



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Efecto del carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro y de un antioxidante polifenólico sobre la expresión del gen de ciclina D1”.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:
DORYS ADRIANA LÓPEZ RAMOS**



MÉXICO, D.F.

2007



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.

Jurado asignado:

Presidente	Dr. José Pedraza Chaverri
Vocal	Dr. Francisco Hernández Luis
Secretario	Dra. María Elena Ibarra Rubio
1er. Suplente	Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta
2º. Suplente	M. en C. José Ignacio Páramo Ramírez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 120 del departamento de biología en el edificio F de la facultad de química, UNAM.

Reconocimientos:

El proyecto fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico bajo el PAPIIT No. IN-224805 y No. IN-214307.

En los primeros 6 meses del desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo otorgado por el Colegio de Profesores de la facultad de química y la sección 024 del AAPAUNAM por haber ganado la cátedra “Jacobo Gómez Lara”. Posteriormente se contó con el apoyo de beca por parte del PAPIIT No. IN-214307.

Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio
Asesor

Dorys Adriana López Ramos
Sustentante

ÍNDICE

RESUMEN	2
1. ANTECEDENTES	4
1.1. Estrés oxidante	4
1.2. Antioxidantes	5
1.2.1. <i>Tamarindus indica</i> L.	7
1.3. Cáncer	7
1.3.1. Ciclo celular	8
1.3.2. Transición G1/S y ciclina D1	10
1.4. Cáncer renal	11
1.4.1. Nitritotriacetato de hierro (FeNTA)	12
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVOS	14
5. METODOLOGÍA	15
5.1. Preparación del extracto de tamarindo	15
5.2. Capacidad antioxidante	15
5.3. Diseño experimental in vivo	15
5.4. Preparación de FeNTA	16
5.5. Daño por oxidación a proteínas	16
5.6. Lipoperoxidación	17
5.7. Niveles de H ₂ O ₂	17
5.8. Síntesis de las sondas de ciclina D1 y GAPDH	18
5.9. Expresión de ciclina D1	20
5.10. Estadística	21
6. RESULTADOS	22
6.1. Extracto de tamarindo	22
6.2. Estrés oxidante por FeNTA <i>in vivo</i>	24
6.3. Expresión de ciclina D1	25
7. DISCUSIÓN	30
8. CONCLUSIONES	35
9. ANEXO DE TÉCNICAS Y SOLUCIONES	36
10. BIBLIOGRAFÍA	63

RESUMEN

El estrés oxidante se define como el desbalance entre la producción de especies oxidantes, principalmente las especies reactivas de oxígeno, y las defensas antioxidantes del organismo. Esta condición se ha asociado a diversas patologías, entre ellas el cáncer. Por ello, se ha puesto gran atención en moléculas antioxidantes para prevenir o tratar estas enfermedades. En especial, se ha demostrado que los compuestos polifenólicos que se encuentran en las frutas y verduras, están entre los compuestos con mayor capacidad antioxidante, y una de las frutas con alto contenido de estos compuestos es el tamarindo. Por otro lado, uno de los tipos de cáncer menos estudiados y con una alta mortalidad es el cáncer renal. El modelo experimental más utilizado para su estudio es el de carcinoma renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en roedores.

Una forma de ver al cáncer es como una enfermedad del ciclo celular. Muy poco se sabe sobre las alteraciones en la transición G1/S del ciclo celular en el carcinoma renal. La sobre expresión de ciclina D1 es una alteración común observada en diversos tumores. Por ello, se decidió investigar si la expresión de este gen se altera en un estudio agudo con FeNTA, pudiendo estar involucrado en su mecanismo de carcinogenicidad, y si un extracto de tamarindo rico en polifenoles protege contra esta alteración.

Los estudios se realizaron en ratas macho Wistar de 250 g el día del sacrificio. Se dividieron en 4 grupos (n= 4-7) denominados control, tamarindo, FeNTA y tamarindo+FeNTA. Los grupos control y FeNTA recibieron durante 15 días agua vía i.g., mientras los grupos tamarindo y tamarindo+FeNTA recibieron extracto de tamarindo a una dosis aproximada de 30 mg de fenoles/Kg de peso corporal. Al término del tratamiento se administró FeNTA vía i.p a las ratas de los grupos FeNTA y tamarindo+FeNTA, y a los grupos control y tamarindo se les administró el vehículo. Las ratas se sacrificaron por decapitación una hora después de esta administración. Se extrajeron ambos riñones y se separó la corteza, en la que se realizaron las diferentes determinaciones.

Se midió el daño por oxidación en proteínas y en lípidos, así como los niveles de peróxido de hidrógeno. El FeNTA provocó un aumento en estos tres parámetros y se observó que el extracto de tamarindo protegió. El tratamiento únicamente con extracto de tamarindo no tuvo efecto sobre los parámetros de estrés oxidante determinados.

Para determinar la expresión del gen de ciclina D1 se montaron las técnicas de biología molecular necesarias. Esto consistió en la síntesis de las sondas específicas para el

ARNm de ciclina D1 y GAPDH por la reacción de RT-PCR, el marcaje de las sondas con digoxigenina y el montaje de la técnica de Northern blot.

Los resultados mostraron que la expresión del gen de ciclina D1 no se altera una hora después de la administración intraperitoneal de FeNTA y ni por el tratamiento de las ratas con el extracto de tamarindo.

1. ANTECEDENTES

1.1. Estrés Oxidante

En condiciones normales, la célula mantiene un equilibrio entre las especies reactivas oxidantes y las defensas antioxidantes. Cuando este equilibrio se rompe se presenta el fenómeno llamado estrés oxidante (Zentella, et.al., 1995). Entre las especies reactivas oxidantes se encuentran aquellas derivadas del oxígeno las cuales denominaremos como ERO a lo largo del presente trabajo.

Entre las ERO se encuentran el radical superóxido, formado por la adición de un electrón al oxígeno molecular, el peróxido de hidrógeno, formado como intermediario en la producción de otras ERO, y el radical hidroxilo, formado por el peróxido de hidrógeno a través de la reacción de Fenton (Menestra, 2007; Nordberg, et.al., 2001).

Las ERO se producen de manera endógena durante diversos procesos como la inflamación y la cadena respiratoria que se lleva a cabo en la mitocondria (Klaunig, et.al., 2004).

Se sabe que las ERO juegan un doble papel en los sistemas biológicos ya que pueden tener efectos benéficos o dañinos dependiendo de las condiciones en las que se presenten (Valko, 2006). Por un lado, las ERO son capaces de estimular algunas respuestas celulares. Estas respuestas pueden dividirse en 5 categorías: 1) modulación de la acción y secreción de citocinas, factores de crecimiento y hormonas, 2) transporte de iones, 3) transcripción, 4) neuromodulación, y 5) apoptosis (Lander, 1997; Allen, et al., 2000).

Aún no se ha comprendido por completo el mecanismo molecular por el cual el estado de oxido-reducción de la célula regula diversas vías de señalización y factores de transcripción. Sin embargo, los efectos producidos por alteraciones en este estado de la célula parecen estar mediados a través de la oxidación o reducción de los grupos sulfhidrilo de las proteínas, generalmente de proteínas G, algunos factores de transcripción y canales iónicos. Entre las vías de señalización sensibles al estado redox que más se han estudiado se encuentran la regulación del factor de transcripción NF- κ B y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Lander, 1997; Allen, et al., 2000).

Por otro lado, en altas concentraciones las ERO pueden tener efectos tóxicos, y para protegerse las células cuentan con defensas antioxidantes (Sun, 1990; Oberley, 2002). Entre estas se pueden mencionar las enzimas: catalasa, que cataliza la formación de agua y oxígeno a partir de peróxido de hidrógeno; superóxido dismutasa, que convierte al radical superóxido en peróxido de hidrógeno; y glutatión peroxidasa, que transforma al peróxido de hidrógeno en agua (Evans, et.al., 2001; Matés, et.al., 1999; Zentella, 1995).

Dentro de los efectos nocivos que pueden tener las especies reactivas de oxígeno están el daño a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, una de las razones por las que se relaciona al estrés oxidante con diferentes patologías como hipertensión, diabetes y cáncer (Benzei, 2003; Matés, et.al., 1999). Además de su participación en la regulación de vías de señalización como ya se mencionó anteriormente.

1.2. Antioxidantes

Dado que el estrés oxidante se ha visto implicado en diversas enfermedades, se ha puesto especial interés en estudiar el potencial de los agentes antioxidantes para tratar de prevenir o contrarrestar estas enfermedades (Scalbert, et. al., 2005).

En especial, hay un gran interés por los compuestos polifenólicos debido a que se les han encontrado capacidades antioxidantes notorias que resultan benéficas para la salud humana (Bravo, 1998).

Estos compuestos son productos secundarios del metabolismo de las plantas, principalmente de las vías del ácido siquímico y acetato (Bravo, 1998; Ross, 2002). En la naturaleza, los polifenoles pueden variar desde moléculas simples hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos. En general, se presentan de manera conjugada con uno o más azúcares unidos a sus grupos hidroxilo lo que tiende a hacerlos solubles en agua (Bravo, 1998; Ross, 2002).

Los grupos hidroxilo de estos compuestos pueden aceptar un electrón para formar radicales relativamente estables y de esta manera interrumpir la cadena de reacciones de

oxidación provocada por los radicales libres en los componentes celulares (Scalbert, et al., 2005). Además, actúan como quelantes de metales que pueden catalizar la peroxidación de lípidos, afectar la transcripción de genes y la expresión de numerosas proteínas de señalización por medio de su interacción con proteínas y la generación de ERO (Harris, 2003; Valko, 2006).

Este extenso grupo de compuestos puede dividirse en 10 clases, fenoles simples, benzoquinonas, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, cumarinas e isocumarinas, cromonas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, lignanos y ligninas, y flavonoides. De estas 10 clases de compuestos polifenólicos destacan los flavonoides por ser los más abundantes en las plantas (Bravo, 1998). Las propiedades antioxidantes de los flavonoides se deben a su capacidad para reaccionar con los radicales libres y para inducir a las defensas antioxidantes endógenas (Ross, et al., 2002).

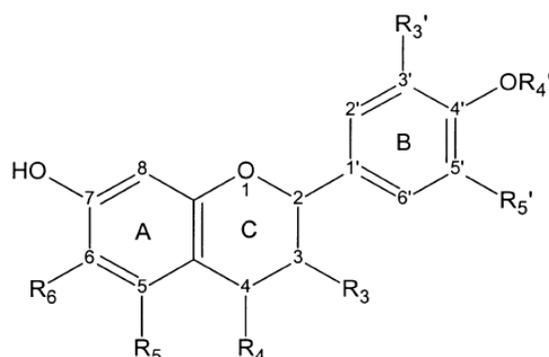


Fig.1. Esqueleto general de un flavonoide. La numeración y denominación de los anillos se hizo de acuerdo a Nichenametla, 2006

Los compuestos polifenólicos se encuentran en las frutas, verduras y granos, por lo que una dieta rica en estos alimentos se ha relacionado con una menor incidencia de enfermedades como ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Nichenametla et al., 2006; Sun, et al., 2002; Ross, et al., 2002). Entre los frutos con gran contenido de antioxidantes polifenólicos se encuentra el tamarindo.

1.2.1. *Tamarindus indica* L.

Tamarindus indica L. es un árbol perteneciente a la familia leguminosae. Su fruto, unas vainas de color pardo con un epicarpio quebradizo y que contienen varias semillas envueltas por una pulpa fibrosa de color pardo oscuro, se conoce como tamarindo. La pulpa se utiliza como condimento en ciertos tipos de cocina y en la preparación de refrescos, confituras y helados. Se ha reportado que la actividad antioxidante de extractos de pulpa y pericarpio se debe principalmente a la presencia de taninos y procianidinas que pertenecen al grupo de los flavonoides. Además, la pulpa de la fruta contiene azúcares, ácidos orgánicos como el cítrico, acético, tartárico y ascórbico, pectinas, vitaminas, minerales y calcio, y se le atribuyen propiedades digestivas, carminativas, laxantes y expectorantes (Sudjaroen, et. al., 2005; Parrota, 2001).



Fig.2. Tamarindo (Sleekfreak.ath.cx:81, 2007)

1.3. Cáncer

El cáncer se define como una enfermedad genética que se caracteriza por un crecimiento tisular debido a la proliferación descontrolada y continua de células anormales, que en los estadios más avanzados adquieren la capacidad de invasión y colonización de otros tejidos (Alberts, 2002).

El desarrollo de cáncer depende de muchos factores como la dieta, el estilo de vida y el ambiente del individuo (Soobrattee, 2006; Lee, et.al., 2006). También se tienen evidencias de la participación del estrés oxidante en su desarrollo, sin embargo el mecanismo específico por el cual lo hace se desconoce. Se han propuesto varios mecanismos. Uno de ellos es a través de la participación de las ERO en diversas vías de transducción de

señales alterando factores de crecimiento, cinasas y fosfatasas, y factores de transcripción, lo que puede alterar la expresión de algunos genes (Crawford, 1995, Valko, 2004; Kehrer, 2000). Otro mecanismo involucra el daño por oxidación al DNA que podría provocar mutaciones y alteraciones en la transcripción (Kehrer, 2000; Valko, 2004).

Entre las alteraciones esenciales que caracterizan el crecimiento maligno de las células están incluidas: la autosuficiencia en señales de crecimiento, la insensibilidad a señales anti-crecimiento, la evasión de apoptosis, el potencial replicativo ilimitado, la angiogénesis sostenida y la invasión de tejidos y metástasis (Hanahan, 2000; Mikhail, 2003).

Una manera de ver el cáncer es como una enfermedad del ciclo celular (Bartek, et. al., 1999). Esto se debe a que, en los últimos años, se ha observado que la mayoría de las células tumorales han sufrido uno o más defectos que alteran la maquinaria del ciclo celular. Dichos defectos pueden tener como blanco componentes directos del ciclo o cascadas de señalización que finalmente lo afectarán. El resultado es una desregulación en el ciclo celular y un ambiente propenso al desarrollo de cáncer (Bartek, 1999; Hall, et.al., 1996; Sherr, 1996).

1.3.1. Ciclo celular.

Las células se reproducen a través de una secuencia ordenada de eventos en la que se duplica su contenido y se dividen en dos. Este ciclo de duplicación y división se conoce como ciclo celular (Alberts, 2002).

El ciclo celular se compone básicamente de 4 fases denominadas G1 (gap 1), S (fase de síntesis), G2 (gap 2) y M (fase de mitosis).

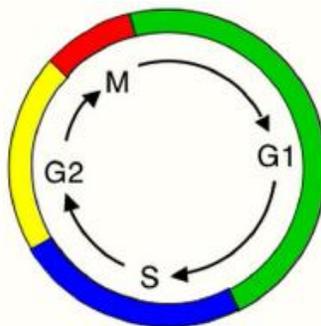


Fig.3. Fases del ciclo celular (van den Heuvel, 2005)

Durante la fase G1 las células crecen y llevan un metabolismo normal, en la fase S ocurre la replicación del DNA y se duplican los cromosomas, en la fase G2 la célula crece y se prepara para la mitosis y, finalmente, en la fase M los cromosomas se separan y la célula se divide para dar origen a dos células hijas (Karp, 2002). Existe una quinta fase denominada G0. En ella se encuentran las células metabólicamente activas pero que no prosiguen con el ciclo celular (Schafer, 1998; Shackelford, et al., 2000).

Dada la importancia del ciclo celular, es casi imposible pensar que este ocurra sin un complejo sistema de regulación. Para ello, se cuentan con puntos de control (también llamados puntos de restricción) en algunas de las fases del ciclo. Los puntos de control están ubicados al final de las fases G1, G2 y M. En el punto ubicado en G2 se verifica que el material genético y las estructuras celulares se hayan duplicado correctamente antes de que el proceso de división comience (Tessema, 2004). El control en la fase M consiste en verificar que los cromosomas estén alineados de manera adecuada para su división (Karp, 2002). En el punto de control de G1, la célula decide si entra a un nuevo ciclo de división o permanece en fase G1 o G0 dependiendo de los estímulos intra y extracelulares (Tessema, 2004).

Dentro del sistema de control del ciclo celular están involucradas diversas proteínas reguladoras las cuales actúan en los puntos de control del ciclo para asegurar que no se avance a la siguiente fase hasta que la anterior se haya completado de manera adecuada (Alberts, 2002; Schafer, 1998; Tessema, 2004). Entre estas proteínas se encuentran las ciclinas dependientes de cinasas (o CDK's) y las ciclinas (Diel, 2002; Schafer, 1998). Las CDK's son un grupo de serin treonin proteincinasas que forman complejos con sus subunidades reguladoras, las ciclinas (Malumbres, 2001). Las ciclinas son una familia de proteínas que aparecen y desaparecen durante las fases del ciclo (de ahí su nombre) gracias a la regulación de la transcripción de sus genes y de la degradación de las proteínas (Tessema, 2004). Por ejemplo, la expresión de ciclina D1, uno de los 3 tipos de ciclina D que participan en la fase G1, está estrictamente regulada durante el ciclo celular a nivel de expresión de proteína, activación de la transcripción y localización celular. Entre las vías de señalización que están involucradas en su regulación se encuentra la de Ras/Raf/MAPK que incrementa la transcripción del gen de ciclina D1 por la activación del factor de transcripción ETS. Además de activarse por el factor ETS, la transcripción también puede activarse por otros factores de transcripción que tienen sitios de unión en

su región promotora como NF- κ B y AP-1. También se encuentra la vía de Ras/PI3K/Akt/GSK-3 β que regula la degradación de ciclina D1 a través de su fosforilación y ubiquitinación. Se ha visto que algunas de estas vías son sensibles, entre otros factores, al estado redox de la célula (Coqueret, 2002; Gladden, et al., 2005; Musgrove, 2006).

1.3.2. Transición G1/S y ciclina D1

Las CDK's que participan en la transición G1/S son CDK4, CDK6 y CDK2, y el tipo de ciclinas a las que se unen son las ciclinas D y E (Malumbres, 2001). Los complejos formados entre las ciclinas y las CDK's regulan el progreso del ciclo celular (Collins, 2005).

Mientras las células se encuentran en la fase G1 y no hay estímulos que le indiquen entrar a un nuevo ciclo de división, la proteína retinoblastoma pRb (un inhibidor del progreso del ciclo celular) se encuentra unida al factor de transcripción E2F. Este factor activa la transcripción de genes importantes para el progreso a la fase S, como los de las ciclinas tipo E y CDK 2 que se unen en la etapa tardía de la fase G1, y de esta manera bloquea su actividad. Cuando la célula recibe señales que le indican el inicio de un nuevo ciclo, se forman los complejos entre CDK4/6-Ciclina D, los cuales fosforilan a pRb para que libere al factor de transcripción E2F y se pueda llevar a cabo su actividad (Alberts, 2002; Tessema, 2004).

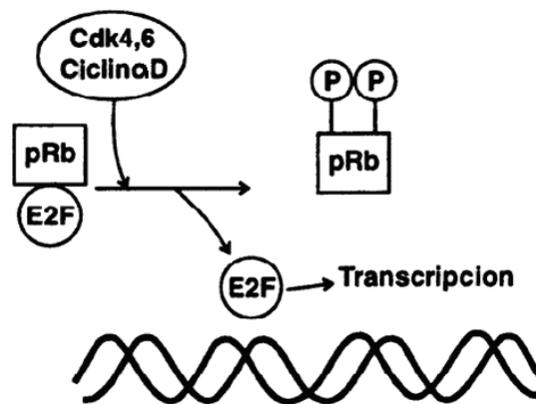


Fig.4. Esquema de la activación de E2F por los complejos de ciclina – CDK's (Schafer, 1998).

Existen 3 tipos de cilinas D: D1, D2 y D3. De estos tres tipos destaca la ciclina D1 que se ha caracterizado como un proto-oncogen, es decir, en condiciones propicias puede ser

activado como oncogen y funcionar como acelerador de la proliferación celular y tumorigénesis (Karp, 2002; Diehl, 2002).

Dentro de las alteraciones en la transición G1/S que se han observado en diferentes tipos de cáncer, la sobre expresión de ciclina D1 es una de las más comunes (Alberts, 2002; Malumbres, 2001; Diehl, 2002; Hedberg, 1999; Hedberg, 2003; Fu, 2007).

Esta sobre expresión se ha observado en el desarrollo de diversos tipos de cáncer como el de pulmón, vejiga, esófago y mama (Alao, 2007), por lo que ha aumentado la importancia de su estudio en los últimos años, y se ha propuesto la posibilidad de utilizar a las ciclinas como blancos de agentes quimiopreventivos (Alao, 2007; Petty, 2003). De hecho, varios experimentos han demostrado que algunos agentes terapéuticos inducen la degradación de ciclina D1 en células cancerosas, lo que puede ser una nueva estrategia para el tratamiento de cáncer (Alao, 2007).

1.4. Cáncer renal

El carcinoma celular renal es un tipo de cáncer renal que se origina en las células de los túbulos renales (Drucker, 2005). Este tipo de cáncer generalmente carece de signos o síntomas que adviertan su presencia, por lo que generalmente se detecta en etapas tardías, y aproximadamente de 20 a 30% de los pacientes que lo padecen presentan metástasis al momento del diagnóstico, además de que 50% de los pacientes con la enfermedad localizada desarrollan metástasis (Milowsky, 2003). Más aún, su tratamiento también es complicado ya que este cáncer es resistente a diversos agentes citotóxicos, y, comparado con otros tipos de cáncer, la quimioterapia también resulta ineficiente (Sternberg, 2003; Milowsky, 2003; Nelson, 2007). La supervivencia de los pacientes con cáncer renal en fases avanzadas se ha estimado en menos de 1 año (Drucker, 2005).

La mejora en la eficacia de los tratamientos depende del avance en el entendimiento del mecanismo molecular del carcinoma renal, con lo que será posible la elaboración de nuevos agentes dirigidos hacia un blanco específico (Drucker, 2005).

Actualmente hay muy pocos grupos de investigación estudiando las alteraciones de la transición G1/S del ciclo celular en el carcinoma renal. Los estudios que hay hasta ahora se han realizado en muestras de tumores de pacientes, en donde se ha observado

alteraciones en la expresión de ciclina D1, E, p27 y pRB (Hedberg, et al., 2002; Hedberg, et al., 2003; Hedberg, et al., 2004). Actualmente, no se han estudiado este tipo de alteraciones en el modelo de carcinoma renal en roedores inducido por nitrilotriacetato de hierro. De ahí la importancia de caracterizar este modelo.

1.4.1. Nitrilotriacetato de hierro.

El modelo más utilizado para el estudio del carcinoma renal es aquel inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en roedores. Se ha comprobado que una sola inyección intraperitoneal produce daño renal y que su administración repetida produce carcinoma renal (Preece, et al., 1989). El mecanismo específico por el cual el FeNTA lleva al desarrollo de cáncer se desconoce, sin embargo existen muchas evidencias de que el estrés oxidante está involucrado (Dutta, et.al., 2005; Ansar, et.al., 1999; Qi, et al., 1999, Iqbal, et al., 2003).

Después de su administración intraperitoneal, el FeNTA se absorbe en la vena porta a través del mesotelio y pasa a la circulación vía el hígado (Umemura, et al., 1990). Debido a su bajo peso molecular es fácilmente filtrado por el glomérulo hacia el lumen de los túbulos proximales renales, donde el hierro es reducido (Devinder, et al., 2003). Esto genera ERO, como el radical superóxido el cual puede participar junto con el peróxido de hidrógeno en la reacción de Haber-Weiss para producir el radical hidroxilo. Por un lado, el ADN puede sufrir daño directo por las ERO producidas. Por otro lado, el radical hidroxilo puede provocar la peroxidación de los lípidos de las membranas los cuales pueden posteriormente dañar al ADN. (Hamazaki, et al., 1989; Chopra, et al., 2004; Umemura, et al., 1990; Ansar, et al., 1999).

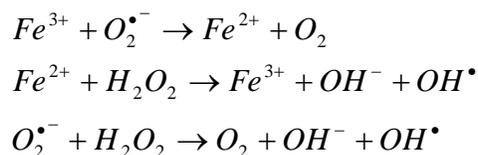


Fig. 5. Reacción de Haber Weiss. (Kehrer, 2000)

2. JUSTIFICACIÓN.

Se ha demostrado ampliamente la participación del estrés oxidante en muchas patologías como hipertensión, diabetes y cáncer. Es por ello que se está estudiando el potencial de agentes antioxidantes para prevenir y contrarrestar estas patologías. En especial, han recibido gran atención los compuestos polifenólicos presentes en las frutas y verduras por su gran capacidad antioxidante, y una de las frutas con alto contenido de polifenoles es el tamarindo.

Por otro lado, entre los tipos de cáncer menos estudiados está el cáncer renal. Un problema serio con éste cáncer es que su diagnóstico es difícil en etapas tempranas lo que conduce a una alta mortalidad. El modelo más utilizado para el estudio del cáncer renal es aquél inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) que es un modelo ya establecido y aceptado como un equivalente experimental del carcinoma celular renal humano. Existen evidencias de que el estrés oxidante está involucrado en su carcinogenicidad, sin embargo el mecanismo específico se desconoce.

Hasta ahora, no se han hecho estudios que evalúen las alteraciones del ciclo celular en el modelo de cáncer renal inducido por FeNTA. La ciclina D1 es una proteína reguladora del ciclo celular que actúa en la transición G1/S, está alterada en diferentes tipos de cáncer y responde a estrés oxidante. Por todo lo anterior, se consideró importante evaluar en este modelo las probables alteraciones a la expresión del gen de ciclina D1 inducidos por FeNTA y si un extracto de tamarindo rico en polifenoles previene estas alteraciones.

3. HIPÓTESIS.

El estrés oxidante inducido por el nitrilotriacetato de hierro provocará un aumento en la expresión del gen de ciclina D1 y un extracto de tamarindo rico en polifenoles protegerá contra este aumento.

4. OBJETIVOS.

General

Estudiar si el estrés oxidante inducido por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) altera la expresión del gen de ciclina D1 y si un extracto de tamarindo rico en polifenoles protege contra estas alteraciones

Particulares

- Investigar en un estudio agudo con FeNTA, si el tratamiento con un extracto de tamarindo rico en polifenoles previene o disminuye el daño por oxidación a proteínas y lípidos y la generación de peróxido de hidrógeno que podrían estar involucrados en su carcinogenicidad.
- Implementar las técnicas de biología molecular necesarias para determinar la expresión del gen de ciclina D1: síntesis de sondas por RT-PCR, marcaje de sondas con digoxigenina y Northern blot.
- Investigar si en este estudio se altera la expresión del gen de ciclina D1, pudiendo formar parte de los mecanismos moleculares de la carcinogenicidad del FeNTA.

5. METODOLOGÍA

5.1. Preparación del extracto de tamarindo

El tamarindo que se utilizó se obtuvo en un mercado y pertenecía a un lote proveniente de Colima. El extracto se preparó agregando 400 mL de etanol al 70% por cada 100 g de pulpa y pericarpio del fruto. Se maceró durante 5 días en refrigeración. Posteriormente se filtró con gasa y con un rotaevaporador se eliminó el etanol (Martinello, 2006). El extracto obtenido se centrifugó 20 min a 8000 rpm y se filtró con gasa para eliminar restos de grasa. Se almacenó a 4°C.

5.2. Capacidad antioxidante.

Las propiedades antioxidantes del extracto se probaron midiendo su capacidad para inhibir al peróxido de hidrógeno. Para esto se montó una técnica utilizando TiCl_4 .

Se colocó en el tubo de reacción el peróxido de hidrógeno a una concentración conocida (50 μM) y se adicionó el antioxidante. Al cabo de unos minutos se agregó el tetracloruro de titanio para que el peróxido de hidrógeno que no se atrapó formara un complejo con el titanio. Este complejo se precipitó agregando hidróxido de amonio concentrado, se resuspendió en medio ácido, y se detectó a 410 nm. La concentración de H_2O_2 fue calculada interpolando el valor de absorbancia en una curva patrón con concentraciones conocidas de peróxido de hidrógeno (Brennan, 1977; Ferguson, 1983; Patterson, 1984; Wang, 2000).

5.3. Diseño experimental.

Para la realización de los protocolos se utilizaron ratas macho Wistar de aproximadamente 250 g al día del sacrificio. El número total de ratas, 21 en el primer protocolo y 24 en el segundo, se dividieron en 4 grupos denominados: 1) control, 2) tamarindo, 3) FeNTA y 4) tamarindo+FeNTA. Los cuatro grupos se trataron durante 15 días de la siguiente manera: a los grupos tamarindo y tamarindo+FeNTA se les administró el extracto de tamarindo vía intragástrica a una dosis de 30 mg de fenoles totales/Kg de peso corporal y a los grupos control y FeNTA se les administró el vehículo (agua). Al término del tratamiento, se administró nitrilotriacetato de hierro a una dosis de 15 mg Fe/Kg de peso corporal vía intraperitoneal a las ratas de los grupos FeNTA y tamarindo+FeNTA y a las ratas de los grupos control y tamarindo se les administró solución salina. Una hora después de ésta administración los animales se sacrificaron por

decapitación. Se extrajeron ambos riñones y se separó la corteza, en la que se realizaron las diferentes determinaciones.

5.4. Preparación de FeNTA

Se realizó una modificación de la técnica de Awai (Awai, et al., 1979). Se preparó una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 120 mM con la que se preparó, a su vez, una solución de nitrato de hierro (FeNO_3) 160 mM y una solución de ácido nitrilotriacético disódico 320mM. Se mezclaron en proporción 1:2 de FeNO_3 y ácido nitrilotriacético. Se ajusta el pH a 7.4 con NaHCO_3 en polvo. Una vez mezcladas ambas soluciones se deben mantener protegidas de la luz, ya que el FeNTA es un compuesto fotolábil. Esta solución es de uso inmediato.

5.5. Daño por oxidación a proteínas.

Una alternativa para evidenciar la presencia de estrés oxidante es medir los productos estables finales de las reacciones oxidativas, ejemplo de ello son los grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) que se originan por acción de las ERO sobre las proteínas, convirtiendo algunos aminoácidos (leucina, valina, lisina, arginina, prolina, treonina e isoleucina) en derivados carbonilo. Además, los grupos carbonilo también son productos de reacciones de rompimiento de enlaces peptídicos, e incluso de la interacción de los residuos de aminoácidos con productos de lipoperoxidación como el 4-hidroxinonal o el malondialdehído (MDA) (Nyström, 2005). Esta determinación se llevó a cabo en homogenados de corteza renal, basándose en la reactividad de los grupos carbonilo con dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas de proteína, las cuales absorben la luz a 370 nm (Fig.6). En las mismas muestras se determinó el contenido de proteínas por absorción a 280nm para expresar el contenido de grupos carbonilo en nmol/mg proteína (Reznick, et al., 1994, Levine, et al., 1994).

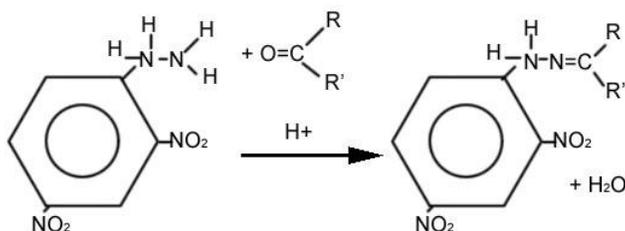


Fig.6. Reacción de la dinitrofenilhidrazina con el grupo carbonilo de las proteínas.

5.6. Lipoperoxidación

Uno de los marcadores clásicos de estrés oxidante es la determinación de productos de la peroxidación de lípidos que finalmente llevan a la pérdida de la función e integridad de las membranas biológicas. El MDA es uno de los productos derivados de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados y hay evidencias de su relación con el proceso de carcinogénesis (Burcham, 1998). Esta determinación se llevó a cabo en homogenados de corteza renal con un método colorimétrico específico para MDA en el que esta molécula reacciona con *N*-metil 2-fenilindol en medio ácido a 45°C, lo que genera un compuesto colorido que absorbe a 586 nm (Fig.7). En las mismas muestras se determinó el contenido de proteínas totales por el método de Lowry para expresar la cantidad de MDA en nmol/mg proteína (Erdelmeier, et al., 1998; Gerard-Monier, et al., 1998].

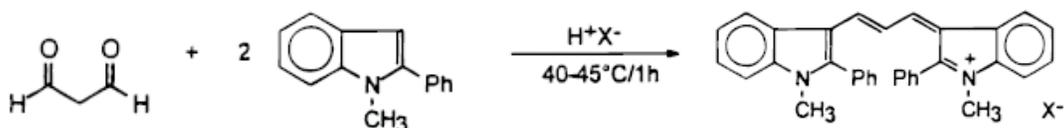
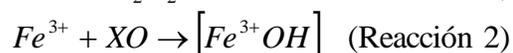


Fig.7. Reacción de malondialdehído con *N*-metil-2-fenilindol

5.7. Niveles de H_2O_2

Esta determinación se llevó a cabo por el método de FOX, que está basado en la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} por el peróxido de hidrógeno en condiciones ácidas (Reacción 1). El ión férrico se une con el naranja de xilenol (3,3'-bis(*N,N*-di(carboximetil)-aminometil)-*O*-cresolsulfona-fenofaleína, sal sódica) para formar un complejo estable colorido que absorbe luz a 560 nm (Reacción 2), en estas muestras se determinó también el contenido de proteínas por el método de Lowry para expresar el resultado en nmol de H_2O_2 /mg proteína (Long, et al., 1999).



5.8. Síntesis de las sondas de ciclina D1 y GAPDH

La preparación de las sondas se hizo a través de la técnica RT-PCR. Para ello, se extrajo ARN total del tejido de corteza renal de ratas controles utilizando la técnica de TRIzol™ de Invitrogen Life Technologies, CA, USA. Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la disolución de los componentes celulares. La adición de cloroformo seguida de centrifugación separa la solución en dos fases (acuosa y orgánica). El ARN permanece en la fase acuosa y se recupera precipitándolo con isopropanol. Posteriormente se centrifuga y se decanta el isopropanol, y la pastilla de ARN se resuspende en agua DEPC (dietilpirocarbonato). Para conocer su concentración se midió la absorbancia a 260 nm y a 280 nm de una dilución 1:250 de ARN. Sabiendo que una densidad óptica a 260 nm equivale a 40 µg de ARN se puede calcular la cantidad presente en la muestra. La relación de las absorbancias medidas, 260/280 nm, debe estar entre 1.8 – 2.0.

El ARN se ultrapurificó utilizando DNAsa con el fin de obtener el ARN para la síntesis de ADNc. Esta enzima digiere ADN de una y dos hebras dejando la preparación libre de ADN, evitando así la amplificación de regiones inespecíficas.

Una vez purificado el ARN se llevó a cabo la reacción de RT-PCR para obtener las sondas. El primer paso en la reacción es la síntesis de ADNc a partir de ARN. Esto se logra por medio de la enzima reverso transcriptasa. Una vez que se tienen diversas copias de ADNc comienza la reacción de PCR (Fig.8) que va a amplificar el ADNc y consiste en tres pasos

- 1) Separación de las hebras de ADNc (94°C)
- 2) Alineación de oligonucleótidos complementarios a sus secuencias específicas en el ADNc de interés (ciclina D1 o GAPDH en este caso) (60°C).
- 3) Elongación del ADNc por una DNA polimerasa termoestable (72°C)

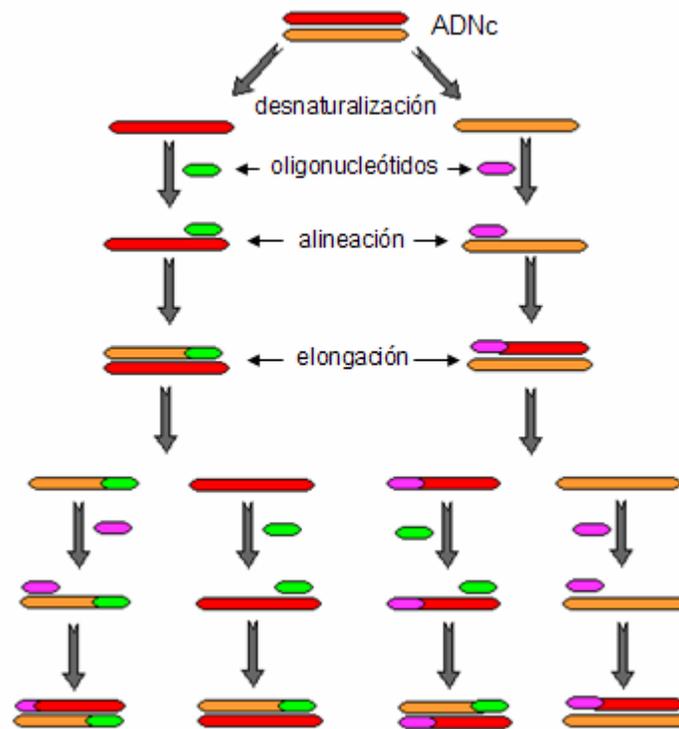


Fig.8. Reacción de PCR (<http://members.aol.com>, 2007)

Este ciclo se repite varias veces (en este caso fueron 30) (Alberts, et al., 2002, Watson, 1992). Los productos de RT-PCR se almacenan a 4°C para uso inmediato y a -20°C a largo plazo.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron:

CD1 (Ciclina D1) (Hur, 2000; Cai, et al., 2006, Uto, et al., 2001)

5'-TGG AGC CCC TGA AGA AGA G-3'

5'-AAG TGC GTT GTG CGG TAG C-3'

GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) (Cai, et al., 2006)

5'-GGC TGA GAA TGG GAA GCT GGT CAT -3'

5'-CAG CCT TCT CCA TGG TGG TGA AGA -3'

Los oligonucleótidos se ajustaron a una concentración de 5 y 10 mM.

El gen de GAPDH se utilizó como control, su función se detalla más adelante.

Los ADNc obtenidos de la reacción de RT-PCR se purificaron a partir de la banda de una electroforesis en gel de agarosa al 1.3% utilizando el estuche comercial PureLink™ Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen Life Technologies, CA, USA y se determinó su concentración a 260 nm ($1\text{DO}_{260\text{nm}} = 20\mu\text{g}$ de ADN). Posteriormente éstos se marcaron con digoxigenina utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* que tiene la función de polimerizar el ADN, incorporando al azar nucleótidos marcados que se encuentran en el medio de reacción (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche, USA).

5.9. Expresión de ciclina D1 (CD1)

La determinación de la expresión del gen de ciclina D1 se hizo con un Northern blot. Para ello, se extrajo el ARN total del tejido de corteza renal de las muestras del protocolo con Trizol.

Este ARN se separó en base a su tamaño en un gel de agarosa por medio de una electroforesis. Las moléculas de ARN se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon, la cual se incubó con la sonda complementaria al ARNm del gen de interés marcada con digoxigenina. Después, la membrana se incubó con un anticuerpo anti-digoxigenina-AP el cual se unirá a la digoxigenina pegada a la sonda. Para observar esta unión, el fragmento Fab del anticuerpo anti-digoxigenina-AP tiene unida la enzima fosfatasa alcalina, la cual al reaccionar con su sustrato (CSPD) emite luz a una longitud máxima de 477 nm que es grabada en películas de rayos X, a lo que se conoce como autorradiografía.

La evaluación de la expresión de un ARNm por medio del Northern blot que se corrige a través de la comparación con genes que funcionan como estándares internos, genes control o también llamados "housekeeping". Estos genes se expresan en todos los tejidos y líneas celulares a un nivel relativamente constante. Entre este tipo de genes están incluidos aquél de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el de la β -actina y los de las unidades 18S y 28S del ARN ribosomal (Oliveira, 1999). El gen utilizado como control en el presente trabajo fue el de GAPDH. La misma membrana que se hibridó con la sonda de ciclina D1 se lavó para retirar la sonda marcada unida a la membrana y se hibridó posteriormente con la sonda para el ARNm de GAPDH.

Para obtener los resultados de la expresión del gen se realizó un análisis densitométrico de las bandas de los ARNm de ciclina D1 y de GAPDH de las autorradiografías correspondientes utilizando el programa ChemImager 4400, Alpha. Innotech, CA, USA.

Se calculó la relación de las densidades CD1/GAPDH para corregir los posibles errores de carga en el gel obteniéndose entonces datos relativos de densitometría. Después se compararon los resultados obtenidos en los distintos grupos estudiados (Alberts, et al., 2002; Watson, 1992).

5.10. ESTADÍSTICA

Se utilizó el programa GraphPad Prism para llevar a cabo el análisis estadístico. Los datos se analizaron por análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente se utilizó la prueba de Newman-Keuls para determinar las diferencias significativas entre los grupos.

6. RESULTADOS

6.1. Extracto de tamarindo.

El extracto se preparó y se caracterizó en nuestro laboratorio encontrando un contenido de 3.3 mg de fenoles/mL y una capacidad inhibitoria del radical superóxido con una CI_{50} tamarindo = 2.96 μ g fenoles/mL, capacidad superior a la determinada para la vitamina C (CI_{50} vitamina C = 25 μ g/mL).

En el caso particular de este trabajo, se montó una técnica para determinar la capacidad del extracto de atrapar peróxido de hidrógeno, el cual se ha visto que juega un papel importante como segundo mensajero (Veal, et al., 2007). La técnica consiste en la formación de un complejo entre el titanio y el peróxido de hidrógeno que puede leerse a 410 nm. Las concentraciones de peróxido de hidrógeno de la curva patrón que se seleccionaron con base en la literatura fueron: 2.5 μ M – 100 μ M (Fig. 9) (Ferguson, et al., 1983; Brennan, et al., 1977).

La primera prueba fue realizar curvas de inactivación del H_2O_2 utilizando piruvato, un compuesto que está comprobado que reacciona con el peróxido de hidrógeno (Fig. 10) (Salahudeen, et al., 1991).

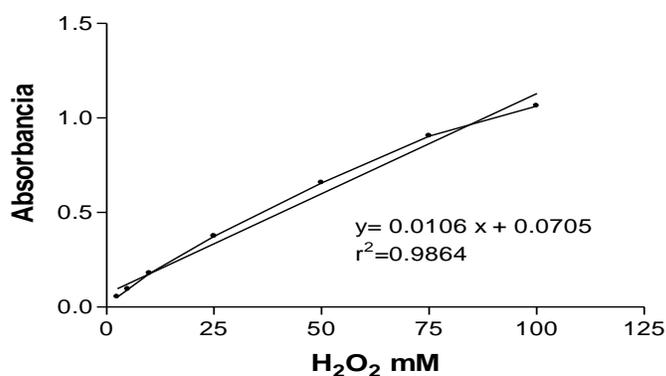


Fig.9. Gráfica de la curva patrón para determinar la concentración de peróxido de hidrógeno. La línea de puntos es la experimental y la continua es la regresión lineal.

Para los ensayos posteriores con otros antioxidantes se decidió meter un control de piruvato para comprobar que la técnica funcionara adecuadamente.

Ya con la técnica montada, se midió la capacidad antioxidante del extracto de tamarindo preparado (Fig.11).

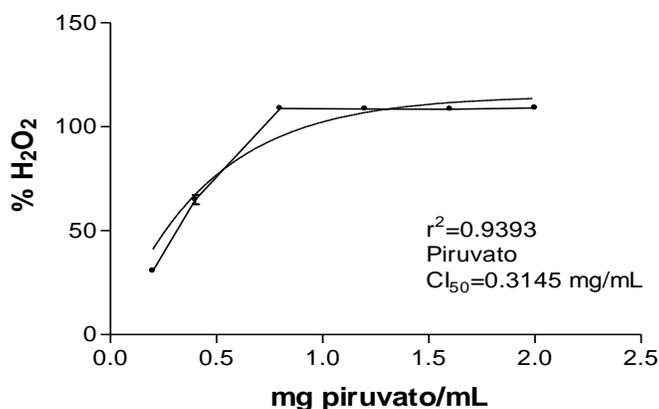


Fig. 10. Gráfica del porcentaje de peróxido de hidrógeno que reacciona con el piruvato. Se observa que el piruvato inhibe al H₂O₂ y llega a inactivarlo por completo. La línea de puntos es la experimental y la continua es la regresión no-lineal.

Con este resultado se probó que el extracto tiene, in vitro, una muy buena capacidad de inactivar al peróxido de hidrógeno (CI_{50} tamarindo=19.2 μ g de fenoles totales /mL), incluso mejor que el piruvato (CI_{50} piruvato=314.5 μ g de fenoles totales/mL) que es un compuesto que se conoce como un buen inactivador del H₂O₂.

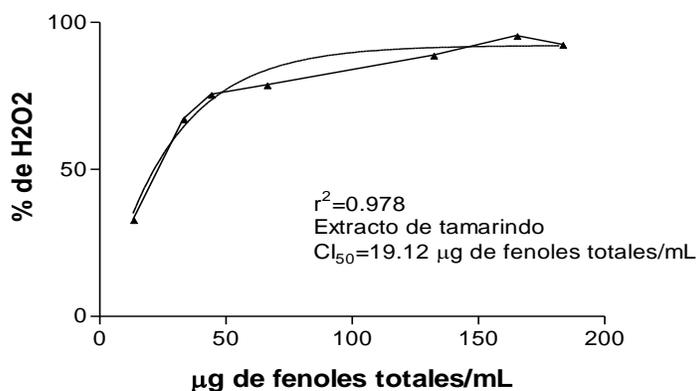


Fig.11. Gráfica del porcentaje de peróxido de hidrógeno que se inhibe con el extracto de tamarindo. Se observa que de acuerdo a la cantidad de fenoles totales presentes en el extracto de tamarindo estos inhiben el peróxido de hidrógeno hasta inactivarlo casi por completo. La línea de puntos es la experimental y la continua es la regresión no-lineal.

6.2. Estrés oxidante por FeNTA in vivo

Durante el período de tratamiento con el extracto de tamarindo se hizo un seguimiento del peso corporal de las ratas. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos, lo que indica que el extracto de tamarindo no fue tóxico y no afectó el crecimiento normal de las ratas.

Las determinaciones de estrés oxidante se realizaron en el tejido cortical del riñón.

En las fig.12, 13 y 14 se puede observar que la administración intraperitoneal de FeNTA provoca un incremento en los valores de todos los parámetros determinados con respecto a los valores del grupo control, lo cual indica que hay daño por oxidación.

En el caso del daño a proteínas y lípidos se puede observar que el tratamiento previo con tamarindo sí ofrece protección contra este daño, aunque esta protección es parcial ya que los valores del grupo tamarindo+FeNTA están aún elevados con respecto a los del grupo control. Sin embargo, para el peróxido de hidrógeno se observa protección total, ya que los valores del grupo tamarindo+FeNTA son estadísticamente iguales a los valores del grupo control.

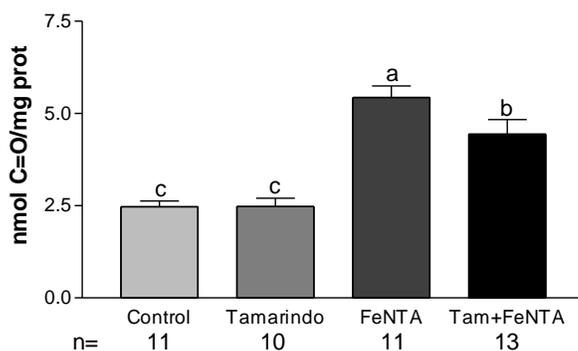


Fig. 12. Daño por oxidación a proteínas, determinado como la cantidad de carbonilos (C=O) por mg de proteína. En la gráfica se observa que el tamarindo protege parcialmente contra el daño provocado por el FeNTA. Grupos con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

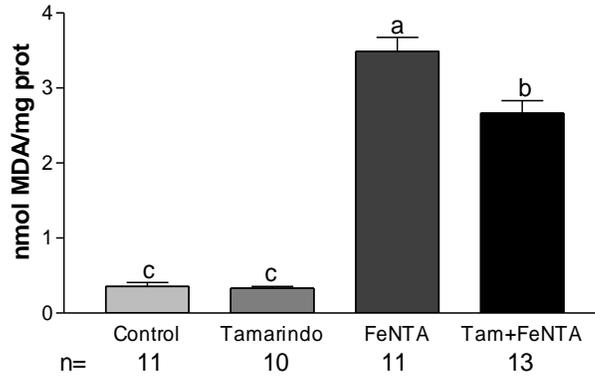


Fig. 13. Daño por oxidación a lípidos, determinado como la cantidad de malondialdehído (MDA) por mg de proteína. En la gráfica se observa que el tamarindo protege parcialmente contra el daño provocado por el FeNTA. Grupos con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

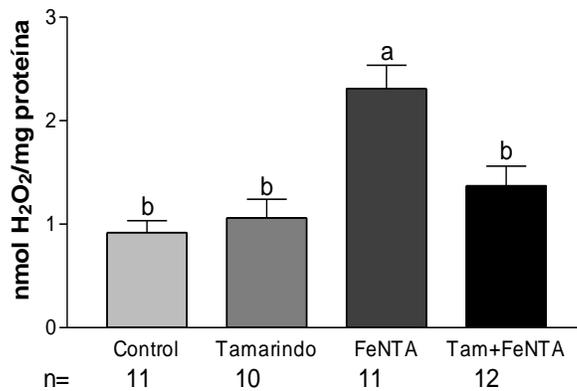


Fig. 14. Niveles de peróxido de hidrógeno. En la gráfica se observa que el tamarindo protege totalmente contra el aumento de peróxido de hidrógeno provocado por el FeNTA. Grupos con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

6.3. Expresión de CD1

En esta sección está incluido el montaje de las técnicas de biología molecular desde la extracción del ARN para la síntesis y amplificación de las sondas hasta la realización del Northern blot.

La primera parte consistió en la síntesis de las sondas específicas para ciclina D1 y GAPDH. Se extrajo el ARN total de la corteza renal de una rata control (Fig.15) para ultrapurificarlo y utilizarlo como molde en la reacción de RT-PCR.

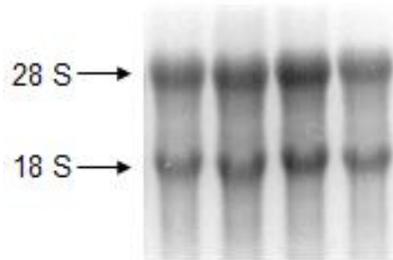


Fig.15. Fotografía de la separación de ARN total en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En la imagen se pueden observar las bandas de ARN ribosomal 28S y 18S.

Las bandas compactas del ARN ribosomal (Fig.15) indican que no hay degradación de las moléculas. Las relaciones 260/280 nm estuvieron alrededor de 1.5 después de la extracción y también después de la ultrapurificación indicando que se conservó la integridad del ARN.

A través de una búsqueda bibliográfica se seleccionaron las secuencias de los oligonucleótidos para sintetizar las sondas de ciclina D1 y de GAPDH.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron:

Ciclina D1. (*Hur K, 2000, Cai FG, et al., 2006, Uto, H., et al., 2001*)

5'-TGG AGC CCC TGA AGA AGA G-3'

5'-AAG TGC GTT GTG CGG TAG C-3'

GAPDH. (*Cai FG, et al., 2006*)

5'-GGC TGA GAA TGG GAA GCT GGT CAT -3'

5'-CAG CCT TCT CCA TGG TGG TGA AGA -3'

Los oligonucleótidos se mandaron sintetizar a Invitrogen Life Technologies, CA, USA. Se resuspendieron y se calculó su concentración a 260 nm según se describe en la metodología. Se hicieron diluciones para tener alícuotas a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M.

Posteriormente, y también con base en la literatura, se determinaron las condiciones para la reacción de RT-PCR. Se decidió utilizar 1 μ g de ARN ultrapurificado y 2 μ L de la

alícuota con concentración 5 μ M de los oligonucleótidos; los demás reactivos se usaron como lo indica el inserto del estuche comercial, ajustando el volumen de agua.

Las condiciones finalmente utilizadas para la reacción de RT-PCR fueron las siguientes:

1	55°C, 30 min 94°C, 2 min 94°C, 30 s	} 1X	3	94°C, 30 s 60°C, 30 s 72°C, 45 s*	} 20X
2	94°C, 30 s 60°C, 30 s 72°C, 45 s		} 10X	4	

Los productos de la reacción se corrieron en un gel de agarosa para identificar la presencia de las sondas (Fig. 16). Para la sonda de ciclina D1 se esperaba un producto de 424 pb y para la de GAPDH uno de 152 pb.

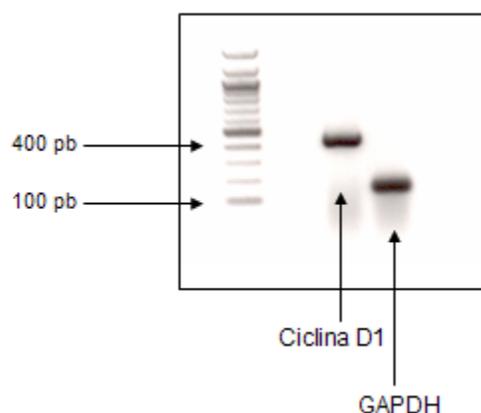


Fig. 16. Fotografía del gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en donde se corrieron los productos de RT-PCR. Se observa un producto cercano a los 400 pb y otro entre 100 y 200 pb. También se puede notar la ausencia de bandas inespecíficas.

Con este gel se comprobó la obtención de las sondas. Posteriormente, se hizo la realización de geles preparativos para la purificación de la banda a partir del gel como se indica en la metodología. Una vez puras, las sondas se marcaron con digoxigenina como se indica en el inserto del estuche comercial utilizado.

En la fig.17 se presenta la imagen de la autorradiografía donde se probó el marcaje de las sondas.

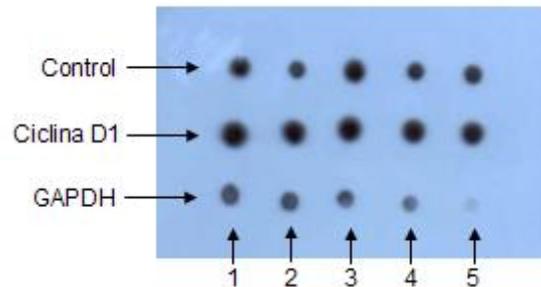


Fig. 17. Autorradiografía del marcaje de las sondas. Se observa la comparación cualitativa entre el marcaje de las sondas de ciclina D1 y GAPDH contra un control de ADN marcado incluido en el estuche comercial. Los números indican las diluciones siendo el número 1 la dilución más pequeña y el número 5 la dilución más grande.

El control es una muestra de ADN marcada con digoxigenina que viene incluido en el estuche comercial. Se hicieron las mismas diluciones para el control y para las sondas de ciclina D1 y GAPDH para comprobar la eficiencia del marcaje. Las manchas que se ven en la autorradiografía corresponden al ADNc o sonda marcada. La comprobación del marcaje es más clara en el carril de la sonda de GAPDH en donde se observa que conforme aumenta la dilución la intensidad de la mancha disminuye indicando una menor cantidad de sonda marcada.

Después de haber comprobado que las sondas estaban marcadas, se montó el Northern blot. Para ello se extrajo el ARN de las muestras de corteza de riñón de las ratas de los 4 grupos estudiados y se corrió una electroforesis en gel de agarosa. El ARN se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon y se hibridó con las sondas marcadas.

La temperatura de hibridación se calculó de acuerdo al contenido de GC con la siguiente fórmula:

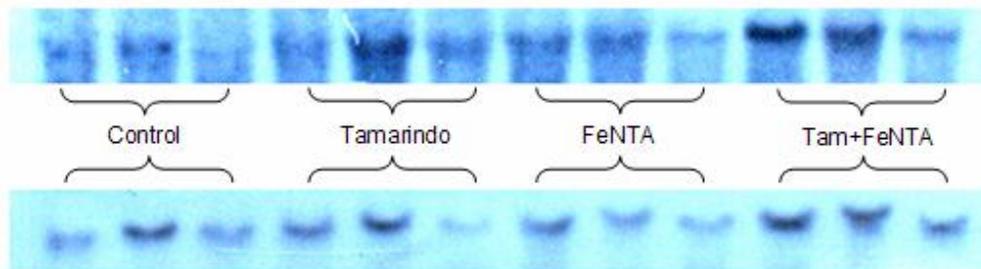
$$T_m = 49.82 + 0.41(\%G + C) - (600/l) [l = \text{longitud en pares de bases}]$$

$$T_{opt.} = T_m - (20 - 25^\circ C)$$

Se encontró que la temperatura óptima para hibridar las membranas con las sondas de ciclina D1 y GAPDH es $45 \pm 1^\circ C$. Después de la hibridación se hizo la detección quimioluminiscente.

En la fig.18A se observan autorradiografías representativas después de haber hecho la detección. Lo que se ve en la figura son bandas que corresponden a la sonda marcada unida a su secuencia complementaria en el ARNm del gen ya sea de ciclina D1 o de GAPDH en la misma membrana. Es decir, primero se hizo la hibridación de la membrana con la sonda de ciclina D1 y se realizó la detección; después se hicieron lavados para retirar la sonda marcada que se encontraba unida a la membrana y entonces se hibridó con la sonda de GAPDH. Se realizó un análisis densitométrico de las autorradiografías para obtener valores que permitieran expresar numéricamente los niveles de expresión del gen. Para obtener resultados comparables se calculó la relación CD1/GAPDH con el fin de corregir, con los valores de GAPDH, los posibles errores de carga en el gel. Los valores de la relación CD1/GAPDH son los que se encuentran graficados en la fig.18B, donde se observa que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

A.
Ciclina D1



GAPDH

B.

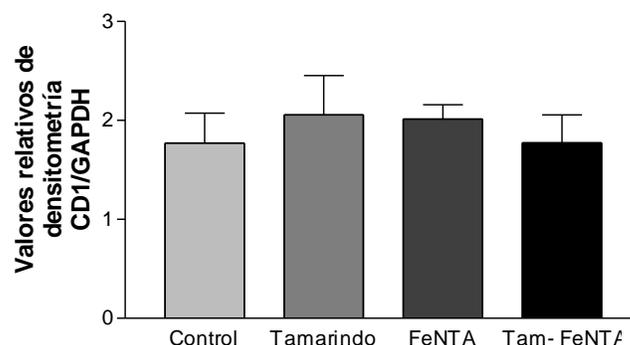


Fig.18. A. Autorradiografía de las membranas hibridadas con las sondas de Ciclina D1 (bandas de arriba) y GAPDH (bandas de abajo). B. Gráfica en donde se observan los valores relativos de densitometría CD1/GAPDH de cada grupo estudiado (n=4-5).

7. DISCUSIÓN.

El estrés oxidante está involucrado en muchas patologías. Por esta razón, los antioxidantes se están estudiando como vías de tratamiento o prevención de estas enfermedades. Entre los compuestos con mayor capacidad antioxidante se encuentran los compuestos polifenólicos, los cuales se encuentran en frutas y verduras, como el tamarindo. El cáncer es una de las enfermedades en donde participa el estrés oxidante. Uno de los tipos de cáncer menos estudiados es el cáncer renal, cuyo tratamiento resulta complicado, no sólo porque en la mayoría de los casos se detecta en etapas tardías, sino también porque no responde a los agentes quimioterapéuticos que se usan para tratar otros tipos de cáncer. Por ello, se requiere un mejor entendimiento del mecanismo molecular del carcinoma renal para mejorar la eficacia de su tratamiento. El modelo experimental más utilizado para su estudio es el carcinoma renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en roedores. Existen evidencias de que el estrés oxidante está involucrado en la carcinogenicidad del FeNTA, sin embargo, no se conocen mecanismos moleculares involucrados.

El tamarindo es un fruto rico en compuestos polifenólicos. Recientemente se estudiaron las propiedades hipolipémicas y antioxidantes de un extracto de tamarindo en ratas con hipercolesterolemia (Martinello, 2006). En esos estudios se probó *in vitro* la capacidad del extracto de atrapar el radical superóxido; además, se encontró que reduce los niveles de ácido tiobarbitúrico lo cual sugiere que posee capacidad para proteger contra la lipoperoxidación. Esta capacidad antioxidante los autores la atribuyeron al gran contenido de flavonoides y otros compuestos polifenólicos en el extracto (Martinello, 2006). El extracto de tamarindo que se utilizó en los protocolos experimentales de este trabajo se preparó como lo indica Martinello (2006). Se caracterizó en el laboratorio, encontrando un contenido de 3.3 mg de fenoles totales/mL de extracto y comprobando su capacidad de atrapar al radical superóxido con una $CI_{50 \text{ tamarindo}} = 2.96 \mu\text{g fenoles/mL}$ la cual fue más eficaz que la vitamina C que es de 25 $\mu\text{g/mL}$.

Además en el presente trabajo se montó una técnica para medir su capacidad de atrapar peróxido de hidrógeno. En la literatura se reporta el uso de una solución de $TiCl_4$ al 20% para realizar el ensayo. Esta solución debe prepararse a partir de una solución concentrada al 99.9%, cuyo manejo resulta complicado y peligroso debido a que al contacto con la atmósfera forma HCl. Se encontró que actualmente se ofrece de manera

comercial una solución de TiCl_4 0.09 M. Entonces se montaron curvas patrón usando ambas concentraciones (20% y 0.09M) preparadas a partir la solución concentrada para ver si funcionaban de la misma manera. Las concentraciones de H_2O_2 para la curva se determinaron probando las concentraciones propuestas por Brennan (0.1 mM – 1 mM) (Brennan, et al., 1977) y las propuestas por Ferguson (2.5 μM – 75 μM) (Ferguson, et al., 1983) quedando finalmente una curva en el rango de 2.5 – 100 μM .

Las curvas que se hicieron para comparar las dos soluciones dieron coeficientes de correlación muy similares y cercanos a uno. Con base en esto, se decidió adquirir la solución de tetracloruro de titanio al 0.09M comercial y probar nuevamente que funcionara como las otras soluciones. La curva realizada con esta solución también presentó un coeficiente de correlación cercano a uno, se corroboraron los resultados.

Entonces, se hizo una curva de inhibición del peróxido de hidrógeno con piruvato, cuya CI_{50} reportada en la literatura es de 0.41 mg/mL (Ávila, 2004), y se obtuvo una $\text{CI}_{50}=314.5$ μg de fenoles totales/mL similar a la de la literatura indicando que la técnica funcionaba correctamente. Se realizó una curva de inhibición de peróxido de hidrógeno con diferentes concentraciones del extracto de tamarindo obteniéndose una $\text{CI}_{50 \text{ tamarindo}}=19.2$ μg de fenoles totales /mL, que es mucho menor al valor obtenido para el piruvato, indicando que tiene una mayor capacidad antioxidante ya que se obtiene la misma inhibición del peróxido de hidrógeno con una menor concentración.

Una vez preparado el extracto de tamarindo y habiendo comprobado su capacidad antioxidante *in vitro*, se llevaron a cabo los protocolos experimentales.

Una hora después de la administración de FeNTA a las ratas se observó un aumento en el daño por oxidación a proteínas y lípidos y los niveles de peróxido de hidrógeno en la corteza renal. Estos resultados concuerdan con la literatura, donde se ha reportado que una hora después de la administración intraperitoneal de FeNTA se presenta el mayor nivel de estrés oxidante (Dávalos-Salas, 2006, Qi, et al., 1999; Umemura, et al., 1990).

Se ha reportado el contenido compuestos polifenólicos como la catequina, epicatequina, procianidina y naringenina, en la pulpa y el pericarpio del tamarindo (Sudjaroen, et al., 2003) atribuyéndoles principalmente las capacidades antioxidantes de este fruto, por lo tanto, la protección que se observó en el tejido renal es probablemente consecuencia de la presencia de estas moléculas en el extracto. Por un lado, los polifenoles reaccionan con las especies reactivas de oxígeno impidiendo que dañen directamente al ADN, a las

proteínas y a los lípidos. Por otro lado, interfieren en la cadena de oxidación de lípidos ya que donan un átomo de hidrógeno a los radicales formados, evitando que lípidos oxidados formen aductos con el ADN lo que posteriormente podría contribuir al desarrollo de cáncer (Bravo, 1998; Burcham, 1998).

Ahora bien, muy poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la carcinogenicidad del FeNTA debido a la falta de estudios sobre este tema. La sobre expresión del gen de ciclina D1 es una de las alteraciones más comunes en la transición G1/S del ciclo celular en diversos tipos de cáncer. Esto ha sido reportado en diversos tipos de cáncer como el de mama y el de pulmón (Petty, et al., 2003; Arnold, et al., 2005). Así mismo, se ha visto esta sobre expresión en modelos de exceso de hierro (Troadek, et al., 2006; Brown, et al., 2006). Existen muy pocos grupos de investigación que estudian la sobre expresión de ciclina D1 en el cáncer renal. Prácticamente el único grupo que ha trabajado al respecto es el de Hedberg y cols. en Suecia. Este grupo ha evaluado entre otras cosas, alteraciones en la expresión de las ciclinas D1, D3, E, además de p27 y pRb (Hedberg, et al., 2003, 2004). Encontraron que la ciclina D1 se encuentra sobre expresada en algunos de los tumores renales y que esto estaba asociado con el pronóstico del paciente; es decir, aquellos en los que la ciclina D1 se encontraba sobre expresada sobrevivían más que aquellos en los que se encontraba en niveles bajos. Esto debido a que la ciclina D1 participa en las etapas tempranas de la transformación celular. De este modo, los tumores de tamaño pequeño presentan niveles elevados de ciclina D1 indicando un cáncer menos avanzado y por lo tanto menos complicado de tratar (Hedberg, 1999). Sin embargo, las muestras de tumores humanos con las que trabajaron se obtuvieron de 5 hasta 21 años antes de hacer las determinaciones y el rango de edades de los pacientes de quienes obtuvieron las muestras varía de entre 25-87 años, por lo que hacen falta estudios que corroboren estos resultados. Hay también trabajos en donde se estudió la alteración de la expresión del gen de ciclina D1 en modelos de sobre carga de hierro. Estos estudios se realizaron en tejido hepático de roedores en donde se observó un aumento tanto en la proteína como en el ARNm de ciclina D1 (Troadek, et al., 2006; Brown, et al., 2006). Por evidencias como estas es que nosotros esperábamos un aumento en la expresión del gen: el estrés oxidante producido por una sobrecarga de hierro, provoca una activación en la transcripción del gen. Sin embargo, el modelo de trabajo es distinto al nuestro, y el tiempo de exposición al agente que provoca la sobre carga de hierro en estos modelos es mayor. Por otro lado, la regulación de la expresión

del gen de ciclina D1 involucra diversas vías de señalización sensibles al estado de oxidoreducción de la célula. Una hora después de la administración de FeNTA es cuando se presenta el mayor nivel de estrés oxidante, por lo que era probable que este cambio en el estado de la célula provocara una activación de las vías involucradas en la expresión del gen de ciclina D1, en especial la vía de Ras/Raf/MAPK que participa en la transcripción del gen (Musgrove, 2006; Cook, et al., 2000).

A pesar de que se ha visto una correlación entre el estado redox intracelular y las fases del ciclo celular, la relación causa y efecto entre este estado y la actividad de los factores reguladores que determinan el progreso del ciclo celular in vivo aún permanecen inciertos (Oktyabrsky, et al., 2007). En el 2003, Menon y su equipo estudiaron la regulación redox de la transición G1/S del ciclo celular en fibroblastos de embriones de ratón. Concluyeron que esta fase está regulada por los cambios en el estado de óxido reducción de la célula y que las moléculas prooxidantes inician la progresión de la fase G1 a S, mientras que los agentes antioxidantes inhiben este proceso. Para probar esto, ellos utilizaron N-acetilcisteína (NAC) como antioxidante y observaron que inducía una inhibición en la señalización redox que resultó en una disminución de los niveles de ciclina D1, y en un incremento en p27 (inhibidor de de CDKs) y Rb hipofosforiladas. En contraste, un reestablecimiento de la señalización redox disminuyó p27, incrementó ciclina D1 y Rb fosforilada e indujo el progreso a la fase S de las células. Estas proteínas pueden ser reguladas vía sus residuos de cisteína. Debido a estos estudios, Menon propone a la ciclina D1, a p27 y a pRB como moléculas blanco para la señalización redox en la transición G1/S. Cabe señalar que la expresión de estas 3 moléculas se ha visto alterada en cáncer renal humano (Hedberg, et al., 2003; Hedberg, et al., 2004). Con base en esto, se considera que este tipo de alteraciones podrían ser al menos uno de los mecanismos moleculares de carcinogenicidad del FeNTA. Sin embargo, en nuestro trabajo no se encontraron modificaciones en la expresión del gen de ciclina D1. Por un lado, el FeNTA pudo haber activado las vías de señalización sensibles al estado redox involucradas en la regulación del gen de ciclina D1 a través del aumento de especies reactivas de oxígeno, sin embargo, es posible que al tiempo del sacrificio estas vías no hayan concluido el ciclo de activación y que esa sea la razón por la que no se observe un aumento en la transcripción del gen.

Por otro lado, dependiendo del grado del estrés oxidante provocado por el FeNTA, se pudo haber provocado una alteración en los grupos SH de algunas proteínas, en especial de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B. Esta alteración pudo ser en el dominio de

unión al ADN impidiendo de esta manera la activación de la transcripción de los genes regulados por estos factores como ciclina D1 (Oktyabrsky, 2007).

De cualquier manera, el extracto de tamarindo estaría protegiendo contra los efectos del estrés oxidante provocado por el FeNTA impidiendo ya sea la activación de las vías de regulación de la transcripción del gen o la oxidación de aminoácidos importantes en los factores que activan la transcripción del gen. En particular, resalta la protección que ofrece el extracto de tamarindo contra el aumento de peróxido de hidrógeno provocado por el FeNTA, ya que es una de las ERO que más se han estudiado como molécula de señalización y que se ha comprobado que es capaz de activar algunas vías.

Este trabajo muestra que el estrés oxidante provocado por el FeNTA una hora después de su administración intraperitoneal en roedores y el tratamiento con el extracto de tamarindo durante 15 días no provocan alteraciones en la expresión del gen de ciclina D1. Sin embargo, aún no se puede descartar la participación del gen en el mecanismo de carcinogenicidad del FeNTA. Es necesario investigar más a fondo alteraciones en la expresión de ciclina D1 en otras etapas del modelo y evaluar cambios en la proteína además del ARNm. Esta caracterización molecular del modelo de carcinoma renal en roedores inducido por FeNTA es importante ya que al encontrar alteraciones comunes en este modelo y pacientes con cáncer, podría validarse como equivalente al carcinoma renal humano.

8. CONCLUSIONES.

- El extracto de tamarindo tiene *in vitro* una muy buena capacidad de inactivar al peróxido de hidrógeno.
- El tratamiento con el extracto de tamarindo previo a la administración de FeNTA protege contra el daño por oxidación a proteínas y lípidos, y contra el aumento de peróxido de hidrógeno producidos por este agente.
- Se realizó exitosamente la implementación de las técnicas de biología molecular: síntesis de sondas específicas para los genes de Ciclina D1 y GAPDH por la reacción de RT-PCR, marcaje de las sondas y Northern blot.
- El estrés oxidante inducido por el FeNTA una hora después de su administración, no altera la expresión del gen de Ciclina D1, ni el tratamiento con el extracto de tamarindo bajo las condiciones utilizadas en el presente trabajo.

9. ANEXO DE TÉCNICAS Y SOLUCIONES

DAÑO OXIDANTE A PROTEÍNAS

(Reznick , et al., 1994; Levine, et al., 2000)

Preparación del homogenizado y técnica

- Pesar 100mg de tejido y homogenizar en 900 μ L de amortiguador de fosfatos 50 mM EDTA 1 mM, tritón 0.1% c/inhibidores de proteasas.
- Centrifugar las muestras 20 min a 32000 xg a 4°C en tubos eppendorff, tomar el sobrenadante (muestra).
- Tratar las muestras con sulfato de estreptomicina 10% durante 12 hrs a 4°C colocando 200 μ L de sulfato de estreptomicina a 600 μ L de homogenado.
- Centrifugar 10 min a 3500 xg a 4°C
- Hacer 2 tubos por muestra
- Blanco: 150 μ L homogenado + 600 μ L HCl 2.5 M
- Problema: 150 μ L homogenado + 600 μ L dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM
- Agitar los tubos e incubar 1h a temperatura ambiente en oscuridad. Agitar cada 15 minutos.
- Adicionar 750 μ L de TCA 20%.
- Agitar en vórtex
- Incubar los tubos a 4°C por 10 min.
- Centrifugar por 10 min a 4°C a 5000 xg.
- Descartar el sobrenadante.
- Resuspender el botón con 600 μ L de TCA 10% a temperatura ambiente
- Centrifugar los tubos 10 min a 5000 xg a 4°C
- Decantar el sobrenadante.
- Realizar 3 lavados con 600 μ L etanol-acetato de etilo (1:1). Ayudarse con pipeta
- Para el último lavado centrifugar los tubos 15 min a 6850 xg a 4°C.
- Dejar que se evapore bien el etanol-acetato de etilo en el último lavado (campana)
- Resuspender el botón en 1mL de guanidina 6 M en solución de fosfatos 20mM pH 2.3
- Leer todos los tubos a 370 nm (visible)
- Calibrar con guanidina 6M

Preparación de la curva patrón

- Preparar una curva de albúmina en guanidina.

Tabla 1. Curva de albúmina en guanidina

	[ABS] mg/mL	μL ABS 4 mg/mL en Guanidina	Guanidina μL
1	0.26	65	935
2	0.5	125	875
3	1	250	750
4	2	500	500

- Leer solo los tubos blanco (con HCl) en esta curva. Para obtener el contenido de proteínas en el ensayo a 280 nm (UV)
- Calibrar con guanidina 6 M.

Cálculos

Ejemplo: Se usa el coeficiente de absorción de la DNPH ($22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para calcular el contenido de carbonilos. Los resultados se expresan como nmoles de carbonilos/mg de proteína.

Muestra

$$\left(Abs_{problema} - Abs_{blanco} \right) \left(\frac{45.45}{mg_{proteína}} \right) = \frac{nmol}{mg_{proteína}}$$

*El factor de 45.45 se obtiene:

El coeficiente de extinción mola de DNPH usado para calcular la [] de carbonilos, donde C es la [] de DNPH/mL

$$\epsilon = 22000 \text{ M} = 22000 / (10^6 \text{ nmol/mL})$$

$$C = \frac{Abs}{\epsilon} = \frac{Abs}{2.2 \times 10^4 / 10^6} = \Delta Abs * 45.45$$

Soluciones

- Amortiguador de homogenización: amortiguador de fosfatos 50 mM pH=7.4 con leupetina (5 μg/mL), pepsatina A (7 μg/mL) y aproptonina (5 μg/mL) y EDTA 1 mM. Pesar 0.419 g de NaH_2PO_4 , 0.278 g de Na_2HPO_4 , 0.0372 g de EDTA- Na_2 disolver

en 100 mL. Agregar 1 tableta de inhibidores de proteasas por cada 10 mL de amortiguador a utilizar (Complete mini, ref. 11 836 153 001, Protease inhibitor cocktail tablets, Keep it easy).

Disolver todos los componentes en agua destilada, ajustar el pH y aforar

Almacenar a 4°C

NOTA: Los inhibidores se añaden al momento que se va a utilizar el amortiguador

- Sulfato de estreptomicina 10% en amortiguador de fosfatos 50 mM c/inhibidores de proteasas, EDTA, tritón.

Para preparar 10 mL pesar 1 g. de sulfato de estreptomicina, disolver en amortiguador de fosfatos 50 mM c/inhibidores, EDTA y Tritón y aforar

- Solución de HCl 2.5 M (0.05 L):

Tomar 10 mL de ácido clorhídrico 37% y aforarlo a 50 mL

- DNPH 10mM

Pesar 49.5 mg de DNPH y disolver en 25 mL de HCl 2.5 M.

- Ácido Tricloroacético TCA 20%(w/v)

Pesar 20 g TCA y disolver en 100 mL H₂O. Almacenar a temperatura ambiente.

NOTA: Pesarlo en vidrio

- TCA 10% (ácido tricloroacético)

Pesar 10 g TCA y disolver en 100 mL H₂O. Almacenar a temperatura ambiente.

NOTA: Pesarlo en vidrio

- EtOH: Acetato de etilo 1:1 (v/v)

Mezclar cantidades iguales de EtOH absoluto y de acetato de etilo.

Almacenar a 4°C.

- Solución de fosfatos 20 mM pH=2.3

Pesar 0.7584 g de K₂HPO₄·3H₂O y 0.092 g de KH₂PO₄. Disolver en 200 mL agua destilada, ajustar pH y llevar al volumen deseado. Almacenar a temperatura ambiente.

- Guanidina-HCl 6.0 M.

Pesar 11.4636 g de guanidina-HCl y disolver en solución de fosfatos 20 mM pH 2.3 y aforar a 20 mL.

- Albúmina sérica bovina 4 mg/mL en guanidina 6 M

Pesar 0.04 g de ABS, disolver y aforar a 10 mL con guanidina 6 M. Almacenar a 4°C

LIPOPEROXIDACIÓN

(Erdelmeier, et al., 1998).

Preparación del homogenizado

- Lavar el riñón en solución salina isotónica fría (NaCl 0.9%)
- Pesar 0.1 g de tejido
- Preparar homogenizado en 1 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM a pH 7.4
- Centrifugar el homogenizado a 3000 xg a 4°C por 10 min para remover las partículas grandes
- Tomar el sobrenadante
- Mantener las muestras en hielo previo al ensayo. Si no se van a utilizar inmediatamente congelarlas a -70°C, una vez descongelada la muestra no puede ser recongelada.

Técnica

- Añadir un volumen (6mL) de metanol 100% a tres volúmenes (18 mL) del estándar 10 mM de 1metil-2-fenilindol en acetinitrilo (reactivo A).
- Poner en tubos de ensayo 200 µL de muestra.
- Añadir 650 µL del reactivo A.
- Agitar suavemente en el vortex.
- Añadir 150 µL de HCl 37% (12N).
- Mezclar bien y tapar los tubos.
- Incubar a 45° C \pm 1 °C por 60 min.
- Centrifugar los tubos a 15 000 xg por 10 min
- Transferir el sobrenadante a una celda.
- Leer la absorbancia a 586 nm.

Blanco de muestra

Se sugiere medir un blanco de muestra para corregir la contribución de la muestra a 586 nm. Este blanco se hace añadiendo 650 µL de acetinitrilo/metanol (75/25%) en lugar del reactivo A. La adición del ácido y la incubación de la muestra se llevan a cabo como se describió previamente.

Preparación de la curva patrón

- Diluir 1/500 (v/v) en agua el estándar 10 mM de 1,1,3,3 tetrametoxipropano en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.4 para obtener un stock 20 μ M
- Pipetear las siguientes cantidades de reactivos:

Tabla 2. Cantidades de reactivos en la curva patrón

Tubo	Stock (μ L)	Agua o amortiguador (μ L)	Concentración TMOP (μ M)
Blanco	0	200	0
1	25	175	0.5
2	50	150	1.00
3	100	100	2.00
4	150	50	3.00
5	200	0	4.00

Cálculos

- Usando los datos obtenidos calcule la absorbencia neta de las muestras a 586 nm restando el valor obtenido del blanco de muestra
- Dividir el valor obtenido de MDA entre la cantidad de proteínas determinadas por el método de Lowry para reportar [MDA]/mg de proteína

Soluciones

- Amortiguador de homogenización: Amortiguador de fosfatos 20 mM a pH 7.4.
Pesar 0.8626 g de Na_2PO_4 y 0.5340 g de KH_2PO_4 , disolver los componentes en agua destilada, ajustar el pH y aforar a 500 mL. Almacenar a 4°C.
- Tris-HCl 20 mM pH=7.4
Para preparar 100 mL pesar 0.3152g de Tris-HCl y disolver en agua destilada, ajustar el pH a 7.4 y aforar. Almacenar a 4°C
- 1,1,3,3-tetrametoxipropano 10mM (TMOP)
Para preparar 10 mL tomar 16.47 μ L de TMOP, Disolver Tris-HCl 20 mM pH 7.4 y aforar. Almacenar a 4°C
- 1-metil-2-fenilindol 10 mM
Para preparar 25mL pesar 0.05182 g de 1-metil 2-fenil indol y disolver en 25mL de acetonitrilo. NOTA: La solución es estable 4 días a 4°C, pero se recomienda prepararla el mismo día del ensayo
- Acetonitrilo-metanol 75/25%

Para preparar 100 mL mezclar 75 mL de acetonitrilo con 25 mL de metanol.
Preparar en el momento del ensayo

NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

(Long, et al., 1999).

Preparación del homogenizado

- Hacer los homogenados inmediatamente después del sacrificio.
- Homogenizar 100 mg de tejido en 900 μL en amortiguador de fosfatos 100 mM pH=7.4.
- Centrifugar a 15 000 g durante 20 min, tomar el sobrenadante.

Técnica

- Mezclar en tubos eppendorf nuevos de 1.5 ml:

Tabla 3. Cantidades de cada reactivo en el tubo de reacción

Reactivos	Estándares	Muestra
Sol. FOX	900 μL	900 μL
St H_2O_2	90 μL	-
Muestra	-	90 μL
Metanol (HPLC)	10 μL	10 μL

- Agitar en vortex 5"
- Incubar 30 min a temperatura ambiente
- Centrifugar a 15,000 g durante 10 min/temp. amb.
- Incubar 30 min a temperatura ambiente
- Medir absorbancia a 560 nm vs. curva estándar
 - Blanco: Metanol + muestra para corregir la absorbancia de la muestra

Preparación de la curva patrón

- Diluir 285 μL de H_2O_2 30% con H_2O desionizada hasta 100 mL. (hacerlo en matraz aforado) para obtener la solución "stock" de H_2O_2 25 μM
- Hacer una dilución 1:250 para obtener un estándar de H_2O_2 . 100 μM

- Hacer diluciones como sigue para obtener cada uno de los estándares de la curva

Tabla 4. Diluciones para preparar los estándares para la curva patrón para la técnica de lipoperoxidación

[H ₂ O ₂] μM	μl de H ₂ O ₂ 100 μM	μl de H ₂ O
0	-	1000
2.5	25	975
5.0	50	950
10	100	900
25	250	750
50	500	500
75	750	250

- De cada estándar se tomarán 90 μl para usarlos en el ensayo, de manera que la concentración final de cada estándar será la siguiente:

Tabla 5. Curva patrón para la técnica de lipoperoxidación.

Estándar de H ₂ O ₂ μM	[H ₂ O ₂] en el ensayo
0	0
2.5	0.225 μM
5.0	0.45 μM
10	0.90 μM
25	2.25 μM
50	4.50 μM
75	6.75 μM

Cálculos

- Para expresar la cantidad de H₂O₂. por cada mg de proteína, primero se tiene que determinar el contenido total de proteína por el método de Lowry. El valor obtenido de H₂O₂ se divide entre el valor de Lowry (mg/mL) para que las unidades sean nmol/mg proteína

Soluciones

- Amortiguador de homogenización: amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.4
 Pesar 1.33 g de KH₂PO₄ y 2.16 g y Na₂HPO₄ y disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar a 250 mL. Almacenar a 4°C.
- H₂SO₄ 250 mM
 Para preparar 200 mL tomar 2.7 mL de H₂SO₄ y llevar a 200 mL con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente

- Hidroxitolueno butilado 4 mM en metanol grado HPLC (Reactivo 1):
Para prepara 18 mL pesar 0.015686 g y disolver en 18 mL de MeOH. Preparar en el momento del ensayo
- Naranja de xilenol 1 mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56 mM (Reactivo 2)
Pesar 1.52 mg de naranja de xilenol y 2.0 mg de sulfato ferroso amoniacal disolver ambos en 2.0 mL de H₂SO₄ 250 mM
NOTA: Estos dos reactivos son estables por una semana a 4°C
- Preparación del reactivo de FOX
Mezclar 9 volúmenes de reactivo 1 con 1 volumen de reactivo 2.
Reactivo 1= hidroxitolueno butilado 4 mM en metanol grado HPLC:
Reactivo 2= Xylenol orange 1 mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56 mM
Preparar en el momento del ensayo
- Stock H₂O₂ 25 μM
Para preparar 100 mL diluir 285 μL de H₂O₂ 30% con H₂O desionizada y aforar a 100 mL. Preparar en el momento del ensayo

MEDICIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

(Lowry, et al., 1951)

Preparación de las muestras:

- Diluir con agua 1:150 el sobrenadante del homogenado de la técnicas de Fox y lipoperoxidación

Técnica

- Preparar una curva estándar con albúmina sérica bovina al 0.05%.

Tabla 6. Preparación de la curva patrón de albúmina sérica bovina (ABS).

	[ASB]μg/0.2 ml	ASB (μl)	H ₂ O (μl)
B	Blanco	0	200
1	5	10	190
2	10	20	180
3	15	30	170
4	25	50	150

5	35	70	130
6	50	100	100

- Numerar tubos de vidrio de 12 x 75 mm o de 13 x 100 mm
- Colocar en cada tubo 0.2 ml de la muestra diluída
- A todos los tubos añadir 1 ml de sol. C (incluyendo los tubos del blanco y de la curva estándar).
- Agitar y esperar 10'.
- A todos los tubos añadir 100 µl de sol. D con agitación simultánea
- Esperar 30'.
- Leer a 660 nm.
- Calibrar con el blanco de la curva.

Cálculos

El factor de corrección se obtiene de la siguiente manera:

- Multiplicar la concentración obtenida en el espectro x 5 para pasar de µg/200 µl a µg/ml (en el ensayo de Lowry se usan 200 µl de muestra).
- Multiplicar por la dilución de la muestra (lo que permite conocer la concentración real de la proteína en µg/ml)
- Dividir entre 1000 (para pasar de µg/ml a mg/ml).

Pasar de 0.2 ml a ml		dilución		Pasar de µg a mg		FACTOR DE CORRECCIÓN
5	x	50	÷	1000	=	0.25
5	x	150	÷	1000	=	0.75

Soluciones

- Na₂CO₃ al 2%, NaOH al 0.4%, tartrato de sodio al 0.02% (Solución A.)
 Pesar 20 g de Na₂CO₃ , 4 g de NaOH y 0.2 g de tartrato de sodio y potasio.
 Almacenar a temperatura ambiente.
- CuSO₄ al 0.5% (Solución B)
 Pesar 0.5 g en 100 mL de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.
- Solución C.
 Mezclar como se indica en la tabla 7.

Tabla 7. Ejemplo de las cantidades de la solución A y solución B para la técnica de Lowry.

	25 tubos	50 tubos
Solución A	25 mL	50 mL
Solución B	0.5 mL	1 mL

Preparar en el momento del ensayo

- Folín 1 N (Solución D)

Mezclar volúmenes iguales de Folín 2N y agua destilada. Preparar en el momento del ensayo

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

(Wang, et al., 2000; Patterson, et al., 1984; Brennan, et al., 1977; Ferguson, et al., 1983).

NOTA: A partir del paso en que se agrega $TiCl_4$ el ensayo debe realizarse en la campana y con el siguiente equipo: guantes y bata.

Curva patrón

Tabla 8. Curva patrón de peróxido de hidrógeno.

	$[H_2O_2]$ μM	$\mu L H_2O_2$ ***	μL Amortiguador	$\mu L TiCl_4$	$\mu L NH_4OH$
B	0	---	1000	135	200
1	2.5	25 (0.1mM)	975	135	200
2	5.0	50 (0.1mM)	950	135	200
3	10	100 (0.1mM)	900	135	200
4	25	25 (1 mM)	975	135	200
5	50	50 (1 mM)	950	135	200
6	75	75 (1 mM)	925	135	200
7	100	100 (1 mM)	900	135	200

**El $TiCl_4$ se agrega antes del hidróxido de amonio y después de agregar cada uno hay que agitar.

*** Se utilizan 2 stocks de H_2O_2 por ello se especifican 2 concentraciones diferentes.

- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm.
- Separar el precipitado y lavarlo con acetona 3 veces (600 μL de acetona en cada lavado).
- Disolver el precipitado en 3 mL de H_2SO_4 1 M, y leer a 410 nm.

Técnica

- Agregar los reactivos como se indica en la tabla 9.

Tabla 9. Diluciones del extracto.

Tubo	Dilución del extracto	μL de extracto	μL de Amortiguador	μL H_2O_2 1mM
1	1:18	55.5	894.5	50
2	1:20	50	900	50
3	1:25	40	910	50
4	1:50	20	930	50
5	1:75	13.3	936.7	50
6	1:100	10	940	50
7	1:250	4	946	50

Tubo	Conc. de piruvato	μL de piruvato ***	μL de Amortiguador	μL H_2O_2 1mM
8	0.4 mg/mL	133	817	50

***El tubo número 8 es un control de piruvato, el cual se prepara a partir de una solución stock de piruvato a una concentración de 3 mg/mL

- Incubar 30 minutos.
- Agregar 135 μL de TiCl_4 0.09M a todos los tubos y agitar.
- Agregar 200 μL de NH_4OH concentrado a todos los tubos para precipitar el complejo peróxido – titanio y agitar.
- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm.
- Desechar el sobrenadante.
- Lavar el precipitado con acetona. (aprox. 500 μL)
- Resuspender en 3 mL de H_2SO_4 1M.
- Leer a 410 nm contra blanco. (El blanco contiene todos los reactivos excepto el extracto de tamarindo, el cual se sustituye por 100 μL más de amortiguador).

Soluciones.

- Preparación del stock de H_2O_2 1 mM:
Tomar 114 μL de H_2O_2 al 30% y llevar a 10 mL.
- Preparación del stock de H_2O_2 0.1 mM
Tomar 1 mL del stock de H_2O_2 1 mM y aforar a 10 mL.
- Preparación del amortiguador 0.17M pH=7.4.
Pesar 2.001 g de NaH_2PO_4 y 3.667 g de Na_2HPO_4 disolver en 200 mL de agua destilada. Ajustar el pH y aforar a 250 mL
- Preparación del H_2SO_4 1M
Tomar 13.88 mL de H_2SO_4 y aforar a 250 mL.

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL CON TRIZOL

TRizol® Reagent

Invitrogen Life Technologies, CA, USA.

Cat. No. 15596-018.

Recomendaciones.

- Manejar todo el equipo con guantes.
- Tratar la cuchilla del politrón con H₂O₂ por 4-5 hrs y después tratarla con H₂O-DEPC durante toda la noche.
- Trabajar máximo 6 muestras y procurar que el ARN no este descongelado durante mucho tiempo.

Técnica.

- Colocar 1 mL de trizol en un tubo de vidrio de 12 x 75 con tapón y estéril.
- Colocar de 0.05-0.11 g de tejido en el tubo con trizol.
- Homogenizar con el politrón, enjuagar la cuchilla con agua estéril y por último enjuagar con H₂O-DEPC, secando cada vez que se enjuague con papel absorbente procurando casi no tocar la cuchilla.
- Incubar 5 min a temperatura ambiente.
- Transferir a un tubo eppendorf de 1.5 mL (el tubo debe estar estéril y rotulado)
- Agregar 0.2 mL de cloroformo.
- Agitar en vortex 15 segundos.
- Incubar 2-3 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 2 min a 19 319 g a 4°C.
- Transferir la fase acuosa (superior) a otro tubo eppendorf estéril y rotulado. Se debe transferir cuidadosamente, en pequeñas cantidades cada vez para evitar tomar líquido de la interfase.
- Agregar 0.5 mL de isopropanol y mezclar por inversión.
- Incubar 10 min a 4°C. (De preferencia incubar toda la noche para obtener un mayor rendimiento de ARN)
- Centrifugar 15 min a 19 319 g a 4°C.
- Decantar de un golpe e invertir los tubos sobre papel secante.
- Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 75%/H₂O-DEPC frío
- Agitar en vortex.
- Centrifugar 8 min a 8 586 g a 4°C.
- Decantar de un golpe para que se seque.

- Una vez que no haya residuos de etanol resuspender la pastilla en H₂O-DEPC.
- Guardar a -70°C.

Soluciones y reactivos necesarios:

- Trizol.
- Cloroformo.
- Isopropanol.
- Etanol al 75 %/H₂O-DEPC.

ULTRAPURIFICACIÓN DE ARN CON DNASA.

Técnica.

- Colocar en un tubo eppendorf:

Tabla 10. Cantidades de reactivos para la ultrapurificación de ARN.

195 µL	H ₂ O-DEPC
25 µL	Amortiguador de DNasa
25 µL	DNasa 1U/ µL (25U)
5 µL	ARN 5 µg/ µL (25 µg)

- Incubar 15 min a temperatura ambiente.
- Inactivar DNasa adicionando 25µL de EDTA 25 mM.
- Incubar a 65°C por 10 min.
- Adicionar 275 µL de fenol saturado a pH 8.0 calentado previamente a 65°C.
- Agitar en vortex 15 segundos.
- Centrifugar 2 min a 19 319 g a temperatura ambiente.
- Transferir la fase acuosa (superior) a otro eppendorf.
- Adicionar 275 µL de la mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1.
- Agitar en vortex 15 segundos.
- Centrifugar 2 min a 19 319 g a temperatura ambiente.
- Transferir a otro eppendorf la fase superior.
- Agregar 700 µL de etanol absoluto frío y 100 µL de acetato de sodio 3M a pH 5.3.
- Agitar en vortex y guardar a -80°C por toda la noche.
- Centrifugar 15 min a 19 319 g a 4°C.
- Decantar de un golpe y lavar el botón con 750 µL de etanol al 75%/H₂O-DEPC.

- Centrifugar 15 min a 19 319 g a 4°C.
- Decantar de un golpe y esperar a que
- Resuspender el botón de ARN en H₂O-DEPC.

Soluciones.

- EDTA 25 mM
Pesar 0.09305 g EDTA y aforar a 10 mL con H₂O-DEPC
Ó tomar 500 µL de EDTA 0.5 M y aforar a 10 mL.
- Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0
Pesar 78.8 g de Tris- HCl disolver en 800 mL ajustar el pH y aforar a 1 L con H₂O-DEPC
- Tris-HCl 0.1 M pH 8.0
Hacer una dilución 1:5 de la solución de Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0. Ajustar el pH.
- Fenol pH 8.0. (Proteger el frasco contenedor con papel aluminio durante la preparación y durante el almacenaje)
 - Descongelar el fenol calentandolo a 65°C.
 - Tomar 50 mL de fenol y agregar 50 mL de Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0.
 - Agitar vigorosamente algunos minutos.
 - Dejar reposar para separar las 2 fases.
 - Repetir este procedimiento tantas veces sea necesario con Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0, hasta que el fenol alcance un pH 8.0.
 - Medir el pH con tiras de papel pH.
 - Cuando se alcance el pH deseado adicionar 1 mL de Tris-HCl 0.1 M.
 - El fenol debe ser transparente.
- Mezcla cloroformo – alcohol isoamílico 24:1
Agregar 1 mL de alcohol isoamílico a 24 mL de cloroformo.
- Acetato de sodio 3M pH 5.3.
Pesar 24.609g de acetato de sodio, disolver en 70 mL, ajustar el pH y aforar a 100 mL.

ELECTROFORESIS DE ARN.

Recomendaciones.

- Tratar la cámara de electroforesis con H₂O₂ por media hora antes de usarla, enjuagar con agua estéril y secar el exceso.

Técnica.

Utilizar las siguientes cantidades para preparar el gel de agarosa al 1%.

Tabla 11. Preparación del gel de agarosa al 1%.

Componentes	Minigel (30 mL)	Gel grande (80 mL)
Agarosa BM	0.3 g	0.8 g
H ₂ O-DEPC	25.2 mL	67.2 mL
MOPS 10X	3 mL	8 mL
Formaldehído	1.5 mL	4 mL

- Pesar la agarosa en un matraz erlenmeyer. (Tratar de hacerlo directo del bote)
- Agregar la cantidad correspondiente de H₂O-DEPC.
- Calentar en microondas 25 segundos aproximadamente, retirarlo en cuanto se forme burbujas. Agitar suavemente hasta que este totalmente disuelto.
- Adicionar los mL de MOPS 10X, agitar continuamente y esperar a que se enfríe a una temperatura que se soporte al tacto.
- Adicionar el formaldehído y mover suavemente para que se homogenice sin formar burbujas.
- Vaciar la solución en el molde y dejar gelificar 10-20 minutos.
- Agregar el amortiguador de corrida hasta que apenas tape el gel y retirar el peine.

Para tratar las muestras debe prepararse una solución desnaturizante, la cual lleva por cada muestra de ARN los componentes de la tabla 12:

Tabla 12. Preparación de la solución desnaturizante.

Componente	Minigel (30 mL)	Gel grande (80 mL)
Formamida	5 µL	10 µL
MOPS 10X	1 µL	2 µL
Formaldehído	2 µL	4 µL
Azul	1 µL	2 µL
Bromuro de etidio	0.16 µL	0.32 µL

- Las muestras deben estar siempre en hielo y estar descongeladas el menor tiempo posible.

- Colocar los μL necesarios de muestra para tener los μg de ARN necesarios para el gel. (5 μg para el minigel y 50 μg para el gel grande).
- Agregar la cantidad apropiada de solución desnaturizante. (8 μL para el minigel y para el gel grande calcular la cantidad necesaria dependiendo de los μL de RNA utilizados)
- Poner los tubos en baño maría a 65 °C durante 10 min, después colocarlos inmediatamente en hielo.
- Cargar el gel con las muestras.
- Conectar la cámara a la fuente de poder y correr el minigel a 65 V hasta que entren las muestras y bajar después el voltaje a 55 y correr una hora y media. El gel grande se corre a 65V durante 3 horas aproximadamente.
- Observar el gel en el transiluminador UV.

Soluciones.

- EDTA 0.5 M, pH 8.0
Pesar 186.12 g de EDTA disolver en 800 mL, ajustar el pH con lentejas de NaOH y aforar a 1 L.
- Acetato de sodio 1 M
Pesar 8.203 g de acetato de sodio y aforar a 100 mL.
- MOPS 10 X, pH 7.0
Pesar 41.86 g de MOPS, 6.8 g de acetato de sodio, agregar 20 mL de EDTA 0.5M, ajustar pH. Aforar a 1 L con H₂O-DEPC y esterilizar por filtración.
- MOPS 12X, pH 7.0
Pesar 56.51 g de MOPS, agregar 60 mL de acetato de sodio 1M y 24 mL de EDTA 0.5M. Ajustar pH. Aforar a 1 L con H₂O-DEPC y esterilizar por filtración.
- Amortiguador de corrida.
Tomar 83.3 mL de MOPS 12X y aforar a 1L con agua estéril.
- Azul.

Tomar las siguientes cantidades de cada componente:

Cantidad	Componente	Concentración final
1 mL	Glicerol	50%
40 μL	EDTA 0.5 M, pH 8.0	10 mM
5 mg	Azul de bromofenol	0.25%
5 mg	Xileno de cianol	0.25 %

960 µL	H ₂ O-DEPC	
--------	-----------------------	--

- Bromuro de etidio

Preparar un solución stock de 10 mg/mL y hacer una dilución 1:6 para la solución que se pone en contacto con la muestra.

RT-PCR

Titan One Tube RT-PCR Kit.
Roche applied Science, USA.
Cat. 11 939 823 001.

Mezcla 1

En un tubo de PCR colocar las cantidades indicadas en la tabla 13.

Tabla 13. Cantidades de reactivos por tubo para la mezcla 1.

Componente	Control kit	Muestra ARN
Agua estéril	10.5 µL	X µL*
dNTP	4 µL	4 µL
DTT sol.	2.5 µL	2.5 µL
Inhibidor de RNasa	1 µL	1 µL
Primers control	2 µL	--
Primer sentido	--	2 µL**
Primer antisentido	--	2 µL**
ARN control	5 µL	--
ARN templado	--	X µL*
MgCl ₂	--	1.5 µL
µL totales	25 µL	25 µL

* La cantidad de agua depende de la cantidad de ARN que se añada. Se necesita 1 µg de ARN.

**Los primers utilizados tienen una concentración de 5 µM.

Mezcla 2

En un tubo eppendorf estéril colocar lo que se indica en la tabla 14.

Tabla 14. Cantidades de reactivos para la mezcla 2.

Componente	1 Reacción
Agua estéril	14 μ L
5X RT-PCR amortiguador	10 μ L
Enzima	1 μ L
Total	25 μL

Estas cantidades son solo para una reacción, se debe calcular la cantidad necesaria para el número de reacciones que se vayan a llevar a cabo.

Termociclador.

Se debe programar de la siguiente manera:

55°C, 30 min 94°C, 2 min 94°C, 30 s	} 1X
94°C, 30 s 60°C, 30 s 72°C, 45 s	} 10X
94°C, 30 s 60°C, 30 s 72°C, 45 s*	} 20X
94°C, 30 s 60°C, 30 s 72°C, 7 min 4°C, ∞	} 1X

* Se aumenta 5 s cada ciclo.

Los productos de RT-PCR se almacenan a 4°C a corto plazo y a -20°C a largo plazo.

ELECTROFORESIS DE DNA

Técnica.

Utilizar las cantidades de la tabla 15 para preparar un el gel para la electroforesis.

Tabla 15. Cantidades de reactivos para preparar un gel de agarosa al 1.3%

Componente	Minigel	Gel grande
Agarosa	0.4 g	1.3 g
H ₂ O estéril	29.4 mL	98 mL
TAE 50X	600 µL	2 mL
Bromuro de etidio	5 µL	10 µL

- Pesar la agarosa en un matraz erlenmeyer. (Tratar de hacerlo directo del bote)
- Agregar la cantidad correspondiente de H₂O estéril.
- Calentar en microondas 25 segundos aproximadamente, retirarlo en cuanto se forme burbujas. Agitar suavemente hasta que este totalmente disuelto.
- Adicionar la cantidad necesaria de TAE 50X, agitar continuamente y esperar a que se enfríe a una temperatura que se soporte al tacto.
- Adicionar el bromuro de etidio y mover suavemente para que se homogenice sin formar burbujas.
- Vaciar la solución en el molde y dejar gelificar 10-20 minutos.
- Agregar el amortiguador de corrida hasta que apenas tape el gel y retirar el peine.

Las muestras se preparan de la siguiente manera:

Tabla 16. Preparación de las muestras para la electroforesis.

Componente	Minigel		Gel grande	
	Marcador	Muestras	Marcador	Muestras
Marcador	1 µL	--	1 µL	--
Muestra (ADN)	--	x µL*	--	x µL*
TAE 1X	4 µL	4 µL	6 µL	6 µL
Amortiguador de carga	2 µL	2 µL	3 µL	3 µL

* La cantidad de µL depende de la cantidad de ADN requerida.

- Cargar el gel con las muestras.
- Conectar la cámara a la fuente de poder y correr el minigel a 65 V por 1 hora y media y el gel grande a 70 V por 2 horas y media aproximadamente.
- Observar el gel en el transiluminador UV.

Soluciones.

- Amortiguador de carga.

Utilizar las cantidades indicadas en la tabla 17 para preparar el amortiguador de carga:

Tabla 17. Preparación de la solución de carga.

Cantidad	Componente	Concentración final
1 mL	Glicerol	50%
4 µL	EDTA 0.5 M, pH 8.0	1 mM
5 mg	Azul de bromofenol	0.25%
5 mg	Xileno de cianol	0.25 %
996 µL	H ₂ O-DEPC	

- TAE 50X
Pesar 30.25 g de Tris- base, 4.65 g de EDTA, agregar 7.14 mL de ácido acético glacial y aforar a 500 mL.
- TAE 1X (Amortiguador de corrida).
Hacer una dilución 1:50 de la solución de TAE 50X.

PURIFICACIÓN DE ADN

PureLink™ Quick Gel Extraction Kit
Invitrogen™ Life Technologies, CA, USA.
Cat. K2100-12

Recomendaciones.

- Para minimizar la degradación de DNA se debe utilizar guantes y una navaja limpia para cortar la banda del gel.
- Mantener un ambiente estéril para evitar contaminación con DNAsas.
- Asegurar que no se introduzcan DNAsas en las soluciones del Kit.

Técnica.

Disolución del gel.

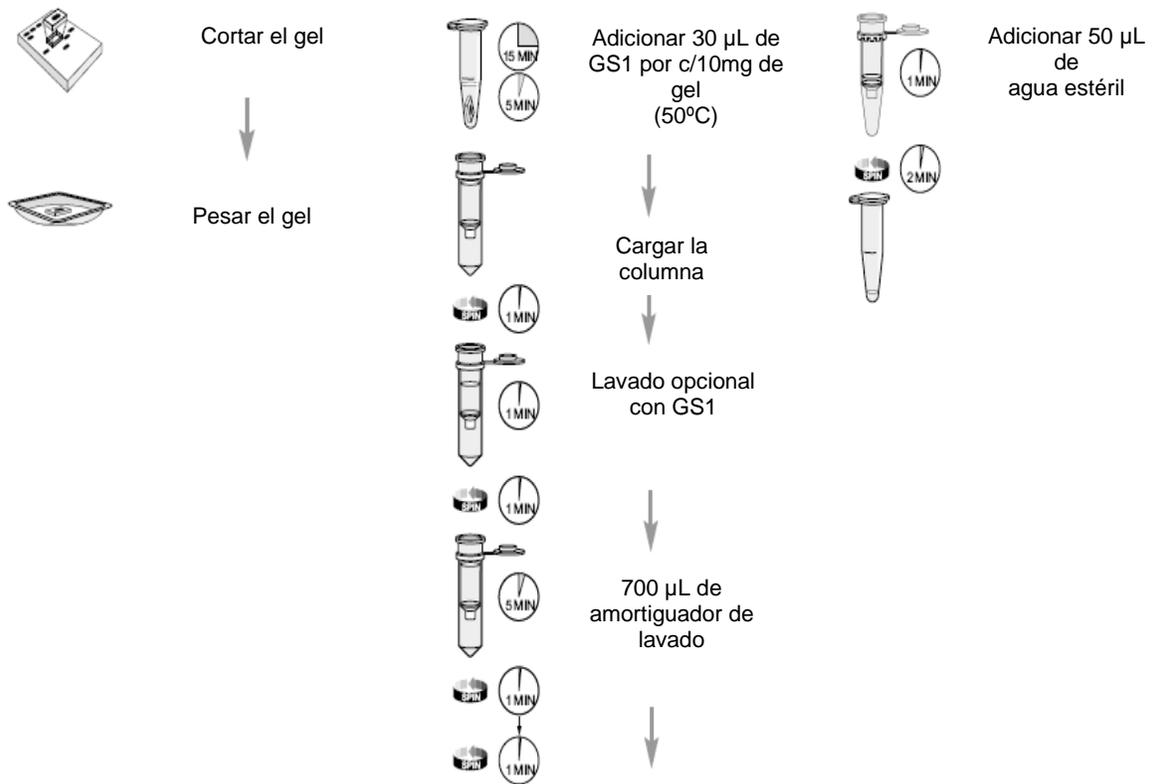
- Añadir el Amortiguador para solubilizar el gel (GS1) a la pieza del gel como sigue:
Para geles de agarosa $\leq 2\%$, colocar no más de 400 mg de gel en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Adicionar 30 μL de amortiguador GS1 por cada 10 mg de gel.
- Incubar el gel con GS1 A 50 °C por al menos 15 min. Agitar cada 3 min para asegurar que se disuelva.
- Una vez que el gel este disuelto incubar 5 min más a 50°C.
- Proceder a la purificación.

Lavados (todas las centrifugaciones son a temperatura ambiente)

- Colocar una columna en un tubo para lavado (2 mL) y colocar el gel disuelto en la columna.
- Centrifugar a 12 000 g por 1 min. Descartar el líquido en el tubo de lavado volver a colocar la columna.
- Lavado opcional: Añadir 500 μL de GS1 en la columna, incubar a temperatura ambiente por 1 min. Centrifugar a 12 000 g por 1 min y descartar el líquido del tubo de lavado. Volver a colocar la columna.
- Añadir 700 μL de amortiguador de lavado W9 con etanol a la columna e incubar 5 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 12 000 g por 1 min y descartar el líquido del tubo de lavado.
- Centrifugar a 12 000 g por 1 min para remover cualquier residuo de W9. Descartar el tubo de lavado.
- Proceder a eluir el ADN.

Elusión de ADN

- Colocar la columna en un tubo de recuperación de 1.5 mL. Añadir 50 μL de agua estéril caliente (65-70°C) al centro de la columna. Incubar 15 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12 000 g por 2 min. El tubo de recuperación contiene el DNA purificado. Descartar la columna.



Almacenamiento de ADN

- Almacenar el ADN purificado a -20°C .
- Para evitar el congelamiento y descongelamiento repetido del ADN guardarlo a 4°C para su uso inmediato o realizar alícuotas para almacenarlo a -20°C a largo plazo.

MARCAJE DE LA Sonda.

DIG high prime DNA labeling and detection starter kit II
 Roche Applied Science, USA.
 Cat. 11 585 614 910

Equipo adicional al incluido en el kit:

- Agua estéril, doblemente destilada.
- EDTA 0.2 M, pH 8.0

Técnica.

- Añadir en un tubo para reacción 300 ng de ADN templado y agua a un volumen final de 16 μ L.
- Desnaturalizar el ADN en un baño de agua hirviendo por 10 min e inmediatamente colocarlo en un baño de hielo.
- Colocar 4 μ L de DIG-High Prime al ADN desnaturalizado, mezclar y centrifugar ligeramente.
- Incubar toda la noche a 37°C.
- Parar la reacción añadiendo 2 μ L de EDTA 0.2 M, pH 8.0 y/o calentar a 65°C por 10 min.
- Almacenar a 4°C para uso inmediato.

EFICIENCIA DEL MARCAJE

DIG high prime DNA labeling and detection starter kit II

Roche Applied Science, USA.

Cat. 11 585 614 910

- Realizar las siguientes diluciones del ADN control incluido en el kit y del ADN templado.

Tabla 18. Preparación de las diluciones para comprobar la eficiencia del marcaje.

Diluciones	Dilución en el amortiguador (ADN/amortiguador)
1. 1:3.3 (A)	1 μ L/ 2.3 μ L
2. 1:10 (B)	1 μ L/10 μ L
3. A diluido 1:10 (C)	1 μ L (A)/ 10 μ L
4. B diluido 1:10	1 μ L (B)/ 10 μ L
5. C diluido 1:10	1 μ L (C)/ 10 μ L

- Colocar 1 μ L del cada dilución en una membrana de nylon.
- Fijar el ácido nucleico en un cross linker 30 s.
- Lavar la membrana con amortiguador de ácido maléico durante 2 min.
- Incubar 30 min con solución de bloqueo.
- Incubar 30 min con solución de anticuerpo.
- Lavar con el amortiguador de lavado 2 x 15 min.

- Lavar con el amortiguador de detección.
- En el cuarto oscuro con la luz roja colocar la membrana en un acetato con el ADN hacia arriba y agregar 0.1 mL de CSPD ready-to-use. Inmediatamente cubrir la membrana con un segundo acetato e incubar 5 min a temperatura ambiente.
- Exponer a una película de rayos X por 15-25 min a temperatura ambiente.
- Revelar.

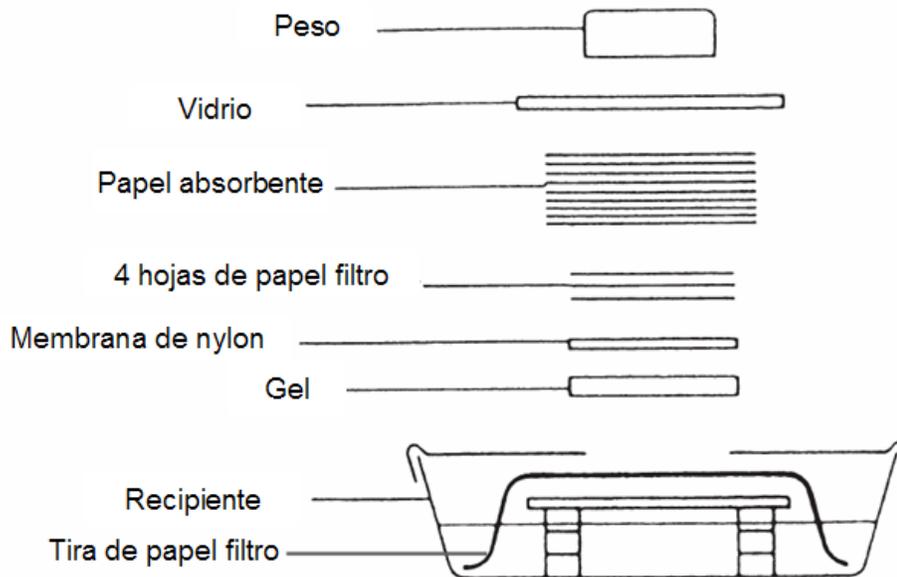
Soluciones. (Para el marcaje de la sonda y la detección inmunológica)

- SSC 20X
Pesar 88.2 g de citrato de sodio y 173.4 g de NaCl aforar a 1 L.
- SDS 10 %
Pesar 10 de SDS (duodecil sulfato de sodio) y aforar a 100 mL.
- Amortiguador de lavado.
Pesar 5.8 g de ácido maléico, 4.38 g de NaCl, agregar 1.5 mL de tween 20 y aforar a 500 mL.
- Amortiguador de ácido maléico.
Pesar 5.8 g de ácido maléico, 4.38 g de NaCl y aforar a 500 mL.
- Amortiguador de detección.
Pesar 7.88 g de Tris -HCl, 2.92 g de NaCl, disolver en 400 mL, ajustar el pH y aforar a 500 mL.
- Solución de bloqueo.
Hacer una dilución 1:10 de la solución de bloqueo 10X incluida en el kit en amortiguador de ácido maleico.
- Solución de anticuerpo.
Centrifugar 5 min a 10 000 rpm el anticuerpo anti-digoxigenina-AP incluido en el kit. Tomar la cantidad necesaria para hacer una dilución 1:10 000 en solución de bloqueo.

TRANSFERENCIA DE ARN

- Revelar el gel en el transiluminador
- Cortar la membrana 0.5 cm más chica que el gel.
- Humedecer por 5 min aproximadamente en el amortiguador de transferencia.

- Cortar y humedecer en el mismo amortiguador una tira larga de papel filtro del largo del gel y con un ancho que permita que la tira este en contacto con el amortiguador de transferencia y colocarlo sobre el molde que soportara al gel.
- Se coloca el gel, encima de él la membrana y sobre ésta 4 piezas de papel filtro cortadas 0.5 más pequeñas que la membrana.
- Colocar de 8 a 10 cm de alto de papel absorbente ligeramente más pequeños que las piezas de papel filtro.
- Colocar un rectángulo de vidrio y finalmente sobre éste colocar una pieza pesada en el centro para compactar.
- Se deja que se lleve a cabo la transferencia durante 10- 12 horas.
- Revisar si se transfirió el ARN.
- Retirar las el papel absorbente y el papel fiarlo con cuidado de o mover la membrana.
- Colocar al gel junto con la membrana en el transiluminador UV y levantar con cuidado la membrana del gel.
- Si el gel ya no tiene nada retirar la membrana y enjuagarla con el amortiguador. Una vez que se ha marcado la posición de las bandas 28S y 18S con lápiz No. 2 (del lado inverso de donde esta el ARN).
- Se seca la membrana con papel filtro y después a temperatura ambiente, se mete al cross linker 30 s a una energía de 1200.
- Se guarda la membrana en una bolsa de hibridación a -20°C.



Soluciones.

- SSC 20X (Amortiguador de transferencia.)

La preparación de este amortiguador está indicada en la técnica para determinar la eficiencia de marcaje de la sonda.

HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN INMUNOLÓGICA.

DIG high prime DNA labeling and detection starter kit II

Roche Applied Science, USA.

Cat. 11 585 614 910

- Precaentar un volumen apropiado de la solución de hibridación (10 ml/100 cm²) a la temperatura de hibridación (43-44°C)
- Prehibridar la membrana durante 2 horas.
- Colocar 8 µL de sonda marcada y 92 µL de solución para hibridar en un tubo eppendorf y hervir durante 10 min. Inmediatamente después colocar la sonda en un baño de hielo. Adicionar la sonda desnaturalizada a la solución de hibridación (que quede a una concentración de 25 ng/ mL de solución de hibridación).
- Hibridar la membrana durante 15 – 20 hrs a 43 – 44°C.
- Realizar 2 lavados con SSC 2X, SDS 0.1% a temperatura ambiente, 2 x 5 min.
- Realizar 2 lavados con SSC 0.5X, SDS 0.1% a 50°C por 15 min.
- Lavar con el amortiguador de lavado por 5 min.
- Incubar la membrana con la solución de bloqueo durante 30 min.

- Incubar la membrana con la solución de anticuerpo durante 30 min.
- Realizar 2 lavados con el amortiguador de lavado por 15 min.
- Incubar con el amortiguador de detección por 5 min.
- En el cuarto oscuro con la luz roja colocar la membrana en un acetato con el ADN hacia arriba y agregar 1 mL de CSPD ready-to-use. Inmediatamente cubrir la membrana con un segundo acetato e incubar 5 min a temperatura ambiente.
- Incubar la membrana con CSPD a 37°C durante 30 min.
- Exponer a una película de rayos X por 15-25 min a temperatura ambiente.
- Revelar.

Para desnudar la membrana realizar los siguientes lavados:

- Enjuagar la membrana en SSC 2X.
- Agregar SDS 0.1% hirviendo a la membrana y dejar que se enfríe. Repetir este paso una vez más.
- Guardar la membrana en SSC 2X a 4°C.

10. BIBLIOGRAFÍA.

Alao JP, The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention, *Mol cancer*, 2007;6.

Alberts B, Johnson A, et al., *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed., 2002 Garland Science Taylor and Francis Group, 984-1026,1313-1362.

Allen RG, Tresini M, Oxidative stress and gene regulation, *Free Radic Biol Med*, 2000;28:463-499.

Ansar S, Iqbal M, et al., Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitritotriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice, *Carcinogenesis*, 1999; 20:599-606.

Arnold A, Papanikolaou A, Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis, *J Clin Oncol*, 2005;23:4215-4224.

Ávila LR, Actividad antioxidante in vitro de preparaciones comerciales y extractos de ajo, tesis de licenciatura, Facultad de química, UNAM, 2004.

Awai M, Narasaki M, et al., Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitritotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Am J Pathol*, 1979; 95:663-673.

Bartek J, Lukas J, et al., Perspective: defects in cell cycle control and cancer, *JPathol*, 1999;187:95-99.

Blagosklonny MV, Cell immortality and hallmarks of cancer, *Cell Cycle*, 2003;2:296-299.

Bravo L, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutr Rev*, 1998;56:317-333.

Brennan T, Frenkel C, Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol* 1977; 59:411-416.

Brown KE, Mathahs M, et al., Chronic iron overload stimulates hepatocyte proliferation and cyclin D1 expression in rodent liver, *Transl Res*, 2006;148:55-62.

Burcham PC, Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts, *Mutagenesis*, 1998;13:287-305.

Cai FG, Xiao JS, et al., Effects of ischemic preconditioning on cyclin D1 expression during early ischemic reperfusion in rats, *World J Gastroenterol*, 2006;12:2936-2940.

Chopra K, Singh D, et al., Nephrotoxicity and its prevention by catechin in ferric nitritotriacetate promoted oxidative stress in rats, *Human Exp Toxicol.*,2004;23:137-143.

Collins I, Garrett MD, Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors, *Curr Opin Pharmacol*, 2005;5:366-373.

Cook SJ, Balmanno K, et al., Regulation of cell cycle re-entry by growth, survival and stress signaling pathways, *Biochem Soc Trans*, 2000;28:233-240.

Crawford DR, Edbauer-Nechamen CA, et al., Oxidant-modulated gene expression. In Davies and Ursini (eds). *The Oxygen Paradox*, 1995, pp. 327-335.

Dávalos-Salas MI, Efecto del tratamiento con un concentrado de arándano sobre alteraciones inducidas por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) tanto *in vivo* como *in vitro*. Tesis para obtener el grado de maestra en ciencias. Facultad de Química, UNAM, 2006.

Diehl JA, Cycling to cancer with cyclin D1, *Cancer Biol Ther*, 2002;1:226-231.

Drucker BJ, Renal cell carcinoma: current status and future prospects, *Cancer Treat Rev*, 2005;31:536-545.

Dutta KK, Nishinaka Y, et al., Two distinct mechanisms for loss of thioredoxin-binding protein-2 in oxidative stress-induced renal carcinogenesis, *Lab Invest.*, 2005;85:798-807.

Erdelmeier I, Gerard-Monnier D, et al., Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol*, 1998; 10:1184-1194.

Evans P, Halliwell B, Micronutrients: oxidant/antioxidant status, *Br J Nutr*, 2001;85(suppl 2):S67-S74.

Ferguson IB, Christopher B, et.al., Inhibition by calcium of senescence of detached cucumber cotyledons. *Plant Physiol* 1983; 71:182-186.

Finkel T, Oxidant signals and oxidative stress, *Curr Opin Cell Biol*, 2003;15:247-254.

Finkel T, Oxygen radicals and signaling, *Curr Opin Cell Biol*, 1998;10:248-253.

Fruehauf JP, Meyskens FL, Reactive oxygen species: a breath of life or death?, *Clin Cancer Res*, 2007;13:789-794.

Fukuda A, Toshihiko O, et.al., Oxidative stress response in iron – induced renal carcinogenesis: acute nephrotoxicity mediates the enhanced expression of glutathione S-transferase γ isozyme, *Arch Biochem*, 1996; 329:39-46.

Gago-Domínguez M, Castelao JE, et. al., Lipid peroxidation: a novel unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States), *Cancer causes and control*, 2002;13:287-293.

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

Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, et al., Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol*, 1998; 10:1176-83.

Gladden AB, Diehl JA, Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer, *J Cell Biochem*, 2005;96:906-913.

Halliwel B, Chirico S, Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance, *Am J Clin Nutr*, 1993;57(suppl):715S-725S.

Halliwel B, Oxidative stress and cancer: have we moved forward?, *Biochem J*, 2007;401:1-11.

Halliwel B, Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiol*, 2006;141:312-322.

Hamazaki S, Okada S, et al., Oxygen reduction and lipid peroxidation by iron chelates with special reference to ferric nitrilotriacetate, 1989;272:10-17.

Hamazaki S, Okada S, et al., Thiobarbituric acid-reactive substance formation of rat kidney brush border membrane vesicles induced by ferric nitrilotriacetate, *Arch Biochem Biophys*, 1989;274:348-354.

Hanahan D, Weinberg RA, The hallmarks of cancer, *Cell*, 2000;100:57-70.

Hedberg Y, Davoodi E, et al., Cyclin E and p27 protein content in human renal cell carcinoma: clinical outcome and associations with cyclin D, *Int J Cancer*, 2002;102:601-607.

Hedberg Y, Davoodi E, et al., Cyclin-D1 expression in human renal cell carcinoma, *Int J Cancer (Pred Oncol)*, 1999;84:268-272.

Hedberg Y, Ljungberg B, et al., Expression of cyclin D1, D3, E, and p27 in human renal cell carcinoma analysed by tissue microarray, *Br J Cancer*, 2003;88:1417-1423.

Hedberg Y, Ljungberg B, et al., Retinoblastoma protein in human renal cell carcinoma in relation to alterations in G1/S regulatory proteins, *Int J Cancer*, 2004;109:189-193.

Hosokawa Y, Arnold A, Mechanism of cyclin D1 (CCND, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression, *Genes Chromosomes Cancer*, 1998;22:66-71.

<http://members.aol.com/BearFlag45/Biology1A/LectureNotes/LNPics/Recomb/pcr.gif>, 2007.

<http://sleekfreak.ath.cx:81/3wdev/VITAHTML/SUBLEV/IT1/REFOREST.HTM>, 2007

Hur K, Kim JR, et al, Overexpression of cyclin D1 and cyclin E in 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced rat colon carcinogenesis, *J Vet Sci*, 2000;1:121-126.

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

Iqbal M, Giri U, et al., Age-dependent renal accumulation of 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE)-modified proteins following parentela administration of ferric nitrilotriacetate commensurate with its differential toxicity: implications for the involvement of HNE-protein adducts in oxidative stress and carcinogenesis, *Arch Biochem Biophys*, 1999;365:101-112.

Iqbal M, Okazaki Y, et al., a nitric oxide generador attenuates ferric nitrilotriacetate-induced renal oxidative stress, hyperproliferative response and necrosis in ddY mice, *Biochim Biophys Acta*, 2003;1623:98-108.

Iqbal M, Okazaki Y, et al., In vitro curcumin modulates ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) and Hydrogen Peroxide (H₂O₂)-induced peroxidation of microsomal membrane lipids an DNA damage, *Teratog Carcinog Mutagen Suppl*, 2003;1:151-160.

Iqbal M, Okazaki Y, et al., Nitroglycerin, a nitric oxide generador attenuates ferric nitrilotriacetate-induced renal oxidative stress, hyperproliferative response and necrosis in ddY mice, *Biochim Biophys Acta*, 2003;1623:98-108.

Iqbal M, Rezazadeh H, et al., α -Tocopherol (vitamin – E) ameliorates ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) – dependent renal proliferative response and toxicity: diminution of oxidative stress, *Hum Exp Toxicol.*, 1998;17:163-171.

Joyce D, Albanese C, et al., NF- κ B and cell-cycle regulation: the cyclin connection, *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001;12:73-90.

Karp G, Cell and molecular biology, concepts and experiments. John Wiley and sons, inc 3rd edition, 2002, 580-619, 671-695.

Kawanishi S, Hiraku Y, et al., The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis, *Free Radic Biol Med.*, 2002; 32:822-832.

Kehrer JP, The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity, *Toxicology*, 2000;149:43-50.

Klaunig JE, Kamendulis LM, The role of oxidative stress in carcinogenesis, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004;44:239-267.

Komutarin T, Azadi S, et al., Extract of seed coat of Tamarindus indica inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo, *Food Chem Toxicol*, 2004;42:649-658.

Kuser P, Hall DR, et al., The mechanism of iron uptake by transferrins: the X-ray structures of the 18 kDa NII domain fragment of duck ovotransferrin and its nitrilotriacetate complex, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 2002;58:777-783.

Lander HM, An essential role for free radicals and derived species in signal transduction, *FASEB J*, 1997;11:118-24.

Lee KW, Lee HJ, The roles of polyphenols in cancer chemoprevention, *Biofactors*, 2006;26:105-121.

Leibold E, Deckardt K, et al., NTA and Fe(III)NTA: differential patterns of renal toxicity in subchronic studies, *Human Exp Toxicol.*, 2002; 21:445-452.

Levine RL, Wehr N, et al., Determination of carbonyl groups in oxidized proteins, *Methods Mol Biol*, 2000;99:15-24.

Li H, Jacque A, Diffusion distances of known iron complexes in model systems, *Free Radic Biol Med*, 1999; 26:61-72.

Long LH, Evans PJ, et al., Hydrogen peroxide in human urine: Implications for antioxidant defense and redox regulation, *Biochem Biophys Res Commun*, 1999;262:605-609.

Loo G, Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review), *J Nutr Biochem*, 2003;14:64-73.

Lowry OH, Rosebrough NJ, et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 1951;193:265-275.

Malumbres M, Barbacid M, To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer, *Nat Rev Cancer*, 2001;1:222-231.

Marnett LJ, Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, 2000;21:361-370.

Martinello F, Soares SM, et al., Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters, *Food Chem Toxicol*, 2006;44:810-818.

Martínez-Muñoz C, Post JA, et al., The effect of hydrogen peroxide on the cyclin D expression in fibroblasts, *Cell Mol Life Sci*, 2001;58:990-996.

Menon SG, Sarsour EH, et al., Redox regulation of the G1 to S phase transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle, *Cancer Res*, 2003;63:2109-2117.

Milowsky MI, Nanus DM, Chemotherapeutic strategies for renal cell carcinoma, *Urol Clin N Am*, 2003, 30:601-609.

Musgrove EA, Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation, *Growth Factors*, 2006;24:13-19.

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

Nichenametla SN, Taruscio TG, et al., A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2006;46:161-183.

Nordberg J, Arnér ESJ, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radic Biol Med*, 2001;31:1287-1312.

Nyström T, Role of oxidative carbonylation in protein quality control senescence, *EMBO J.*, 2005;24:1311-1317.

OberleyTD, Oxidative damage and cancer, *Am J Pathol*, 2002;160:403-408.

Okada S, Prevention of free – radical mediated tissue damage and carcinogenesis induced by low – molecular weight iron, *Biometals*, 2003;16:99-101.

Oktyabrsky ON, Smirnova GV, Redox Regulation of Cellular Functions, *Biochemistry*, 2007;72:132-145.

Oliveira JG, Prados RZ, et al., The housekeeping gene glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase is inappropriate as internal control in comparative studies between skin tissue and cultured skin fibroblasts using Northern blot analysis, *Arch Dermatol Res*, 1999;291:659-661.

Park SG, Chung C, et al., Up-regulation of cyclin D1 by HBx is mediated by NF-kB2/BCL3 complex through kB site of cyclin D1 promoter, *J Biol Chem*, 2006;281:31770-31777.

Parrota JA, Healing plants of peninsular India, ISBN085199 S01-2, 2001, UK.

Patterson BD, MacRae EA, et.al., Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Analytical Biochemistry*, 1984; 139:487-492.

Petty WJ, Dragnev KH, et al., Cyclin D1 as a target for chemoprevention, *Lung cancer*, 2003;41:S155-S161.

Preece NE, Evans PF, et al., The induction of autoxidative tissue damage by iron nitrilotriacetate in rats and mice, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 1988;93:89-100.

Preece NE, Hall DE, et al., Effects of acute and sub-chronic administration of iron nitrilotriacetate in the rat, *Toxicology*, 1989; 59:37-58.

Qi W, Reiter RJ, et al., Inhibitory effects of melatonin on ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation and oxidative DNA damage in the rat kidney, *Toxicology*, 1999;139:81-91.

Rahman A, Ahmed S, et al., Glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor, abrogates ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress and renal damage, *Arch Biochem Biophys*, 2003;418:71-79.

Reznick AZ, Packer L, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, *Meth Enzymol* 1994; 223: 357-363.

Rice-Evans C, Flavonoid Antioxidants, *Curr Med Chem*, 2001;8:797-807.

Ross JA, Kasum CM, Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety, *Annu Rev Nutr*, 2002;22:19-34.

Salahudeen AK, Clark EC, et al., Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo, *J Clin Invest.*, 1991;88:1886-93.

Scalbert A, Manach C, et al., Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2005;45:287-306.

Schafer KA, The cell cycle: a review, *Vet Pathol*, 1998;35:461-478.

Shackelford RE, Kaufman WK, et al., Oxidative stress and cell cycle checkpoint function, *Free Radic Biol Med*, 2000;28:1387-1404.

Singh D, Chander V, et al., Carvedilol and trimetazidine attenuates ferric nitrilotriacetate-induced oxidative renal injury in rats, *Toxicology*, 2003;191:143-151.

Soobrattee MA, Bahorum T, et al., Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer, *Biofactors*, 2006;27:19-35.

Sudjaroen Y, Haubner R, et al., Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp, *Food Chem Toxicol*, 2005;43:1673-1682.

Sun Yi, Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis, *Free Radic Biol Med*, 1990;8:583-599.

Suzuki YJ, Forman HJ, et al., Oxidants as stimulators of signal transduction, *Free Radic Biol Med*, 1997;22:269-285.

Terada Y, Inoshita S, et al., Regulation of cyclin D1 expression and cell cycle progression by mitogen-activated protein kinase cascade, *Kidney Int*, 1999;56:1258-1261.

Tessema M, Lehmann U, et al., Cell cycle and o end, *Virchows Arch*, 2004;444:313-323.

Thannickal VJ, Fanburg BL, Reactive oxygen species in cell signaling, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000;279:L1005-L1028.

Toyokuni S, Tanaka T, et al., Induction of renal cell carcinoma in male wistar rats treated with cupric nitrilotriacetate, *Lab Invest*, 1996;75:239-248.

Troadec MB, Courselaud B, et al., Iron overload promotes cyclin D1 expression and alters cell cycle in mouse hepatocytes, *J Hepatol*, 2006;22:391-399.

Tsuchiya K, Akai K, et al, Oxygen radicals photo-induced by ferric nitrilotriacetate complex, *Biochim Biophys Acta*, 2005; 30:1725:111-9.

Uchida K, Fukuda A, et al., A renal carcinogen ferric nitrilotriacetate mediates a temporary accumulation of aldehyde-modified proteins within cytosolic compartment of rat kidney, *Arch Biochem Biophys.*, 1995;317:405-411.

Umemura T, Sai K, et al., Oxidative DNA damage, lipid peroxidation and nephrotoxicity induced in the rat kidney after ferric nitrilotriacetate administration, *Cancer Letters*, 1990;54:95-100.

Uto H, Ido A, et al., Transduction of antisense Cyclin D1 using two – step gene transfer inhibits the growth of rat hematoma cells, *Cancer Res.*, 2001;61:4779-4783.

Valko M, Izakovic M, et al., Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol Cell Biochem*, 2004;266:37-56.

Valko M, Leibfritz D, et al., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int J Biochem Cell Biol*, 2007;39:44-84.

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

Van den Heuvel S, Cell – cycle regulation, *WormBook*, The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/woembook.1.28.1, <http://wormbook.org>.

Veal EA, Day AM, et al., Hydrogen peroxide sensing and signaling, *Mol Cell*, 2007;26:1-14.

Wada S, Chikamori H, et. al., Synthesis of new titanium chelated complexes stabilized in aqueous solution and their stability on pH and temperature. *J Mater Sci Lett*. 2000;19:1855-1858.

Wang SY, Hongjun J, Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen, *J Agric Food Chem*, 2000; 48:5677-5684.

Watson JD, Gilman M, et al., *Recombinant DNA*, 2nd ed., Scientific American Books, USA, 1992.

Ye SF, Ichimura K, et al., Suppressive effects of active hexose correlated compound on the increased activity of hepatic renal ornithine decarboxylase induced by oxidative stress, *Life Sci*, 2003; 74:593-602.

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