emelianenko N, et al. Biochemical and molecular markers in renal cell carcinoma: an update and future prospects. *Biomarkers*, 2005;10(4):258-294.
- Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2004;22(24):4991-5004.
- Kimoto T, Koya S, Hino K, et al. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. *Pathology International*, 2000;50(9):670-689.
- Klatte T, Seligson DB, LaRochelle J. Molecular signatures of localized clear cell renal cell carcinoma to predict disease-free survival after nephrectomy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2009;18(3):894-900.
- Knebelmann B, Ananth S, Cohen HT, et al. Transforming growth factor alpha is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Research*, 1998;58(2):226-231.
- Komutarin T, Azadi S, Butterworth L, et al. Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology*, 2004;42(4):649-658.
- Kondo K, Kim WY, Lecchpammer M, et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient to growth suppression of VHL -/- tumors. *Molecular Cancer Research*, 2004; 2: 89-95.
- Kondo K, Klco J, Nakamura E, et al. Inhibition of HIF is necessary for tumour suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell*, 2002; 1: 237-246.
- Kopper, L, Tímár J. Genomics of Renal Cell Cancer-Does it Provide Breakthrough? *Pathology Oncology Research*, 2006;12:5-11.
- Kovacs, G, Akhtar M, Beckwith BJ, et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *Journal of Pathology*, 1997;183(2):131-133.
- Koyle MA, Hatch DA, Furness III PD et al. Long-term urological complications in survivors younger than 15 months of advanced stage abdominal neuroblastoma. *Journal of Urology*, 2001;166(4):1455-1458.
- Krinke, G., *The laboratory rat*, Academic Press, 2000.

- Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature*, 2008; 5(10): 588-599.
- Kunkle DA, Egleston BL, Uzzo RG. Excise, ablate or observe: the small renal mass dilemma - a meta-analysis and review. *The Journal of Urology*. 2008;179(4):1227-1233.
- Lam JS, Schvarts O, Said JW, et al. Clinicopathological and molecular correlations of necrosis in the primary tumor patients with renal cell carcinoma. *Cancer*, 2005;103(12):2517-2525.
- Lardner A. The effects of extracellular pH on immune function. *Journal of Leukocyte Biology*, 2001;69(4):522-530.
- Lee SW, Lee KI, Kim JY. Revealing urologic diseases by proteomic techniques. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2005;815(1-2):203-213.
- Lee CM, Hickey MM, Sanford CA, et al. VHL Type 2B gene mutation moderates HIF dosage *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*, 2009;28(14):1694-1705.
- Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2007;25(30):4757-4764.
- Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the von Hippel-Lindau protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1996;271(41):25492-25497.
- Li M, Kim W. Two sides of every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2011;15(2):187-195.
- Libertino, J., Open Partial Nephrectomy, Renal Cancer: Contemporary Management, Springer Science Business Media New York, 2013.
- Linehan WM, Srinivasan R, Schmidt LS. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nature Reviews Urology*, 2010;7(5):277-285.
- Linehan WM, Evaluation and screening for hereditary renal cell cancers. *Canadian Urological Association Journal*, 2013;7(9-10):324-325.
- Ljungberg, B. Renal cell carcinoma guideline. *European Urology*, 2007;51:1502-1510.
- Long LH, Evans PJ, Halliwell B. Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999;262(3):605-609.
- Lonser RR, Glenn GM, Walther M, et al. von Hippel-Lindau disease. *Lancet*, 2003;361(9374):2059-2067.
- Lőrincz T, Tímár J, Szendrői M. Alterations of microvascular density in bone metastases of adenocarcinomas. *Pathology and Oncology Research*. 2004;10(3):149-153.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 1951;193(1):265-275.
- Lubensky IA, Schmidt L, Zhuang Z, et al. Hereditary and sporadic papillary renal carcinomas with c-met mutations share a distinct morphological phenotype. *American Journal of Pathology*, 1999;155(2):517-526.
- Maiti R, Jana D, Das UK, et al. Antidiabetic effect of aqueous extract of seed of tamarindus indica in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004;92(1):85-91.
- Maiti R, Das UK, Ghosh D. Attenuation of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats by aqueous extract of seed of *Tamarindus indica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005;28(7):1172-1176.

- Makino Y, Cao R, Svensson K, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 2001;414(6863):550-554.
- Mancini V, Battaglia M, Dittono P, et al. Current insights in renal cell cancer pathology. *Urologic Oncology*, 2008;26(3):225-238.
- Mandriota K, Davies D, Murray P, et al. HIF activation identifies early lesion in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell*, 2002;1:459-468.
- McDermott DF, Regan MM, Clark JI, et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(1):133-141.
- Mc Dougal., Epidemiology of renal cell carcinoma. In Vogelzang N., Sacardino, P., Shipley W., Coffey D., Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology, 2<sup>nd</sup> edition, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000.
- Meléndez-Rodríguez F, Roche O, Sánchez-Prieto R, et al. Hypoxia-inducible factor 2-dependent pathways driving Von Hippel-Lindau-Deficient renal cancer. *Frontiers in Oncology*, 2018; 8(214):1-8.
- Mignogna C, Staibano S, Altieri V, et al. Prognostic significance of multidrug resistance protein (MDR-1) in renal cell carcinomas: a five year follow up analysis. *BMC Cancer*, 2006;19(6):293.
- Miller P, Snyder D. Phytochemicals and cancer risk: A review of the epidemiological evidence. *Nutritional in Clinical Practice*, 2014; 27(5):599-612.
- Montani M, Heinimann K, von Teichman A, et al. VHL-gene deletion in single renal tubular epithelial cells and renal tubular cysts: further evidence for a cyst-dependent progression pathway of clear cell renal carcinoma in von Hippel-Lindau disease. *American Journal of Surgical Pathology*, 2010;34(6):806-815.
- Morales Montor JG, Maldonado Valadez RE, Petersen Juárez ES, et al. Incidentalomas renales en el Hospital General Dr. Manuel Gea González: Diagnóstico, Manejo y seguimiento. *Revista Mexicana de Urología*, 2002;62(2):52-57.
- Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 1996;335(12):865-875.
- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 2007;356(2):115-124.
- Murray, R., Clinical Chemistry. The C.V. Mosby Co. St. Louis. Toronto. Princeton 1984;1261-1266.
- Nelson EC, Evans CP, Lara PN Jr. Renal cell carcinoma: Current status and emerging therapies. *Cancer Treatment Reviews*, 2007;33(3):299-313.
- Nickerson ML, Warren MB, Toro JR, et al. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Cancer Cell*, 2002;2(2):157-164.
- Nishiyama Y, Suwa H, Okamoto K, et al. Low incidence of point mutations in H-, K- and N-ras oncogenes and p53 tumor suppressor gene in renal cell carcinoma and peritoneal mesothelioma of Wistar rats induced by ferric nitrotriacetate. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1995;86(12):1150-1158.
- Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence, *The EMBO Journal*, 2005; 24(7):1311-1317.

Okada, S., Induction of the rat renal adenocarcinoma by ferric-nitritotriacetate (Fe-NTA). *Japan Archives International Medicine*, 1982;29:485-491.

Okuda H, Saitoh K, Hirai S, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein mediates ubiquitination of activated atypical protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001;276(47):43611-43617.

Oosterwijk-Wakka JC, Boerman OC, Mulders PF, et al. Application of Monoclonal Antibody G250 Recognizing Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013;14(6):11402-11423.

Pantuck AJ, Zeng G, Belldegrun AS, et al. Pathobiology, prognosis, and targeted therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia-induced pathway, *Clinical Cancer Research*, 2003;9(13):4641-4652.

Park JI, Lee MG; Cho K, et al. Transforming growth factor beta 1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF-kB, JNK, and Ras signaling pathways. *Oncogene*, 2003;22(28):4314-4332.

Pastorek J, Pastoreková S, Callebaut I, et al. Cloning and characterization of MN, a tumour associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene*, 1994;9(10):2877-2888.

Pastoreková, S., Cancer-related carbonic anhydrase isoenzymes and their inhibition. In carbonic anhydrase. Its inhibitors and activators (Supuran, C.T. et al., eds), 255-281, CRC Press 2004.

Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, et al. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *European Urology*, 2003;44(2):226-232.

Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. *Cell Death and Differentiation*, 2008;15(4):628-634.

Pause A, Lee S, Lonergan KM, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998;95(3):993-998.

Pavlovich CP, Walther MM, Eyler RA, et al. Renal tumors in the Birt-Hogg-Dube syndrome. *American Journal of Surgical Pathology*, 2002;26(12):1542-1552.

Pavlovich CP, Schmidt LS. Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma, *Nature Reviews of Cancer*, 2004;4(5):4381-4393.

Peles E, Nativ M, Campbell PL, et al. The carbonic anhydrase domain receptor of tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell*, 1995;82(2):251-260.

Petersen. Cáncer Renal: Experiencia del Hospital General "Dr- Manuel Gea González" *Revista Mexicana de Urología*, 2001;61(2):88-96.

Potter CPS, Harris AL. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *British Journal of Cancer*, 2003;89(1):2-7.

Potter C, Harris AL. Hipoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target, *Cell Cycle*, 2004;3(2):164-167.

Protzel C, Maruschke M, Hakenberg OW. Epidemiology, Aetiology, and Pathogenesis of Renal Cell Carcinoma, *European Urology Supplements*, 2012;11(3):52-59.

Pfaffenroth EC, Linehan WM. Genetic Basis for Kidney Cancer, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2008;8(6):779-790.

- Pumthong, G., 1999, Antioxidative activity of polyphenolic compounds extracted from seed coat of *Tamarindus indica* Linn. PhD thesis, Chiangmal University, Thailand.
- Purdue MP, Johansson M, Zelenika D, et al. Genome wide association study of renal cell carcinoma identifies two susceptibility loci on 2p21 and 11q13.3. *Nature Genetics*, 2011;43(1):60-65.
- Rathmell WK, Acs G, Simon MC, et al. HIF transcription factor expression and induction of hypoxic response genes in a retroperitoneal angiosarcoma. *Anticancer Research*, 2004;24(1):167-170.
- Raval R, Lau K, Tran M, et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and Hif-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Molecular and Cellular Biology*, 2005;25:5675-5686.
- Ravaud A, Wallerand H, Culine S, et al. Update on the medical treatment of metastatic renal cell carcinoma, *European Urology*, 2008; 54(2):315-325.
- Ricketts C, Woodward ER, Killick P, et al. Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma. *Journal of National Cancer Institute*, 2008;100(17):1260-1262.
- Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet*, 2009;373(9669):1119-1132.
- Robertson FM, Cendron M, Klauber GT, et al. Renal cell carcinoma in association with tuberous sclerosis in children. *Journal of Pediatric Surgery*, 1996;31(5):729-730.
- Rogenhofer S, Kahl P, Mertens C, et al. Global histone H3 lysine 27 (H3K27) methylation levels and their prognostic relevance in renal cell carcinoma. *BJU International*, 2011;109(3):459-465.
- Rohzim J, Sameni M, Ziegler G, et al. Pericellular pH effects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Research*, 1994;54(24):6517-6525.
- Rosenberger GA. Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. *Neuroscientist*, 2002;8(6):586-595.
- Rosset C, Netto CBO, Ashton-Prolla P. TSC1 y TSC2 gene mutations and their implications for treatment in Tuberous Sclerosis Complex: a review. *Genetics and Molecular Biology*, 2017;40(1):69-79.
- Rumpelt HJ, Störkel S, Moll R, et al. Bellini duct carcinoma: further evidence for this rare variant of renal cell carcinoma, *Histopathology*, 1991;18(2):115-122.
- Sato T, Umetsu A, Tmanoi F. Characterization of the Rheb-mTOR signaling pathway in mammalian cells: constitutive active mutants of Rheb and mTOR. *Methods of Enzymology*, 2008;438:307-320.
- Sakano K, Mizutani M, Murata M, et al. Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005;39(8):1041-1049.
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends of Pharmacological Sciences*, 2012;33(4):207-214.
- Shen C, Beroukhir R, Schumacher SE, et al. Genetic and functional studies implicate HIF1 $\alpha$  as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discovery*. 2013;1(3):223-235.
- Schips L, Dalpiaz O, Lipsky K, et al. Serum levels of endothelial growth factor and endostatin in renal cell carcinoma patients compared to a control group. *European Urology*, 2007;51(1):168-174.
- Schlöndorff J, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *Journal of Cell Science*, 1999;112(Pt 21):3603-3617.



- Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, et al. Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene*, 1999;18(14):2343-2350.
- Shaw G, The silent disease. *Nature*, 2016;537:S98-S99.
- Shi Q, Le X, Wang B, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene*, 2001;20(28):3751-3756.
- Schraml P, Struckmann K, Hatz F, et al. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Pathology*, 2002;196(2):186-193.
- Siddhuraju P, Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated Tamarindus indica seed coat. *LWT Food Science and Technology*, 2007;40:982-990.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 2012;62:10-29. 2018;68(1):7-30.
- Skinner DG, Colvin RB, Vermillion CD, et al. Diagnosis and management of renal cell carcinoma, *Cancer*, 1971;28(5):1165-1177.
- Smith K, Gunaratnam L, Morley M, et al. Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL-/- renal cancer. *Cancer Research*, 65(12):5221-5230.
- Soini Y, Kallio JP, Hirvikoski P, et al. Oxidative/nitrosative stress and peroxiredoxin 2 are associated with grade and prognosis of human renal carcinoma, *Journal Compilation*, 2006;114:329-337.
- Srigley JR, Eble JN. Collecting duct carcinoma of kidney. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 1998;15(1):54-67.
- Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *American Journal of Surgical Pathology*, 2013;37(10):1469-1489.
- Prasad SR, Humphrey PA, Catena JR, et al. Common and Uncommon Histologic Subtypes of Renal Cell Carcinoma: Imaging Spectrum with Pathologic Correlation. *Radiographics*, 2006;26(6):1795-1806.
- Srirangalingam U, Walker L, Khoo B, et al. Clinical manifestations of familial paraganglioma and pheochromocytomas in succinate dehydrogenase B (SDH-B) gene mutation carriers. *Clinical Endocrinology (Oxf)*, 2008;69(4):587-596.
- Stadler WM. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer*, 2005;104(11):2323-2333.
- Staller P, Sulitkova J, Liszman J, et al. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*, 2003;425(6955):307-311.
- Mindrup SR, Pierre JS, Dahmouch L, et al. The prevalence of renal cell carcinoma diagnosed at autopsy. *BJU International*, 2005;95(1):31-33.
- Stolze IP, Tian YM, Appelhoff RJ, et al. Genetic Analysis of the Role of the Asparaginyl Hydroxylase Factor Inhibiting Hypoxia-inducible Factor (HIF) in Regulating HIF Transcriptional Target Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 2004;279(41):42719-42725.
- Storkel S, Eble JN, Adlakha K, et al. Classification of renal cell carcinoma: workgroup no. 1. Union Internationale contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on cancer (AJCC). *Cancer*, 1997;80(5):987-989.
- Sudarshan S, Sourbier C, Kong HS, et al. Fumarate hydratase deficiency in renal cancer induces glycolytic addiction and hypoxia-inducible transcription factor 1 alpha stabilization by glucose-dependent generation of reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biology*, 2009;29(15):4080-4090.

Sudjaroen Y, Haubner R, Würtele G, et al. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food and Chemical Toxicology*, 2005;43(11):1673-1682.

Suksomtip M, Pongsamart S. Protective effect against oxidation of human low-density lipoprotein and plasmid DNA strand scission of tamarind seed coat extract in vitro. *LWT Food Science and Technology*, 2008;41(10):2002-2007.

Sutphin PD, Chan DA, Li JM, et al. Targeting the Loss of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene in Renal Cell Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 2007;67(12):5896-5905.

Svastová E, Zilka N, Zat'ovicová M, et al. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin, *Experimental Cell Research*, 2003;290(2):332-345.

Svastova E, Witariski W, Csaderova L, et al. Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamel-lipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012;287(5):3392-3402.

Taide M, Kanda S, Eguchi J, et al. A study of growth factors in human renal cysts with or without renal cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 1993;217(2):199-203.

Thomas JO, Tawfik OW. Recent advances in the diagnosis of renal cell carcinoma, *Diagnostic Histopathology*, 2008;14(4):157-163.

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

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

Toyokuni S, Okada K, Kondo S, et al. Development of high-grade renal cell carcinomas in rats independently of somatic mutations in the Tsc2 and VHL tumor suppressor genes. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1998;89(8):814-820.

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

Tsuda T, Makino Y, Kato H, et al. Screening for antioxidative activity of edible pulses. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1993;57(9):1606-1608.

Uchida, K., Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 6388-6393.

Ushanandini S, The anti-snake venom properties of *Tamarindus indica* (leguminosae) seed extract. 2006;20(10):851-858.

Uzzo R, Nephron sparing surgery of renal tumors: indications, techniques and outcomes. *Journal of Urology*, 2001; 166: 6.

Vanharanta S, Buchta M, McWhinney S, et al. Early-Onset Renal Cell Carcinoma as a Novel Extraparaganglial Component of SDHB-Associated Heritable Paraganglioma. *American Journal of Human Genetics*, 2004;74(1):153-159.

- van Rooijen E, Voest EE, Logister I, et al. von Hippel-Lindau tumor suppressor mutants faithfully model pathological hypoxia-driven angiogenesis and vascular retinopathies in zebrafish. *Disease Models and Mechanisms*, 2010;3(5-6):343-353.
- van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, et al. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science*, 1997;277(5327):805-808.
- Varela I, Tarpey P, Raine K, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature*, 2011;469 (7331):539-542.
- Vargas-Olvera, C. Efecto de un extracto de semillas de tamarindo (EST) sobre el desarrollo de cancer renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA), 2009, Facultad de Química, UNAM.
- Vergati M, Intrivici C, Huen NY, et al. Strategies for Cancer Vaccine Development. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010;Article ID 596432,13 páginas.
- Vindrieux D, Devailly G, Augert A, et al. Repression of PLA2R1 by c-MYC and HIF-2alpha promotes cancer growth, *Oncotarget*, 2014;5(4):1004-1013.
- Vogelzang NJ, Clinical Signs and Symptoms of Renal Cell Carcinoma, Chapter 8, in Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology, 2.
- Volpe A, Patard JJ. Prognostic factors in renal cell carcinoma, *World Journal of Urology*, 2010;28(3):319-327.
- Walsh PC. Campbell's Urology, 8th edition, Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sidney, Toronto: Saunders; 2002. 3954p.
- Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB Journal*, 2004;18(12):1462-1464.
- Werb Z, Yan Y. A cellular striptease act. *Science*, 1998;282(5392):1279-1280.
- World Health Organization Classification of Tumours, International Agency for Research on Cancer (IARC), Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, 2004.
- Xia W, Nagase S, Montia AG, et al. BAF180 is a critical regulator of p21 induction and a tumor suppressor mutated in breast cancer. *Cancer Research*, 2008;68(6):1667-1674.
- Yang JC, Hughes M, Kammula U, et al. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *Journal of Immunotherapy*. 2007;30(8):825-830.
- Yoshimura K, Uemura H. Role of vaccine therapy for renal cell carcinoma in the era of targeted therapy. *International Journal of Urology*, 2013;20(8):744-755.
- Young AP, Kaelin WG Jr. Senescence triggered by the loss of the VHL tumor suppressor. *Cell Cycle*, 2008;7(12):1709-1712.
- Zatovicova M, Sedlakova O, Svastova E, et al. Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase is a metalloproteinase-dependent process regulated by TACE/ADAM 17, *British Journal of Cancer*, 2005;93(11):1267-1276.
- Závada J, Závadová Z, Zaťovicová M, et al. Soluble form of carbonic anhydrase (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients, *British Journal of Cancer*, 2003;89(6):1067-1071.
- Zhang WY, Liu HQ, Xie KQ, et al. Procyanidin Dimer B2 (epicatechin-(4beta-8)-epicatechin). Supresses the expression of cyclooxygenase-2 in endotoxin-treated monocytic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006;345(1):508-515.

Zhou GX, Ireland J, Rayman P, et al. Quantification of carbonic anhydrase IX expression in serum and tissue of renal cell carcinoma patients using enzyme-linked immunosorbent assay: prognostic and diagnostic potentials. *Urology*, 2010,75(2):257-261.

Zisman A, Chao DH, Pantuck AJ, et al. Unclassified renal cell carcinoma: clinical features and prognostic impact of a new histological subtype. *Journal of Urology*, 2002;168(3):950-955.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011;12(1):21-35.