



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

COMPORTAMIENTO DIFERENCIAL DE NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  Y EGFR A LO LARGO DEL PROCESO CARCINOGENÉTICO RENAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

Telma Olivia Pariente Pérez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio  
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Leticia Rocha Zavaleta  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Dr. Alejandro Dehesa Zentella  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Abril, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## RECONOCIMIENTOS

El presente estudio fue apoyado por el programa UNAM-DGAPA-PAPIIT con los proyectos No IN227010, IN221313 e IN228716, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (SEP- CONACyT) con el proyecto No. 284155 (ahora “Programa Presupuestario F003”), así como por la Facultad de Química bajo el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP) beca No. 5000 9109, otorgados a la Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio.

Un reconocimiento al M. en C. José Dolores Solano Becerra, Técnico Académico del laboratorio 225, por su colaboración, asistencia técnica y asesoría en la discusión de resultados. Así mismo al personal de la Unidad de Experimentación Animal, especialmente a M.V.Z. Lucía Macías Rosales, por su indispensable colaboración en el cuidado y manejo de los animales.

Durante los estudios de doctorado la sustentante gozó de una beca otorgada por CONACyT, con numero de CVU 329513

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena Ibarra Rubio por su tutoría y dirección en la realización del presente proyecto de investigación.

A mi comité tutor el cual estuvo conformado por:

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Dr. Alejandro Dehesa Zentella

que asesoró esta tesis y por el apoyo brindado durante todo proceso de revisión

A los miembros del jurado asignado para la revisión de la tesis:

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dra. Marina Macias Silva

Dra. Marcela Lizano Soberón

Dr. Emilio Rojas Del Castillo

Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiminez

por sus comentarios y observaciones

También un agradecimiento especial al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por la donación recibida.

## DEDICATORIA

Le dedico esta tesis a toda mi familia. Principalmente, a mis padres por apoyarme e impulsarme a seguir adelante hasta alcanzar mis metas. Por todas sus enseñanzas que me han llevado a ser la persona que soy hoy, los amo con todo mi corazón.

A mi hermana Zulma por estar a mi lado y contenerme en los buenos y no tan buenos momentos; por su alegría, fuerza y valor que día a día demuestra.

A la familia Pariente Benítez, porque a pesar de la distancia siempre están ahí sosteniéndome para afrontar las dificultades sin perder nunca la cabeza ni morir en el intento.

A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio 225 por su amistad, apoyo, comprensión y trabajo en equipo, infinitas gracias Paty, Francisco, Ignacio, Alejandra, José, Verito y Juanita.

A Rocío por su amistad y confianza durante todo este tiempo.



No sabes que lo fuerte que eres, hasta que ser fuerte es tu única opción

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. ANTECEDENTES .....	3
1.1 Cáncer.....	3
1.2 Carcinoma de células renales (CCR).....	3
1.3 Factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B).....	5
1.4 Otras funciones de I $\kappa$ B $\alpha$ .....	10
1.5 Receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR).....	11
1.6 NF- $\kappa$ B/ I $\kappa$ B $\alpha$ / EGFR en el CCR .....	15
1.7 Modelo experimental de carcinogénesis renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).....	16
2. JUSTIFICACIÓN.....	18
3. HIPÓTESIS .....	19
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 Objetivo general.....	19
4.2 Objetivos particulares.....	19
5. METODOLOGÍA.....	20
5.1 Diseño experimental.....	20
5.1.1 Administración de N-dietilnitrosamina (DEN).....	22
5.1.2 Administración del FeNTA.....	22
5.1.3 Eutanasia y toma de muestras.....	22
5.2 Inmunohistoquímica (IHQ).....	23
5.3 Extracción de mRNA y RT-PCR.....	23
5.4 Extracción de proteínas totales y Western blot.....	24
5.5 Extracción de proteínas nucleares y ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).....	24
5.6 Fraccionamiento celular.....	25
5.7 Análisis densitométrico y estadístico.....	26
6. RESULTADOS.....	27
6.1 Apariencia de los riñones extraídos.....	27
6.2 NF- $\kappa$ B (p65), I $\kappa$ B $\alpha$ y EGFR en los tumores inducidos con FeNTA por IHQ.....	28
6.3 Niveles del mRNA de EGFR en tumores inducidos por FeNTA.....	31

<b>6.4 Niveles renales de p65, I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math> y EGFR en etapas tempranas de la carcinogénesis.....</b>	<b>31</b>
<b>6.5 Actividad de NF-<math>\kappa</math>B y niveles de mRNA de EGFR.....</b>	<b>33</b>
<b>6.6 Determinación de la localización subcelular de I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math> y EGFR en etapas tempranas de la carcinogénesis renal.....</b>	<b>34</b>
<b>6.7 Determinación de los niveles de p65, I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math> y EGFR en hígado y pulmón de ratas expuestas al carcinógeno renal durante uno y dos meses.....</b>	<b>37</b>
<b>6.8 Resumen de resultados.....</b>	<b>38</b>
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>47</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>48</b>
<b>11. ARTICULO PUBLICADO .....</b>	<b>59</b>

## ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
AT	Tejido adyacente
CCR	Carcinoma de células renales
CCRcc	Carcinoma de células renales de células claras
DEN	N-dietilnitrosamina
DF	Grupo experimental DEN-FeNTA
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
FeNTA	Nitrilotriacetato de Hierro
HDACs	Desacetilasas de histonas
HIFs	Factores inducibles por hipoxia
IHQ	Inmunohistoquímica
I $\kappa$ B $\alpha$	Proteína Inhibidora kappa B alpha
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
NLS	Secuencia de señal de localización nuclear
NTT	Tejido no tumoral
PRC1 y 2	Complejo represor polycomb 1 y 2
RHD	Dominio de homología REL
RDU	Unidades densitométricas relativas
RT-PCR	Reverso transcriptasa- reacción en cadena de la polimerasa
TAD	Dominio de transactivación
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alpha
TT	Tejido tumoral
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VHL	Von Hippel-Lindau
WB	Western blot



## RESUMEN

El carcinoma de células renales (CCR) es el tipo de cáncer renal más común en adultos, el cual es generalmente asintomático incluso en etapas avanzadas, por lo que su diagnóstico oportuno es poco frecuente, lo que hace casi imposible el estudio de esta neoplasia en etapas tempranas. Los tumores de CCR inducidos con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en ratas, corresponden histológicamente al subtipo de células claras (CCRcc) de pacientes, y la exposición al carcinógeno durante uno o dos meses conduce a diferentes etapas tempranas del desarrollo neoplásico. Un incremento en los niveles del factor de transcripción kappaB (NF- $\kappa$ B) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), así como una disminución en los niveles del inhibidor alfa de NF- $\kappa$ B ( $I\kappa$ B $\alpha$ ) son alteraciones frecuentemente reportadas en el CCR humano, pero no está claro su estatus en los tumores inducidos con FeNTA y se desconoce su evolución a lo largo de la carcinogénesis renal. Con base en esto, en el presente estudio se analizó el comportamiento de NF- $\kappa$ B (p65),  $I\kappa$ B $\alpha$  y EGFR en diferentes etapas del modelo experimental de carcinogénesis renal. Al analizar los tumores inducidos con FeNTA se encontraron incrementados los niveles de p65, una de las subunidades de NF- $\kappa$ B predominantes en el CCRcc, así como las de EGFR (proteína y mRNA), en cambio disminuyeron los niveles del principal inhibidor de NF- $\kappa$ B,  $I\kappa$ B $\alpha$ , una combinación clásica de cambios también observada en los tumores de pacientes. En contraste, en las etapas tempranas estudiadas se obtuvieron diferentes respuestas; es decir, a un mes de exposición al carcinógeno la actividad de NF- $\kappa$ B y los niveles EGFR aumentaron, y, contrario a lo esperado, también los niveles de  $I\kappa$ B $\alpha$ ; mientras que a los dos meses de tratamiento con FeNTA, la actividad de NF- $\kappa$ B disminuyó, pero los niveles de EGFR e  $I\kappa$ B $\alpha$  se mantuvieron incrementados, aunque en menor proporción. En el caso de los niveles del mRNA de EGFR, se determinó que hay un aumento semejante en ambos tiempos. Ante estos hallazgos, se decidió analizar la localización subcelular de  $I\kappa$ B $\alpha$  y EGFR, encontrando que ambas proteínas están presentes tanto en núcleo como en citoplasma, y que sus niveles aumentan en ambas fracciones celulares. Por último, ninguna de estas alteraciones se observaron en hígado y pulmón, órganos donde no se desarrollan tumores con el protocolo de tratamiento utilizado.

Recapitulando, los tumores inducidos con FeNTA y las neoplasias de CCR humano son análogos en cuanto al comportamiento clásico de NF- $\kappa$ B,  $I\kappa$ B $\alpha$  y EGFR; mientras que se reconocieron distintivas combinaciones de cambios no convencionales de estas 3 moléculas en cada una de las etapas tempranas de la carcinogénesis estudiadas, además de la presencia tanto en citoplasma como en núcleo de  $I\kappa$ B $\alpha$  y EGFR. Estos resultados sugieren que las alteraciones observadas pueden estar relacionadas con diferentes vías de señalización, ocasionando efectos particulares dependiendo de la fase de transformación maligna en que se encuentren las células renales. Más aún, no se encontraron cambios en hígado y pulmón, lo que sustenta la participación de la desregulación de las proteínas estudiadas en la carcinogénesis renal. Así mismo, dada la similitud entre la neoplasia experimental y el CCR humano, esto podría ocurrir también durante el desarrollo de los tumores en los pacientes. Por lo tanto, el presente trabajo abre una nueva ventana en la búsqueda de roles de NF- $\kappa$ B,  $I\kappa$ B $\alpha$  y EGFR distintos a los clásicos, los cuales pueden conducir a la identificación de marcadores moleculares que lleven a una detección oportuna y a desarrollar estrategias terapéuticas y/o preventivas más efectivas contra este tipo de cáncer.

## ABSTRACT

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common type of cancer of the adult kidney. It is generally asymptomatic even at advanced stages, so opportune diagnosis is rare, making it almost impossible to study this cancer at its early stages. RCC tumors induced by ferric nitrilotriacetate (FeNTA) in rats histologically correspond to the human clear cell RCC subtype (ccRCC) and the exposure to this carcinogen during either one or two months leads to different early stages of neoplastic development. High levels of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and epidermal growth factor receptor (EGFR) as well as low levels of NF- $\kappa$ B inhibitor alpha (I $\kappa$ B $\alpha$ ) are frequent in human RCC, but their status in FeNTA-induced tumors is unclear and their evolution along renal carcinogenesis is unknown. On this basis, in the present study NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR behavior was analyzed at different stages of the experimental renal carcinogenesis model.

Like in patients, neoplastic tissue showed high levels of p65, one of the predominant subunits of NF- $\kappa$ B in ccRCC, and of EGFR (protein and mRNA), as well as a decrease in the levels of the NF- $\kappa$ B main inhibitor, I $\kappa$ B $\alpha$ , resulting a classic oncogenic combination. Conversely, different responses were observed at early stages of carcinogenesis. After one month of FeNTA-exposure, NF- $\kappa$ B activity and EGFR levels augmented, but unexpectedly, I $\kappa$ B $\alpha$  also did; while after two months, NF- $\kappa$ B activity diminished but EGFR and I $\kappa$ B $\alpha$  remained increased, although to a lesser extent. Concerning EGFR mRNA levels, the increase was similar at both early stages. Given these outcomes, the subcellular location of I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR was investigated, finding that both proteins are present in the nucleus and in the cytoplasm, and that their levels increase in both cell fractions. Lastly, neither of these alterations was observed in liver or lung, organs where no primary tumors are developed with the protocol of treatment followed.

Summarizing, FeNTA-induced tumors and RCC human neoplasms are analogues regarding to the classic NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR behavior. In contrast, distinctive combinations of unconventional changes of these 3 molecules were recognized at the early stages, as well as the presence in both cytoplasm and nucleus of I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR. In addition, no modifications were found in liver or lung. These results suggest that, although the proteins studied are very probably implicated in the carcinogenic process, their deregulation may be related to different signaling pathways, causing particular effects depending on the phase of malignant transformation. Furthermore, given the similarity between the experimental and human neoplasms, this could also occur in tumors development in patients. Therefore, novel insights were provided in the present work to continue searching for mechanisms other than the classic roles of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR, which may lead to identify molecular markers to reach an opportune detection and to develop more effective therapeutic and/or preventive strategies against RCC.

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 Cáncer

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública alrededor del mundo. Es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por un crecimiento tisular debido a una proliferación descontrolada y continua de células anormales, que en estadios más avanzados adquieren la capacidad de invasión y colonización de otros tejidos (Alberts *et al.*, 2019) y cuyo desarrollo se ha dividido en tres etapas: iniciación, promoción y progresión (Figura 1). La iniciación es el primer paso del proceso de transformación y ocurre cuando una célula normal sufre ciertas mutaciones, las cuales pueden ser inducidas por agentes externos, ya sean físicos (luz UV y radiaciones), químicos (carcinógenos) y/o biológicos (virus). Estas alteraciones genéticas, junto con modificaciones en proteínas y lípidos, resultan en la desregulación de vías de señalización asociadas con la proliferación, sobrevivencia y diferenciación celular dando lugar a células iniciadas (Siddiqui *et al.*, 2015; Klauning, 2018). Durante la etapa de promoción las células iniciadas proliferan activamente, lo que lleva a la acumulación de células preneoplásicas, este periodo es relativamente largo. Finalmente, la progresión es el estado final de la transformación neoplásica en el que más cambios genéticos y fenotípicos ocurren, caracterizado por un crecimiento acelerado del tumor donde las células adquieren un potencial metastásico e invasivo (Siddiqui *et al.*, 2015; Klauning, 2018). Cabe mencionar que las primeras dos etapas del proceso carcinogénico son clave para su prevención y/o curación, debido a que las alteraciones producidas pueden ser reversibles mediante funciones de reparación del DNA y/o control del ciclo celular, o bien por el uso de agentes quimiopreventivos (Siddiqui *et al.*, 2015).

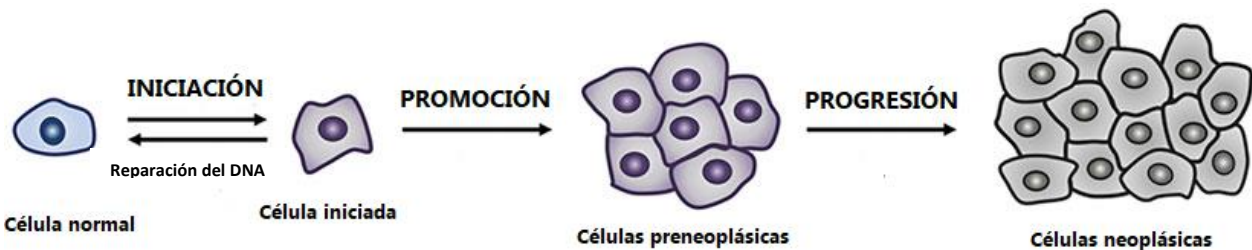


Figura 1. Etapas del proceso de carcinogénesis. Los eventos tempranos del desarrollo del cáncer son categorizados en tres etapas: iniciación, promoción y progresión, basadas en aspectos moleculares y celulares que conllevan a la transformación de una célula normal a una neoplásica. La primera etapa de la carcinogénesis, la iniciación, se caracteriza por mutaciones, originadas por factores externos, ya sean físicos (radiaciones, luz UV), químicos (carcinógenos) o biológicos (virus) que resultan en la generación de una célula iniciada. Durante la promoción, la célula iniciada prolifera activamente, lo que conlleva a una lesión preneoplásica. Finalmente, en la progresión se acumulan más mutaciones, las cuales les confiere a las células preneoplásicas una mayor capacidad invasiva y/o metastásica convirtiéndola en una célula neoplásica (modificado de Siddiqui *et al.*, 2015)

## 1.2 Carcinoma de células renales (CCR)

El CCR es el cáncer renal maligno más común en adultos, representa del 75 al 80% de las neoplasias renales y constituye alrededor del 3% de todas las neoplasias en adultos (Shaw,

2016; Jemal, 2007). De acuerdo con el reporte del Global Cancer Observatory (Globocan 2020), en México se registraron 3 083 muertes, a consecuencia del cáncer renal, ubicándolo en el décimo lugar de los cánceres con mayor número de decesos en nuestro país, y cuya incidencia incrementa con la edad y su predominancia es más alta en hombres respecto a las mujeres con una relación 3:2.

Entre los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de esta neoplasia están la obesidad, la hipertensión y el tabaquismo; así como algunas condiciones médicas tales como la insuficiencia renal crónica, hemodiálisis, trasplantes renales y enfermedad quística renal adquirida (Gray and Harris, 2019; Hsieh *et al.*, 2017). Entre las complicaciones que presenta esta neoplasia están: a) es asintomática en etapas tempranas, y aunque los avances en las técnicas de imagenología han favorecido su diagnóstico temprano, se ha estimado que alrededor del 30% de los pacientes con CCR se diagnostica en etapas avanzadas, cuando ya se ha desarrollado metástasis (Petejova and Martinek, 2016; Dalgin *et al.*, 2007); b) existen diferentes subtipos histológicos, cada uno de los cuales cursa con distintas alteraciones moleculares, por lo que responden de manera diferente a los tratamientos (Haddad *et al.*, 2015; Linehan *et al.*, 2010); c) es resistente a las quimioterapias y la radioterapias convencionales, y el efecto de la inmunoterapia es muy limitada (Haddad *et al.*, 2015); y d) a pesar de ser detectado y tratado oportunamente, presenta una alta recurrencia (Athar *et al.*, 2008).

El CCR es un tipo de cáncer considerado como un grupo diverso de tumores epiteliales en el riñón y que de acuerdo con la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) en Vancouver (2012) se han identificado 15 subtipos histológicos distintos de CCR bien establecidos, de los cuales los más frecuentes son el de células claras (CCRcc), seguido del papilar I y II (CCRp) y el cromóforo (CCRcr). Estos tres subtipos en conjunto representan más del 90% de todos los CCRs (Bahadoram *et al.*, 2022; Muglia and Prado, 2014).

### **CCR de células claras (CCRcc)**

El CCRcc es la variante más común, representando aproximadamente el 80% de todos los casos de CCR. Esta neoplasia se origina en el epitelio del túbulo contorneado proximal que se localiza en la corteza renal (Muglia and Prado, 2014). Macroscópicamente los tumores de CCRcc se presentan, principalmente, como una masa globular unilateral limitada por una cápsula fibrosa, la cual comúnmente sobresale de la corteza renal, y en un corte del tumor se observa un color amarillo dorado debido a la presencia de lípidos y colesterol (Hsieh *et al.*, 2017; Petejova and Martinek, 2016) (Figura 2); sin embargo, esto varía con el grado tumoral. Histológicamente, su patrón de crecimiento también es variado, ya que puede ser el papilar sólido, acinar y quístico, pseudopapilar, tubular o sarcomatoide (George *et al.*, 2001). Se nombra de células claras porque su citoplasma suele ser claro o granular eosinofílico, ya que es rico en lípidos y glucógeno (Hsieh *et al.*, 2017; Petejova and Martinek, 2016). Además, los tumores de CCRcc están altamente vascularizados (Petejova and Martinek, 2016) y los sitios de metástasis más comunes son pulmón, hígado y hueso (Muglia and Prado, 2014).

La mayoría de los casos de CCRcc son esporádicos (95%), cuya alteración más común es la inactivación del gen supresor de tumores Von Hippel–Lindau (VHL), ya sea por pérdida o inactivación bialélica (Petejova and Martinek, 2016). La pérdida o inactivación de VHL ocasiona una regulación al alza de los factores inducibles por hipoxia (HIFs), lo que da como resultado un

aumento en la expresión de sus genes blanco, tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el de la eritropoyetina (EPO), el transportador de la glucosa 1 (GLUT1) y ciclina D1, entre otros (Lombardi, 2021; Milkulainen *et al.*, 2019; Shen, 2013) y por consecuencia cambios en el metabolismo celular y la señalización involucradas en la proliferación y supervivencia celular.

Por otra parte, estudios genómicos han demostrado que, además de VHL, otros tres genes supresores de tumores (PBRM1, SETD2 y BAP1) que residen en el cromosoma 3p, están implicados en el desarrollo de CCRcc, (Haddad y Margulis, 2015).



Figura 2. Aspecto macroscópico de un riñón con carcinoma de células renales de células claras. En la imagen se observa una masa tumoral de 8 cm de diámetro, la cual tiene bordes bien definidos, es parduzca con extensas zonas amarillas brillantes, con múltiples nódulos satélites (Carballo and Mollinedo, 2006)

El tratamiento del CCR depende de la etapa o estadio en el que se encuentre al momento del diagnóstico. En etapas tempranas, cuando el CCR está localizado, se puede tratar de manera exitosa mediante nefrectomía parcial o radical; mientras que en etapas avanzadas o CCR metastásico la radioterapia y quimioterapia convencional (vinblastina, la floxuridina y el 5-fluorouracilo) tienen una efectividad baja (Hsieh *et al.*, 2017). Sin embargo, durante la última década, se han logrado avances notables en el tratamiento del CCR metastásico, gracias al entendimiento de las vías de señalización implicadas en el desarrollo de esta neoplasia, lo que ha conducido a la utilización de fármacos dirigidos, tales como sorafenib, sunitinib, bevacizumab, pazopanib y axitinib, que inhiben al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y a su receptor (VEGFR), y everolimus y temsirolimus, agentes que están siendo aprobados y que inhiben al complejo 1 blanco de rapamicina (mTORC1); así como inmunoterapias, utilizando nivolumab, por ejemplo (Hsieh *et al.*, 2017).

### 1.3 Factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)

NF- $\kappa$ B consiste en una familia de cinco proteínas: p65/RelA, RelB, cRel, p50 (NF-KB1) y p52 (NF-KB2) (Figura 3) las cuales forman homo o heterodímeros, que se unen diferencialmente al

DNA, induciendo la expresión de sus genes blanco, relacionados con diferentes procesos biológicos, tales como la respuesta inmune, inflamación, diferenciación, proliferación y supervivencia celular (Yu *et al.*, 2020; Mitchell and Hoffmann, 2015). Las proteínas de NF- $\kappa$ B presentan un dominio de homología REL (RHD) en el extremo-NH<sub>2</sub>, el cual media su dimerización, su interacción con su inhibidor específico ( $\kappa$ B) y su unión al DNA (Zhang *et al.*, 2019). Dependiendo de la manera en que son sintetizadas se agrupan en dos categorías:

- a) Sintetizadas en su forma madura: en esta categoría se ubican las proteínas: RelA/ p65, c-Rel y RelB, las cuales contienen un dominio de transactivación (TAD) que interactúa con el aparato transcripcional y que es necesario para la regulación positiva en la expresión de genes.
- b) Sintetizadas en forma de precursores: p100 y p105 las cuales contienen secuencias repetidas tipo ankirinas en su extremo-COOH que funcionan como dominios I $\kappa$ B autoinhibitorios. Estos precursores son procesados en el proteosoma resultando en la producción de su forma madura p52 y p50, las cuales carecen de un dominio de transactivación (TAD).

La combinación de estas proteínas da como resultado 15 posibles dímeros de NF- $\kappa$ B, de los cuales 12 inducen la transcripción de sus genes blanco; siendo p65/p50 el dímero más común y abundante en diferentes tipos celulares (Zhang and Sun, 2015; Hoffman *et al.*, 2006). Mientras que los dímeros formados por las proteínas p50 y p52, al carecer del dominio TAD funcionan como represores de la transcripción (Zhang and Sun, 2015).

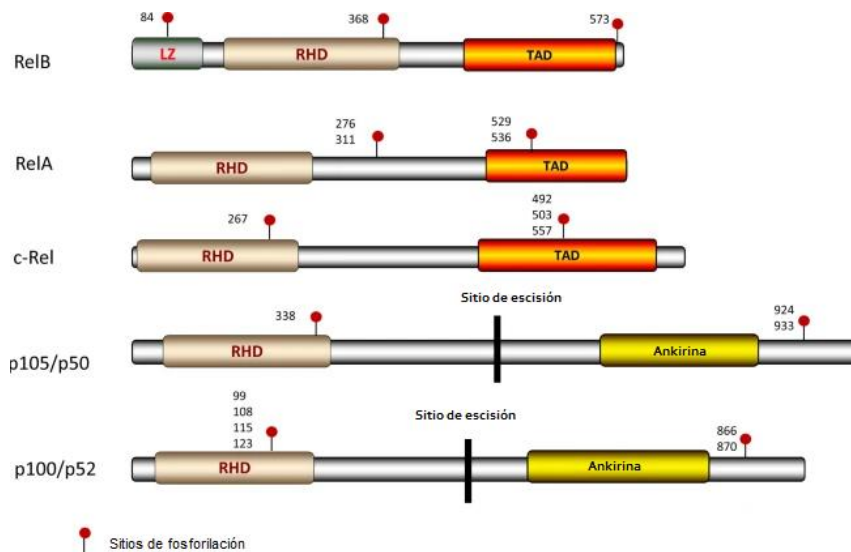


Figura 3. Estructura de los miembros de la familia NF- $\kappa$ B. El dominio de homología Rel (RHD) es compartido por todos los miembros de la familia. RelA, RelB y c-Rel contienen un dominio de transactivación (TAD) y RelB tiene un dominio de leucina (LZ). Las proteínas p105 y p100 tienen múltiples dominios de repeticiones tipo ankirina, que se escinden para generar los productos p50 y p52 después de la señal de activación. En círculos rojos se muestran los sitios de fosforilación (Zhang *et al.*, 2019).

La actividad de NF- $\kappa$ B está altamente regulada por la interacción con su proteína inhibidora I $\kappa$ B en el citoplasma lo que hace que los dímeros permanezcan inactivos en el citoplasma. I $\kappa$ B es una familia de proteínas constituida por I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\delta$ , I $\kappa$ B $\zeta$  y Bcl3 que se caracterizan por presentar múltiples dominios de repetición tipo ankirinas (ANKs), a través de los cuales el inhibidor interactúa con el dominio RHD de NF- $\kappa$ B enmascarando la secuencia de señal de localización nuclear (NLS) (Figura 4) (Chiba *et al.*, 2013; Hayden and Ghosh, 2008). En el caso de I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$  exhiben, en el extremo-NH<sub>2</sub>, una región donde ocurren fosforilaciones y ubiquitinaciones, las cuales están asociadas a su separación del complejo NF- $\kappa$ B y su posterior degradación, además de una región rica en prolina, glutamato, serina y treonina en el extremo-COOH, llamada PEST, la cual, participa en la activación de NF- $\kappa$ B inducida por ROS (Figura 4) (Ferreiro and Komives, 2010; Takada *et al.*, 2003; Shoonbroodt and Piette, 2000). I $\kappa$ B $\alpha$  es la principal proteína inhibidora del dímero p65/p50 y la más abundante de todas las I $\kappa$ Bs (Yu *et al.*, 2020; Hayden and Ghosh, 2008).

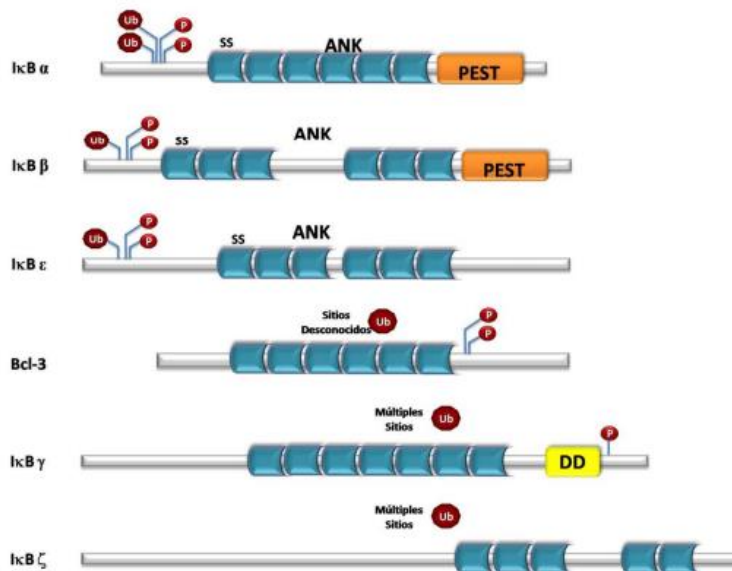


Figura 4. Estructura de las proteínas de la familia I $\kappa$ B. Las fosforilaciones y ubiquitinaciones en las proteínas I $\kappa$ Bs, son modificaciones que la llevan a su degradación a través del proteosoma, están indicados en rojo; ANK son los múltiples dominios de repetición tipo ankirina; PEST es la secuencia rica en residuos Pro-Glu-Ser-Thr en el extremo-COOH, la cual participa en la activación de NF- $\kappa$ B inducida por ROS; DD, dominio de muerte (Hayden and Ghosh, 2008).

En células quiescentes, los dímeros de NF- $\kappa$ B se encuentran en el citoplasma unido a proteínas I $\kappa$ Bs, en un estado en “reposo”. Ante la presencia de ciertos estímulos, tales como citocinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina (IL-1)), factores de crecimiento, radiaciones UV, rayos X y las especies reactivas de oxígeno (ROS), las I $\kappa$ Bs son fosforiladas y eventualmente ubiquitinadas y degradadas vía proteosoma (Yu *et al.*, 2020; Mitchell *et al.*, 2015; Gloire *et al.*, 2006). La separación de las I $\kappa$ Bs libera y activa a NF- $\kappa$ B, que se transloca a núcleo para inducir la transcripción de genes blanco, tales como *ciclina D1*, *c-myc*, *cox2*, entre otros, incluyendo aquellos de *I $\kappa$ B* (Yang *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 1993).



Se han descrito dos vías de activación para NF- $\kappa$ B, una conocida como vía clásica o canónica y la otra es la vía no clásica o alternativa (Figura 5).

La vía de señalización clásica o canónica de NF- $\kappa$ B es activada en respuesta a citocinas pro-inflamatorias, tales como TNF $\alpha$  e ILs, así como en respuesta a receptores tipos Toll (TLRs), lipopolisacáridos (LPS), infecciones virales, daño al DNA y ROS. Todas estas señales convergen en la activación de la cinasa de I $\kappa$ B (IKK), la cual está constituida por dos subunidades catalíticas (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) y una subunidad reguladora (IKK $\gamma$ ). La subunidad IKK $\beta$  es la principal responsable de la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en los residuos de Ser32 y Ser36. Una vez fosforilada, I $\kappa$ B $\alpha$  es degradada vía proteosoma y NF- $\kappa$ B es translocado al núcleo donde activa la transcripción de sus genes blanco (Zhang *et al.*, 2021; Mitchell *et al.*, 2015) (Figura 5A).

En cambio, la vía alternativa o no clásica es inducida por: linfotóxina  $\beta$  (LT $\beta$ ), el factor de activación de células B (BAFF), el ligando CD40, el virus de leucemia humana de células T (HTLV) y el virus de Epstein Barr (EBV), entre otros estímulos, los cuales activan a la cinasa inductora NF- $\kappa$ B (NIK) quien fosforila a IKK $\alpha$  que, a su vez, fosforila a la proteína p100 (NF- $\kappa$ B1), la cual es subsecuentemente proteolisada para generar su forma madura (p52). Entonces, el dímero que contiene p52 se transloca hacia el núcleo y realiza su función de factor de transcripción (Zhang *et al.*, 2021; Mitchell *et al.*, 2015) (Figura 5B).

Es así como ambas vías clásica y alternativa controlan la dinámica y activación del repertorio de dímeros de NF- $\kappa$ B a través de la degradación de las proteínas inhibitoras de I $\kappa$ B o procesamiento de las proteínas precursoras de NF- $\kappa$ B (O’Dea and Hoffmann, 2010).

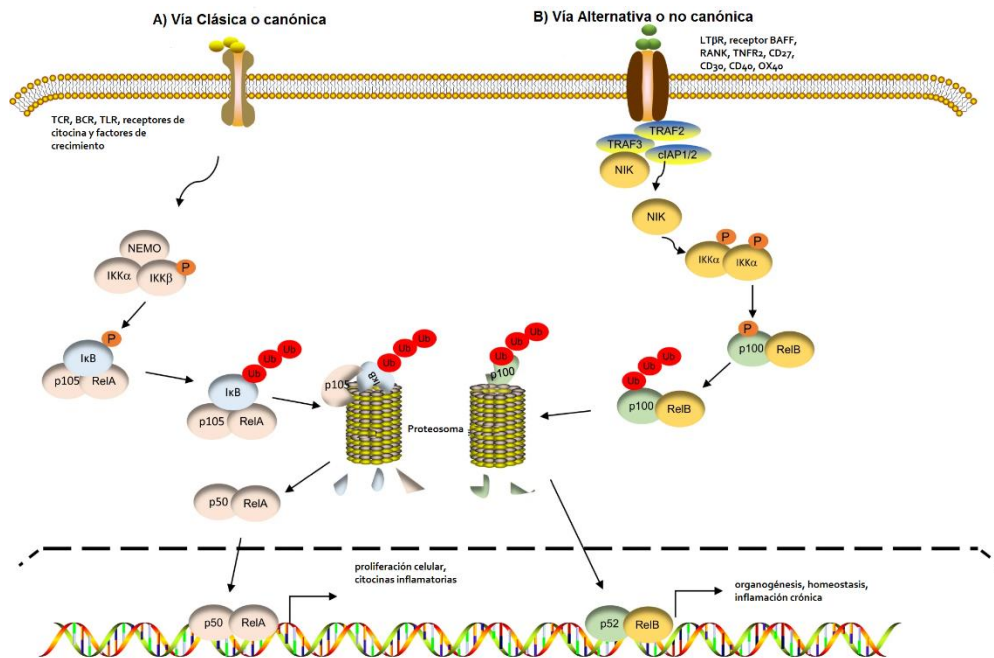


Figura 5. Vías de activación de NF- $\kappa$ B. **A) Vía clásica o canónica:** Es activada por múltiples señales proinflamatorias (ILs, TNF $\alpha$ ), las cuales se unen a sus receptores (TNFR1, IL-1R1, etc.) e inducen la



activación del complejo IKK, el cual está formado por dos subunidades catalíticas (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) y una subunidad reguladora (IKK $\gamma$ ). IKK $\beta$  fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$  y a su vez, I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada es ubiquitinada y degradada vía proteosoma. Entonces NF- $\kappa$ B se transloca al núcleo donde se une a los sitios  $\kappa$ B e induce la expresión génica. **b) Vía alternativa o no canónica:** Esta vía es inducida por estímulos como linfotóxina  $\beta$ , o ligando CD40, entre otros, los cuales activan a la cinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK), que fosforila a IKK $\alpha$  que, a su vez, fosforila a la proteína p100 (NF-KB1). p100 es proteolisada para generar su forma madura p52. Entonces, el dímero que contiene p52 se transloca al núcleo e induce la transcripción de sus genes blanco (Gloire *et al.*, 2006; Pasparakis, 2009).

Como se mencionó anteriormente, entre los genes regulados por NF- $\kappa$ B están los de las I $\kappa$ Bs, principalmente I $\kappa$ B $\alpha$ . Tras la activación y translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo, este induce la transcripción del gen de I $\kappa$ B $\alpha$ ; una vez sintetizado I $\kappa$ B $\alpha$  se transloca al núcleo, donde se une e inhibe la actividad de NF- $\kappa$ B, devolviéndolo al citosol, lo que significa que la proteína inhibidora, no solo regula la actividad del factor de transcripción en el citoplasma, sino también en el núcleo, removiendo del DNA los dímeros de NF- $\kappa$ B activos, constituyendo un circuito de retroalimentación negativa (Figura 6) (Wang *et al.*, 2020; Ferreiro and Komives, 2010; Aranza-Seisdedos *et al.*, 1997).

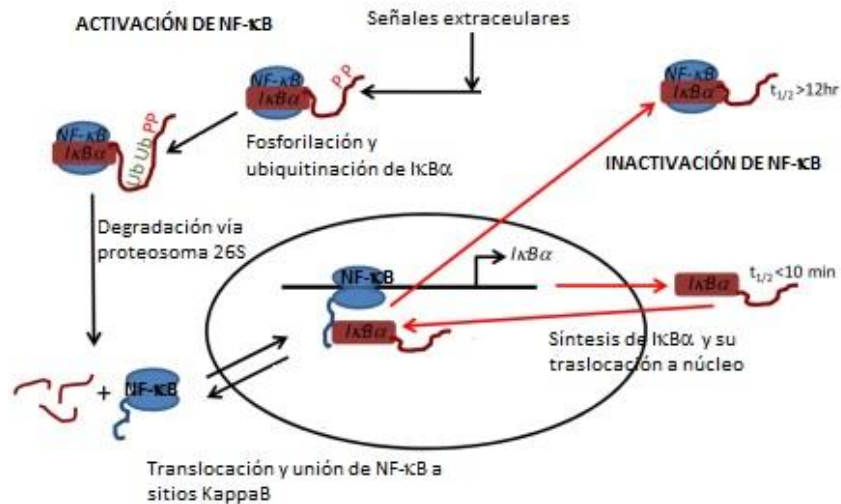


Figura 6. Retroalimentación negativa de la regulación de NF- $\kappa$ B. El complejo NF- $\kappa$ B es retenido en el citoplasma por su proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ , la cual, después de una señal de activación, es fosforilada, ubiquitinada y degradada vía proteosoma 26S, liberando a NF- $\kappa$ B. El factor de transcripción se transloca entonces al núcleo donde se une a sus genes blanco, entre ellos el de I $\kappa$ B $\alpha$ . Por otro lado, el I $\kappa$ B $\alpha$  recién sintetizado es importado al núcleo donde se une a NF- $\kappa$ B llevándolo hacia el citoplasma (Ferreiro and Komives, 2010).

Como se puede observar, la activación de NF- $\kappa$ B es un proceso inducible, regulado y transitorio. En las células tumorales, diferentes tipos de alteraciones moleculares ocasionan la pérdida en la regulación de NF- $\kappa$ B, por lo que llega a ser activado constitutivamente, lo que tiene como consecuencia la expresión desregulada de genes involucrados en el control de apoptosis, del ciclo celular y de procesos de adhesión y migración; procesos que participan en el desarrollo y progresión del cáncer, estableciéndose una clara relación entre NF- $\kappa$ B y carcinogénesis (Hoesel and Schmid, 2013; Lee *et al.*, 2007).

## 1.4 Otras funciones de I $\kappa$ B $\alpha$

I $\kappa$ B $\alpha$  es una proteína dinámica que se transloca constitutivamente del citoplasma al núcleo para inducir activamente la exportación de NF- $\kappa$ B y con ello dar por terminada su actividad transcripcional. Tam *et al.*, (2000) mostraron que el movimiento del complejo NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B $\alpha$  entre el núcleo y citoplasma es mediado por el receptor exportador nuclear CRM1. La secuencia de exportación nuclear (NES) que se une al CRM1 que se encuentra ubicado en el extremo N-terminal de I $\kappa$ B $\alpha$ , pero no en I $\kappa$ B $\beta$  o I $\kappa$ B $\epsilon$ .

Algunos estudios han reportado que I $\kappa$ B $\alpha$  en núcleo no solo tiene como función regular la actividad de NF- $\kappa$ B, sino que puede asociarse con otras proteínas, tales como desacetilasas de histonas (HDACs) o los co-represores nucleares N-CoR y SMRT (Aguilera *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2003; Viatour *et al.*, 2003). Se ha observado, que en fibroblastos I $\kappa$ B $\alpha$ , junto con HDACs, es reclutada al promotor de los genes blanco de Notch, (hes 1), lo que correlaciona con su represión transcripcional (Aguilera *et al.*, 2004). De igual manera, se ha demostrado que I $\kappa$ B $\alpha$  se encuentra predominantemente en el núcleo de queratinocitos, donde facilita la asociación del complejo represor polycomb (PRC2) a promotores específicos (Mulero *et al.*, 2013). Las proteínas del grupo polycomb regulan la estructura de la cromatina ocasionando determinados patrones de expresión génica en diferentes células. En los mamíferos, existen dos complejos principales del grupo polycomb: el complejo represor polycomb 1 (PRC1) y 2 (PRC2). PRC2 participa en varios procesos biológicos, tales como diferenciación, mantenimiento de la identidad y proliferación celular y la plasticidad de las células madre, mediante regulación de la compactación de la cromatina e induce la metilación de la histona H3 en la lisina 27 (Margueron and Reinberg, 2011). Por lo que, la unión de I $\kappa$ B $\alpha$  nuclear y PRC2 proporciona, a esta última, la capacidad de responder a TNF $\alpha$ , estableciendo una relación entre las señales involucradas con la inflamación y la homeostasis en el mantenimiento de la identidad de los queratinocitos, ya que en este caso, la localización nuclear de I $\kappa$ B $\alpha$  junto con PRC2 permite el mantenimiento de la estructura de la piel, mientras que, en respuesta a TNF $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$  se separa de PRC2 y se trasloca al citoplasma, lo que se ha relacionado con la progresión del carcinoma de células escamosas (Figura 6) (Mulero *et al.*, 2013).

Asimismo, Mulero *et al.*, (2013) demostraron que el I $\kappa$ B $\alpha$  nuclear, además de estar fosforilado en los residuos S32 y 36, también es sumoiledado en K21 y 22 lo que puede estar relacionado con sus funciones nucleares, ya que le permite unirse a las histonas. Por otra parte, se ha reportado que las sumoilaciones en I $\kappa$ B $\alpha$ , le confiere resistencia a la degradación, ya que es sumoiledada en el mismo residuo que es ubiquitinado (residuo K21), lo que evita su degradación. Esta modificación es independiente de las fosforilaciones convencionales (S32 y S36) (Wang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2009).

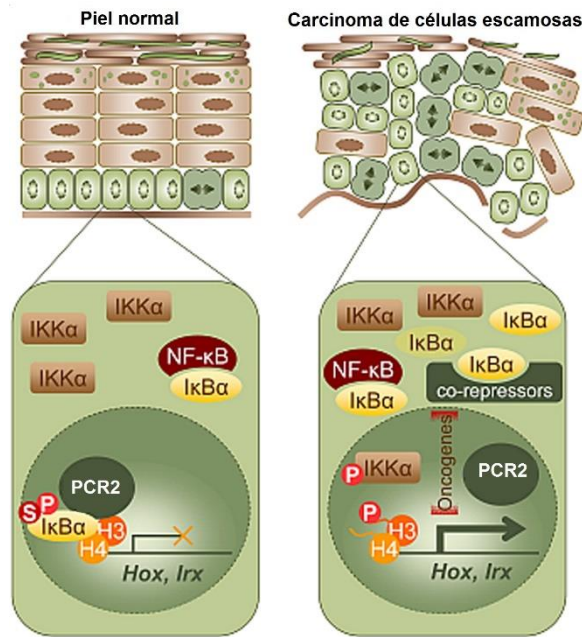


Figura 6. Modelo para la función del IκBα nuclear en queratinocitos normales y transformados. En queratinocitos normales, IκBα fosforilado y sumoilado se trasloca al núcleo y se une al complejo de polycomb 2 (PCR2) e inhibe la expresión de genes relacionados con el desarrollo, mantenimiento y diferenciación celular, tales como Hox e Irx, mientras que, en queratinocitos transformados y en el carcinoma de células escamosas, IκBα es acumulado en el citoplasma y se ha asociado con la progresión del tumor, debido al incremento en la expresión Hox e Irx (Mulero *et al.*, 2013)

Por otro lado, estudios realizados por Rao *et al.*, (2010) mostraron que IκBβ, otro miembro de la familia IκB y cuyo gen es blanco de NF-κB, es resintetizado, hipofosforilado y translocado al núcleo, donde se une al heterodímero RelA/c-Rel, lo que facilita y estabiliza el reclutamiento de este complejo a los promotores de los genes de IL-1β, IL-6 y TNFα, lo que prolonga su expresión. Por lo que los autores sugieren que IκBβ desempeña un papel dual en la respuesta inflamatoria, como inhibidor de NF-κB y activador nuclear de algunos genes diana del heterodímero RelA/c-Rel.

### 1.5 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

Este receptor, conocido también como ErbB ó HER-1, pertenece a la familia de receptores ErbB que es parte de la subclase I de la superfamilia de receptores de tirosina cinasa (RTK); los otros 3 receptores transmembranales de la subclase I son ErbB2 (neu/HER-2), ErbB3 (HER-3) y ErbB4 (HER-4) (Sabbah *et al.*, 2020; Melenhorts *et al.*, 2008; Holbro and Haynes, 2004). Se sabe que la activación de los receptores ErbB es controlada por la unión de sus ligandos, tales como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento transformante-α (TGF-α), anfiregulina (AR), epiregulina (EREG) y neuregulina (NRGs), entre otros, lo que induce autofosforilaciones entre sus homo ó heterodímeros en residuos de tirosina específicos (Figura 7) (Sabbah *et al.*, 2020; Melenhorts *et al.*, 2008; Ditmann *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2001).

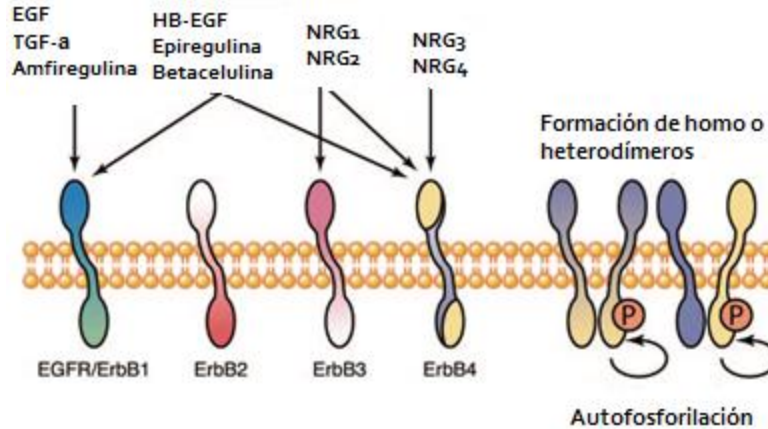


Figura 7. Familia de receptores ErbB: EGFR/ErbB1, ErbB2, ErbB3 y ErbB4; diferentes ligandos inducen la formación de los homo o heterodímeros y la activación del dominio de cinasa de tirosina intrínseco, resultando en autofosforilaciones en residuos de tirosina específicos (Melenhorts *et al.*, 2008).

Una vez activado, EGFR regula procesos celulares tales como: crecimiento, proliferación y diferenciación celular, entre otros, mediante dos mecanismos: a) como transductor de señales mitogénicas extracelulares; o b) como factor de transcripción o co-activador al unirse a otros factores de transcripción (Figura 8) (Lo *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2001; Marti *et al.*, 2001). En la transducción de señales mitogénicas (Figura 8a), una vez que EGFR es activado, los residuos de tirosina fosforilados actúan como sitios de unión para las proteínas Grb2, SHC ó PLC $\gamma$ , formando complejos que activan cascadas de señalización río abajo, como son Ras-Raf-MEK-ERK 1/2, PI3K-Akt-mTOR ó Jak/STATs, las cuales están relacionadas con procesos de proliferación, diferenciación, sobrevivencia y anti-apoptosis (Sibilia *et al.*, 2007).

Por otro lado, en los últimos 30 años se ha reportado un modo diferente de señalización de EGFR dentro del núcleo en varios tipos de células (Lo *et al.*, 2005; Schausberger *et al.*, 2003; Kamio *et al.*, 1990), así como en algunos tumores entre los que están el carcinoma adrenocortical primario, de piel, mama, bazo, cérvix, tiroides y de la cavidad oral (Psyrrri *et al.*, 2005; Lo *et al.*, 2005; Marti *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 1995; Kamio *et al.*, 1990). Se han propuesto dos mecanismos por los cuales el receptor se transloca al núcleo:

- a) La traslocación nuclear mediada por endosoma, en la cual, la activación de EGFR por EGF, ocasiona su internalización mediante endocitosis dependiente o independiente de clatras formando endosomas tempranos. Estos endosomas pueden tomar dos direcciones: reciclar el receptor a la superficie celular o bien, degradarlo vía fusión con lisosomas. Lo *et al.*, (2006) observaron que la velocidad de internalización es mayor que la de su degradación, por lo que sugieren que una cantidad de EGFR puede acumularse en el citoplasma y traslocarse al núcleo. EGFR interactúa a través de su señal de localización nuclear (NLS) con los receptores transportadores nucleares, importinas  $\alpha/\beta$ 1 y CRM1 (mantenimiento de la región de la cromatina). La proteína importina  $\beta$ 1 interactúa con las nucleoporinas del complejo de poro nuclear para transportar a EGFR desde la membrana nuclear externa a la membrana nuclear interna. Entonces, el EGFR incrustado en la membrana nuclear interna se libera al nucleoplasma (Wang *et al.*, 2010; Lo *et al.*, 2006).

- b) La retro-translocación por la maquinaria de tráfico asociada al retículo endoplásmico (ER), la cual también implica la internalización del receptor mediante la formación del endosoma que se fusiona con el RE a través del aparato de Golgi. El EGFR unido al RE se retro-transloca al citosol con la ayuda del translocón Sec6 $\beta$ , proteína que forma un canal a través de la membrana del RE para el transporte de proteínas (Wells *et al.*, 2002; Wiertz *et al.*, 1996). Posteriormente el EGFR ya en el citosol es estabilizado por la proteína chaperona HSP70 y dirigido por las proteínas importinas para que entre al núcleo (Liao and Carpenter, 2007).

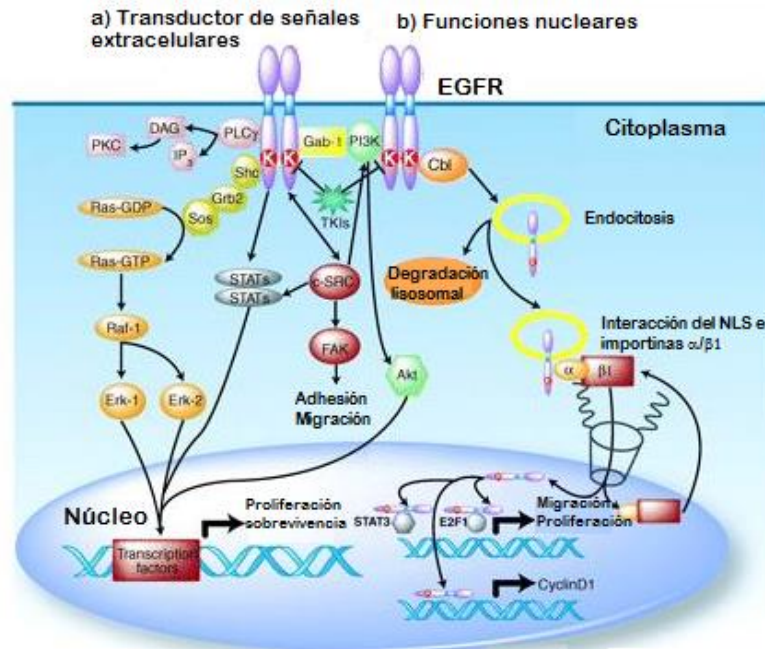


Figura 8. Vías de señalización de EGFR. La activación de EGFR conduce a la homo/heterodimerización y fosforilación subsecuente de residuos de tirosina específicos. Una vez activado EGFR puede funcionar como transductor de señales extracelulares (a) reclutando varias proteínas en la porción intracelular de los receptores, y activando distintas vías de señalización tales como: la ruta Ras/Raf/MAPK (naranja) y la ruta PI3K (verde); mientras que, la fosfolipasa C (rosa) y los factores de transcripción STAT (azul) se unen directamente al receptor induciendo su activación. Los receptores activados sufren endocitosis, y los endosomas pueden seguir dos rutas posibles: degradación lisosomal o la traslocación nuclear mediada por importina  $\alpha/\beta$ 1. Una vez en el núcleo, el EGFR puede comportarse como un factor de transcripción o como cofactor transcripcional uniéndose a otros factores de transcripción entre los que están E2F1 o STAT3/5 (b). Ambas vías dan como resultado la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, supervivencia, invasión y metástasis (modificado de Scaltriti and Baselga, 2006).

Al entrar al núcleo, el EGFR puede tener distintos efectos. Se han identificado tres funciones principales: a) puede actuar como factor de transcripción, reconociendo secuencias ricas en A-T (ARS), como es el caso del promotor del gen de la ciclina D1 (Figura 8b); b) como co-activador de factores de transcripción asociándose y formando complejos con E2F1, STAT3, STAT5, los cuales regulan la expresión de genes como aquel de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) encargada de la producción de óxido nítrico (Figura 8b) (Lo *et al.*, 2006; Lo *et al.*, 2005; Lin *et al.* 2001); y c) como cinasa de residuos de tirosina en diferentes proteínas, como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), la cual es fosforilada en su residuo



Tyr211 incrementando su estabilidad. Es así, como la actividad del EGFR nuclear está vinculada con la proliferación celular y resistencia a fármacos, entre otros procesos involucrados en la tumorigénesis y tratamiento del cáncer (Dittmann *et al.*, 2010; Schausberger *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2001; Marti *et al.*, 1991).

En el caso particular del riñón, la presencia y activación de los ErbB juegan un papel importante en la nefrogénesis, la regulación de la hemodinámica renal, el manejo de electrolitos, la reabsorción de magnesio y la gluconeogénesis en el túbulo proximal (Harris, 1991). Durante la nefrogénesis, el EGFR es detectado en la membrana citoplasmática del túbulo colector en etapas tempranas y tardías, mientras que ErbB2, ErbB3 y ErbB4 se localizan, principalmente, en túbulo distal y colector (Figura 9). En el riñón ya formado y sano EGFR se expresa constitutivamente en el glomérulo, túbulos e intersticio, y su activación es esencial para la iniciación de la desdiferenciación y proliferación de las células tubulares renales después de un daño renal agudo, no obstante, su desregulación ha sido asociada a con varias formas de glomerulonefritis, daño renal fibrótico progresivo, enfermedad poliquística renal, lesiones fibrosas glomerulares y en el cáncer (Melenhorts *et al.*, 2014).

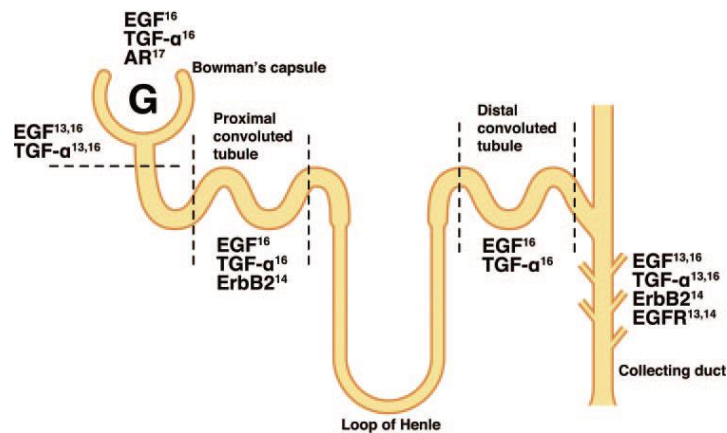


Figura 9. Expresión de los miembros de la familia de ErbB en la nefrogénesis humana. Se muestra la distribución de los diferentes ErbB y los ligandos (EGF y TGF $\alpha$ ) en los distintos segmentos de la estructura de la nefrona. Durante la embriogénesis ErbB2 se expresa en el desarrollo de túbulos proximales y ductos colectores, mientras que EGFR solo en los ductos colectores. EGF y TGF $\alpha$  se expresan en las estructuras que se convierten en la cápsula de Bowman, túbulo proximal, túbulo distal y ductos colectores. (Melenhorts *et al.*, 2014).

Los miembros de la familia de ErbB han sido implicados en el desarrollo del cáncer y se utilizan como marcadores de pronóstico y/o blancos terapéuticos en varios tipos de neoplasias. Particularmente, para EGFR se han descrito diferentes fenómenos como los responsables de su sobreexpresión y/o activación anormal en diversos tipos de tumores, los cuales abarcan desde una amplificación, sobreexpresión y/o distintas mutaciones en su gen, hasta ciclos autocrinos de diversos factores de crecimiento que conllevan a su activación constitutiva (Wykosky *et al.*, 2011; Sibilía, 2007). En lo que respecta a las mutaciones, la más frecuentemente reportada en diferentes tipos de cáncer es la delección de los exones 2-7, cuyo resultado es un receptor activo constitutivamente en ausencia de ligando (Ekstrand *et al.*, 1994;

Wong *et al.*, 1992), aunque, se han reportado otras en sus dominios intra y extracelulares (Moscatello *et al.*, 1995; Wikstrand *et al.*, 1995).

### 1.6 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ /EGFR en el CCR

Una de las alteraciones comúnmente reportadas en el CCR, es un incremento en los niveles y/o actividad de NF- $\kappa$ B (Matusan-Ilijas *et al.*, 2011; Metoglu *et al.*, 2008; Djordjevic *et al.*, 2008; Sourbier *et al.*, 2007; Oya *et al.*, 2003). Oya *et al.*, (2003) sugirieron una correlación directa entre el grado del tumor, invasión y metástasis del CCR con la expresión y activación de NF- $\kappa$ B. Además, demostraron que el aumento en la activación de NF- $\kappa$ B en los tumores estaba asociada con la disminución en la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$ . Posteriormente, Meteoglu *et al.*, (2008) reportaron, en tumores de CCR, una correlación entre la actividad de NF- $\kappa$ B y marcadores de proliferación y apoptosis, es decir, un incremento en la expresión de factores de crecimiento, tales como el EGFR, VEGF o una disminución en Bcl-2 y p53. Cabe mencionar que estos autores determinaron la actividad de NF- $\kappa$ B mediante su localización subcelular, es decir dedujeron la actividad del factor de transcripción al detectar una mayor positividad nuclear en tejido neoplásico comparado con muestras de un riñón normal. Además, hay que resaltar que en todos los estudios referidos se analizó la expresión de las subunidades p50 o p65.

Aunado a todo lo anterior, es bien conocido que casi el 50% de los pacientes con diálisis, a largo plazo desarrollarán quistes, de los cuales aproximadamente el 6% presentarán CCR (MacDougall *et al.*, 1987; Brennan *et al.*, 1991). También en estos casos se ha reportado una sobreexpresión de NF- $\kappa$ B, la cual puede estar involucrada en el desarrollo de los quistes renales y su posterior transformación en tumores (Konda *et al.*, 2008).

Ahora bien, al ser la sobre-expresión o sobre-activación de NF- $\kappa$ B una de las alteraciones implicadas en el desarrollo y progresión del CCR, lo convierten en un blanco terapéutico para el tratamiento de esta neoplasia. Se han propuesto tres tipos de estrategias para inhibir su actividad: a) la sobreexpresión de una mutante de I $\kappa$ B $\alpha$ , b) el silenciamiento con RNA de interferencia (siRNA) o c) el uso de péptidos o inhibidores como el dicarbamato de pirrolidina (PDTC) (Morais *et al.*, 2006, 2010; Sourbier *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2005; Steiner *et al.*, 2001). Sin embargo, en las dos primeras estrategias los resultados *in vitro* han sido limitados, y en el caso de los estudios *in vivo* no han tenido éxito. Los resultados experimentales más prometedores han sido con la quimio-inhibición de NF- $\kappa$ B. En este sentido, los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados por Morais *et al.*, (2006 y 2010), en líneas celulares de CCR y en un modelo xenográfico murino, mostraron que el tratamiento con PDTC inhibe la expresión de NF- $\kappa$ B y, en consecuencia, disminuyen la viabilidad celular y la proliferación.

Otra de las alteraciones observadas frecuentemente en el CCR humano es un incremento en la expresión de EGFR, pero su significado clínico es controversial, ya que algunos autores reportan que este aumento está relacionado con una mala prognosis (Shiau *et al.*, 2009; Merseburger *et al.*, 2005), mientras que otros lo asocian a una buena prognosis (Kallio *et al.*, 2003). Esta controversia podría deberse a los patrones de tinción observadas en las IHQ, ya que algunos reportan que el incremento se presenta en la membrana plasmática (Merseburger *et al.*, 2005; Kallio *et al.*, 2003, Uhlman *et al.*, 1995), mientras que otros lo reportan en citoplasma y membrana (Shiau *et al.*, 2009; Langner *et al.*, 2004), por lo que el significado

clínico depende de dónde se localice. Además, cabe mencionar que en la mayoría de los estudios el comportamiento en los niveles de EGFR es heterogéneo, aunque principalmente encuentran un incremento, también se reportan algunas muestras sin cambio o incluso algunas con una disminución. Cohen *et al.*, (2007) evaluaron la expresión y patrones de localización (citoplasmática vs. membranosa) de EGFR mediante IHQ de 44 muestras de CCRcc. Sus resultados mostraron que el aumento en la tinción de EGFR citoplasmática correlacionaba significativamente con un estadio patológico y grado nuclear Fuhrman más alto; mientras que el aumento en la tinción de EGFR membranoso no correlacionó con el estadio patológico o grado nuclear. El grado nuclear Fuhrman es un sistema que se utiliza para determinar el grado de avance y pronóstico del CCR, particularmente en el caso del CCRcc y papilar, el cual se basa en la forma y tamaño nuclear y la prominencia nucleolar (Liu *et al.*, 2018).

Si bien el significado clínico del aumento en los niveles de EGFR o en su actividad es controversial en el CCRcc, este receptor es considerado como blanco terapéutico en diversos tipos de cáncer, como el de mama, cuello, próstata y pulmón, entre otros (Seshacharyulu *et al.*, 2012; Roskoski 2014). Entre los tratamientos comúnmente utilizados que inhiben la hiperactividad del EGFR están el uso de inhibidores de cinasas o anticuerpos que impiden su activación. Los principales inhibidores empleados son Gefitinib, Erlotinib y Lapatinib; mientras que Cetuximab y Pantitumumab son anticuerpos, que reconocen el dominio extracelular del receptor (Patel *et al.*, 2007). Sin embargo, los resultados de estas terapias moleculares dirigidas al EGFR han sido poco eficaces para el caso del CCRcc (Cossu-Rocca *et al.*, 2016).

### **1.7 Modelo experimental de carcinogénesis renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)**

Uno de los modelos experimentales de carcinogénesis renal que existen, es el carcinoma de túbulo proximal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA), el cual fue adaptado por Athar e Iqbal (1998) de aquel propuesto por otros autores (Awai, 1979). Se sabe que el estrés oxidante es uno de los mecanismos de carcinogenicidad renal de este compuesto (Vargas-Olvera *et al.*, 2012; Athar e Iqbal, 1998; Toyokuni *et al.*, 1996). El FeNTA es un compuesto formado por el complejo del ácido nitrilotriacético con  $Fe^{3+}$ , una molécula de fácil absorción (Preece *et al.*, 1989) y cuyo órgano blanco es el riñón (Mizote *et al.*, 2002). Se ha propuesto que, en el riñón, el FeNTA se filtra por el glomérulo hacia el lumen de los túbulos proximales, en donde se sugiere que se reduce de  $Fe^{3+}NTA$  a  $Fe^{2+}NTA$  por acción de los productos de degradación de glutatión como la cisteína o la cisteinglicina (Toyokuni *et al.*, 1996). La oxidación del FeNTA genera radicales superóxido que participan en las reacciones de Haber-Weiss catalizadas por el hierro para producir el radical hidroxilo, que inducen la peroxidación lipídica y daño a proteínas y al DNA (Tsuchiya *et al.*, 2005). De hecho, se ha encontrado que en la orina de ratas tratadas con FeNTA, se excreta 8-oxo-desoxiguanosina, un marcador de daño oxidativo al DNA (Bahnmann, 1998).

En tratamientos agudos, el FeNTA conduce a la insuficiencia renal, y en tratamientos crónicos lleva a la generación de CCR en roedores, cuyo análisis histopatológico demuestra que los tumores son muy similares a los de CCR humano, particularmente al subtipo de células claras (CCRcc) que es el subtipo histológico más común (Muglia and Prado, 2015). Además, se ha demostrado que el pretratamiento con N-dietilnitrosamina (DEN) reduce el tiempo de



tratamiento necesario para inducir el cáncer y aumenta la incidencia de tumores en comparación con los animales tratados únicamente con FeNTA (Athar and Iqbal, 1998). Asimismo, en trabajos realizados en el laboratorio se ha identificado que después de 1 ó 2 meses de tratamiento con el carcinógeno (FeNTA) se presentan lesiones preneoplásicas (Vargas-Olvera *et al.*, 2012), así como, diferentes alteraciones pro-carcinogénicas en moléculas como Ciclina D1, NF- $\kappa$ B y HIF  $\alpha$ , entre otras (Curiel-Muñiz, 2014; Pacheco-Bernal 2014; Navarro-García, 2013; Pariente-Pérez, 2012). Esto sugiere que el tratamiento durante 1 o 2 meses representan distintas etapas de la carcinogénesis renal inducida con este compuesto. Resulta importante mencionar que con el esquema de tratamiento que seguimos en nuestro laboratorio no se inducen tumores primarios en otros tejidos como hígado y/o pulmón (Vargas-Olvera *et al.*, 2012), lo que sugiere una especificidad del FeNTA como carcinógeno renal.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo del cáncer se ha dividido en tres etapas: iniciación, promoción y progresión, siendo las dos primeras, claves para su control. El carcinoma de células renales (CCR) es la neoplasia maligna más común del riñón adulto, se encuentra entre los 10 tumores más comunes en todo el mundo y su incidencia aumenta año tras año. Este tipo de cáncer presenta una alta mortalidad debido a su difícil diagnóstico, ya que es asintomático incluso en etapas avanzadas; asimismo, las opciones para su tratamiento son limitadas debido a la resistencia a las quimio y radioterapias convencionales, y a la baja eficacia y alta toxicidad de la inmunoterapia. Un modelo experimental utilizado para estudiar este tipo de neoplasia es aquel en el que los tumores renales se inducen con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en ratas, y que histológicamente son muy similares a los del CCR humano, correspondiendo al subtipo de células claras, que es el más común en pacientes. Además, con esquemas de exposición al carcinógeno durante uno y dos meses hemos reportado la presencia de displasia y diferentes alteraciones procarcinogénicas, por lo que se ha concluido que estos tiempos de tratamiento representan distintas etapas tempranas. Con base en lo anterior, se considera que este modelo experimental es una herramienta muy útil para estudiar este tipo de cáncer, y particularmente sus etapas iniciales que son prácticamente imposibles de estudiar en los pacientes. Entre las alteraciones moleculares frecuentemente reportadas en CCR humano está un incremento en los niveles y/o activación de NF- $\kappa$ B (p65) y EGFR, así como una disminución en los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$ , pero no está claro su estado en los tumores inducidos por FeNTA y se desconoce su evolución a lo largo de la carcinogénesis renal.

### 3. HIPÓTESIS

Tanto en tumores inducidos con FeNTA como en etapas tempranas de la carcinogénesis renal, NF- $\kappa$ B se encontrará sobre-activado lo que coincidirá con un aumento en los niveles del mRNA y proteína de EGFR, mientras que I $\kappa$ B $\alpha$  estará disminuida. Estas alteraciones se irán agudizando conforme avance el proceso canceroso.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el comportamiento de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  y EGFR a lo largo del proceso carcinogénico renal en un modelo experimental *in vivo*.

#### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Analizar los niveles y la localización subcelular de NF- $\kappa$ B (p65), I $\kappa$ B $\alpha$  y EGFR en los tumores renales inducidos con FeNTA para establecer su similitud con la neoplasia humana.
- 2) Estudiar si las alteraciones de estas moléculas se presentan en riñón desde las etapas tempranas de la carcinogénesis.
- 3) Determinar si en hígado y pulmón, tejidos donde no se desarrollan tumores primarios, presentan el mismo comportamiento de las tres proteínas que en el riñón.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Diseño experimental

En las figuras 10 y 11 se presenta el diseño experimental y el protocolo de carcinogénesis renal inducida con FeNTA que se siguieron en el presente estudio, respectivamente. Los esquemas de tratamiento con el iniciador N-dietilnitrosamina (DEN) y promotor (FeNTA) se realizaron de acuerdo con los protocolos ya establecidos en nuestro laboratorio (Aguilar-Alonso *et al.*, 2015; Vargas-Olvera *et al.*, 2012). Se utilizaron un total de 67 ratas Wistar macho de entre 31 a 36 días de edad (Harlan México-UNAM) y cuyo peso inicial fue de 70-80 g, divididas aleatoriamente en 2 grupos: Control (C) tratado exclusivamente con los vehículos (solución salina y carbonato de sodio 120 mM), y DEN+FeNTA (DF) tratado con una dosis única intraperitoneal de DEN (200 mg<sub>DEN</sub>/kg<sub>pc</sub>) y con administraciones repetidas de FeNTA, aumentando gradualmente la dosis cada semana comenzando con 3 hasta 9 mg<sub>Fe</sub>/kg<sub>pc</sub>, manteniendo esta última desde la 4a hasta la 16a semana (Tabla 1). Para analizar las etapas tempranas de carcinogénesis, 10 ratas fueron decapitadas después de un mes y otras 10 después de dos meses de exposición al FeNTA para el grupo DF, así como 6 animales para el correspondiente grupo C de cada tiempo de estudio. Para el protocolo de carcinogénesis, los animales restantes (6 ratas del grupo C y 29 del DF) fueron sacrificados dos meses después de la última inyección de FeNTA semanal, algunos de ellos por decapitación para obtener muestras de tumor para los ensayos de RT-PCR, mientras que otros fueron anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital sódico (50 mg/kg<sub>pc</sub>), los riñones fueron perfundidos con solución de Krebs-Ringer pH 7.4 con EDTA 250 mM y fijados en formalina a temperatura ambiente.

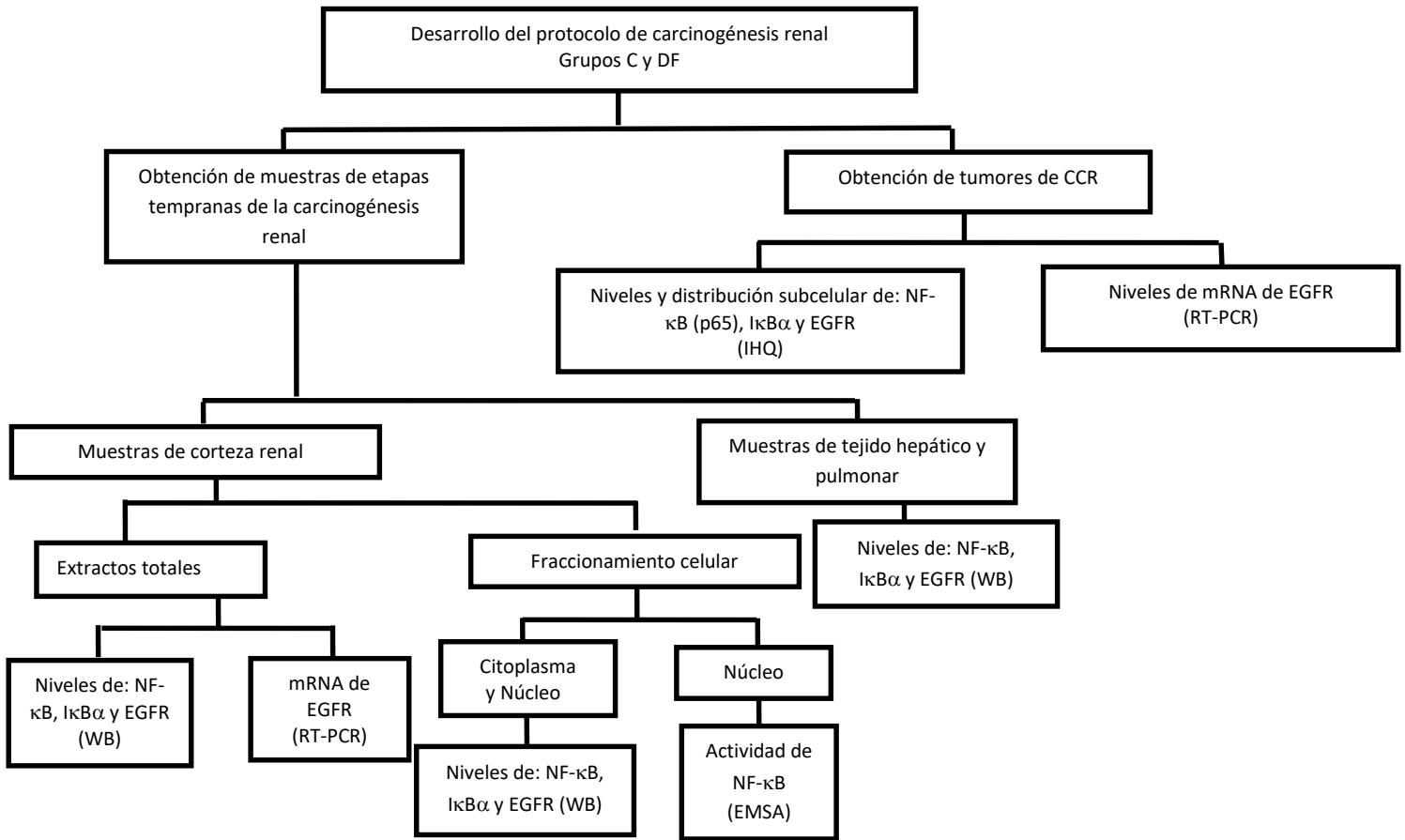


Figura 10. Diseño experimental realizado. IHQ, inmunohistoquímica, WB, Western blot, RT-PCR, EMSA: Ensayo de cambio en la movilidad electroforética.

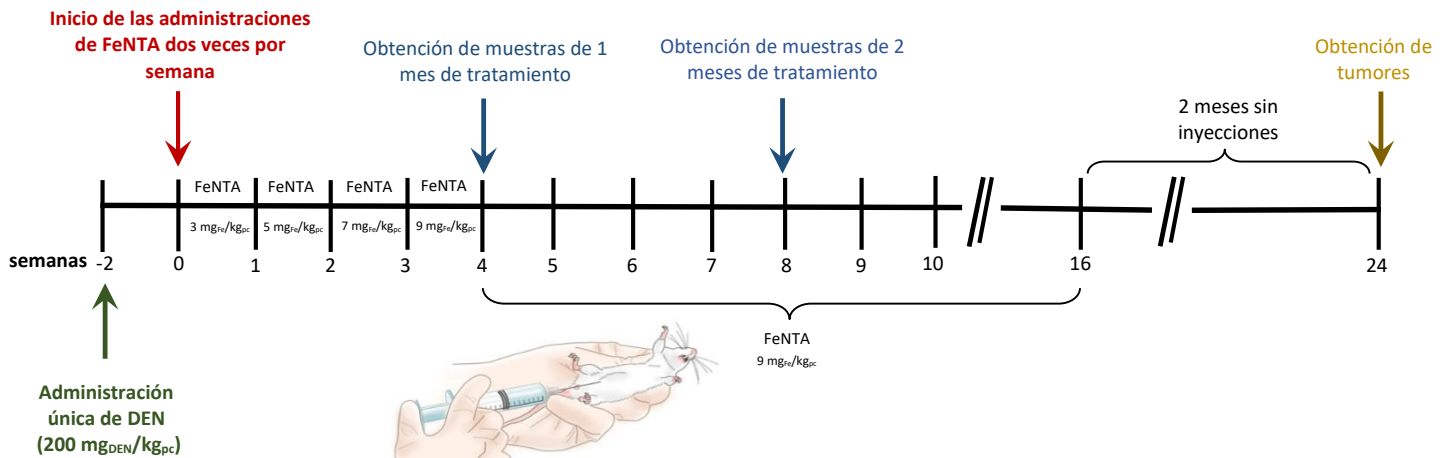


Figura 11. Protocolo de carcinogénesis renal utilizando N-dietilnitrosamina (DEN) como iniciador y nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) como promotor. Dos semanas antes de empezar el tratamiento con FeNTA (semana -2) se administró la dosis única del DEN (200 mg<sub>DEN</sub>/kg<sub>pc</sub>). La semana cero comenzar las administraciones de FeNTA dos veces por semana, aumentando gradualmente la dosis cada semana comenzando con 3 hasta llegar a 9 mg<sub>Fe</sub>/kg<sub>pc</sub>, manteniendo esta última desde la 4a hasta la 16a semana. En las etapas tempranas (1 y 2 meses) los animales se sacrifican 48 h después de la última administración del

FeNTA para evitar sus efectos agudos, y los tumores se obtuvieron 2 meses después de la última inyección de FeNTA en la semana 16ª (Vargas-Olvera *et al.*, 2012).

Tabla 1. Distribución de las ratas Wistar macho en los grupos de estudio

Grupo	# de animales	Esquema de tratamiento
Control (C)	18	Vehículos (Solución salina y carbonato de sodio 120 mM). Se sacrificaron 6 ratas en cada tiempo de estudio (1 mes, 2 meses y al final del protocolo)
DEN+FeNTA (DF)	49	Administración única de DEN vía intraperitoneal en una dosis de 200 mg <sub>DEN</sub> /kg <sub>pc</sub> + la administración de FeNTA vía intraperitoneal dos veces por semanas con aumentos graduales en la dosis 3, 5, 7, 9 mg <sub>Fe</sub> /kg <sub>pc</sub> . Se sacrificaron 10 ratas a uno y dos meses de tratamiento con FeNTA y 29 al final del protocolo.

\* pc= peso corporal

### 5.1.1 Administración de N-dietilnitrosamina (DEN)

El DEN se obtuvo de Sigma Aldrich, Inc. (St Louis MO, EUA). Se preparó diluyendo el contenido del vial (1 mL de 990-999 mg/mL) en 11 mL de solución salina. Su administración se realizó vía intraperitoneal en una dosis 200 mg<sub>DEN</sub>/kg<sub>pc</sub> ajustando el volumen dependiendo del peso de cada animal (Vargas-Olvera *et al.*, 2012; Athar e Iqbal, 1998).

### 5.1.2 Administración del FeNTA

El tratamiento con el carcinógeno inició 14 días después de la administración del DEN. El FeNTA se preparó justo antes de utilizarlo siguiendo el método de Awai *et al.*, (1979), con ligeras modificaciones (Vargas-Olvera *et al.*, 2012) Primero se preparó una solución de nitrato de hierro (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 160 mM y otra de sal sódica de ácido nitrilotriacético 320 mM, utilizando en ambos casos una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) 120 mM como disolvente (todos los reactivos utilizados fueron de Sigma Aldrich Inc). Se mezclaron ambas soluciones en una proporción 1:2 respectivamente, quedando una concentración final de hierro de 2.98 mg<sub>Fe</sub>/mL. Se ajustó el pH a 7.4 con NaHCO<sub>3</sub> y se administró vía intraperitoneal el volumen necesario para alcanzar la dosis correspondiente (3, 5, 7 ó 9 mg<sub>Fe</sub>/kg<sub>pc</sub>).

### 5.1.3 Eutanasia y toma de muestras

Para el estudio de las etapas tempranas de la carcinogénesis, se realizó la eutanasia de las ratas por decapitación después de uno y dos meses de tratamiento con FeNTA a las 48 h de la última administración del carcinógeno. Los riñones fueron inmediatamente removidos, se separó la corteza de la médula y las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se

almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Asimismo se extrajeron también muestras de tejido hepático y pulmonar. Para la obtención de los tumores, la eutanasia se realizó dos meses después de la segunda administración correspondiente a la 16ª semana de tratamiento con FeNTA. Para los análisis de IHQ, se perfundió con solución Krebs-Ringer (Cold Spring Harbor Protocols, 2008) uno de los riñones de 3 ratas control y de 6 ratas del grupo DF.

## 5.2 Inmunohistoquímica (IHQ)

Para el análisis de inmunohistoquímica, los riñones se fijaron con formalina, se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de  $5\ \mu\text{m}$  de espesor utilizando un micrótopo de rotación marca Leica<sup>(R)</sup>. Las secciones se desparafinaron y deshidrataron utilizando procedimientos estándar, comenzando con xilol, concentraciones decrecientes de etanol con agua y por último agua. La exposición de antígeno se realizó con una solución caliente de citrato de sodio 0.01 M pH 6. Posteriormente, las muestras se incubaron con solución de bloqueo durante 30 min ( $\text{H}_2\text{O}_2$  3%, en PBS) para suprimir la actividad de la peroxidasa endógena. Transcurrido el tiempo, se realizaron lavados con PBS, las muestras se incubaron en Tritón X-100 al 5% y la unión de inmunoglobulinas no específicas se bloqueó incubando las muestras en albúmina libre de IgG al 5% en PBS; subsecuentemente las secciones se incubaron durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en una cámara humidificada con el correspondiente anticuerpo primario (NF- $\kappa\text{B}$  (p65) (Cat. No. sc 8008),  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (Cat. No. sc 371) ó EFGR (Cat. No. sc 03 G)). Todos los anticuerpos fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, Inc. a una dilución 1:250 preparado con tritón PBS al 3%. Al día siguiente, el anticuerpo primario se eliminó con lavados de PBS y las secciones se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h con una dilución 1:200 del anticuerpo secundario IgG de conejo o ratón (según el caso) acoplado con biotina (kit ABC Vectastain®). Completado el tiempo, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el reactivo de avidina-biotina conjugado con peroxidasa (kit ABC Vectastain®). La inmunorreacción se detectó con el kit DAB (Vector Laboratories) y las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se deshidrataron. Finalmente, para evaluar el perfil de expresión de las distintas proteínas en el tejido renal, se analizaron cuatro campos aleatorios de cada muestra con un microscopio Nikon E600 acoplado a una cámara digital sight D5-5M a ampliaciones de 100x y 200x; la intensidad de tinción (valor medio de gris) de las células inmunopositivas se evaluó con el software Image J (NIH, Bethesda), el cual convierte el valor medio gris en uno numérico, utilizando una escala de 0 (blanco) a 255 (negro) (Mendoza-Rodriguez *et al.*, 2003).

## 5.3 Extracción de mRNA y RT-PCR

A partir de las muestras de corteza renal de las ratas tratadas durante 1 y 2 meses con FeNTA y de tumores obtenidos al final del protocolo se realizó la extracción de RNA total utilizando TRIzol<sup>TM</sup> (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración de RNA espectrofotométricamente a 260 nm. Utilizando el volumen equivalente a  $1\ \mu\text{g}$  de RNA, se llevó a cabo la RT-PCR empleando el estuche comercial Titan One Tube RT-PCR (Roche Applied Science). Para determinar semicuantitativamente la cantidad de mRNA de EGFR se utilizaron los siguientes cebadores: sentido 5'-AGTGGTCCTTGGAAACTTGG-3', antisentido 5'-GTTGACATCCATCTGGTACG-3' (Ledeganck *et al.*, 2011); y para GADPH, usado como control de carga, sentido 5'-

GGCTGAGAATGGGAAGCTGGTCAT-3', antisentido 5'-CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA-3' (Cai *et al.*, 2006). El programa para la síntesis del DNAc y amplificación de los templados fue el siguiente: 1 ciclo de 5 min a 94°; 10 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, 30 s a 72°C; 20 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, 30 s con un incremento de 5 s cada ciclo a 72°C; 1 ciclo de 7 min a 72°C.

#### **5.4 Extracción de proteínas totales y Western blot**

Se homogeneizaron 150 mg de corteza renal (homogeneizador PT10 / 35GT Polytron®), en un amortiguador de lisis frío (DTT 1 mM, TRIS-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, azida sódica 15 mM, triton X-100 al 10% y glicerol al 30%) añadido con el inhibidor de proteasas comercial cOplete™ Mini y las tabletas de cóctel PhosSTOP™ inhibidor de fosfatasa (Roche Diagnostics). Después de la centrifugación de los homogeneizados (13,000 x g durante 30 min a 4°C) (centrífuga Thermo Scientific Legend RT+), se recuperaron los sobrenadantes y se cuantificó la proteína total mediante el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc). Se sometieron a electroforesis cantidades iguales de proteína (60-80 µg dependiendo del caso) en una SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana Immobilon® PVDF (Millipore Corp). Las membranas se bloquearon durante 1 h con leche en polvo descremada al 1% y se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario (NF-κB (p65) (Cat. No. sc 8008), IκBα (Cat. No. sc 371) ó EFGR (Cat. No. sc 03 G), todos los anticuerpos fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, Inc.) durante toda la noche a 4°C; luego, se lavaron e hibridaron con el respectivo anticuerpo secundario. Las bandas inmunorreactivas se detectaron usando el sustrato de HRP quimioluminiscente Immobilon™ (Millipore Corp.) y se registraron en películas de rayos X. Los resultados se obtuvieron mediante un análisis densitométrico, descrito en las siguientes secciones.

#### **5.5 Extracción de proteínas nucleares y ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)**

Con la finalidad de determinar la actividad de NF-κB por EMSA se realizó la extracción de proteínas nucleares de las muestras de corteza renal como se describe a continuación:

Se colocaron 100 mg de tejido renal en 800 mL de amortiguador A (HEPES 10 mM, pH: 7.9, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.5 mM y una tableta de inhibidor de proteasas cOplete™ mini (Roche Diagnostics) y se homogenizaron con un Politrón PT-1035 GT a 40,248 x g durante 8-20 s. Después de 2 min en baño de hielo, se adicionaron 5 µL de NP-40 (Nonidet P-40) manteniendo la mezcla en hielo durante 20 min y agitando cada 2 min. Posteriormente, se centrifugó durante 15 min a 1500 x g y 4°C (centrífuga Thermo Scientific LEGET RT+). Se separó el sobrenadante (fracción citosólica), mientras que el precipitado se resuspendió con 100 µL de amortiguador B (HEPES 20 mM, pH 7.9, NaCl 420 mM, glicerol 25%, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, PSMF 0.5 mM, DTT 0.5 mM y una tableta del inhibidor de proteasas cOplete™ mini (Roche Diagnostics) y se incubó en baño de hielo durante 20 min agitando la mezcla cada 2 min. Al término de la incubación, se centrifugó durante 10 min a 13,000 x g a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante el cual contiene las proteínas nucleares, y se almacenó a -20°C hasta su análisis. La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc.).



En la fracción nuclear se determinó la actividad de unión de NF- $\kappa$ B a su secuencia consenso, mediante un EMSA. Para esto se utilizó la secuencia consenso de doble cadena reconocida por NF- $\kappa$ B cuando está conformado por p65: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' (Santa Cruz Biotechnology Inc.). El oligo de doble cadena se marcó con digoxigenina usando el estuche comercial DIG Gel Shift Kit, 2nd generation (Roche Applied Science) y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se llevó a cabo el EMSA usando el mismo estuche comercial. Se utilizaron 2 ng de oligo marcado y un volumen correspondiente a 60  $\mu$ g de proteínas nucleares. La formación del complejo ADN-proteína se determinó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida nativa al 5% con TBE 0.5X (Tris 50 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 0.5 mM) durante 120 min a 80 V. Las muestras se transfirieron a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche Diagnostics) en TBE 0.5X durante 30 min a 300 mA (trans-blot SD Semi-dry Transfer cell, BIO-RAD). Posteriormente la membrana se expuso a luz ultravioleta (CL-1000 reticulador ultravioleta, UVP), durante 60 s, para llevar a cabo el entrecruzado. Finalmente, se realizó la inmunodetección de digoxigenina y se obtuvieron las autorradiografías correspondientes, las cuales fueron evaluadas mediante un análisis densitométrico (descrito en las siguientes secciones). La especificidad de la unión y el reconocimiento de la identidad de las bandas desplazadas se examinó, mediante ensayos de competencia y de súper-retardo. En el primero se incubó una muestra con un exceso molar de 100 veces de oligonucleótido no marcado, además de los 2 ng del oligonucleótido marcado. En el segundo, la muestra se incubó previamente con un anticuerpo que se une a alguno de los componentes del factor de transcripción, en este caso p65, anti-p65 (Cat. No. sc-8008, Santa Cruz Biotechnology) lo que alterará el corrimiento de la banda correspondiente al complejo factor de transcripción-oligonucleótido marcado.

## 5.6 Fraccionamiento celular

Se homogeneizaron 150 mg de corteza renal (homogeneizador PT10 / 35GT Polytron® Kinematica) en amortiguador Gough (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0.15 M, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, NP-40 0.65%, PMSF 0.5 Mm y DTT 1 mM). La mezcla se incubó en hielo durante 30 min con agitación cada 5 min, centrifugándola posteriormente a 13,000 x g durante 2 min a 4°C (Thermo Scientific Legend RT+). Se recuperó el sobrenadante (fracción citoplásmica) y se almacenó a 4°C; el precipitado se resuspendió en 250  $\mu$ l de amortiguador HEPES (HEPES 20 mM, pH 7.9, glicerol 25%, NaCl 0.4 M, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, PMSF 0.5 Mm y DTT 1 mM). Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente con agitación constante, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 12,000 x g a 4°C (centrífuga Thermo Scientific Legend RT+), y el sobrenadante (proteínas nucleares) se transfirió a un tubo que contenía 400  $\mu$ L de amortiguador D (HEPES 20 mM, pH 7.9, glicerol 20%, KCl 50 M, EDTA 0.2 M, PMSF 0.5 Mm y DTT 1 mM). Para realizar los análisis de WB se utilizó la misma cantidad de proteínas citoplasmáticas y nucleares de cada muestra, para lo cual se determinó su concentración por el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc).

## 5.7 Análisis densitométrico y estadístico

El análisis densitométrico se realizó utilizando el programa ImageJ 1.44P, de las National Institutes of Health (NIH), USA. Para el WB y el RT-PCR los resultados de los grupos experimentales se expresaron como unidades densitométricas relativas con respecto al grupo Control (RDU/C) calculadas dividiendo las unidades densitométricas totales de la banda correspondiente a la proteína de interés entre el valor de la banda correspondiente a la proteína utilizada como control de carga obtenida para la misma muestra en la misma membrana. Este resultado, a su vez, se dividió entre el resultado obtenido para el grupo control. Para EMSA, los datos se calcularon dividiendo las unidades densitométricas de la oligobanda desplazada de las muestras problema entre el valor medio densitométrico obtenido para las muestras del grupo control. Por último, para el WB de fracciones celulares, los resultados se expresaron como la tasa obtenida al dividir el valor densitométrico de la banda correspondiente a la proteína de interés entre el de la banda correspondiente al control de carga (RDU, por sus siglas en inglés).

Todos los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar del promedio (SEM). Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía seguido por la prueba post hoc de Tukey en la figura 14 y por Prueba t con corrección de Welch en todas las demás figuras. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism see.5.0b para Windows (GraphPad Software). Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 6. RESULTADOS

Para la realización del presente estudio se desarrolló un protocolo de carcinogénesis renal inducida con FeNTA, durante el cual a algunos animales se les practicó la eutanasia después de uno o dos meses de tratamiento con el carcinógeno para el análisis de etapas tempranas del desarrollo de la neoplasia, y el resto al final del protocolo cuando se obtuvieron tumores.

### 6.1 Apariencia de los riñones extraídos

Se examinó la apariencia macroscópica tanto de los tumores renales inducidos, como de los riñones extraídos a uno o dos meses de exposición al FeNTA. En la figura 12 se muestran fotografías representativas de la apariencia macroscópica e histológica de los tumores renales obtenidos, así como las correspondientes a un tumor de CCR de células claras de humano (Mancini *et al.*, 2008). En esta figura se puede apreciar la gran similitud en la apariencia macroscópica de los tumores experimentales con aquella de los tumores humanos y se evidencia que el FeNTA induce el subtipo de células claras, el subtipo más común en pacientes, como lo habíamos reportado en protocolos realizados previamente (Vargas-Olvera *et al.*, 2012). En la figura 13 se presentan fotografías representativas de los riñones de los grupos C y DF a uno y dos meses de tratamiento, donde se puede apreciar que, a ambos tiempos de estudio, los riñones del grupo DF muestran daño patente presentando una coloración pálida en la corteza y una médula irritada, comparándolos con los riñones del grupo C, siendo este daño mayor a los dos meses cuando, además, se observó la presencia de quistes.

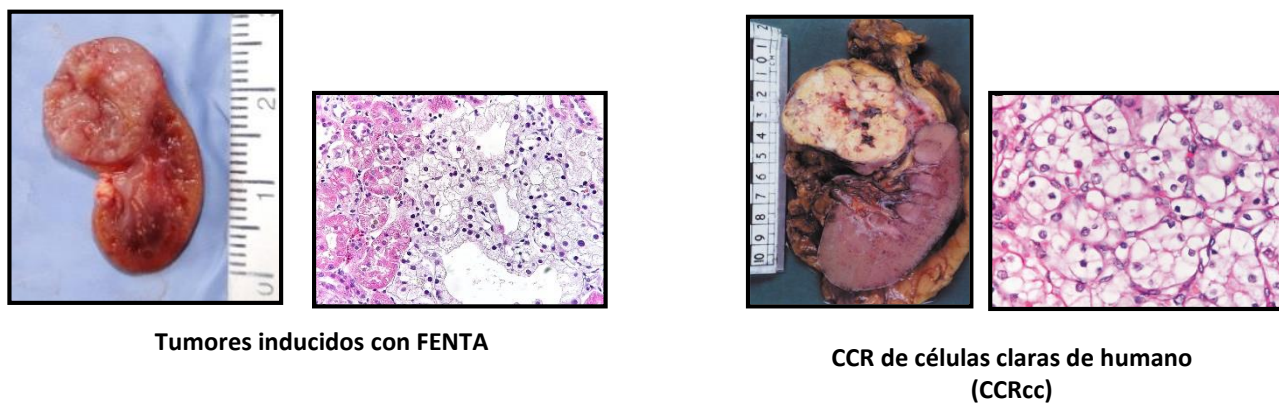
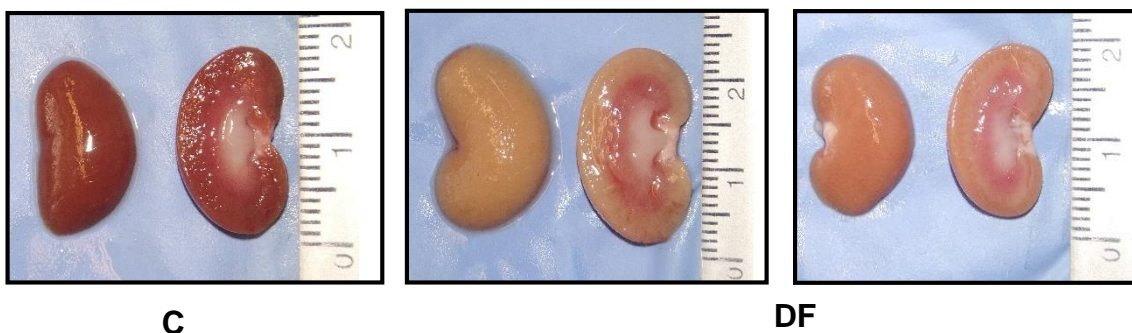


Figura 12. Apariencia macro y microscópica de los tumores inducidos con FeNTA y su comparación con el CCR de células claras de humano. Se puede apreciar la gran similitud macroscópica e histopatológica de ambas neoplasias. Imagen de CCR humano tomada de Mancini *et al.*, (2008). X400, hematoxilina y eosina.

### a) 1 mes



### b) 2 meses



Figura 13. Apariencia macroscópica de los riñones extraídos después de uno (a) y dos meses (b) de exposición al FeNTA. El grupo DF, para ambos tiempos estudiados, mostró alteraciones evidentes como son corteza pálida y médula irritada, así como la presencia de quistes (flechas) al segundo mes. C: grupo Control, DF: grupo DEN+FeNTA.

## 6.2 NF- $\kappa$ B (p65), I $\kappa$ B $\alpha$ y EGFR en los tumores inducidos con FeNTA por IHQ

Con la finalidad de determinar si las alteraciones reportadas en el CCR humano sobre la vía de NF- $\kappa$ B se presentan en los tumores de CCR inducido con FeNTA, se analizaron los niveles de p65, de su proteína inhibidora (I $\kappa$ B $\alpha$ ) y de EGFR, producto de uno de sus genes blanco, mediante IHQ, en muestras de riñones con tumores. Se estudió la proteína p65 por ser el componente más común del factor de transcripción y cuyos niveles se han reportado elevados en el CCR humano, al igual que la disminución de su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  (Oya *et al.*, 2003). EGFR, por su parte, se determinó por ser el producto de un gen blanco clásico de NF- $\kappa$ B y el cual está aumentado en los tumores de pacientes e incluso se ha utilizado como blanco terapéutico (Meteoglu *et al.*, 2008).

En la figura 14 se muestran imágenes representativas de las IHQ e histogramas de la cuantificación de la inmunoreactividad promedio de las moléculas analizadas tanto en muestras renales con CCR (grupo DF) como en tejido renal sano (grupo C). Cabe mencionar que el análisis de las muestras con CCR se realizó en distintas áreas identificadas como: tejido tumoral (TT), tejido adyacente al tumor (AT) y tejido no tumoral (NTT), que son zonas del mismo riñón, pero alejadas del tumor. En el caso de p65 (NF- $\kappa$ B) podemos observar una baja tinción positiva en el grupo control (Figura 14A) a diferencia del grupo DF, en el cual se presenta una

mayor tinción positiva en todas las áreas analizadas (Figuras 14B-D), es decir, el aumento de esta proteína fue similar en TT, AT y NTT. En contraste, se observó una fuerte tinción positiva de  $I\kappa B\alpha$  en el grupo de control (Figura 14E), la cual disminuyó en las ratas expuestas al carcinógeno (Figura 14 F-H). El NTT presentó una intensidad de tinción menor que el grupo C, pero notoriamente mayor que el TT y el TA, además de que su presencia nuclear también fue más frecuente en NTT que en TT y TA. Con respecto a EGFR, la inmunotinción fue similar en TT y AT con un comportamiento heterogéneo, ya que el 63% de las muestras estudiadas presentaron diferentes niveles de sobreexpresión (Figura 14 J y K) en comparación con el C (Fig. 14I); mientras que en el 37% no se observaron cambios o incluso presentaron una tinción negativa. Sin embargo, el valor promedio de los niveles de EGFR para todas las muestras analizadas reveló un aumento tanto en TT como en AT, y cuya localización subcelular fue, preferentemente, citoplasmática para ambas áreas; aunque cabe mencionar que se llegó a observar la presencia del receptor en el núcleo en algunas muestras, siendo más evidente en AT. Por el contrario, en NTT los niveles de EGFR aumentaron en todas las muestras tanto en el citoplasma como en el núcleo (Fig. 14L).



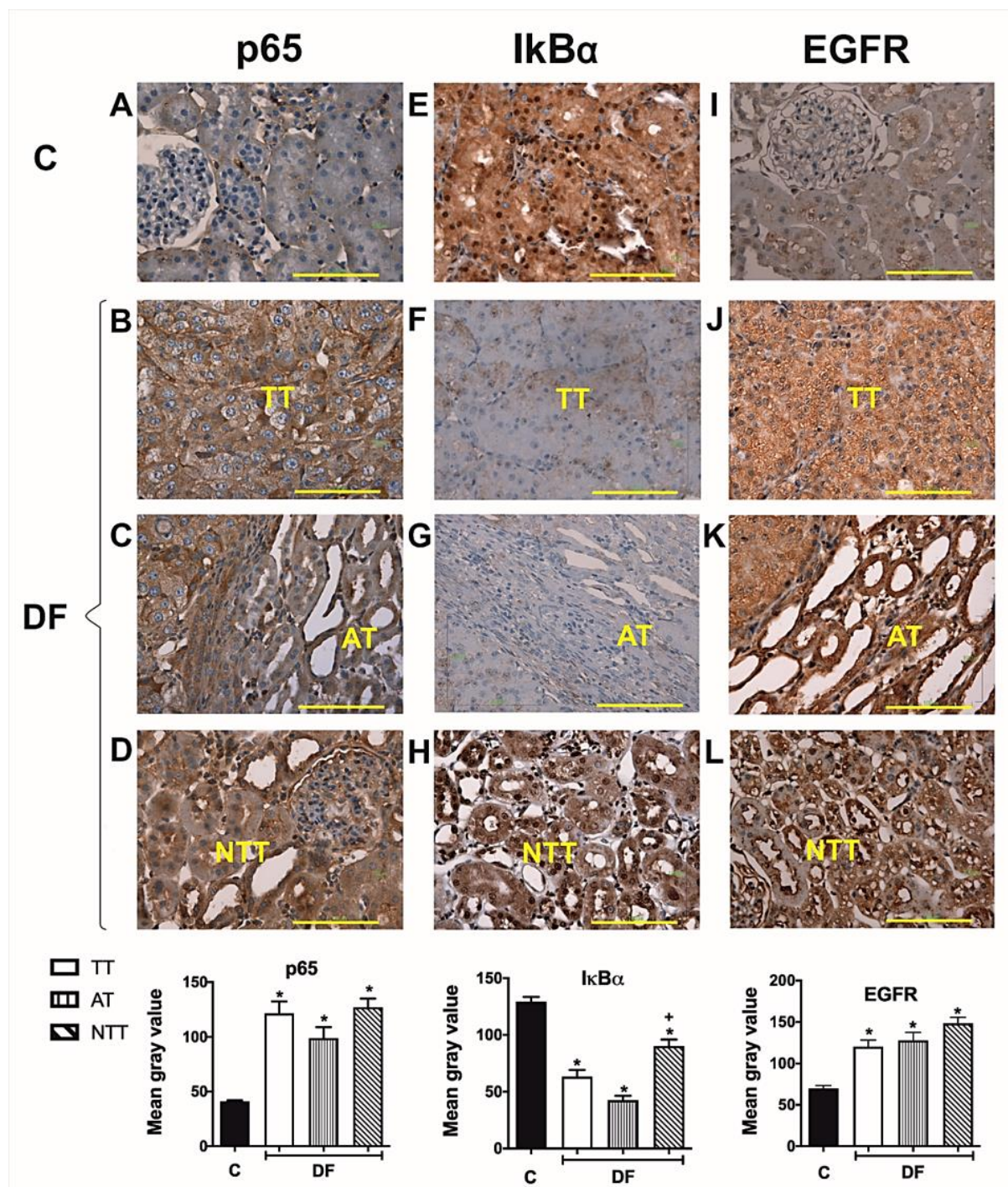


Figura 14. IHQ de NF- $\kappa$ B (p65), I $\kappa$ B $\alpha$  y EGFR en muestras renales obtenidas al final del protocolo de carcinogénesis. Se muestran fotomicrografías representativas e histogramas de la cuantificación de cada proteína. Los niveles de NF- $\kappa$ B (p65) aumentaron en el grupo tratado con DEN + FeNTA (DF) de manera similar en todas las áreas analizadas: tejido tumoral (TT), tejido adyacente (AT) y tejido no tumoral (NTT) (paneles A-D), mientras que los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  disminuyeron en las tres regiones del grupo DF, aunque esta disminución fue más notoria en TT y AT que en la región NTT (paneles E-H). Por su parte, se observó una baja expresión de EGFR en el grupo control, la cual aumentó en el grupo DF en las áreas analizadas de manera comparable (TT, AT y NTT) (paneles I-L). Grupo de control (C). Barra = 100  $\mu$ m. Se analizaron cuatro campos aleatorios por muestra, n = 3 y 5 para los grupos C y DF, respectivamente. Los resultados se

expresan como valor medio de gris. Las columnas representan la media  $\pm$  SEM. X400. \*  $p \leq 0.05$  vs. C, +  $p \leq 0.05$  vs. TT y TA.

### 6.3 Niveles del mRNA de EGFR en tumores inducidos por FeNTA

Por otra parte, dado que el gen de EGFR es blanco de NF- $\kappa$ B se determinaron los niveles de mRNA de EGFR en muestras de tejido tumoral, como una evidencia más directa de la posible participación del factor de transcripción en el aumento del receptor (Figura 15). En concordancia con el comportamiento observado en los niveles de la proteína, el mRNA de EGFR aumentó en unos tumores (61%), pero disminuyó o no hubo cambios en otros (39%), y al igual que en la proteína, el promedio obtenido de todas las muestras analizadas resultó en un aumento.

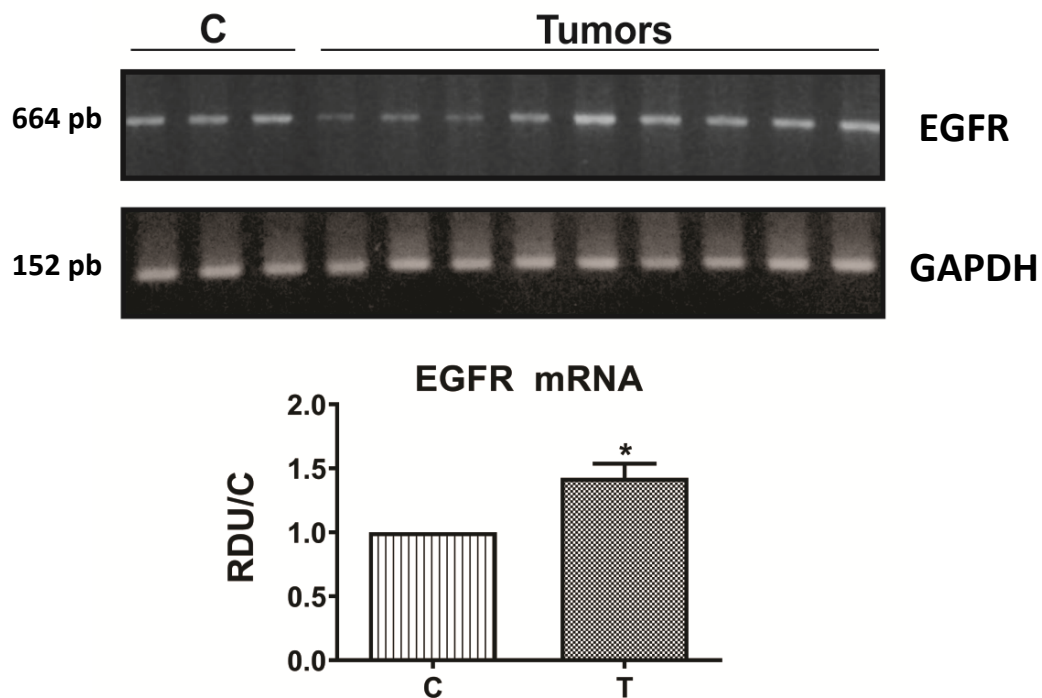


Figura 15. Niveles del mRNA de EGFR en tumores renales inducidos con FeNTA. Se muestran imágenes representativas de las electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio de los cDNA de EGFR y GAPDH obtenidos por RT-PCR, así como el histograma del análisis densitométrico de todas las muestras analizadas. El valor medio de los niveles del mRNA de EGFR mostró un aumento, pero su comportamiento varió entre las muestras; mientras que aumentó en algunas, en otras disminuyó o no presentó cambios. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM  $n = 5$  y  $14$  para el grupo C y tumores (grupo DF), respectivamente. \*  $p \leq 0.05$  vs C. RDU= Unidades relativas de densitometría

### 6.4 Niveles renales de p65, I $\kappa$ B $\alpha$ y EGFR en etapas tempranas de la carcinogénesis

Ante los resultados obtenidos en los tumores inducidos por FeNTA respecto al comportamiento de I $\kappa$ B $\alpha$ , p65 y EGFR, el cual coincide con lo reportado en el CCR humano, decidimos analizar si estas moléculas podrían estar implicadas en el proceso carcinogénico desde etapas tempranas, para lo cual se determinaron los niveles de estas proteínas en la corteza renal de ratas expuestas al FeNTA durante uno y dos meses. En la figura 16 se presentan imágenes

representativas de las autorradiografías de los Western blots y los histogramas de los análisis densitométricos de todas las muestras analizadas de las moléculas de interés a ambos tiempos de estudio. Como se puede observar en la figura 16A, el grupo DF no mostró cambios en los niveles de p65 con respecto al grupo C, a ninguno de los tiempos estudiados. En el caso de I $\kappa$ B $\alpha$  (Figura 16A), se observaron dos bandas, una de ellas se presentó, principalmente, en el grupo C con un desplazamiento electroforético correspondiente a un peso molecular aproximado de 32 kDa, mientras que la otra banda fue más intensa en el grupo DF mostrando un desplazamiento correspondiente a 34 kDa aproximadamente, la cual es más cercana al peso molecular reportado de I $\kappa$ B $\alpha$  en ratas, i.e. 35 kDa (Uniprot # UniRef90\_P2596). Por lo anterior, para el análisis cuantitativo de esta proteína, los cálculos se realizaron con la suma de las unidades densitométricas de ambas bandas, y el resultado fue un aumento estadístico en ambos tiempos de estudio, siendo éste más evidente a un mes de exposición al carcinógeno que a los dos. En lo que respecta a los niveles de EGFR, se observó un notorio incremento en el grupo DF tanto a un mes como a dos meses de exposición al carcinógeno (Figura 16B), y, aunque el aumento parece ser más intenso a un mes de tratamiento con FeNTA, como ocurrió para I $\kappa$ B $\alpha$ , no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los dos tiempos de estudio.

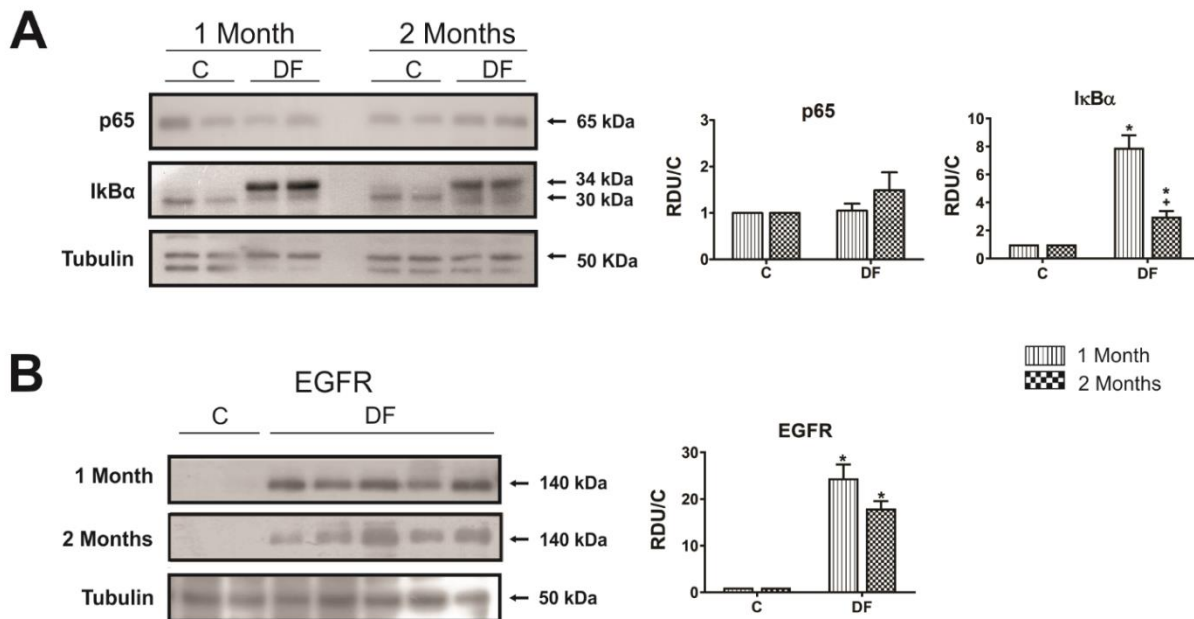


Figura 16. Niveles renales de p65, I $\kappa$ B $\alpha$  y EGFR en etapas tempranas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA. Se presentan imágenes representativas de autorradiografías de los WB e histogramas de los análisis densitométricos realizados a todas las muestras de ambos tiempos de estudio. Los niveles de p65 no cambiaron en el grupo DF con respecto al C en ninguno de los tiempos estudiados (panel A). En el caso de I $\kappa$ B $\alpha$  (panel A) y EGFR (panel B) se observa un incremento en ambas etapas, el cual fue más evidente a un mes de tratamiento con respecto a los dos meses, aunque solo en el caso de I $\kappa$ B $\alpha$  la diferencia entre los dos tiempos fue estadísticamente significativa. Se utilizó tubulina como control de carga. RDU = unidades relativas de densitometría vs. la correspondiente



tubulina y con respecto al grupo C. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. n = 4 y 7 para los grupos C y DF, respectivamente. \*  $p \leq 0.05$  vs. C correspondiente, +  $p \leq 0.05$  vs. DF a un mes.

## 6.5 Actividad de NF- $\kappa$ B y niveles de mRNA de EGFR

Si bien no se encontraron cambios en los niveles de p65 en las etapas tempranas, no sabíamos si NF- $\kappa$ B estaba activo, por lo que se decidió analizar la capacidad de unión del factor de transcripción a su secuencia de DNA consenso cuando está formado por p65. Esto se realizó mediante la técnica de EMSA utilizando extractos de proteínas nucleares de muestras de corteza renal de los dos tiempos estudiados (Figura 17A). Al realizar esta técnica se incluyeron diferentes pruebas como controles: los carriles 1 y 2 corresponden a los ensayos sin muestra y sin oligonucleótido marcado, respectivamente, la ausencia de banda en ambos casos nos permite verificar que la banda observada en las muestras de los grupos C y DF corresponde a la formación del complejo oligonucleótido marcado-NF- $\kappa$ B; el carril 3 corresponde a un ensayo de competencia, descrito en la metodología, para confirmar la identidad de la banda observada, descartando que sea una banda inespecífica; y carril 4 es el resultado de un ensayo de súper-retardo, en el cual se utilizó un anticuerpo específico para p65, lo que permitió verificar la presencia de esta proteína en el complejo NF- $\kappa$ B, cabe mencionar que estas dos últimas pruebas se realizaron con la primera muestra del grupo C, y cuya disminución en la intensidad de la banda corrobora su identidad, y que al menos en parte, el factor de transcripción está constituido por p65. Al analizar las muestras experimentales se encontró que a un mes de exposición al carcinógeno la actividad del factor de transcripción aumentó con respecto al grupo control; mientras que a los dos meses ésta disminuyó.

Por otra parte, también se determinaron los niveles de mRNA de EGFR, para averiguar si la actividad del factor de transcripción coincidía con los niveles del producto de uno de sus genes blanco clásicos de nuestro interés. En la figura 17B, se muestra una imagen representativa de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio resultantes de la electroforesis de los cDNA de EGFR y GAPDH obtenidos por RT-PCR, así como el histograma correspondiente al análisis desitométrico de todas las muestras estudiadas. Los resultados obtenidos indican que los niveles de mRNA incrementaron a ambos tiempos de estudio.

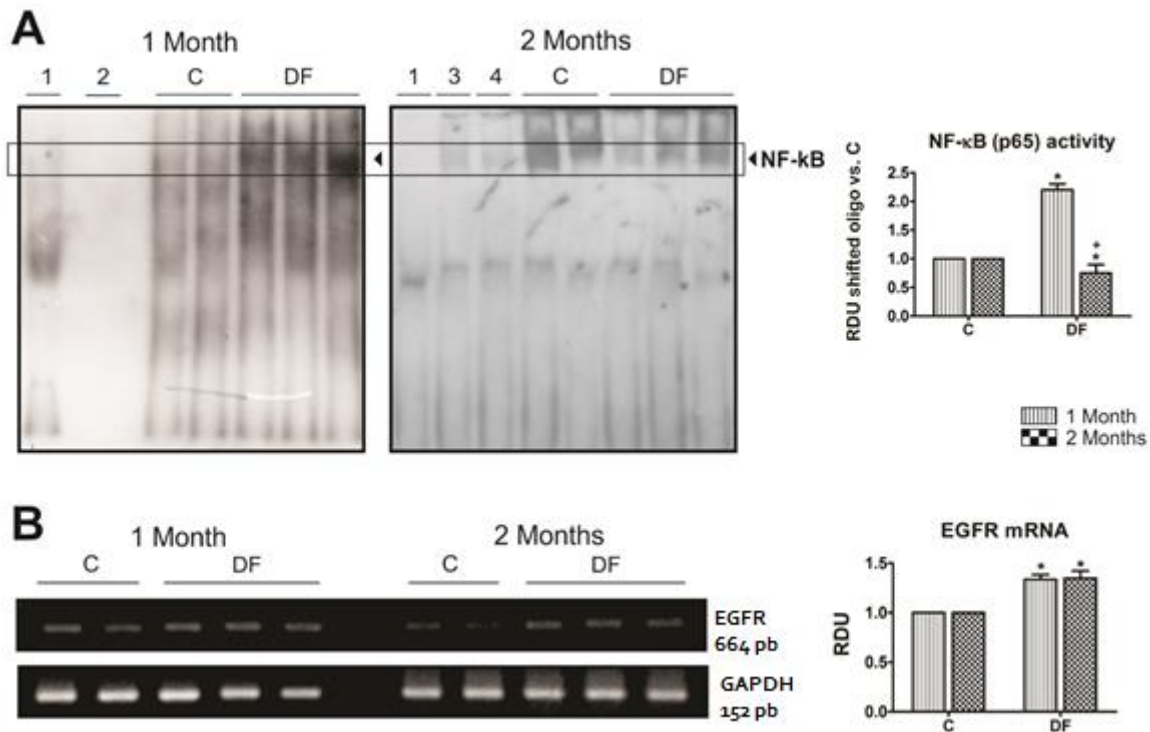


Figura 17. Actividad de NF- $\kappa$ B analizada por EMSA y niveles de mRNA de EGFR determinados por RT-PCR en etapas tempranas de carcinogénesis renal inducida con FeNTA. Se muestran imágenes representativas de ambas determinaciones, así como los correspondientes histogramas del análisis densitométrico de todas las muestras ensayadas. (A) Los EMSA se realizaron utilizando extractos de proteínas nucleares: carril 1: oligonucleótidos marcados con digoxigenina, pero sin muestra; carril 2: muestra sin oligonucleótidos; carril 3: ensayo de competencia realizado usando un exceso molar de 100 veces de oligonucleótido no marcado; carril 4: ensayo de súper-retardo realizado utilizando un anticuerpo anti-p65. La exposición a DF indujo un aumento en la actividad de NF- $\kappa$ B después de un mes, pero una disminución después de dos meses. (B) Los niveles del mRNA de EGFR aumentaron en un grado similar en ambos tiempos de tratamiento carcinogénico. Se utilizó GAPDH como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  SEM.  $n = 4$  para el grupo C y 7 para el grupo DF. \*  $P \leq 0.05$  vs. C correspondiente, y +  $P \leq 0.05$  vs. DF después de un mes. C, grupo de control; DF, grupo tratado con DEN + FeNTA; EMSA, ensayo de cambio de movilidad electroforética; RDU= unidades relativas de densitometría para EMSA, y vs. GAPDH y con respecto al grupo C para el RT-PCR.

## 6.6 Determinación de la localización subcelular de $\kappa$ B $\alpha$ y EGFR en etapas tempranas de la carcinogénesis renal

Dado el comportamiento diferencial encontrado en las tres moléculas estudiadas, en las etapas tempranas de la carcinogénesis, se decidió determinar su localización subcelular, ya que ésta tiene relación con la función biológica que ellas podrían estar realizando. Para esto se realizaron ensayos de WB con extractos proteicos de fracciones citoplasmáticas y nucleares, así como análisis por IHQ. (Figura 18). En el panel A se muestran imágenes representativas de las autorradiografías de los WB realizados para  $\kappa$ B $\alpha$  y EGFR a los dos tiempos estudiados, así como los histogramas correspondientes de todas las muestras analizadas. En esta determinación utilizamos una muestra de células HeLa (H) como control positivo para confirmar la identidad de las bandas correspondientes a las proteínas de interés. Se puede observar que las dos proteínas están presentes tanto en el citoplasma como en el núcleo y que ambas

fracciones del grupo DF presentaron un incremento estadísticamente significativo en los dos tiempos de estudio. Es importante aclarar que, para el cálculo de estos resultados, las unidades relativas de densitometría no se ajustaron a los valores de los grupos C correspondientes, con el fin de facilitar la evaluación de las diferencias entre ambas fracciones celulares de la corteza renal de los animales estudiados. Así mismo, al parecer, el incremento fue mayor al primer mes de tratamiento que al segundo, comportamiento que coincide con lo observado en los extractos totales (Figura 16), aunque en este caso no hubo diferencias entre los dos tiempos en ninguna de las proteínas. Además del análisis densitométrico, y con la finalidad de determinar si acumulación de las proteínas era mayor en una fracción que en otra, se determinó la tasa de translocación para ambas proteínas y en ambos tiempos de estudio. Esto se calculó mediante la división de las unidades densitométricas correspondientes a la fracción nuclear entre las unidades densitométricas totales (citoplasma + núcleo) (Figura 18B). Este cálculo se realizó como una estrategia más para obtener evidencias del papel que podrían estar jugando estas moléculas en las dos etapas tempranas estudiadas, sin embargo, aunque se aprecia una tendencia a aumentar, no se encontraron cambios significativos en la tasa de traslocación de ninguna de las 2 proteínas. Por otro lado, la distribución subcelular de I $\kappa$ B $\alpha$  y EGFR se examinó también por IHQ (Fig. 18C), y los resultados obtenidos confirmaron lo observando mediante el WB, es decir, ambas proteínas se encuentran principalmente en el citoplasma, pero también en el núcleo, especialmente I $\kappa$ B $\alpha$ .

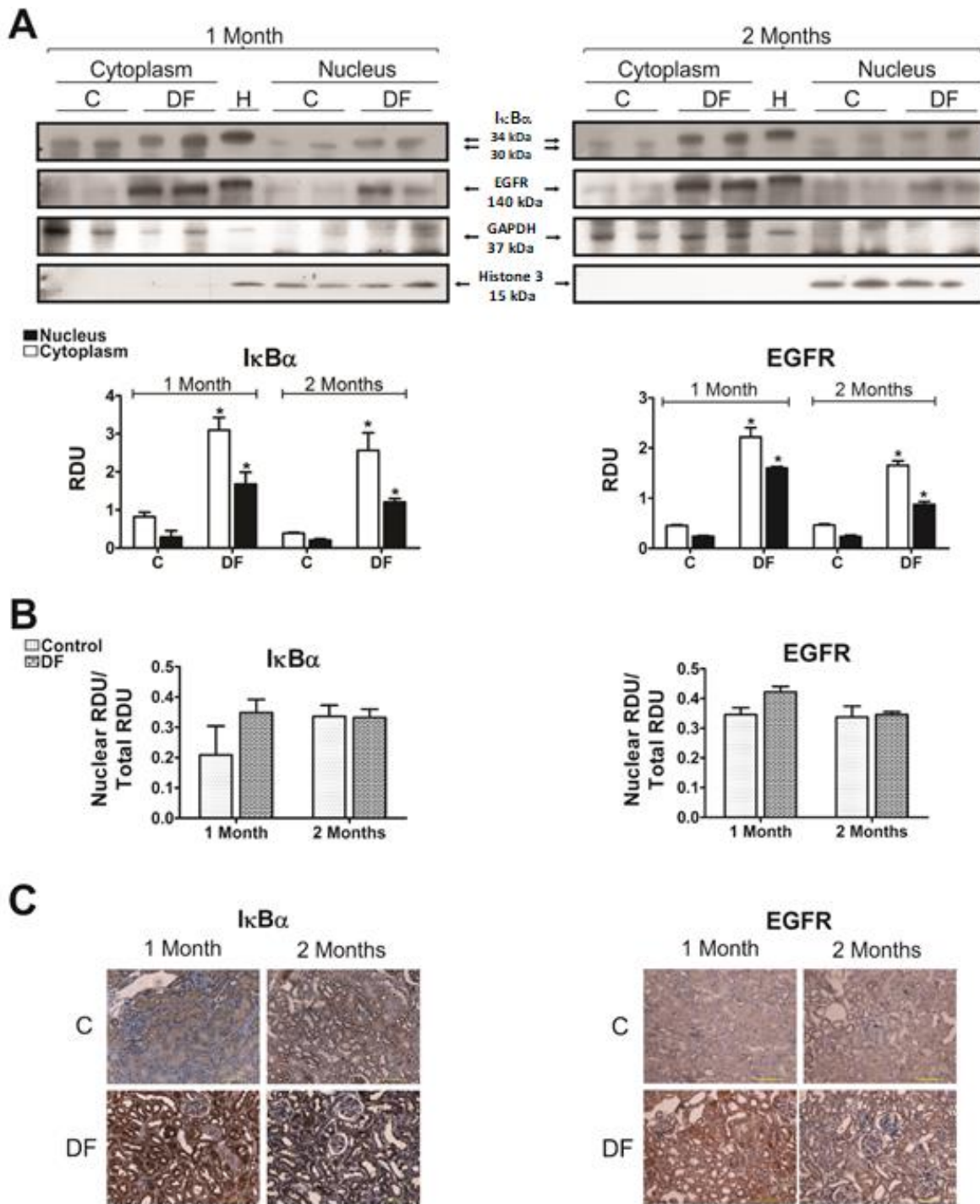


Figura 18. Distribución subcelular de IκBα y EGFR en etapas tempranas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA. (A) Se muestran imágenes representativas de los WB de fracciones nucleares y citoplasmáticas de corteza renal e histogramas cuantitativos de todas las muestras analizadas. Se utilizaron GAPDH e histona 3 como control de carga para las fracciones citoplasmática y nuclear, respectivamente. El carril central de las imágenes de WB corresponde a una muestra de células HeLa (H) utilizada como control positivo para confirmar la identidad de las bandas correspondientes a las proteínas de interés. Los niveles de IκBα y EGFR aumentaron en el grupo DF en ambas fracciones celulares en los dos tiempos estudiados. (B) Gráficos de translocación, la cual se calculó dividiendo las RDU obtenidos para la fracción nuclear de cada muestra analizada entre las RDU totales

(citoplasmática + nuclear) correspondientes donde se aprecia que la translocación de ninguna de las proteínas cambió. (C) Imágenes representativas de IHQ de cada proteína evaluada que confirman los resultados obtenidos por los ensayos de WB. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. n = 4 para el grupo C y 5 para el grupo DF. \*  $P \leq 0.05$  vs. C. C: grupo control; DF, grupo tratado con DEN + FeNTA; RDU unidades relativas de densitometría vs. control de carga correspondiente.

## **6.7 Determinación de los niveles de p65, I $\kappa$ B $\alpha$ y EGFR en hígado y pulmón de ratas expuestas al carcinógeno renal durante uno y dos meses**

Interesantemente, el FeNTA se ha manejado como un carcinógeno renal que induce tumores hasta en un 80% de los animales tratados y que en algunos casos puede presentarse metástasis en hígado y pulmón (Vargas-Olvera *et al.*, 2012; Okada S, 1996; Iqbal *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha reportado que en ratones bajo esquemas de tratamiento diferentes al que se utilizó en el presente trabajo se inducen adenomas y adenocarcinomas de pulmón primarios en un 30% de los animales estudiados (Kimoto *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha encontrado en el hígado, que tras 12 h de la administración de FeNTA se induce un incremento en los niveles de estrés oxidante, así como daño tisular y algunos eventos pro-proliferativos (Okada S, 1996), pero no hemos encontrado reportes que indiquen que el FeNTA genere algún tipo de cáncer hepático primario. Más aún, con el esquema de tratamiento carcinogénico utilizado en el presente trabajo, reportamos que no se desarrollan tumores primarios en pulmón ni en hígado (Vargas-Olvera *et al.*, 2012). Por lo tanto, con el fin de determinar si las alteraciones observadas en el comportamiento de p65, I $\kappa$ B $\alpha$  y EGFR estaban particularmente relacionadas con el riñón o eran una respuesta generalizada, se determinó su estatus en tejido pulmonar y hepático de las ratas tratadas con FeNTA durante uno o dos meses. La figura 19 muestra imágenes representativas de los WB realizados y los histogramas correspondientes al análisis densitométrico de todas las muestras analizadas de cada una de las proteínas determinadas. Como se puede observar, ninguna de las tres proteínas presentó cambios en hígado ni en pulmón en los tiempos estudiados.

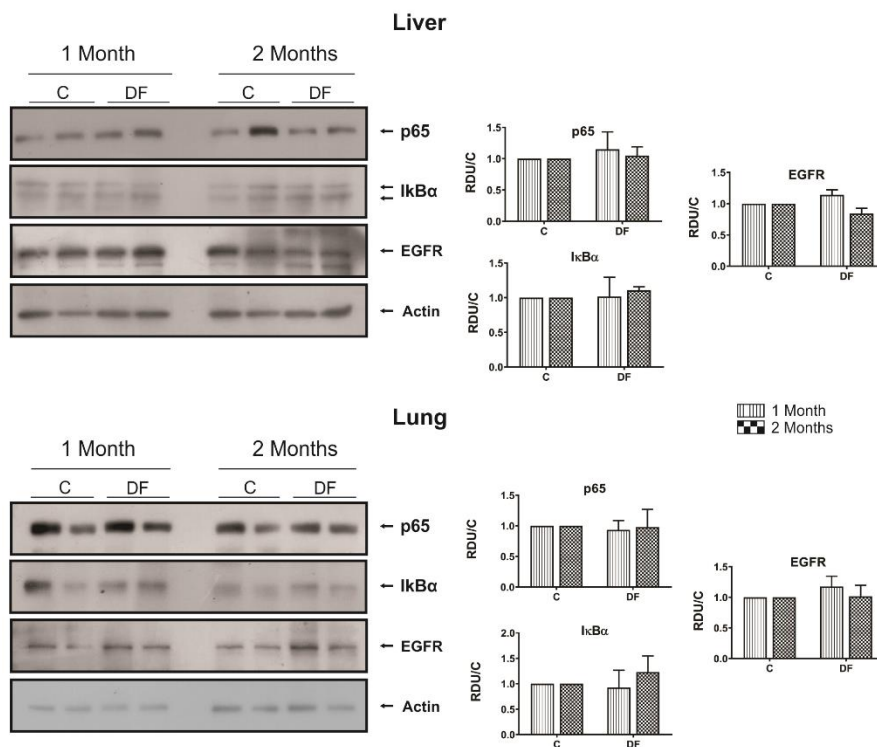


Figura 19. Niveles de p65, IκBα y EGFR en hígado y pulmón en etapas tempranas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA. Imágenes representativas de WB e histogramas cuantitativos. No se observaron cambios en la expresión de ninguna de las proteínas, tanto en el hígado como en el pulmón a ninguno de los tiempos estudiados. Las barras representan la media  $\pm$  SEM.  $n = 4$  para el grupo C y 5 para el grupo DF.  $P \geq 0.05$  vs. C. C: grupo control; DF: grupo tratado con DEN + FeNTA; RDU= unidades relativas de densitometría.

## 6.8 Resumen de resultados

En la tabla 2 se sintetizan los resultados obtenidos tanto en tumores como en las etapas tempranas del desarrollo carcinogénico; donde se puede apreciar que:

- En los tumores, obtenidos dos meses después de la última administración de FeNTA en la semana 16<sup>a</sup>, se presentó un incremento en los niveles de p65 (NF-κB), una disminución de IκBα con una localización subcelular citoplásmica, y un aumento en los niveles de EGFR (proteína y mRNA), con una localización subcelular principalmente citoplásmica.
- Después de un mes de tratamiento con FeNTA no se observaron cambios en los niveles renales de p65, sin embargo, incrementó la actividad de NF-κB; los niveles de IκBα aumentaron tanto en el citoplasma como en núcleo, comportamiento también observado con EGFR, lo que concordó con un aumento en los niveles de su mRNA.
- A dos meses de exposición al carcinógeno tampoco hubo cambios en los niveles de p65, pero a diferencia de lo observado a un mes de tratamiento la actividad NF-κB disminuyó, mientras que los niveles de IκBα y EGFR continuaron aumentados y distribuidos tanto en citoplasma como núcleo, aunque la elevación de los niveles de IκBα fue menor que al primer mes. Así mismo los niveles de mRNA de EGFR continuaron incrementados.

Finalmente, ninguna de las alteraciones mencionadas fueron observadas en hígado y pulmón en etapas tempranas, tejidos en los que no se induce tumores primarios con el protocolo de tratamiento seguido en el presente trabajo.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos en tumores renales y etapas tempranas de la carcinogénesis.

		<b>TUMORES</b>	<b>1 MES</b>		<b>2 MESES</b>	
<b>NF-κB</b>	Niveles de proteína (p65)	Aumentó	Sin cambios		Sin cambios	
	Actividad	ND	Aumentó		Disminuyó	
<b>IκBα</b>	Niveles de proteína	Disminuyó	↑ Aumentó		↑ Aumentó	
	Localización subcelular	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
<b>EGFR</b>	Niveles de proteína	Aumentó	Aumentó		Aumentó	
	mRNA	Aumentó	Aumentó		Aumentó	
	Localización subcelular	Citoplasma (principalmente)	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma

ND=No determinado

## 7. DISCUSIÓN

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, en el 2020 se reportaron 9, 958, 133 muertes como consecuencia de esta enfermedad (Globocan 2020), es una enfermedad genética multifactorial y su desarrollo se ha dividido en tres etapas: iniciación, promoción y progresión, en las cuales ocurren diferentes eventos moleculares y celulares que llevan a la transformación de una célula normal a una neoplásica (Klaunig, 2018). La identificación de los mecanismos que llevan a dichos eventos, particularmente en las etapas de iniciación y promoción resulta de gran importancia ya que permite mejorar las estrategias para su prevención, detección oportuna y/o tratamiento más eficaz.

La neoplasia renal más común en adultos es el CCR, la cual presenta una alta mortalidad por varias razones, entre las que está ser asintomática aún en etapas avanzadas, por lo que frecuentemente se diagnóstica tardíamente e incluso con metástasis presente, además de que existen diferentes subtipos histológicos que cursan con distintas alteraciones genéticas y moleculares lo que conlleva a una respuesta diferencial a los tratamientos, los cuales además tienen un efecto muy limitado (Makhov *et al.*, 2018; Peri *et al.*, 2013, Cohen *et al.*, 2005 ). Por lo tanto, la comprensión de las alteraciones que ocurren durante el desarrollo de esta neoplasia, resultan ser cruciales para lograr una detección oportuna y un tratamiento más eficaz. En este sentido, en nuestro laboratorio se implementó un modelo experimental de carcinogénesis renal inducida con FeNTA en ratas, que nos permitiera estudiar los eventos moleculares tempranos y tardíos de esta neoplasia. La exposición al carcinógeno durante cuatro meses llevó al desarrollo de tumores renales, los cuales, de acuerdo con estudios histopatológicos corresponden al subtipo histológico de células claras (Vargas-Olvera *et al.*, 2012), que es el subtipo más frecuente en los pacientes con CCR (80%) (Makhov *et al.*, 2018; Vargas-Olvera *et al.*, 2012). Además, hemos identificado lesiones preneoplásicas, así como diferentes alteraciones procarcinogénicas después de uno y dos meses de exposición al FeNTA y, en consecuencia, establecimos estos tiempos de tratamiento como diferentes etapas tempranas del proceso de carcinogénesis (Aguilar-Alonso *et al.*, 2015; Vargas-Olvera *et al.*, 2012).

Una de las alteraciones que se han identificado frecuentemente en pacientes con CCR es el incremento en los niveles y actividad de NF- $\kappa$ B (Lua *et al.*, 2018; Meteoglu *et al.*, 2008; Oya *et al.*, 2001), lo cual correlaciona con una disminución en los niveles de su proteína inhibidora (I $\kappa$ B $\alpha$ ) y un aumento en marcadores de proliferación y angiogénesis, tales como EGFR, PCNA y VEGF (Dordevic *et al.*, 2008; Meteoglu *et al.*, 2008; Oya *et al.*, 2001). En el presente trabajo se desarrolló un protocolo de carcinogénesis renal inducido con FeNTA, con la finalidad de averiguar si las alteraciones de NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ /EGFR mencionadas, se presentaban también en los tumores inducidos con FeNTA, lo que, además de ayudar a caracterizar los tumores experimentales, nos permitiría continuar estableciendo su equivalencia con los tumores humanos.

Los tumores desarrollados en este protocolo presentaron una apariencia macroscópica muy similar a la observada en el humano, es decir presentaron un color amarillo dorado y una ubicación apical (George *et al.*, 2001). Por otro lado, su análisis histopatológico mostró un citoplasma claro y una arquitectura que corresponde al subtipo histológico de células claras, como lo hemos reportado en trabajos previos (Aguilar-Alonso *et al.*, 2015; Vargas-Olvera *et al.*,



2012), lo cual resulta muy importante ya que indica la buena reproductibilidad del esquema utilizado en nuestro laboratorio para inducir la carcinogénesis renal.

El análisis de p65/I $\kappa$ B $\alpha$ /EGFR en tumores se realizó por IHQ ya que la cantidad de tejido tumoral es muy limitada, además de que esta técnica nos permitiría estudiar también el comportamiento de las proteínas en las áreas contiguas y alejadas del tumor, es decir, en tejido adyacente (AT) y tejido no tumoral (NTT) de la misma muestra, respectivamente. Los resultados indican un incremento en los niveles de p65 (NF- $\kappa$ B) en los tumores, lo que concuerda con lo reportado tanto en tumores de CCR humano como en líneas celulares derivadas (Lua *et al.*, 2018; Ng *et al.*, 2018; Meteoglu *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2006; Oya *et al.*, 2001). Más aún, este incremento se presentó tanto en el citoplasma como en el núcleo al igual que lo reportado por Ng *et al.* (2018), quienes evaluaron la expresión de las proteínas de NF- $\kappa$ B en tumores de CCR y concluyeron que la expresión de p65 en el núcleo correlacionaba con una baja supervivencia cáncer-específica. Por otro lado, estudios donde se realizaron protocolos similares al nuestro, han reportado un incremento en los niveles de p65 en tejido renal, el cual fue abatido por el uso de algunos fitoextractos (Siddiqi *et al.*, 2015; Rehman *et al.*, 2013; Tanveer *et al.*, 2011; Morais *et al.*, 2006), sin embargo, en ninguna de esas publicaciones se aclara si el aumento ocurre en tejido renal total o solo en los tumores, mientras que en el presente trabajo se evidenció que el incremento ocurre en todo el riñón.

En lo que respecta a I $\kappa$ B $\alpha$ , proteína inhibidora de NF- $\kappa$ B, se observó una disminución sustancial, o incluso su ausencia, en los tumores experimentales, lo que concuerda con los hallazgos de Oya *et al.* (2003) en RCC humano. Cabe mencionar que esta disminución fue menor en NTT y cuya localización fue tanto en el citoplasma como en el núcleo, en comparación con TT y AT donde la disminución fue mucho mayor, y se localizó, principalmente, en citoplasma. Esto lleva a suponer que, en NTT, I $\kappa$ B $\alpha$ , posiblemente esté regulando a NF- $\kappa$ B tanto en núcleo como en el citoplasma, ya que se sabe que una vez sintetizado I $\kappa$ B $\alpha$ , se transloca a núcleo, donde se une e inhibe la actividad de NF- $\kappa$ B, regresándolo al citosol (Ferreiro and Komives, 2010; Aranza-Seisdedos *et al.*, 1997), por lo que el comportamiento observado en NTT podría ser al menos uno de los mecanismos por los cuales estas células se defienden de la malignización.

Por su parte, al analizar los niveles de EGFR en los tumores inducidos con FeNTA se observó un aumento en comparación con el tejido renal de las ratas control, a pesar de que su comportamiento fue heterogéneo, ya que la mayoría de las muestras presentaron un incremento, pero en algunas el receptor disminuyó y en otras no se observaron cambios. Dicho comportamiento también ha sido reportado en los tumores de CCR humano (Kallio *et al.*, 2003), donde el análisis de todas las muestras resulta en un incremento aunque su significado clínico sigue siendo controversial, debido a que algunos autores asocian este incremento con una buena prognosis (Kallio *et al.*, 2003), mientras que otros con una mala (Mock *et al.*, 1997); sin embargo, se ha sugerido que el significado clínico está asociado más bien con su distribución subcelular (Kankaya *et al.*, 2016; Pu *et al.*, 2009; Meteoglu *et al.*, 2008; Kallio *et al.*, 2003; Mock *et al.*, 1997). En este sentido, ya que encontramos a EGFR preferentemente en el citoplasma de las células tumorales se esperaría un mal pronóstico de acuerdo con Kankaya *et al.* (2016), quienes analizaron particularmente el subtipo de CCRcc.

Asimismo, analizamos los niveles de mRNA de EGFR en los tumores, encontrando un incremento en el 61% de las muestras analizadas, lo que sugiere que el aumento de la proteína es inducido transcripcionalmente, y muy probablemente debido, al menos en parte, por NF- $\kappa$ B ya que los niveles de p65 también aumentaron, aunque también podrían estar participando otros factores de transcripción como AP-1 o HIF o bien, mecanismos de estabilización del mRNA.

En resumen, los resultados obtenidos del análisis de los tumores inducidos con FeNTA, indican una combinación clásica de alteraciones en las tres moléculas estudiadas, es decir, una disminución de I $\kappa$ B $\alpha$  asociada con un aumento en los niveles de p65 que correlaciona con un aumento en los niveles de EGFR, y no solo de la proteína, sino también de su mRNA, por lo que NF- $\kappa$ B parece estar activo. Este comportamiento coincide con lo reportado en el CCR humano y sugiere que esta vía de señalización puede estar participando en la progresión y mantenimiento del CCR tanto en el modelo experimental como en el humano. Asimismo, cabe resaltar que nuestros hallazgos sustentan la equivalencia de ambas versiones de la enfermedad y el uso del modelo para su estudio, comprensión y búsqueda de alternativas terapéuticas.

Dado lo encontrado en los tumores experimentales, y para identificar mecanismos moleculares probablemente asociados con la malignización celular, se analizó el comportamiento de las moléculas de interés en etapas tempranas de la carcinogénesis renal, es decir, a uno o dos meses de exposición al carcinógeno. A ambos tiempos fue evidente el daño renal, siendo éste más pronunciado a los dos meses. Esto coincide con lo que reportamos previamente (Vargas-Olvera *et al.*, 2012), donde se muestran además imágenes del daño histológico, lo que representa una evidencia más de la reproducibilidad del modelo experimental.

La determinación de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  y p65, realizada mediante la técnica de WB, así como la actividad de NF- $\kappa$ B (mediante EMSA) a un mes de tratamiento con FeNTA mostraron un incremento en la actividad del factor de transcripción a pesar de que los niveles de p65 no cambiaron y, contrario a lo esperado, los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  aumentaron. La elevación en la actividad de NF- $\kappa$ B sin que se modifiquen los niveles de p65 puede explicarse por modificaciones postraduccionales de p65 las cuales aumentan la afinidad de NF- $\kappa$ B por su secuencia diana o promueven su asociación con algunos cofactores como p300 y p-TEF $\beta$ , lo que trae como consecuencia un incremento en su actividad (Christian *et al.*, 2016; Perkins *et al.*, 2006), jugando roles diferentes a la regulación de NF- $\kappa$ B en esta etapa temprana de la carcinogénesis.

Como se mencionó previamente, la función clásica de I $\kappa$ B $\alpha$  es detener a NF- $\kappa$ B en el citoplasma o bien traslocarse al núcleo y contener su actividad al unirse y separarlo de su secuencia blanco ayudando a su traslocación de regreso al citoplasma; sin embargo, después de un mes de exposición al FeNTA, la actividad de NF- $\kappa$ B aumenta a pesar de que I $\kappa$ B $\alpha$  también está aumentado, por lo que debe estar desempeñando funciones diferentes a la regulación de NF- $\kappa$ B en esta etapa temprana de la carcinogénesis. Se ha demostrado que I $\kappa$ B $\alpha$  se acumula en el núcleo donde puede funcionar como represor transcripcional al asociarse al complejo represor polycomb (PRC2) que se asocia al promotor de diferentes genes, tales como aquellos de *hox* (Espinosa *et al.*, 2014). El producto de los genes *hox* es una familia de factores de transcripción implicados en la función renal y la organogénesis, y cambios en su expresión

han sido asociados con el desarrollo de CCRcc (Mulero *et al.*, 2013; Cantile *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha establecido que, además de prevenir la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo, I $\kappa$ B $\alpha$  retiene a p53 en el citoplasma, contrarrestando así la función supresora de tumores de p53 en otras neoplasias (Morotti *et al.*, 2017). De hecho, al realizar la determinación de la localización subcelular de I $\kappa$ B $\alpha$ , encontramos que estaba distribuido tanto en citoplasma como en núcleo, y sus niveles aumentados en ambos sitios, observando incluso una tendencia a aumentar su translocación nuclear. Sin embargo, hasta el momento, se desconoce el comportamiento de las proteínas HOX y su posible papel en la carcinogénesis renal inducida por FeNTA, y hasta donde sabemos, la asociación entre I $\kappa$ B $\alpha$  y p53 tampoco se ha investigado en el CCR, lo que resultaría muy interesante investigar.

Así mismo, es importante señalar que la exposición al FeNTA durante uno y dos meses no sólo indujo un aumento en los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  en tejido renal, sino que además observamos un cambio en la movilidad electroforética, sugiriendo que una forma modificada de I $\kappa$ B $\alpha$  se acumula en respuesta al carcinógeno. De hecho, la banda de I $\kappa$ B $\alpha$  desplazada presentó un aumento notorio a un mes de tratamiento en comparación con dos meses de exposición. Este cambio en su movilidad electroforética puede deberse a modificaciones postraduccionales, tales como las fosforilaciones, ubiquitinizaciones o sumoilaciones. Como se refirió antes clásicamente, la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  da lugar a su ubiquitinación, y su posterior degradación vía proteosoma 26S. No obstante, Desterro *et al.* (1998) reportaron que I $\kappa$ B $\alpha$  puede ser sumoilada, lo que le confiere la capacidad de evadir la degradación mediante dicho proteosoma, por lo tanto, la sumoilación de I $\kappa$ B $\alpha$  podría explicar el cambio en la movilidad electroforética y la acumulación observada en nuestro modelo.

Otra posible explicación del incremento de I $\kappa$ B $\alpha$  es la inhibición de la actividad del proteosoma 26S. Se ha sugerido que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos por los que el FeNTA causa lesiones renales agudas y que está estrechamente asociado con su carcinogenicidad renal. El 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) es un producto de la peroxidación de lípidos, el cual puede unirse a proteínas, modificando su estructura o actividad provocando diversos efectos biológicos (Breitzing *et al.*, 2016). En particular, Okada *et al.* (1999) reportaron que uno de los principales blancos de HNE generado por el FeNTA, es el proteosoma 26S, lo cual provoca su inactivación y con ello la acumulación de proteínas que son degradadas por él, entre las cuales está I $\kappa$ B $\alpha$ . Entonces, el aumento observado en I $\kappa$ B $\alpha$  a ambos tiempos podría también deberse, en parte, a la inactividad del proteosoma ocasionada por el FeNTA. Aunque el mecanismo detallado de su inactivación sigue sin estar claro, los autores postulan que el HNE reacciona preferentemente con el sitio activo de las enzimas tripsina y peptidilglutamil péptido hidrolasa del complejo.

Después de dos meses de exposición al carcinógeno, los niveles de p65 tampoco cambiaron, pero contrario a lo observado a un mes de tratamiento, la actividad de NF- $\kappa$ B disminuyó y esto fue consistente con el aumento de I $\kappa$ B $\alpha$ , lo que sugiere que, en esta etapa temprana más avanzada de la carcinogénesis, I $\kappa$ B $\alpha$  está llevando a cabo su función inhibidora clásica sobre NF- $\kappa$ B. En este sentido, el comportamiento observado en el primer mes parece ser la respuesta primaria al carcinógeno, mientras que a los dos meses la respuesta de estas moléculas tenga como fin probablemente contener el proceso de malignización, tal como

proponemos para el tejido no tumoral (NTT). Además, como se mencionó anteriormente, también se observó el desplazamiento de la banda de I $\kappa$ B $\alpha$  en los ensayos de WB, por lo que sería relevante identificar posibles modificaciones postraduccionales presentes en I $\kappa$ B $\alpha$  en las diferentes etapas del proceso cancerígeno e investigar los roles que esta proteína podría estar jugando en cada escenario.

Con respecto al EGFR, los niveles de proteína aumentaron significativamente después de uno y dos meses de tratamiento con FeNTA de manera similar, así como los de su mRNA, lo que sugiere que, al menos parte del aumento en la proteína se debe a una síntesis de novo. Sin embargo, el aumento en los niveles proteínicos del receptor fue notoriamente más alto (alrededor de 25-30 veces), por lo que, probablemente también estén involucrados eventos traduccionales y/o postraduccionales, al igual que en el caso de I $\kappa$ B $\alpha$ . Incluso, también se observó este comportamiento en los tumores analizados, donde EGFR aumentó 2 veces y su mRNA 1.4 veces. EGFR puede tener más estabilidad, como resultado de una disminución en su degradación. Esta hipótesis está soportada por Zhou *et al.* (2011), quienes demostraron, en líneas celulares derivadas de CCRcc humano, una deficiencia en la degradación de EGFR debida a la acumulación de HIF2 $\alpha$ . El mecanismo propuesto por el cual HIF2 $\alpha$  regula la degradación de EGFR es que HIF reprime la expresión del gen de rabaptina-5, lo que retrasa la degradación lisosomal de EGFR, ya que la proteína es fundamental para la fusión endosoma-lisosoma (Zhou *et al.*, 2011). En este sentido, resultados obtenidos en nuestro laboratorio, por publicarse en un futuro próximo muestran un aumento en los niveles renales de HIF2 $\alpha$  después de dos meses de exposición a FeNTA, así como en los tumores inducidos. Esto permite sugerir que el aumento en EGFR en estos tiempos de estudio se debe a su síntesis de novo, pero también al retraso en su degradación; asimismo, este mecanismo puede explicar la localización citoplásmica de EGFR observada en el presente estudio, aunque se desconoce si la síntesis de rabaptina-5 y su relación con la degradación lisosomal del receptor tiene lugar en ratas.

Ahora bien, relacionando los resultados obtenidos, el aumento en los niveles de mRNA de EGFR coincide, al menos en el primer mes, con el aumento encontrado en la actividad de NF- $\kappa$ B, lo que indica que este factor podría ser el responsable de inducir la transcripción de su gen. En cambio, después de dos meses de tratamiento, mientras los niveles de mRNA de EGFR se mantuvieron elevados, la actividad de NF- $\kappa$ B disminuyó, por lo que el incremento del receptor puede ser consecuencia de la participación de otros factores. Por ejemplo, HIF2 $\alpha$ , que además de participar en la estabilización de EGFR como se discutió anteriormente, también está involucrado en la expresión de su gen (Meléndez-Rodríguez *et al.*, 2018). De hecho, resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren un aumento en el factor de transcripción HIF2 $\alpha$  después de dos meses de exposición al FeNTA, pero no al primer mes, opuesto a lo observado con respecto a la actividad de NF- $\kappa$ B. Por lo tanto, el aumento en los niveles de mRNA de EGFR puede ser la respuesta a la actividad de NF- $\kappa$ B después de un mes de exposición al FeNTA, en tanto que a los dos meses puede ser consecuencia de la actividad HIF2 $\alpha$ .

Otro factor de transcripción que podría estar participando en la expresión del gen de EGFR es el factor activador de la proteína -1 (AP-1), particularmente los dímeros que contienen c-Jun (Johnson *et al.*, 1999). Se ha reportado que hay 7 secuencias blanco para c-Jun en el promotor del gen del receptor (Johnson *et al.*, 1999), y en nuestro laboratorio hemos encontrado un aumento de la actividad AP-1 mediante EMSA de c-Jun en las primeras etapas de la

carcinogénesis renal inducida con FeNTA (resultados por publicar), por lo que no se descarta la idea de que los niveles de mRNA del EGFR estén regulados también por AP-1.

Por otro lado, aunque la principal función estudiada y reportada de EGFR es como receptor de la membrana plasmática que traduce señales extracelulares, su translocación nuclear también ha sido demostrada, donde actúa como un co-factor transcripcional al unirse a otras proteínas tales como STAT3, STAT5 y E2F1 (Sharmila and Sindhu, 2017; Brand *et al.*, 2013), o estimula la reparación del ADN asociándose a la subunidad catalítica de las cinasas de proteínas dependientes de ADN cuando el ADN está dañado (Goodwin *et al.*, 2014; Liccardi *et al.*, 2011; Bandyopadhyay *et al.*, 1998), por lo que se consideró importante determinar la ubicación subcelular de EGFR. Nuestros hallazgos demostraron que este receptor está presente y aumentado en el citoplasma, pero también en el núcleo después de uno y dos meses de exposición a FeNTA, mientras que en los tumores la gran mayoría de la proteína se encuentra en el citoplasma. Por lo tanto, en las primeras etapas de carcinogénesis, EGFR puede estar participando en la transformación de las células renales al estimular vías de señalización asociadas con proliferación celular, angiogénesis e invasión y/o con la inhibición de la apoptosis, pero también cabe pensar que esté desempeñando funciones anti-oncogénicas tales como la promoción de la reparación del DNA como un mecanismo de protección contra daño oxidativo inducido por FeNTA (Toyokuni *et al.*, 1994); más aún, es probable que EGFR esté ejerciendo así mismo estos roles anti-oncogénicos en áreas de tejido renal no transformado (NTT y AT), donde el receptor se observó con mayor frecuencia en el núcleo en comparación con los tumores. En contraste, en el tejido neoplásico, EGFR podría estar participando, preferentemente, en el mantenimiento del tumor al inducir, por ejemplo, vías de señalización angiogénicas, ya que el receptor fue localizado preferentemente en el citoplasma. Sin embargo, qué función está desempeñando realmente el EGFR en cada etapa de la carcinogénesis debe investigarse en estudios futuros.

Ya que se sabe que el FeNTA y el DEN pueden causar daño hepático y/o pulmonar (Ansar *et al.*, 1999) decidimos investigar si las alteraciones encontradas de estas moléculas en riñón también estaban presentes en el hígado y los pulmones. Los resultados obtenidos mostraron que alteraciones presentes en riñón no están presentes en ninguno de esos órganos, por lo que apoya firmemente su participación en la carcinogénesis renal. Finalmente, en trabajos previos hemos reportado que el esquema de exposición al FeNTA seguido en el presente trabajo, no llevan al desarrollo de tumores primarios en el hígado o los pulmones (Vargas-Olvera *et al.*, 2012; Aguilar-Alonso *et al.*, 2015).

## 8. CONCLUSIONES

En conclusión, de acuerdo con las evidencias obtenidas en el presente trabajo es muy probable que NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  y EGFR estén implicadas en la carcinogénesis renal, sin embargo, estas proteínas van ajustándose a medida que el proceso evoluciona. En resumen, se observó una combinación clásica de cambios de las tres moléculas en los tumores, lo que sugiere que pueden ser importantes para el mantenimiento del fenotipo maligno, como se ha propuesto en el CCR humano. Por el contrario, se encontraron combinaciones de alteraciones no convencionales o inesperadas distintivas en cada una de las etapas tempranas analizadas, además de la presencia tanto en citoplasma como en núcleo de I $\kappa$ B $\alpha$  y EGFR, sugiriendo que su comportamiento puede estar asociado a diferentes vías de señalización y por lo tanto a efectos particulares dependiendo de la fase del proceso de transformación maligna.

## 9. PERSPECTIVAS

Dada la similitud entre la neoplasia humana y aquella inducida con FeNTA, lo anterior podría ocurrir también en el desarrollo del carcinoma humano. Por lo tanto, la información generada en el presente estudio da pie para continuar buscando mecanismos distintos a los roles clásicos de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  y EGFR, que podrían participar en la transformación de las células renales, y con esto lograr identificar marcadores moleculares que conduzcan a una detección oportuna y desarrollar estrategias terapéuticas y/o preventivas más eficaces contra el CCR.

## 10. REFERENCIAS

Aguilar F. (2010) Alteraciones en AP-1, MAPKs Y Ciclina D1 inducidas por la exposición subcrónica al carcinógeno renal FeNTA y efecto de un extracto de semillas de tamarindo (EST). Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de química, UNAM.

Aguilar-Alonso FA, Solano JD, Vargas-Olvera CY, Pacheco-Bernal I, Pariente-Pérez TO and Ibarra-Rubio ME. (2015) MAPKs' status at early stages of renal carcinogenesis and tumors induced by ferric nitrilotriacetate. *Molecular and Cellular Biochemistry* 404: 161-170.

Aguilera C., Hoya-Arias R., Haegeman G., Espinosa L., and Bigas A. (2004) Recruitment of I $\kappa$ B to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 16537– 16542.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. (2019) *Molecular Biology of the cell*. Garland Science, United States of America. 6th ed.

Ansar S., Iqbal M and Athar M. (1999) Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitrilotriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumor promotion, in mice, *Carcinogenesis* 20: 599-606.

Arenzana-Seisdedos F., Turpin P., Rodriguez M., Thomas D., Hay RT., Virelizier JL., and Dargemont C. (1997) Nuclear localization of I $\kappa$ B promotes active transport of NF- $\kappa$ B from the nucleus to the cytoplasm. *J. Cell Sci.* 110: 369–378.

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

Athar U. and Gentile TC. (2008) Treatment options for metastatic renal cell carcinoma: a review. *Can J Urol* 15 (2): 3954–3966.

Awai M, Narasiki M, Yamanoi Y and 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.

Bahnemann R. (1998) Different patterns of kidney toxicity after subacute administration of Na-Nitriloacetic acid and Fe-nitrilotriacetic acid to wistar rat. *Toxicol. Scien* 46: 166-175.

Bandyopadhyay D., Mandal M., Adam L., Mendelsohn J. and Kumar R. (1998) Physical Interaction between Epidermal Growth Factor Receptor and DNA-dependent Protein Kinase in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 273: 1568- 1573.

Brand TM., Lida M., Luthar N., Starr MM., Huppert EJ. and Wheeler DL. (2013) Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiotherapy and Oncology* 108: 370-377.

Brennan JF., Stilmant MM., Babayan RK. and Siroky MB. (1991) Acquired renal cystic disease: implications for the urologist. *Br J Urol* 67: 342–8.



Cai FG., Xiao JS. and Ye QF. (2006) Effects of ischemic preconditioning on cyclinD (1) expression during early ischemic reperfusion in rats. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 12: 2936-2940.

Cantile M., Schiavo G., Franco R., Cindolo L., Procino A., D'Armiento M., Facchini G., Terracciano L., Botti G. and Cillo C. (2011) Expression of lumbosacral HOX genes, crucial in kidney organogenesis, is systematically deregulated in clear cell kidney cancers. *Anti-Cancer Drugs* 22: 392-401.

Cao H, Lei ZM, Bian L, Rao CV (1995) Functional nuclear epidermal growth factor receptors in human choriocarcinoma JEG-3 cells and normal human placenta. *Endocrinology* 136: 3163–3172

Carballo D and Molliendo W. (2006). ¿Cuál es su diagnóstico? *Rev.Cuadernos*. 51(2): 87-89.

Carvalho G, Lefaucheur C, Cherbonnier C, Métivier D, Chapel A, Pallardy M, Bourgeade MF, Charpentier B, Hirsch F and Kroemer G. (2005) Chemosensitization by erythropoietin through inhibition of the NF-kappaB rescue pathway. *Oncogene* 24: 737–45

Chiba T., Inoko H., Kimura M. and Sato T. (2013) Role of nuclear IκBs in inflammation regulation. *Bio Mol Concepts* 4(2): 187-196

Christian F., Smith E. and Carmody R. (2016) The Regulation of NF-κB Subunits by Phosphorylation. *Cells* 5: 12.

Cohen D. (2005) Molecular genetics of family renal cell carcinoma syndromes. *Clin. Lab. Med.* 25: 259-277

Cohen D., Lane B., Jin T., Magi-Galluzzi C., Finke J., Rini BI., Bukowski RM. and Zhou M (2007) The Prognostic Significance of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma: A Call for Standardized Methods for Immunohistochemical Evaluation. *Clinical Genitourinary Cancer* 5: 264- 270.

Cossu-Rocca P., Muroli MR., Sanges F., Sotgiu G., Asunis A., Tanca L., Onnis D., Pira G., Manca A., Dore S., Uras MG., Ena S. and De Miglio MR. (2016) EGFR kinase-dependent and kinase-independent roles in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Cancer Res* 6(1):71-83

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

Dalgin GS., Holloway DT., Liou LS. and DeLisi C. (2007) Identification and characterization of renal cell carcinoma gene markers. *Cancer Informatics* 3: 65-92.

Desterro JMP., Rodriguez MS. and Hay RT. (1998) SUMO-1 Modification of IκBα Inhibits NF-κB Activation. *Molecular Cell* 2: 233-239.

Dittmann K., Mayer C., Fehrenbacher B., Schaller M., Kehlbach R. and Rodemann HP. (2010) Nuclear EGFR shuttling induced by ionizing radiation is regulated by phosphorylation at residue Thr654. *FEBS Lett* 584: 3878–84.

Dittmann K., Mayer C., Fehrenbacher B., Schaller M., Raju U., Milas L., Chen D., Kehlbach R. and Rodemann H. (2005) Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 280(35): 31182-9

Đorđević G., Matušan-Ilijaš K., Sinožić E., Damante G., Fabbro D., Grahovac B., Lučin K. and Jonjić N. (2008) Relationship Between Vascular Endothelial Growth Factor and Nuclear Factor- $\kappa$ B in Renal Cell Tumors. *Croatian Medical Journal* 49: 608-617.

Ekstrand AJ., Longo N., Hamid ML., Olson JJ., Liu L., Collins VP. and James CD. (1994) Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene.* 9(8): 2313-2320.

Espinosa L., Bigas A. and Mulero MC. (2014) Novel functions of chromatin-bound I $\kappa$ B $\alpha$  in oncogenic transformation. *British Journal of Cancer* 111: 1688.

Espinosa L., Ingle´s-Esteve J., Robert-Moreno A. and Bigas A. (2003). I $\kappa$ B $\alpha$  and p65 regulate the cytoplasmic shuttling of nuclear corepressors: cross-talk between Notch and NF $\kappa$ B pathways. *Mol. Biol. Cell* 14: 491–502.

Ferreiro D. and Komives E. (2010) Molecular mechanisms of system control of NF- $\kappa$ B signalling by I $\kappa$ B $\alpha$ . *Biochemistry.* 49: 1560–1567.

George CM., Stadler WM. and Vogelzang NJ. (2001) Primary neoplasms of the kidney and renal pelvis. In: Schrier RW, editor. *Diseases of the kidney and urinary tract*, Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins p: 831-49.

Gloire G., Legrand-Poels S. and Piette J. (2006) NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 72(11): 1493-50.

Goodwin JF. and Knudsen KE. (2014) Beyond DNA repair: DNA-PK function in cancer. *Cancer discovery* 4: 1126-1139.

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

Harris RC. (1991) Potential physiologic roles for epidermal growth factor in the kidney. *Am J Kidney Dis.* 17: 627– 630.

Hayden MS. and Ghosh S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 132(3): 344-36.

Hoesel B. and Schmid JA. (2013) The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 2:12:86

Hoffmann A., Natoli G and Ghosh G. (2006) Transcriptional regulation via the NF- $\kappa$ B signaling module. *Oncogene*. 25: 6706–6716.

Holbro T and Hynes NE. (2004) ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 44: 195–217.

Hsieh JJ., Purdue MP., Signoretti S., Swanton C., Albiges L., Schmidinger M., Heng DY., Larkin J. and Vincenzo Ficarra V. (2017) Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 3: 17009.

Iqbal M., Sharma SD., Rezazadeh H., Hasan N., Abdulla M. and Athar M. (1996) Glutathione metabolizing enzymes and oxidative stress in ferric nitrilotriacetate mediated hepatic injury. *Redox Rep*. 2(6): 385-91.

Jemal A. (2007) Cancer statistics. *CA. A Cancer Journal of Clinicians*. 57: 43-66

Johnson AC., Murphy BA., Matelis CM., Rubinstein Y., Piebenga EC., Akers LM., Neta G., Vinson C. and Birrer M. (2000) Activator protein-1 mediates induced but not basal epidermal growth factor receptor gene expression. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 6: 17-27.

Kallio JP., Hirvikoski P., Helin H., Kellokumpu-Lehtinen P., Luukkaala T., Tammela TLJ. and Martikainen PM. (2003) Membranous location of EGFR immunostaining is associated with good prognosis in renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 89: 1266-1269.

Kamio T., Shigematsu K., Sou H., Kawai K. and Tsuchiyama H. (1990) Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in human adrenocortical carcinoma. *Hum Pathol* 21: 277–282.

Kankaya D., Kiremitci S., Tulunay O. and Baltaci S. (2016) Prognostic impact of epidermal growth factor receptor on clear cell renal cell carcinoma: Does it change with different expression patterns?. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 59: 35-40.

Kimoto T., Koya-Miyata S., Hino K., Micallef MJ., Hanaya T., Arai S., Ikeda M. and Kurimoto M. (2001) Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. *Virchows Archiv* 438: 259–270.

Klaunig J.E. (2018) Oxidative Stress and Cancer. *Current Pharmacological Design*. 24: 4771-4778.

Konda R., Sugimura J., Sohma F., Katagiri T., Nakamura Y. and Fujioka T. (2008) Over expression of hypoxia-inducible protein 2, hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and nuclear factor kappaB is putatively involved in acquired renal cyst formation and subsequent tumor transformation in patients with end stage renal failure. *J Urol* 180: 481–5.

Langner C., Ratschek M., Rehak P., Schips L. and Zigeuner R. (2004) Are heterogenous results of EGFR immunoreactivity in renal cell carcinoma related to non-standardised criteria for staining evaluation?. *J Clin Pathol* 57: 773–775.

Ledeganck KJ., Boulet GA., Horvath CA., Vinckx M., Bogers JJ., Bossche RVD., Verpooten GA. and Winter BYD. (2011) Expression of renal distal tubule transporters TRPM6 and NCC in a rat

model of cyclosporine nephrotoxicity and effect of EGF treatment. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 301: F486-F493.

Lee CH., Jeon YT., Kim SH. and Song YS. (2007) NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 29(1): 19-35.

Liao HJ. and Carpenter G. (2007) Role of the sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression. *Mol Biol Cell* 18: 1064–72.

Liccardi G., Hartley JA. and Hochhauser D. (2011) EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer research* 71: 1103-1114.

Lin SY., Makino K., Xia W., Matin A., Wen Y., Kwong KY., Bourguignon L. and Hung MC. (2001) Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.* 3: 802– 808.

Linehan WM. and Ricketts J. (2019) The cancer genome atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications. *Nat. Rev. Urol.* 16(9): 539-552.

Linehan WM., Srinivasan R. and Schmidt LS. (2010) The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat. Rev. Urol.* 7: 277–285.

Liu Q., Li J., Khoury J., Colgan SP. and Ibla JC. (2009) Adenosine signaling mediates SUMO-1 modification of I kappa B alpha during hypoxia and reoxygenation. *J Biol Chem.* 284 (20): 13686–13695.

Lo HW. and Hung MC. (2006) Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Cancer Research.* 94(2): 184-188.

Lo HW., Hsu SC., Ali-Seyed M., Gunduz M., Xia W. and Wei Y. (2005) Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer cell.* 7: 575-589.

Lo HW., Ali-Seyed M., Bartholomeusz G., Wu Y. and Hung MC. (2006) Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis importin  $\beta$  1 CRM1. *J Cell Biochem.* 98(6): 1570-83.

Lua J., Qayyum T., Edwards J. and Roseweir AK. (2018) The prognostic role of the non-canonical nuclear factor-kappa B pathway in renal cell carcinoma patients. *Urologia Internationalis.* 101(2): 190–196.

MacDougall ML., Welling DL. and Wiegmann TB. (1987) Renal Adenocarcinoma and Acquired Cystic Disease in Chronic Hemodialysis Patients. *American Journal of Kidney Diseases* 9(2): 166-171.

Makhov P., Joshi S., Ghatalia P., Kutikov A., Uzzo RG. and Kolenko VM. (2018) Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies. *Molecular Cancer Therapeutics.* 17: 1355-1364.

Mancini V., Battaglia M., Ditunno P., Palazzo S., Lastilla G., Montironi R., Bettocchi C., Cavalcanti E., Ranieri E. and Selvaggi F. (2008) Current insights in renal cell cancer pathology. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 26: 225–238.

Margueron R. and Reinberg D. (2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 469(7330): 343-9.

Marti U., Burwen SJ., Wells A., Barker ME., Huling S., Feren AM. and Jones AL. (1991) Localization of epidermal growth factor receptor in hepatocyte nuclei. *Hepatology*. 13: 15–20.

Marti U., Ruchti C., Kampf J., Thomas GA., Williams ED., Peter HJ., Gerber H. and Burgi U. (2001) Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. *Thyroid*. 11: 137–145.

Breitzig M., Bhimineni C., Lockey R. and Kolliputi N. (2016) 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? *Am J Physiol Cell Physiol*. 311: C537–C543.

Matušan-Ilijaša IK., Damante G., Fabbroc D., Đorđevićalt G., Maja H., Grahovacd I., MarićeJosip M., Blaženka S., Nives G. and KsenijaLučina J. (2011) Osteopontin expression correlates with nuclear factor-κB activation and apoptosis downregulation in clear cell renal cell carcinoma. *Pathology - Research and Practice* 207. (2): 104-110.

Meléndez-Rodríguez F., Roche O., Sánchez-Prieto R. and Aragonés J. (2018) Hypoxia-inducible factor 2- dependent pathways driving Von Hippel-Lindau deficient renal cancer. *Frontiers in Oncology*. 8 (214): 1-8.

Melenhorst WBH., Mulder GM., Xi Q., Hoenderop JG., Kimura K., Eguchi S. and van Goor H. (2008) Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in the Kidney Key Roles in Physiology and Disease. *Hypertension*. 52: 987–993.

Mendoza-Rodríguez CA., Monroy-Mendoza MG., Morimoto S. and Cerbon MA. (2003) Pro-apoptotic signals of the bcl-2 gene family in the rat uterus occurs in the night before the day of estrus and precedes ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 208: 31-39.

Merseburger AS., Hennenlotter J SP., Koch S., Horstmann E., Kuehs M KU., Stenzl R., Kuczyk A. and Markus A. (2005) Membranous Expression and Prognostic Implications of Epidermal Growth Factor Receptor Protein in Human Renal Cell Cancer. *Anticancer Research*. 25: 1901-1907.

Meteoglu I., Erdogdu IH., Meydan N., Erkus M. and Barutca S. (2008) NF-KappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell carcinoma tissues. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 27: 53-53.

Mitchell S., Vargas J. and Hoffmann (2015) A: Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscipl. Rev Syst Biol Med*. 8(3):227-41.

Mizote A., Hida A., Hosako M., Fujisawa M., Kamekawa M. and Okada S. (2002) Effects of phlebotomy on the growth of ferric nitrilotriacetate-induce renal cell carcinoma. *Acta Med Okayama* 56(4): 199-204.

Mock H., Sauter G., Buchholz N., Gasser TC., Bubendorf L., Waldman FM. and Mihatsch MJ. (1997) Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor cell proliferation in renal cell carcinoma. *Human Pathology* 28: 1255-1259.

Morais C., Healy H., Johnson DW. and Gobe G. (2010) Inhibition of nuclear factor kappa B attenuates tumour progression in an animal model of renal cell carcinoma. *Nephrol Dial Transplant*. 25: 1462–74.

Morais C., Pat B., Gobe G., Johnson DW. and Healy H. (2006) Pyrrolidine dithiocarbamate exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects in renal cell carcinoma cell lines. *Nephrol Dial Transplant*. 21: 3377–88.

Morotti A., Crivellaro S., Panuzzo C., Carrà G., Guerrasio A. and Saglio G. (2017) I $\kappa$ B- $\alpha$ : At the crossroad between oncogenic and tumor-suppressive signals. *Oncol Lett*. 13: 531-534.

Moscattello DK., Holgado Madruga M., Godwin AK., Ramirez G., Gunn G., Zoltick PW., Biegel JA., Hayes RL. and Wong AJ. (1995) Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 55(23): 5536-5539.

Muglia VF. and Prando A. (2015) Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras*. 48(3): 166–174.

Mulero MC., Ferres-Marco D., Islam A., Margalef P., Pecoraro M., Toll A., Drechsel N., Charneco C, Davis S. and Bellora N. (2013) Chromatin-Bound I $\kappa$ B $\alpha$  Regulates a Subset of Polycomb Target Genes in Differentiation and Cancer. *Cancer cell* 24: 151-166.

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

Ng KL., Yap NY., Rajandram R., Small D., Pailoor J., Ong TA., Razack AH., Wood ST., Morais C. and Gobe GC. (2018) Nuclear factor-kappa B subunits and their prognostic cancer-specific survival value in renal cell carcinoma patients. *Pathology*. 50: 511-518.

O’Dea E and Hoffmann A. (2010) The regulatory logic of the NF- $\kappa$ B signaling system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2:a000216.

Okada K., Wangpoengtrakul C., Osawa T., Toyokuni S., Tanaka K. and Uchida K. (1999) 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated Impairment of Intracellular Proteolysis during Oxidative Stress: IDENTIFICATION OF PROTEASOMES AS TARGET MOLECULES. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 23787-23793.

Okada S. (1996) Iron-induced tissue damage and cancer: The role of reactive oxygen species-free radicals *Pathology International*. 46: 31 1-332

Oya M., Ohtsubo M., Takayanagi A., Tachibana M., Shimizu N. and Murai M. (2001) Constitutive activation of nuclear factor-kB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene*. 20: 3888-3896.

Oya M., Takayanagi A., Horiguchi A., Mizuno R., Ohtsubo M., Marumo K., Shimizu N. and Murai M. (2003) Increased nuclear factor- $\kappa$ B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 24: 377-384.

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

Pariente Pérez TO. Participación de NF- $\kappa$ B en la carcinogenicidad del nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) y efecto de un extracto de semilla de tamarindo (EST). Tesis para obtener el grado de maestra en ciencias, Facultad de Química, UNAM, 2012.

Pasparakis M. (2009). Regulation of tissue homeostasis by NF- $\kappa$ B signalling: implications for inflammatory diseases. *Nature Rev.* (9): 768-788

Patel D., Lahiji A., Patel S., Franklin M., Jimenez X., Hicklin DJ. and Kang X. (2007) Monoclonal Antibody Cetuximab Binds to and Down-regulates Constitutively Activated Epidermal Growth Factor Receptor vIII on the Cell Surface *Anticancer Research* 27: 3355-3366.

Peri S., Devarajan K., Yang D-H., Knudson AG. and Balachandran S. (2013) Meta-Analysis Identifies NF- $\kappa$ B as a Therapeutic Target in Renal Cancer. *PLoS ONE*. 8(10): e76746.

Perkins ND (2006) Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 25: 6717.

Petejova N. and Martinek A (2016). Renal cell carcinoma: Review of etiology, pathophysiology and risk factors. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 160(2): 183-194.

Preece NE., Hall DE., Howarth JA., King KJ. And Parke DV. (1989) Effects of acute and subchronic administration of iron nitrilotriacetate in the rat. *Toxicology* 59:37-58.

Psyrris A, Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Haffty B, Camp R, Rimm D, Burtness BA (2005) Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin Cancer Res* 11: 5856–5862

Pu Y-S., Huang C-Y., Kuo Y-Z., Kang W-Y., Liu G-Y., Huang AM., Yu H-J., Lai M-K., Huang S-P., Wu W-J, (2009) Characterization of membranous and cytoplasmic EGFR expression in human normal renal cortex and renal cell carcinoma. *Journal of Biomedical Science* 16: 82-82.

Rao P., Hayden MS., Long M., Scott ML., West AP., Zhang D., Oeckinghaus A., Lynch C., Hoffmann A., Baltimore D. and Ghosh S. (2010) I $\kappa$ B acts to inhibit and activate gene expression during the inflammatory response. *Nature* 466 (7310): 1115–1119

Rehman MU., Tahir M., Khan AQ., Khan R., Lateef A., Oday OH., Qamar W., Ali F. and Sultana S. (2013) Chrysin suppresses renal carcinogenesis via amelioration of hyperproliferation, oxidative stress and inflammation: Plausible role of NF- $\kappa$ B. *Toxicology Letters* 216: 146-158.

Roskoski R. (2014) The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*, 79: 34–74

Sabbah D., Hajjo R. and Sweidan K. (2020) Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Curr Top Med Chem*. 20(10): 815-834.

Schausberger E, Eferl R, Parzefall W, Chabikovsky M, Breit P, Wagner EF, Schulte-Hermann R, Grasl-Kraupp B, Chabikovsky M (2003) Induction of DNA synthesis in primary mouse hepatocytes is associated with nuclear pro-transforming growth factor alpha and erbb-1 and is independent of c-jun. *Carcinogenesis* 24: 835–841

Schoonbroodt S. and Piette J. (2000) Oxidative stress interference with the nuclear factor- $\kappa$ B activation pathways. *Biochemical Pharmacology*. 60(18): 1075-1083.

Seshacharyulu P., Ponnusamy MP., Haridas D., Jain M., Ganti AK. and Batra SK. (2012) Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16 (1)

Sharmila R and Sindhu G (2017) Evaluate the Antigenotoxicity and Anticancer Role of  $\beta$ -Sitosterol by Determining Oxidative DNA Damage and the Expression of Phosphorylated Mitogen-activated Protein Kinases', C-fos, C-jun, and Endothelial Growth Factor Receptor. *Pharmacogn Mag* 13: 95-101.

Shaw G. (2016) *The silent disease*. Macmillan Publishers Limited. 537: S98-99

Shiau P., Yuan Huan C., Kuo ZY., Kang YW., Liu Y G., Huang MA., Yu JH. Huang PS., Wu J W, Chiou JS. And Hor CT. (2009) Characterization of membranous and cytoplasmic EGFR expression in human normal renal cortex and renal cell carcinoma. *J. of Biomed. Sci.* 16(82):1-13.

Shu S., Wang Y., Zheng M., Liu Z., Cai J., Tang C. and Dong Z. (2019) Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney injury and repair. *Cells* 8(207): 1-22

Sibilia M., Kroismayr R., Lichtenberger B., Natarajan A., Hecking M. and Holcman M. (2007) The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 75 (9): 770-787

Siddiqui IA., Sanna V., Ahmad N., Sechi M., and Mukhtar H. (2015) Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1-12.

Sourbier C., Danilin S., Lindner V., Steger J., Rothhut S., Meyer N., Jacqmin D., Helwig J-J., Lang H. and Massfelder T. (2007) Targeting the Nuclear Factor- $\kappa$ B Rescue Pathway Has Promising Future in Human Renal Cell Carcinoma Therapy. *Cancer Research* 67: 11668-11676.

Steiner T., Junker U., Henzgen B., Nuske K., Durum SK. and Schubert J. (2001) Interferon-alpha suppresses the antiapoptotic effect of NF- $\kappa$ B and sensitizes renal cell carcinoma cells in vitro to chemotherapeutic drugs. *Eur Urol* 39:478–83



Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W., and Greene, W. C. (1993) NF- $\kappa$ B controls expression of inhibitor I $\kappa$ B: Evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259, 1912–1915.

Takada Y., Mukhopadhyay A., Kundu GC., Mahabeleshwar GH., Singh S. and Aggarwal BB. (2003) Hydrogen peroxide activates NF- $\kappa$ B through tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I $\kappa$ B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 278(26):24233-41.

Tam WF., Lee LH., Davis L. and Sen R. (2000). Cytoplasmic sequestration of rel proteins by I $\kappa$ Balpha requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol Cell. Biol.* 20:2269-2284.

Tanveer A., Arjumand W., Seth A., Nafees S., Rashid S., Ali N. and Sultana S. (2011) Preclinical renal cancer chemopreventive efficacy of geraniol by modulation of multiple molecular pathways. *Toxicology* 290 (1): 69-81.

Toyokuni S (1996) Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic Biol Med* 20:553–566.

Toyokuni S., Mori T. and Dizdaroglu M. (1994) DNA base modifications in renal chromatin of wistar rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *International Journal of Cancer* 57: 123-128.

Tsuchiya K. (2005) Oxygen radicals photo-induced by ferric nitrilotriacetate complex, *Biochemical and Biophysical Acta* 1725:111-119.

Uhlman DL., Nguyen P., Manivel JC., Zhang G., Hagen K., Fraley E., Aeppli D. and Niehans GA. (1995) Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin Cancer Res* 1 (8): 913–920.

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

Viatour, P., Legrand-Poels, S., van Lint, C., Warnier, M., Merville, M.P., Gielen, J., Piette, J., Bours, V., and Chariot, A. (2003). Cytoplasmic I $\kappa$ Balpha increases NF- $\kappa$ B-independent transcription through binding to histone deacetylase (HDAC) 1 and HDAC3. *J. Biol. Chem.* 278, 46541–46548.

Wang X., Peng H., Huang Y., Kong W., Cui Q., Du J. and Jin H. (2020) Post-translational modifications of I $\kappa$ B $\alpha$ : the state of the art. *Front. Cell Dev. Biol.* 8: 574706

Wang YN, Wang H, Yamaguchi H, Lee HJ, Lee HH, Hung MC. (2010) COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochem Biophys Res Commun* 399:498–504.

Wells A, and Marti U.(2002) Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:697–702.

Wiertz EJ, Tortorella D, Bogyo M, (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384:432–8

Wikstrand CJ., Hale LP., Batra SK., Hill LM., Humphrey PA. and Kurpad J. (1995) Monoclonal Antibodies against EGFR vIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Research* 55:3140-3148

Wong A., Ruppert J., Bignerf S., Grzeschik C., Humphreyt P., Bigner D. and Vogelstein B. (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Nad. Acad. Sci. USA.* 89: 2965-2969

Wykosky J., Fenton T., Furnari F. and Cavenee W. (2011) Therapeutic targeting of epidermal growth factor receptor in human cancer: successes and limitations. *Chin J Cancer.* 30 (1)

Yang Y., Wu J. and Wang J. (2015) A database and functional annotation of NF-κB target genes *Int J Clin Exp Med.* 9(5):7986- 7995.

Zhang H. and Sun SC. (2015) NF-κB in inflammation and renal diseases *Cell Biosci* 5:63

Zhang L., Xiao X., Arnold PR. and Li XC. (2019) Transcriptional and epigenetic regulation of immune tolerance: roles of the NF-κB family members. *Cellular & Molecular Immunology.* 16: 315–323

Zhang T., Ma C., Zhang Z., Zhang H. and Hu H. (2021) NF-κB signaling in inflammation and cancer. *MedComm.* 2:618–653.

Zhou L. and Yang H. (2011) The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein Promotes c-Cbl-Independent Poly-Ubiquitylation and Degradation of the Activated EGFR. *PLoS ONE* 6: e23936.

# Differential behavior of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ and EGFR during the renal carcinogenic process in an experimental model *in vivo*

TELMA PARIENTE-PÉREZ<sup>1</sup>, FRANCISCO AGUILAR-ALONSO<sup>1</sup>, JOSÉ DOLORES SOLANO<sup>1</sup>,  
CHABETTY VARGAS-OLVERA<sup>1</sup>, PATRICIA CURIEL-MUÑIZ<sup>1</sup>, CARMEN ADRIANA MENDOZA-RODRÍGUEZ<sup>2</sup>,  
DANIELA TENORIO-HERNÁNDEZ<sup>1</sup> and MARÍA ELENA IBARRA-RUBIO<sup>1</sup>

Biology Department, Faculty of Chemistry, Laboratories <sup>1</sup>F-225 and <sup>2</sup>F-323,  
National Autonomous University of Mexico, CDMX 04510, Mexico

Received July 9, 2019; Accepted December 3, 2019

DOI: 10.3892/ol.2020.11436

**Abstract.** Renal cell carcinoma (RCC) is the most common type of cancer of the adult kidney. It is generally asymptomatic even at advanced stages, so opportune diagnosis is rare, making it almost impossible to study this cancer at its early stages. RCC tumors induced by ferric nitrilotriacetate (FeNTA) in rats histologically correspond to the human clear cell RCC subtype (ccRCC) and the exposure to this carcinogen during either one or two months leads to different early stages of neoplastic development. High levels of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and epidermal growth factor receptor (EGFR) as well as low levels of NF- $\kappa$ B inhibitor alpha (I $\kappa$ B $\alpha$ ) are frequent in human RCC, but their status in FeNTA-induced tumors and their evolution along renal carcinogenesis is unclear. On this basis, in the present study NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR behavior was analyzed at different stages of the experimental renal carcinogenesis model. Similar to patients with RCC, neoplastic tissue showed high levels of p65, one of the predominant subunits of NF- $\kappa$ B in ccRCC and of EGFR (protein and mRNA), as well as a decrease in the levels of NF- $\kappa$ B's main inhibitor, I $\kappa$ B $\alpha$ , resulting in a classic oncogenic combination. Conversely, different responses were observed at early stages of carcinogenesis. After one month of FeNTA-exposure, NF- $\kappa$ B activity and EGFR levels augmented; but unexpectedly, I $\kappa$ B $\alpha$  also

did. While after two months, NF- $\kappa$ B activity diminished, but EGFR and I $\kappa$ B $\alpha$  levels remained elevated. In conclusion, FeNTA-induced tumors and RCC human neoplasms are analogues regarding to the classic NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR behavior, and distinctive non-conventional combination of changes is developed at each early stage studied. The results obtained suggest that the dysregulation of the analyzed molecules could be related to different signaling pathways and therefore, to particular effects depending on the phase of the carcinogenic process.

## Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common type of kidney cancer in adults (1). Patients are generally asymptomatic chiefly at the initial phases. Specific early markers have not been identified, resulting in a late diagnosis, frequently even when metastasis is already present (1,2), and there are different histological subtypes with distinct responses to therapies (3). All of the above lead to high mortality rates (1). Hence, an experimental model would be a valuable tool to study this disease and particularly to understand the molecular mechanisms involved in the early stages of renal carcinogenic process, which is almost impossible to achieve in patients. The authors' group has demonstrated that *N*-diethylnitrosamine (DEN)-initiated and ferric nitrilotriacetate (FeNTA)-promoted renal tumors histologically correspond to clear cell RCC (ccRCC), the most common subtype occurring in patients (4) and that the exposure to FeNTA during either one or two months, causes distinct pre-neoplastic lesions and pro-carcinogenic molecular alterations, representing these times of exposure, differential early stages of renal carcinogenesis (5,6).

Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) is a collective term to refer to the family of dimeric Rel transcription factors, which consists of five proteins: p65 (Rel A), c-Rel, RelB, NF $\kappa$ B1 (p105/p50) and NF $\kappa$ B2 (p100/p52) (7), being considered p65/p50 the most classic dimer, where p65 is the subunit responsible for the transactivation of its target genes (8). In most cells, NF- $\kappa$ B is retained in the cytoplasm by its inhibitory protein, I $\kappa$ B (7,8), which blocks the factor's nuclear localization signal. I $\kappa$ B separation, therefore, allows NF- $\kappa$ B nuclear translocation and its consequent binding to  $\kappa$ B sites in DNA. Additionally, NF- $\kappa$ B's

---

*Correspondence to:* Dr María Elena Ibarra-Rubio, Biology Department, Faculty of Chemistry, Laboratory F-225, Building F, National Autonomous University of Mexico, 3000 University Av., Coyoacan, CDMX 04510, Mexico  
E-mail: meir@unam.mx

*Abbreviations:* ccRCC, clear cell renal cell carcinoma; FeNTA, ferric nitrilotriacetate; DEN, *N*-diethylnitrosamine; DF, DEN+FeNTA; NTT, non-tumor tissue; TT, tumor tissue; AT, adjacent tissue; WB, western blotting; IHC, immunohistochemistry; EMSA, electrophoretic mobility shift assay

*Key words:* clear cell renal cell carcinoma, ferric nitrilotriacetate, carcinogenesis, experimental model *in vivo*, NF- $\kappa$ B, p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , epidermal growth factor receptor

activity is controlled in the nucleus by I $\kappa$ B as well, where it induces the factor's liberation from chromatin and its export to the cytoplasm (9,10). The expression of numerous genes related to various events such as cell proliferation, inflammation and inhibition of apoptosis, is under the influence of this transcription factor (7), its deregulation being associated with almost all types of cancer (11,12). Particularly, different authors have reported an NF- $\kappa$ B overexpression in RCC tumors and cell lines (12-15), and in certain publications this overexpression has been correlated to tumor grade, invasion and metastasis, proposing the factor as a target for RCC treatment (2,3,14,16). In fact, apoptosis-induction and/or growth-repression of different RCC cell lines have been demonstrated by using a specific inhibitor of NF- $\kappa$ B activation (Bay-11-7085) or by blocking tyrosine kinases involved in NF- $\kappa$ B activation signaling (17,18). The p65 subunit was studied in all the aforementioned reports apart from Meteoglu *et al* (12) who analyzed the p50 subunit. Furthermore, Ng *et al* (19) reported a decrease in the levels of p50, p52 and c-Rel, as well as the absence of RelB, but an increase in p65 expression in human RCC tumors.

On the other hand, the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene is a known target of NF- $\kappa$ B (20). The EGFR is a transmembrane protein of the ErbB tyrosine kinases family (21) and when it is activated, multiple signaling pathways are induced, thus modulating pleiotropic cell responses, such as proliferation, migration and apoptosis (21). In the kidney, this receptor participates in renal hemodynamics, electrolyte management, magnesium reabsorption, phosphate transport regulation and proximal tubule gluconeogenesis, as well as in renal reparation after ischemia-induced damage (22). However, dysregulation of EGFR has been associated with progressive fibrotic renal damage, polycystic renal disease and RCC (22). In this last case, previous studies have reported EGFR overexpression, but the clinical significance of this increase and its subcellular localization are still controversial (23-28).

Therefore, in the present study, the behavior of NF- $\kappa$ B (p65), I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR was analyzed in renal tumors and at different early stages of FeNTA-induced carcinogenesis, to establish the equivalence between experimental and human neoplasms in this regard and to investigate the probable participation of these molecules in RCC development.

## Materials and methods

**Reagents and antibodies.** All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Merck KGaA unless otherwise indicated. Primary antibodies against I $\kappa$ B $\alpha$  (cat. no. sc-371), NF- $\kappa$ B p65 (cat. no. sc-8008), EGFR (cat. no. sc-03-G),  $\alpha$ -tubulin (cat. no. sc-5286), GAPDH (cat. no. sc-48167),  $\beta$ -actin (cat. no. sc-1616) and histone H3 (cat. no. sc-10809) used for western blotting (WB), immunohistochemistry (IHC), and the supershift test of the electrophoretic mobility shift assay (EMSA), as well as the secondary antibodies (anti-mouse and anti-rabbit, cat. nos. sc-2005 and sc-2004, respectively) used for WB were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc., while the anti-IgG secondary antibodies coupled with biotin (ABC kit Vectastain<sup>®</sup>, cat. nos. PK-6101 and PK 6102) and the peroxidase substrate kit DAB (cat. no. SK-4100) used for IHC were purchased from Vector Laboratories, Inc.

**Carcinogen preparation.** FeNTA solution was prepared as previously described (6).

**Experimental protocol.** All experiments involving animals were performed according to the Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999 and approved by the Institutional Committee for the Use and Care of Laboratory Animals (FQ/CICUAL/081/14). Experimental protocols were carried out as previously described (6) adapted from other authors' studies (29-31). Briefly, 67 male Wistar rats aged between 31 and 36 days and weighing 70-80 g were housed in a controlled temperature environment (21-23°C) with 55-62% humidity and under 12 h light/dark cycles. Rats had free access to food and water and were randomly distributed in two groups: 18 animals treated with a vehicle were used as the control group (C) and 49 animals treated with a single intraperitoneal (i.p.) administration of *N*-DEN (200 mg<sub>DEN</sub>/kg<sub>bw</sub>) and weekly increasing i.p. doses of FeNTA (3-9 mg<sub>Fe</sub>/kg<sub>bw</sub>) twice a week, maintaining the 9 mg<sub>Fe</sub>/kg<sub>bw</sub> dose from the 4th to the 16th week in the carcinogenesis group (DF). To analyze early stages of carcinogenesis, 10 rats were decapitated after one month and 10 more after two months of FeNTA-exposure for DF group as well as 6 animals for the corresponding C group for each time of study. Euthanasia was executed, in both cases, 48 h after the last injection of the carcinogen to avoid its acute effects and without anesthesia as the anesthetic may interfere in different manners with the chemistry of renal tissue and other tissues of interest, such as liver and brain, as well as blood samples. In the present study specifically kidneys, liver and lungs were used. Organs were removed immediately after sacrifice. The renal cortex was carefully dissected and all tissues were immediately frozen in liquid nitrogen storing them at -70°C until use. For the carcinogenesis protocol, the remaining animals were euthanized two months after the final FeNTA exposure, some of them by decapitation as described above to obtain tumor samples for reverse transcription (RT)-PCR assays, while others were anesthetized i.p. with sodium pentobarbital (50 mg/kg<sub>bw</sub>) and the kidneys were perfused with pH 7.4 Krebs-Ringer solution with 250 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), formalin-fixed at room temperature for 24 h and prepared for IHC following standard protocols (32). Animal welfare was carefully monitored during the experimental protocol, twice a week during the first 3 months and 4 times a week during the last three months. Euthanasia was executed by carbon dioxide inhalation when rats showed signs of health deterioration such as losing 20% of weight, or exhibiting prostration, mobility impairment and/or difficulty eating, urinating or defecating.

**IHC.** Sections (5- $\mu$ m thick; rotation micrometer, Leica<sup>®</sup>; Leica Microsystems GmbH) from formalin-fixed paraffin-embedded kidney tissue specimens were placed on slides, deparaffinized with xylene and rehydrated with decreasing concentrations of ethanol (100, 96, 80, 70 and 50%) for 3 min each. The antigen was retrieved by heating at 100°C for 30 min in 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) and subsequently incubated for 30 min with blocking solution (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS) to suppress the endogenous peroxidase activity. After rinsing with PBS, the slides were incubated in 0.5% Triton X-100 at room temperature for 30 min and non-specific immunoglobulin binding was blocked

by incubating sections in 5% albumin IgG free (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) in PBS at room temperature for 30 min. The slides were incubated overnight at 4°C in a humidified chamber with the corresponding primary antibody at a 1:250 dilution, prepared with 3% Triton X-100 in PBS. Then, the unbound primary antibody was removed by washing with PBS and the slides were incubated at room temperature for 2 h with a 1:200 dilution of anti-rabbit or anti-mouse (case dependent) IgG secondary antibody coupled with biotin (ABC kit Vectastain®, Vector Laboratories, Inc.). Sections were washed with PBS and incubated for 1 h at room temperature in peroxidase-conjugated avidin-biotin reagent (ABC kit Vectastain®, Vector Laboratories, Inc.). The immunoreaction was detected with the DAB kit (Vector Laboratories Inc.) and samples were counterstained with hematoxylin at room temperature for 2 min and dehydrated with increasing concentrations of ethanol (50, 70, 80, 96 and 100%), and solutions of 1:1 ethanol-xylene and 100% xylene for 3 min each. Finally, four random fields of each sample were analyzed utilizing a Nikon E600 light microscope; the staining intensity (mean grey value) of immunopositive cells was evaluated with the ImageJ software version 1.44p (National Institutes of Health) (33), which converts the grey level to a numerical value using a scale from 0 (white) to 255 (black), as described previously (32).

**mRNA extraction and RT-PCR.** Semi-quantitative mRNA analysis was achieved by RT-PCR. Total RNA was extracted with the Direct-zol™ RNA MiniPrep kit according to the manufacturer's protocol (cat. no. R2052, Zymo Research). RNA concentrations were determined spectrophotometrically at 260 nm. RT-PCR was carried out starting with 1 µg of total RNA following manufacturer's protocol with the RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (cat. no. K1622; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The thermocycling conditions for cDNA synthesis and amplification were: 1 cycle 55°C (30 min), 94°C (2 min), 94°C (30 sec); 10 cycles 94°C (30 sec), 60°C (30 sec), 72°C (30 sec); 20 cycles 94°C (30 sec), 60°C (30 sec), 72°C (5-30 sec with five seconds increases per cycle); 1 cycle 94°C (30 sec), 60°C (30 sec) and 72°C (7 min). GAPDH was used as control. The oligonucleotide sequences used were: (1) for EGFR, 5'-ACAGAGGACAACATAGATGAC-3' (forward) and 5'-CTGGGCAGTGTGAGATAC-3' (reverse) (34); and (2) for GAPDH, 5'-GGCTGAGAATGGGAAGCTGGT CAT-3' (forward) and 5'-CAGCCTTCTCCATGGTGGTGA AGA-3' (reverse) (35). Amplified fragments were analyzed on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide at room temperature for 30 min and visualized with ultraviolet light (Benchtop 2UV™ Transilluminator UVP). Bands were quantified by densitometry analysis as described below.

**Tissue homogenates and western blot analysis.** A total of 150 mg of renal cortex tissue were homogenized (PT10/35GT homogenizer Polytron®; Kinematica AG), in cold lysis buffer (1 mM DTT, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 15 mM sodium azide, 1.0% Triton X-100 and 30% glycerol) supplemented with the commercial protease inhibitor cOmplete™ Mini and phosphatase inhibitor PhosSTOP™ Cocktail tablets (Roche Diagnostics GmbH). After homogenates' centrifugation (13,000 x g for 30 min

at 4°C) (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Legend RT+ centrifuge), supernatants were recovered and total protein was quantified by the Bradford method (Bio-Rad Laboratories Inc.). Equal protein amounts (60-80 µg) were electrophoresed in a 10% SDS-PAGE polyacrylamide gel and transferred to an Immobilon® PVDF membrane (EMD Millipore). Membranes were blocked for 1 h at room temperature with 1% nonfat dry milk and incubated with the primary antibodies against p65 (1:250), IκBα (1:250), EGFR (1:250) or α-tubulin (1:1,000) overnight at 4°C. Subsequently, membranes were washed and incubated with the corresponding secondary antibody (1:30,000 for anti-rabbit and anti-mouse). Immunoreactive signal bands were detected using Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (EMD Millipore) and were recorded on X-ray films and quantified by densitometry, as described below.

**Nuclear protein extraction and EMSA.** Nuclear protein extracts were prepared by homogenizing 100 mg kidney cortex (PT10/35GT homogenizer Polytron® Kinematica AG) for 8-20 sec in 800 µl buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF and a tablet of protease inhibitor cOmplete™ Mini per 10 ml buffer). Homogenates were mixed with 5 µl Nonidet P-40 (NP-40) and incubated at 4°C for 20 min, stirring 10 times at intervals of 2 min. Then samples were centrifuged for 15 min at 1,500 x g at 4°C (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Legend RT+ centrifuge) and pellets were resuspended in 100 µl buffer B (20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM NaCl, 25% glycerol, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT and a tablet of protease inhibitor cOmplete™ Mini for each 10 ml buffer). After 20 min of incubation at 4°C, mixing by inversion every 2 min, tubes were centrifuged for 10 min at 13,000 x g at 4°C (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Legend RT+ centrifuge) and the supernatants containing the nuclear proteins were stored at -20°C until use. EMSA assay and oligonucleotide digoxigenin labeling were carried out using a commercial kit according to manufacturer's protocol (DIG Gel Shift kit, 2nd generation, Roche Diagnostics GmbH). Briefly, 60 µg of nuclear proteins were incubated with 2 ng of labeled double-stranded consensus sequence recognized by NF-κB: 5'-AGTTGAGACTTTCCC GGGAGGC-3' (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). DNA-protein complexes were resolved by 5% native polyacrylamide gel electrophoresis with 0.5X TBE (50 mM Tris, 45 mM boric acid and 0.5 mM EDTA) for 120 min at 80 V. Samples were transferred to a positively-charged nylon membrane (Roche Diagnostics GmbH) in 0.5X TBE for 30 min at 300 mA (Trans-Blot® SD Semi-dry Transfer cell, Bio-Rad Laboratories Inc.) and crosslinked for 60 sec (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP). Finally, digoxigenin immunodetection was performed and autoradiographs developed. The specificity of binding and recognition of the shifted-bands' identity was examined by: i) Assays without sample, ii) assay without labeled oligonucleotide, iii) competition assay with 100-fold molar excess of unlabeled oligonucleotide and iv) supershift assay performed by previously incubating the nuclear extract with the anti-p65 antibody for 15 min at 37°C.

**Cell fractionation.** A total of 150 mg of renal cortex were homogenized (PT10/35GT homogenizer Polytron® Kinematica) in Gough buffer (10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>,

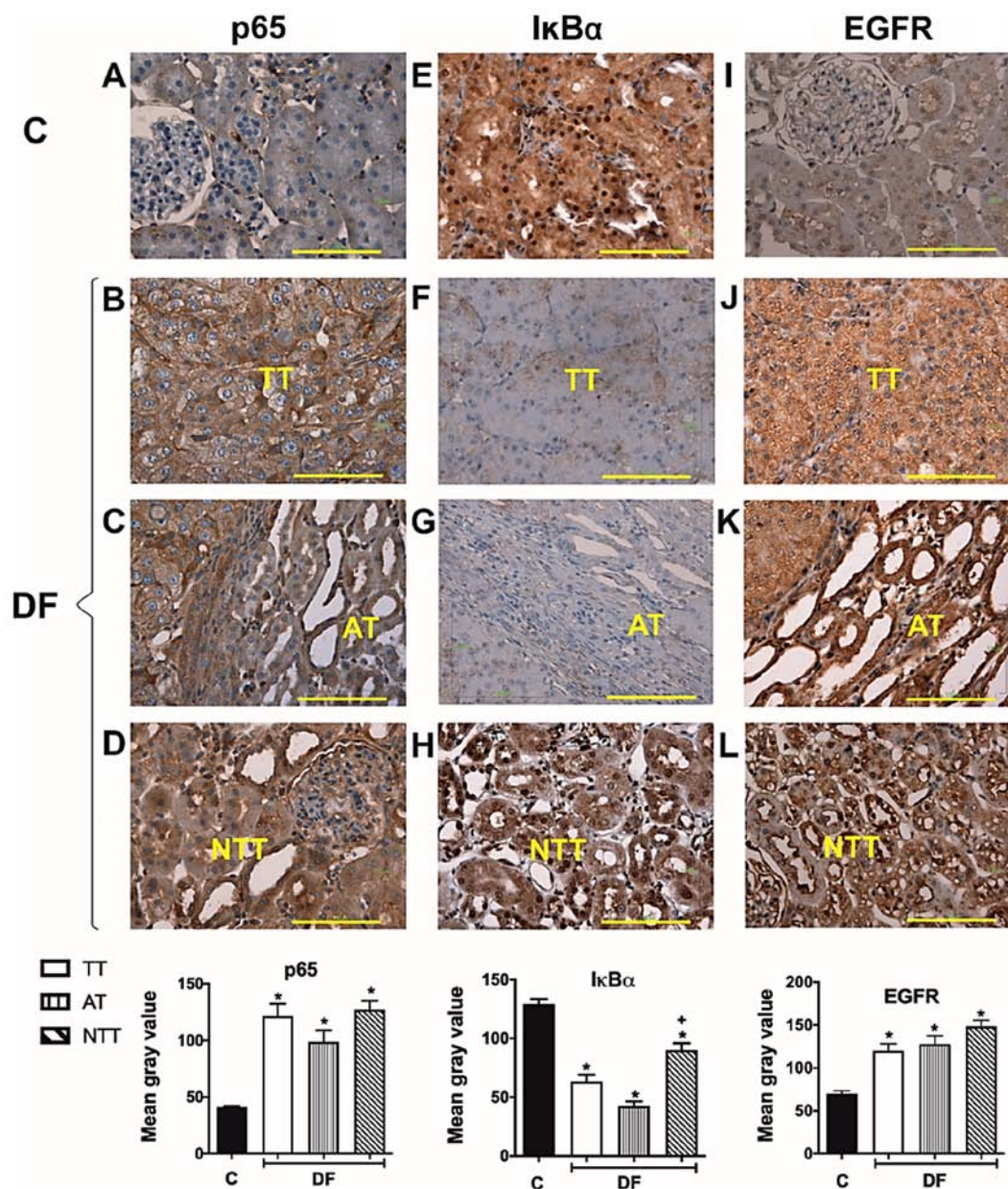


Figure 1. Immunohistochemistry of NF- $\kappa$ B (p65), I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR in renal samples obtained at the end of the carcinogenesis protocol. (A-L) Representative kidney cortex photomicrographs of these proteins are displayed from the C group for (A) p65, (E) I $\kappa$ B $\alpha$  and (I) EGFR and DF exposed rats, as well as the corresponding quantification histograms. NF- $\kappa$ B (p65) levels increased (B) TT, (C) AT and (D) NTT in a similar way. I $\kappa$ B $\alpha$  levels were abated in (F) TT, (G) AT and (H) NTT regions in the DF group, although in this case the decrease in NTT was smaller than in TT and AT. For its part, low EGFR expression in C rats was observed, (I) which increased in kidneys from the DF group in the analyzed areas in a comparable manner for (J) TT, (K) AT, and (L) NTT. AT images (C, G and K) include a TT area as reference. Scale bar=100  $\mu$ m. Magnification, x400. A total of four random fields per sample were analyzed, n=3 for the C group and 5 for the different areas of DF group. Results are expressed as the mean gray value. Columns represent the mean  $\pm$  standard error of the mean. \*P<0.05 vs. C, \*P<0.05 vs. TT and AT. C, control group; DF, N-dietilnitrosamine + ferric nitrilotriacetate treated group; TT, tumor tissues; AT, adjacent tissue; NTT, non-tumor tissue; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; EGFR, epidermal growth factor receptor.

0.65% NP-40, 0.5 mM PMSF and 1 mM DTT) and incubated on ice for 30 min with agitation every 5 min. Homogenates were centrifuged at 13,000  $\times$  g for 2 min at 4°C (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Legend RT+ centrifuge). Supernatants (cytoplasmic fraction) were recovered and stored at 4°C and pellets were resuspended in 250  $\mu$ l HEPES buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 0.4 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF and 1 mM DTT). After 2 h of incubation at 4°C with constant agitation, samples were centrifuged for 10 min at 12,000  $\times$  g at 4°C (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Legend RT+ centrifuge) and supernatants (nuclear proteins)

were transferred to tubes containing 400  $\mu$ l buffer D (20 mM HEPES, pH 7.9, 20% glycerol, 50 M KCl, 0.2 M EDTA, 0.5 mM PMSF and 1 mM DTT). Protein concentrations were determined by the Bradford method (Bio-Rad Laboratories Inc.) to load the same amount of protein from the cytoplasmic and nuclear fractions in electrophoresis gels for WB analysis.

**Densitometry and statistical analysis.** Densitometry analysis was performed using the ImageJ Software version 1.44p (NIH) (33). For WB and RT-PCR, the results from the experimental groups were expressed as relative densitometric units



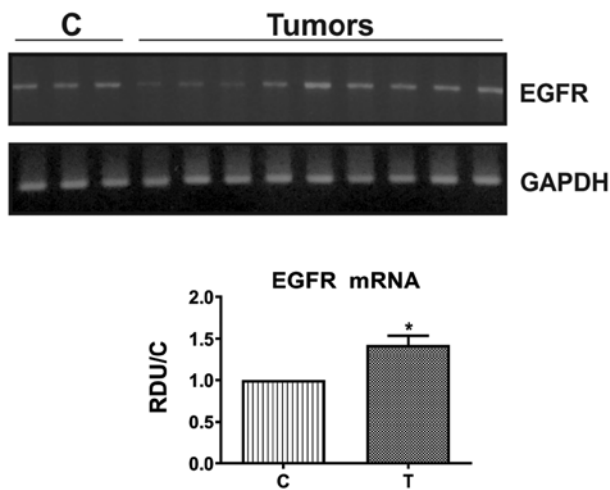


Figure 2. EGFR mRNA levels in ferric nitrilotriacetate (FeNTA)-induced tumors. Representative images of ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis of EGFR and GAPDH cDNAs obtained by reverse transcription-PCR, as well as a histogram of the densitometry analysis of all samples assayed are shown. The mean value of EGFR mRNA levels showed an increase, but its behavior varied among the tumors analyzed; while some of them exhibited an increase, others presented a reduction or had no changes. Bars represent the mean  $\pm$  standard error of the mean.  $n=5$  for C group and 14 for tumors. \* $P\leq 0.05$  vs. C. RDU, relative densitometric units vs. GAPDH and with respect to the C group; EGFR, epidermal growth factor; C, control.

with respect to the control group (RDU/C), calculated by dividing the total densitometric arbitrary units of each band corresponding to the protein of interest, by the value of the band corresponding to the protein used as loading control, obtained from the same sample in the same membrane; and this result, in turn, was divided by the value obtained from the control group. For EMSA, data were calculated by dividing the densitometric units of the shifted oligonucleotide band from problem samples by the mean densitometric value obtained from control samples. Lastly, for WB of cell fractions, results were expressed as the rate obtained by dividing the densitometric value of the band corresponding to the protein of interest by that of the loading control band (RDU).

All data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. Results were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test on Fig. 1 and by unpaired t-test with Welch's correction in all other figures. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.0b for Windows (GraphPad Software, Inc.).  $P\leq 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference.

## Results

**p65, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR in FeNTA-induced renal tumors.** Initially, to determine if FeNTA-induced tumors exhibited similar alterations to those reported in human RCC, the behavior of NF- $\kappa$ B (p65), I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR was analyzed in tumor tissue (TT), as well as in adjacent tissue (AT) and non-TT (NTT) from the DF group compared with the renal cortex from the C group. Fig. 1 displays IHC representative images and histograms of the mean immunoreactivity quantification of these three molecules in renal samples from C and DF groups. Unlike renal tissue from C rats, where low

NF- $\kappa$ B (p65) presence was detected (Fig. 1A), a strong positive NF- $\kappa$ B (p65) stain was observed in all kidney areas studied from the DF group (Fig. 1B-D), i.e. the increase in this protein was similar in TT, AT and NTT. In contrast, the intensity of the I $\kappa$ B $\alpha$  positive stain observed in the C group (Fig. 1E) decreased in rats exposed to the carcinogen (Fig. 1F-H). Interestingly, NTT exhibited an I $\kappa$ B $\alpha$  staining intensity that was decreased compared with the C group, but higher than the TT and AT, as well as a more frequent nuclear presence (Fig. 1H). Concerning EGFR, immunostaining was similar in TT and AT with a heterogeneous behavior, showing different levels of overexpression 63% of the studied samples (Fig. 1J) as compared with C (Fig. 1I); while 37% had no changes or even presented a negative stain. However, the mean value of EGFR levels for all analyzed specimens displayed an augment in TT as well as in AT, and it was detected preferentially in the cytoplasm in both areas; although the nuclear presence of this receptor was higher in AT. In NTT, conversely, EGFR levels increased in all samples in the cytoplasm and in the nucleus (Fig. 1L), like in AT. Moreover, in concordance with protein behavior, the mean EGFR mRNA levels were also significantly enhanced in tumors, despite some samples showing no changes or a decrease (39%) (Fig. 2).

**p65, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR at early stages of FeNTA-induced renal carcinogenesis.** p65, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR levels were determined in the kidney cortex from FeNTA-exposed rats during either one or two months, in order to study the probable participation of these molecules in the carcinogenic process. WB representative images and densitometry analysis of all samples examined are displayed on Fig. 3. Results exhibited no changes in p65 protein levels after either one or two months of FeNTA-exposure (Fig. 3A). In the case of I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 3A), two bands were observed, one being present mainly in the C group with an electrophoretic shift corresponding to a molecular weight of  $\sim 32$  kDa, while the other one was more intense in DF group, showing a displacement that corresponds to  $\sim 34$  kDa, which is closer to the molecular weight reported for I $\kappa$ B $\alpha$  in rats, i.e. 35 kDa (Uniprot #UniRef90\_P2596). Due to the above, I $\kappa$ B $\alpha$  results were calculated with the sum of the densitometric units from both bands, finding a statistical augment at both times studied, which was more evident after one month of carcinogen-exposure. On the other hand, EGFR levels were significantly enhanced in the DF group at both times studied (Fig. 3B) and, although the rise seems to be more intense after one month of FeNTA-exposure, as occurred for I $\kappa$ B $\alpha$ , there was no statistical difference between them.

**NF- $\kappa$ B activity and EGFR mRNA expression at early stages of FeNTA-induced renal carcinogenesis.** Given the preceding findings, EMSAs were carried out in nuclear extracts to investigate NF- $\kappa$ B-DNA binding activity (Fig. 4A). Different tests were performed as technique controls: i) Assays without sample and ii) without labeled-oligonucleotide, where no shifted band was detected (lanes 1 and 2, respectively); iii) a competition assay with a 100-fold molar excess of unlabeled-oligonucleotide, to confirm the identity of the observed band (lane 3); and vi) a supershift assay using the anti-p65 antibody to verify the presence of this protein in the NF- $\kappa$ B complex (lane 4). These two last tests were conducted with the

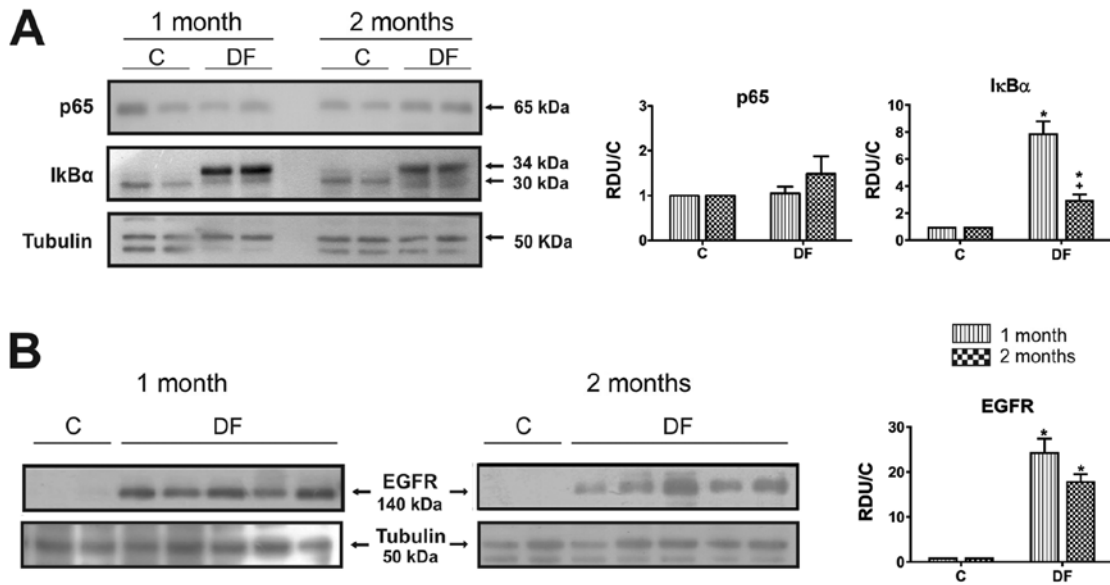


Figure 3. p65, IκBα and EGFR protein levels at early stages of FeNTA-induced renal carcinogenesis. Representative images of western blot assays and histograms are presented. (A) p65 levels did not change in the DF group with respect to C at any time studied. In contrast (A) IκBα as well as (B) EGFR increased in both stages, although to a lesser extent after two months of carcinogen-exposure than after one. α-tubulin was used as a loading control. Bars represent the mean ± standard error of the mean. n=4 for C groups and 7 for DF groups. \*P≤0.05 vs. corresponding C, and †P≤0.05 vs. DF after one. C, control group; DF, N-dietilnitrosamine + FeNTA treated group; RDU, relative densitometric units vs. corresponding tubulin and with respect to the C group; EGFR, epidermal growth factor receptor.

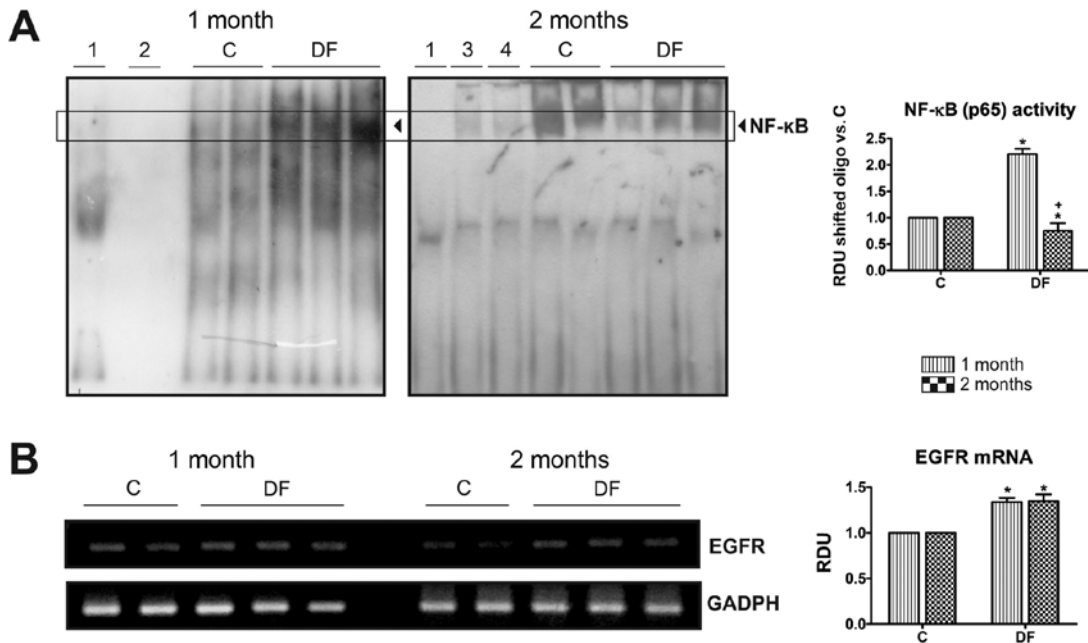


Figure 4. NF-κB activity analyzed by EMSA and EGFR mRNA levels determined by reverse transcription-PCR at early stages of FeNTA-induced renal carcinogenesis. Representative images of both determinations as well as corresponding histograms of densitometric analysis of all samples assayed are exhibited. (A) EMSAs were performed using nuclear extracts: Lane 1: Digoxigenin-labeled oligonucleotides without sample; lane 2: Sample without oligonucleotides; lane 3: Competition assay carried out using a 100-fold molar excess of unlabeled oligonucleotides; lane 4: Supershift assay performed utilizing an anti-p65 antibody. DF exposure induced an increase in NF-κB activity after one month, but it decreased after two months. (B) EGFR mRNA levels increased by a similar degree at both times of exposure. GAPDH was used as a loading control. Bars represent the mean ± standard error of the mean. n=4 for C groups and 7 for DF groups. \*P≤0.05 vs. corresponding C and †P≤0.05 vs. DF after one month. C, control group; DF, N-dietilnitrosamine + FeNTA treated group; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; RDU, relative densitometric units vs. GAPDH and with respect to the C group; NF-κB, nuclear factor kappa B; EGFR, epidermal growth factor receptor.

first control sample shown in the two months image and where a notable decrease in the intensity of the corresponding band can be appreciated. When samples were analyzed, a patent

rise of NF-κB binding to its consensus sequence was observed after one month of FeNTA-exposure; whereas the factor's activity was abated after two months' exposure revealed by



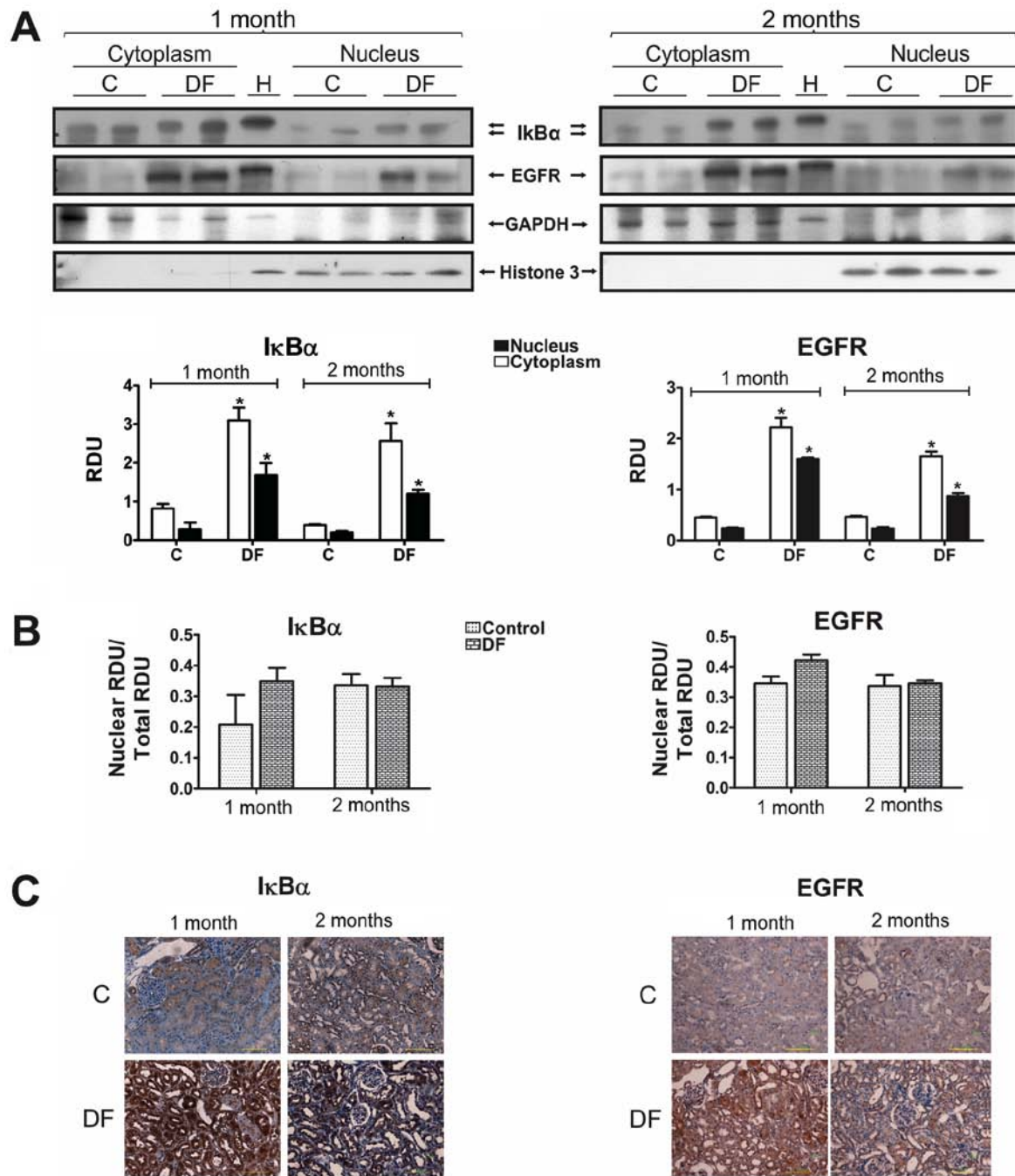


Figure 5. Subcellular distribution of IκBα and EGFR at early stages of FeNTA-induced renal carcinogenesis. (A) Western blotting of renal cytoplasmic and nuclear cell fractions. Representative images and quantitative histograms of all samples assayed are shown. GAPDH and histone 3 were used as loading control for cytoplasmic and nuclear fractions, respectively. Central lane of western blot images corresponds to a HeLa cells' sample (H) used as positive control in order to confirm the identity of the bands corresponding to the proteins of interest. IκBα and EGFR levels increased in both cell fractions at both studied times in DF groups. (B) Graphs of translocation calculated by dividing the nuclear fraction RDU by total (cytoplasmic + nuclear) RDU. No statistical changes were observed. (C) Immunohistochemistry representative images of each protein assessed confirming the results obtained by the western blot assays. Magnification, x400. Bars represent the mean ± standard error of the mean. n=4 for C groups, and 5 for DF groups. \*P≤0.05 vs. corresponding C. C, Control groups; DF, N-dietilnitrosamine + FeNTA treated groups; RDU, relative densitometric units vs. corresponding loading control; EGFR, epidermal growth factor receptor; H, HeLa cells' sample.

a decrease in the intensity of the band in samples from the DF group compared with that from the C one. EGFR mRNA levels, however, remained significantly heightened at both times studied (Fig. 4B).

*Subcellular localization of IκBα and EGFR at early stages of FeNTA-induced renal carcinogenesis.* Cytoplasmic and

nuclear fractions were prepared to investigate the subcellular distribution of IκBα and EGFR by WB (Fig. 5A). For this specific determination, relative densitometric units were not adjusted to the values of the corresponding C groups, in order to facilitate the assessment of the differences in both cell fractions of the kidney cortex from C and DF treated animals. GAPDH and histone 3 were used as loading controls

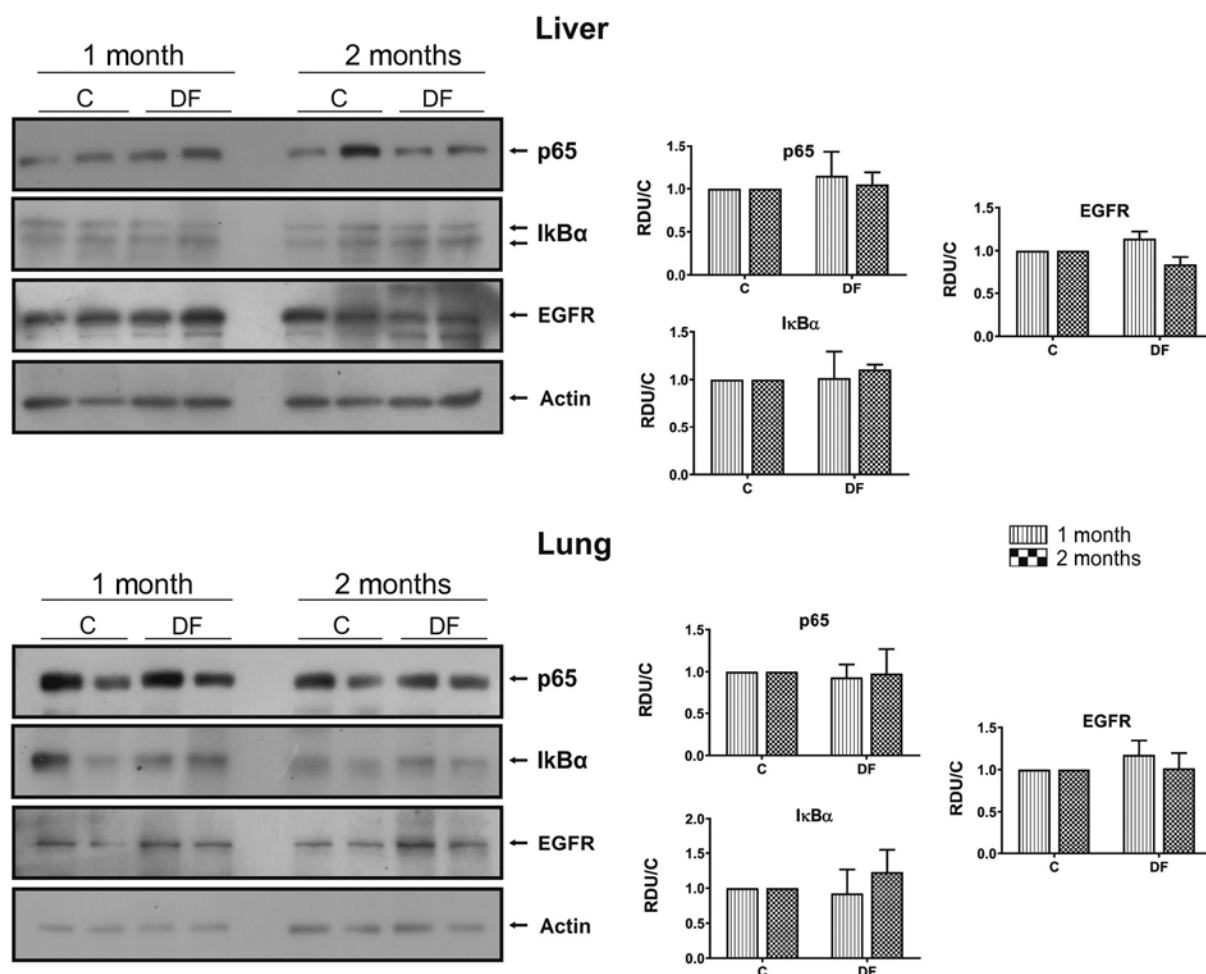


Figure 6. Liver and lung p53, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR protein levels at early stages of FeNTA-induced renal carcinogenesis. Western blotting representative images and quantitative histograms are shown. No changes were observed in the expression of any of these proteins in either the liver or the lung. Bars represent the mean  $\pm$  standard error of the mean.  $n=4$  for C groups, and 5 for DF groups.  $P>0.05$  vs. corresponding C. C, Control groups; DF, N-dietilnitrosamine + FeNTA treated groups; RDU, relative densitometric units; EGFR, epidermal growth factor receptor.

for cytoplasmic and nuclear extracts, respectively. As it can be seen, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR were present in the cytoplasm as well as in the nucleus and displayed a statistically significant increase in both cell fractions, which appears to be higher after one month than after two, a behavior that coincides with that observed when total extracts were analyzed (Fig. 3). However, no changes were detected in the translocation rate of either of these proteins (Fig. 5B), calculated by dividing the nuclear fraction by the total densitometric units, though a tendency to accretion was observed in the first month. In addition, these results were corroborated by IHC (Fig. 5C), observing both proteins (I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR) mostly in the cytoplasm but also in the nucleus, especially I $\kappa$ B $\alpha$ .

*p53, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR in hepatic and lung tissues.* Finally, the authors reported in a previous study (6) that no primary tumors were developed in liver or lungs using the scheme of FeNTA-exposure followed in the present investigation; thus, in order to determine if the alterations observed in p53, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR behavior were particularly associated with the kidney, and was not a generalized response, the status of these proteins was determined in hepatic and lung tissues, finding no differences between C and DF groups (Fig. 6).

## Discussion

RCC is the most common urological type of cancer in adults and has a high mortality rate due to several complications, such as a late diagnosis (1), which additionally makes it very difficult to study events happening at RCC's early phases, this being therefore feasible mostly in experimental models. The research group implemented a FeNTA-induced renal carcinogenesis protocol in rats and all obtained tumors were histopathologically characterized as clear cell subtype of RCC (6), the most frequent subtype in patients (1,4), and even different Fuhrman grades were identified. Also, pre-neoplastic lesions as well as different pro-carcinogenic alterations have been found after either one or two months of FeNTA-exposure and, consequently, these times of exposure were established as distinct early stages of the carcinogenesis process (5,6).

The present study found an overexpression of p53 in FeNTA-induced renal tumors, in agreement with previous observations for NF- $\kappa$ B in rat kidney after long term of FeNTA-exposure (36,37) and similar to what happens in patients' clear cell subtype tumors (14-16,19), as well as in some RCC human cell lines (13). Moreover, NF- $\kappa$ B activity is principally regulated by its inhibitory protein, I $\kappa$ B $\alpha$ , and a

substantial decrease, or even its absence, was observed in the experimental tumors, which is consistent with the findings of Oya *et al* (14) in human RCC. Also, it is worth noting that I $\kappa$ B $\alpha$  was less reduced and its nuclear presence was more frequent in NTT compared with TT and AT, suggesting that it must be restraining NF- $\kappa$ B activity in this area, where p65 was found to be increased in the same way as in TT, thus I $\kappa$ B $\alpha$  might be at least one of the mechanisms by which these cells are defended from malignant transformation. For its part, the mean value of EGFR levels in FeNTA-induced tumors exhibited an enhancement compared with renal tissue from C rats, despite some of them presenting no changes or even a decrease, as described in human tumors (23). Likewise, EGFR mRNA levels increased in most experimental tumors (61%), suggesting that the augment in the protein is transcriptionally induced and very probably caused, at least in part, by NF- $\kappa$ B, since p65 also augmented. Nevertheless, the clinical significance of the EGFR enhancement is still controversial and seems to be associated to its subcellular distribution (12,24,25,27,28). In this respect, since EGFR was found preferentially in the cytoplasm of the tumor cells, a bad prognosis would be expected according to Kankaya *et al* (25), who analyzed ccRCC subtype particularly.

Subsequently, the behavior of these molecules at early stages of renal carcinogenesis was analyzed. After one month of FeNTA-exposure, NF- $\kappa$ B activity was augmented even though p65 levels did not change and I $\kappa$ B $\alpha$  was increased. This could be explained by p65 posttranslational modifications which have been reported to increase the affinity of the transcription factor for its target sequence or to promote its association with some co-activators (38,39) and thus, I $\kappa$ B $\alpha$  might be playing other roles than regulating NF- $\kappa$ B. In this latter case, for instance, some authors have demonstrated that nuclear I $\kappa$ B $\alpha$  forms part of a transcriptional complex that associates with the promoter of different genes such as *hox* (40). Products of *hox* genes are a family of transcription factors implicated in renal organogenesis, and a change in their expression has been associated with ccRCC development (41,42). In fact, the present results showed augmented levels of I $\kappa$ B $\alpha$  in the cytoplasm but also in the nucleus and, interestingly, a tendency to increase its nuclear translocation was even noticed in the first month. On the other hand, it has been established that, besides preventing NF- $\kappa$ B translocation into the nucleus, I $\kappa$ B $\alpha$  is able to retain p53 in the cytoplasm, thereby counteracting the tumor-suppressive functions of p53 in other neoplasias (43). Nowadays, however, the behavior of HOX proteins and their possible role in the FeNTA-induced renal carcinogenesis are unknown and, to the best of our knowledge, the association between I $\kappa$ B $\alpha$  and p53 has not been investigated in RCC, which represent interesting perspectives for future studies.

It is likewise important to point out that exposure of rats to FeNTA during either one or two months, not only induced a renal increase of I $\kappa$ B $\alpha$ , but a shift in its electrophoretic mobility was detected, suggesting that a modified form of I $\kappa$ B $\alpha$  is accumulating in response to the carcinogen. Moreover, this shifted I $\kappa$ B $\alpha$  band increased more in the first month than at the second one. Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  gives rise to its ubiquitination, a modification that is recognized by the 26S proteasome for the inhibitor's degradation. It may therefore indicate that the carcinogen provokes I $\kappa$ B $\alpha$  renal accumulation due to the inhibition of the 26S proteasome, effect that

has been demonstrated by Okada *et al* (44). I $\kappa$ B $\alpha$  accretion may then be an early alteration that leads to promotion of the pro-carcinogenic mechanisms described above.

After two months of carcinogen exposure, in contrast, renal NF- $\kappa$ B activity decreased and this was consistent with the I $\kappa$ B $\alpha$  rise, suggesting that I $\kappa$ B $\alpha$  is carrying out its classical inhibitory functions on the NF- $\kappa$ B transcription factor at this more advanced early stage of renal carcinogenesis. Hence, the behavior observed at the first month seems to be the primary response to the carcinogen, whereas after two months, this effect is being controlled probably in most renal cells as a defense mechanism against malignant transformation, as was proposed above for NTT. However, as mentioned earlier, a shifted band of I $\kappa$ B $\alpha$  was also observed in WB assays after this time of FeNTA-exposure, so it would be relevant to identify posttranslational modifications possibly present in I $\kappa$ B $\alpha$  at the different stages of the carcinogenic process and to investigate the roles this protein might be playing in each stage. Intensive efforts are being conducted in the author's laboratory in this respect. Furthermore, a common therapeutic approach is to prevent the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ , but the true contribution of this protein to cancer pathogenesis is far from being understood (43).

Regarding EGFR, protein levels increased similarly after either one or two months of FeNTA exposure, as well as those of its mRNA, indicating a transcriptional regulation. Nevertheless, the increase in the receptor's protein levels was notably higher (around 25-30 times vs. C) than that of its mRNA (1.4 times vs. C), hence translational and/or posttranslational events may be involved too. Furthermore, although to a lesser extent, EGFR protein levels also increased more than its mRNA levels in the experimental tumors (2 vs. 1.4 times, respectively). EGFR, for example, may have a greater stability, as a result of a decrease in its degradation. This hypothesis is supported by Zhou and Yang (45), who demonstrated deficient EGFR degradation in human ccRCC cell lines induced by an accumulation of HIF2 $\alpha$ , which suppresses rabaptin-5 gene expression, thus delaying EGFR lysosomal degradation, since this protein mediates endosome-lysosome fusion. Results from the author's laboratory, soon to be published, also indicate an increase of HIF2 $\alpha$  renal levels after two months of FeNTA-exposure as well as in the induced tumors. This mechanism may explain the cytoplasmic localization of EGFR found in the present study too. It is unknown, however, if this mechanism takes place in rats.

In the first month, the increase of EGFR mRNA levels coincided with the rise found in NF- $\kappa$ B activity, suggesting that this transcriptional factor is at least one of the causes of the receptor's response. After two months, however, while EGFR mRNA levels were still high, NF- $\kappa$ B's activity decreased, so the receptor's increment could be a consequence of other factors. For example, HIF2 $\alpha$ , which aside from participating in EGFR stabilization as previously discussed, is likewise involved in EGFR gene expression and preliminary results from the authors' research group suggest an increase in the HIF2 $\alpha$  transcription factor after two months' exposure, but not at the first one, contrary to that observed for NF- $\kappa$ B. Therefore, EGFR mRNA levels accretion may be the response to NF- $\kappa$ B's activity after one month of FeNTA-exposure and to HIF2 $\alpha$ 's activity at the second one. Another transcription

factor probably involved as well in the noticed EGFR behavior is AP-1, since there are 7 target sequences for it (c-Jun) in the gene promoter of the receptor (46) and an increase of AP-1 activity (c-Jun EMSA) at the early stages of FeNTA-induced renal carcinogenesis has been observed (still unpublished results of our group). On the other hand, although EGFR's most studied and reported function is as a cell membrane receptor transducing extracellular signals, its nuclear translocation has also been demonstrated, where it acts as a transcription co-factor linked to other proteins including STAT3, STAT5 and E2F1 (47,48), or stimulates DNA repair by associating with the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinases when DNA is damaged (49-51). Therefore, EGFR subcellular location was determined, finding that this receptor is present and increased in the cytoplasm, but also in the nucleus after either one or two months of FeNTA-exposure, while in tumors the vast majority was in the cytoplasm. Hence, at the early stages of carcinogenesis, EGFR may be participating in renal cells' transformation by stimulating signaling pathways associated with cell proliferation, angiogenesis, invasion and apoptosis inhibition, but also may be playing anti-oncogenic roles such as DNA repair promotion as a protective mechanism against FeNTA-induced oxidative damage (52); moreover, EGFR may also be playing these anti-oncogenic roles in the non-transformed renal tissue areas (NTT and AT), where this receptor was observed in the nucleus more frequently compared with tumors. In contrast, in the neoplastic tissue, EGFR could be preferentially participating in tumor maintenance by inducing, for example, angiogenic signaling pathways, as this receptor was preferentially localized in the cytoplasm. Nevertheless, what EGFR is indeed doing at each stage of carcinogenesis should be investigated in future studies.

Finally, whether the alterations in p65, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR observed in kidney were also present in liver and lungs, as it is known that FeNTA and DEN may cause hepatic and/or pulmonary damage was determined (53). Data indicated no alterations in either of these organs, so the behavior observed in p65, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR is very probably kidney specific. Since the authors previously reported that, using the scheme of FeNTA-exposure followed in the present study, no primary tumors were developed in the liver or lungs (5,6), these observations strongly support the participation of the molecules analyzed in the current study in renal carcinogenesis.

It is worth pointing out that the present results, together with the great similarity with histological and mitogen associated protein kinase's behavior previously reported (5,6), reinforce the resemblance between the experimental and human renal carcinoma, and strengthen the usefulness of the experimental model to study this type of cancer, particularly in its early stages, which are almost impossible to analyze in patients.

In conclusion, according to the evidence obtained in the present work, NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR are probably implicated in the carcinogenic process, but these molecules undergo different adjustments as it evolves. In summary, a classical combination of changes was observed in tumors, suggesting that these molecules may be important for maintenance of the malignant phenotype, as has been proposed in human RCC. On the contrary, in the two early stages assessed, distinctive non-conventional combinations of changes and subcellular distributions were observed, suggesting that their behavior

could be related to different signaling pathways and therefore to particular effects depending on the phase of the carcinogenic process. Given the similarity of experimental and human neoplasms, this could also happen in human carcinoma development. Therefore, novel insights were provided in the present study to continue searching for mechanisms other than the classic roles of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR, which may be responsible for the renal cells' malignant transformation, and then to identify molecular markers that lead to an opportune detection and to develop more effective therapeutic and/or preventive strategies against RCC.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Lucía Macías Rosales, (Animal Experimentation Unit, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico), for her assistance in animal care and treatment. Also, the authors acknowledge Dr Elena Martínez-Klimova, (Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico), for her contribution to the language editing of the manuscript.

### Funding

The present study was supported by the Universidad Nacional Autónoma de México through Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT; grant nos. IN227010, IN221313 and IN228716), the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) through Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (grant no. 284155) and the Facultad de Química through Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP; grant no. 5000-9109), given to MEIR. TPP, FAA, CVO and PCM received a fellowship from CONACyT. Also special thanks to Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) for the donation received.

### Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### Authors' contributions

TPP participated in the experimental design, carcinogenesis protocol execution, all the results generation, analysis and interpretation, and is a main contributor of the manuscript preparation. FAA participated in the carcinogenesis protocol execution, electrophoretic-mobility shift assay and reverse transcription-PCR techniques standardization, data analysis and interpretation, figures design, and manuscript drafting and critical revision. JDS participated in the carcinogenesis protocol execution, different techniques advising, as well as data analysis and interpretation. CVO established the carcinogenesis protocol in our laboratory and participated in western blotting results analysis and interpretation. PCM participated in the carcinogenesis protocol execution, data analysis and interpretation, figures design, and manuscript critical revision. CAMR participated in IHC technique advising,

standardization and images acquisition, processing, analysis and interpretation. DTH contributed in IHC assays execution and results generation. MEIR followed and advised throughout the project, participated in experimental conception and design, samples extraction, data analysis and interpretation, and is a main contributor of the manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

### Ethics approval and consent to participate

All experiments involving animals were performed according to the Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-199 and with the approval of the Institutional Committee for the Use and Care of Laboratory Animals (FQ/CICUAL/081/14). Ethical approval for the animal experiments conducted in the study was obtained non-retrospectively. In addition, tumor burden did not exceed the recommended dimensions and rats were anesthetized and sacrificed by acceptable methods.

### Patient consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### References

- Makhov P, Joshi S, Ghatalia P, Kutikov A, Uzzo RG and Kolenko VM: Resistance to systemic therapies in clear cell renal cell carcinoma: Mechanisms and management strategies. *Mol Cancer Ther* 17: 1355-1364, 2018.
- Peri S, Devarajan K, Yang DH, Knudson AG and Balachandran S: Meta-analysis identifies NF- $\kappa$ B as a therapeutic target in renal cancer. *PLoS One* 8: e76746, 2013.
- Morais C, Gobe G, Johnson DW and Healy H: The emerging role of nuclear factor kappa B in renal cell carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 1537-1549, 2011.
- Muglia VF and Prando A: Renal cell carcinoma: Histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras* 48: 166-174, 2015.
- Aguilar-Alonso FA, Solano JD, Vargas-Olvera CY, Pacheco-Bernal I, Pariente-Pérez TO and Ibarra-Rubio ME: MAPKs' status at early stages of renal carcinogenesis and tumors induced by ferric nitrilotriacetate. *Mol Cell Biochem* 404: 161-170, 2015.
- Vargas-Olvera CY, Sánchez-González DJ, Solano JD, Aguilar-Alonso FA, Montalvo-Muñoz F, Martínez-Martínez CM, Medina-Campos ON and Ibarra-Rubio ME: Characterization of N-diethylnitrosamine-initiated and ferric nitrilotriacetate-promoted renal cell carcinoma experimental model and effect of a tamarind seed extract against acute nephrotoxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 369: 105-117, 2012.
- Mitchell S, Vargas J and Hoffmann A: Signaling via the NF $\kappa$ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 8: 227-241, 2016.
- Hayden MS and Ghosh S: Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol* 26: 253-266, 2014.
- Desterro JM, Rodriguez MS and Hay RT: SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2: 233-239, 1998.
- Renard P, Percherancier Y, Kroll M, Thomas D, Virelizier JL, Arenzana F and Bachelier F: Inducible NF-kappaB activation is permitted by simultaneous degradation of nuclear I $\kappa$ B $\alpha$ . *J Biol Chem* 275: 15193-15199, 2000.
- Lua J, Qayyum T, Edwards J and Roseweir AK: The prognostic role of the non-canonical nuclear factor-kappa B pathway in renal cell carcinoma patients. *Urol Int* 101: 190-196, 2018.
- Meteoglu I, Erdogdu IH, Meydan N, Erkus M and Barutca S: NF-kappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell carcinoma tissues. *J Exp Clin Cancer Res* 27: 53, 2008.
- Morais C, Pat B, Gobe G, Johnson DW and Healy H: Pyrrolidine dithiocarbamate exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects in renal cell carcinoma cell lines. *Nephrol Dial Transplant* 21: 3377-3388, 2006.
- Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, Mizuno R, Ohtsubo M, Marumo K, Shimizu N and Murai M: Increased nuclear factor- $\kappa$ B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 24: 377-384, 2003.
- Soubrier C, Danilin S, Lindner V, Steger J, Rothhut S, Meyer N, Jacqmin D, Helwig JJ, Lang H and Massfelder T: Targeting the nuclear factor- $\kappa$ B rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* 67: 11668-11676, 2007.
- Dorđević G, Matushan-Ilijaš K, Sinožić E, Damante G, Fabbro D, Grahovac B, Lučin K and Jonjić N: Relationship between vascular endothelial growth factor and nuclear factor- $\kappa$ B in renal cell tumors. *Croat Med J* 49: 608-617, 2008.
- An J and Rettig MB: Epidermal growth factor receptor inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to the cytotoxic effects of bortezomib. *Mol Cancer Ther* 6: 61-69, 2007.
- Oka D, Nishimura K, Shiba M, Nakai Y, Arai Y, Nakayama M, Takayama H, Inoue H, Okuyama A and Nonomura N: Sesquiterpene lactone parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of renal cell carcinoma by inhibiting the activation of NF-kappaB. *Int J Cancer* 120: 2576-2581, 2007.
- Ng KL, Yap NY, Rajandram R, Small D, Pailoor J, Ong TA, Razack AH, Wood ST, Morais C and Gobe GC: Nuclear factor-kappa B subunits and their prognostic cancer-specific survival value in renal cell carcinoma patients. *Pathology* 50: 511-518, 2018.
- Thornburg NJ and Raab-Traub N: Induction of epidermal growth factor receptor expression by Epstein-barr virus latent membrane protein 1 C-terminal-activating region 1 is mediated by NF- $\kappa$ B p50 Homodimer/Bcl-3 complexes. *J Virol* 81: 12954-12961, 2007.
- Staruschenko A, Palygin O, Ilatovskaya DV and Pavlov TS: Epidermal growth factors in the kidney and relationship to hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F12-F20, 2013.
- Zeng F, Singh AB and Harris RC: The role of the EGF family of ligands and receptors in renal development, physiology and pathophysiology. *Exp Cell Res* 315: 602-610, 2009.
- Cohen D, Lane B, Jin T, Magi-Galluzzi C, Finke J, Rini BI, Bukowski RM and Zhou M: The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in clear-cell renal cell carcinoma: A call for standardized methods for immunohistochemical evaluation. *Clin Genitourinary Cancer* 5: 264-270, 2007.
- Kallio JP, Hirvikoski P, Helin H, Kellokumpu-Lehtinen P, Luukkaala T, Tammela TL and Martikainen PM: Membranous location of EGFR immunostaining is associated with good prognosis in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 89: 1266-1269, 2003.
- Kankaya D, Kiremitci S, Tulunay O and Baltaci S: Prognostic impact of epidermal growth factor receptor on clear cell renal cell carcinoma: Does it change with different expression patterns? *Indian J Pathol Microbiol* 59: 35-40, 2016.
- Merseburger AS, Hennenlotter J, Simon P, Kruck S, Koch E, Horstmann M, Kuehs U, Küfer R, Stenzl A and Kuczyk MA: Membranous expression and prognostic implications of epidermal growth factor receptor protein in human renal cell cancer. *Anticancer Res* 25: 1901-1907, 2005.
- Mock H, Sauter G, Buchholz N, Gasser TC, Bubendorf L, Waldman FM and Mihatsch MJ: Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor cell proliferation in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 28: 1255-1259, 1997.
- Pu YS, Huang CY, Kuo YZ, Kang WY, Liu GY, Huang AM, Yu HJ, Lai MK, Huang SP, Wu WJ, *et al*: Characterization of membranous and cytoplasmic EGFR expression in human normal renal cortex and renal cell carcinoma. *J Biomed Sci* 16: 82-82, 2009.
- Athar M and Iqbal M: Ferric nitrilotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: Implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis* 19: 1133-1139, 1998.
- Ebina Y, Okada S, Hamazaki S, Ogino F, Li JL and Midorikawa O: Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of Iron- and aluminum-nitrilotriacetate complexes in Rats2. *J Natl Cancer Inst* 76: 107-113, 1986.
- Jahangir T and Sultana S: Modulatory effects of shape pluchea lanceolata against chemically induced oxidative damage, hyperproliferation and Two-stage renal carcinogenesis in wistar rats. *Mol Cell Biochem* 291: 175-185, 2006.

32. Mendoza-Rodriguez CA, Monroy-Mendoza MG, Morimoto S and Cerbón MA: Pro-apoptotic signals of the bcl-2 gene family in the rat uterus occurs in the night before the day of estrus and precedes ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 208: 31-39, 2003.
33. Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW: NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-675, 2012.
34. Ledeganck KJ, Boulet GA, Horvath CA, Vinckx M, Bogers JJ, Van Den Bossche R, Verpooten GA and De Winter BY: Expression of renal distal tubule transporters TRPM6 and NCC in a rat model of cyclosporine nephrotoxicity and effect of EGF treatment. *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F486-F493, 2011.
35. Cai FG, Xiao JS and Ye QF: Effects of ischemic preconditioning on cyclinD1 expression during early ischemic reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 12: 2936-2940, 2006.
36. Rehman MU, Tahir M, Khan AQ, Khan R, Lateef A, Oday OH, Qamar W, Ali F and Sultana S: Chrysin suppresses renal carcinogenesis via amelioration of hyperproliferation, oxidative stress and inflammation: Plausible role of NF- $\kappa$ B. *Toxicol Lett* 216: 146-158, 2013.
37. Siddiqi A, Hasan SK, Nafees S, Rashid S, Saidullah B and Sultana S: Chemopreventive efficacy of hesperidin against chemically induced nephrotoxicity and renal carcinogenesis via amelioration of oxidative stress and modulation of multiple molecular pathways. *Exp Mol Pathol* 99: 641-653, 2015.
38. Christian F, Smith EL and Carmody RJ: The regulation of NF- $\kappa$ B subunits by phosphorylation. *Cells* 5: pii: E12, 2016.
39. Perkins ND: Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 25: 6717-6730, 2006.
40. Espinosa L, Bigas A and Mulero MC: Novel functions of chromatin-bound I $\kappa$ B $\alpha$  in oncogenic transformation. *Br J Cancer* 111: 1688-1692, 2014.
41. Cantile M, Schiavo G, Franco R, Cindolo L, Procino A, D'Armiento M, Facchini G, Terracciano L, Botti G and Cillo C: Expression of lumbosacral HOX genes, crucial in kidney organogenesis, is systematically deregulated in clear cell kidney cancers. *Anticancer Drugs* 22: 392-401, 2011.
42. Mulero MC, Ferres-Marco D, Islam A, Margalef P, Pecoraro M, Toll A, Drechsel N, Charneco C, Davis S, Bellora N, *et al*: Chromatin-bound I $\kappa$ B $\alpha$  regulates a subset of polycomb target genes in differentiation and cancer. *Cancer Cell* 24: 151-166, 2013.
43. Morotti A, Crivellaro S, Panuzzo C, Carrà G, Guerrasio A and Saglio G: I $\kappa$ B- $\alpha$ : At the crossroad between oncogenic and tumor-suppressive signals. *Oncol Lett* 13: 531-534, 2017.
44. Okada K, Wangpoengtrakul C, Osawa T, Toyokuni S, Tanaka K and Uchida K: 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during Oxidative Stress: Identification of proteasomes as target molecules. *J Biol Chem* 274: 23787-23793, 1999.
45. Zhou L and Yang H: The von Hippel-lindau tumor suppressor protein promotes c-Cbl-independent poly-ubiquitylation and degradation of the activated EGFR. *PLoS One* 6: e23936, 2011.
46. Johnson AC, Murphy BA, Matelis CM, Rubinstein Y, Piebenga EC, Akers LM, Neta G, Vinson C and Birrer M: Activator protein-1 mediates induced but not basal epidermal growth factor receptor gene expression. *Mol Med* 6: 17-27, 2000.
47. Brand TM, Iida M, Luthar N, Starr MM, Huppert EJ and Wheeler DL: Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother Oncol* 108: 370-377, 2013.
48. Sharmila R and Sindhu G: Evaluate the antigenotoxicity and anticancer role of  $\beta$ -sitosterol by determining oxidative DNA damage and the expression of phosphorylated Mitogen-activated Protein Kinases, C-fos, C-jun, and endothelial growth factor receptor. *Pharmacogn Mag* 13: 95-101, 2017.
49. Bandyopadhyay D, Mandal M, Adam L, Mendelsohn J and Kumar R: Physical Interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* 273: 1568-1573, 1998.
50. Goodwin JF and Knudsen KE: Beyond DNA repair: DNA-PK function in cancer. *Cancer Discov* 4: 1126-1139, 2014.
51. Liccardi G, Hartley JA and Hochhauser D: EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res* 71: 1103-1114, 2011.
52. Toyokuni S, Mori T and Dizdaroglu M: DNA base modifications in renal chromatin of wistar rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Int J Cancer* 57: 123-128, 1994.
53. Ansar S, Iqbal M and Athar M: Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitrilotriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. *Carcinogenesis* 20: 599-606, 1999.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) License.