



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

Efecto del tratamiento con un extracto de Tamarindus indica sobre el daño inducido por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (Fe-NTA)

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

PRESENTA

María Montserrat Torres Martínez

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. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Vocal	Dra. María Elena Ibarra Rubio
Secretario	Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
1er. Suplente	Dra. María Elena Bravo Gómez
2º. Suplente	Dra. Vanesa Maya Ampudia

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química,
Laboratorio F-120, Departamento de Biología, Ciudad Universitaria,
México D.F.

El proyecto se realizó con apoyo de la Dirección General de
Asuntos del Personal Académico bajo el PAPIIT No. IN-224805 y
No.IN-214307.

Dra. María Elena
Ibarra Rubio

María Montserrat
Torres Martínez

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por todo su apoyo.

A la Dra. Ibarra, por ser mi guía en el laboratorio, por toda su ayuda y por su paciencia.

A todos las personas que trabajaron conmigo en el laboratorio: Dorys, Adriana, Mercedes, Fernando, José, Pedro y Arturo.

A todos los profesores de la carrera que me apoyaron y creyeron en mí.

ÍNDICE

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCIÓN	3
2.1	Estrés oxidativo y defensas antioxidantes.....	3
2.2	Cáncer.....	6
2.3	Factor de transcripción NF-kB	7
2.4	Cáncer renal	9
2.5	Nitritotriacetato de hierro (FeNTA)	10
2.6	Antioxidantes polifenólicos	11
2.6.1	Flavonoides.....	12
2.7	<i>Tamarindus indica</i>	13
III	JUSTIFICACIÓN	16
IV	HIPÓTESIS	16
V	OBJETIVOS	16
VI	METODOLOGÍA	17
6.1	Preparación del extracto de tamarindo.....	17
6.2	Caracterización del extracto de tamarindo.....	17
6.2.1	Determinación de la densidad.....	17
6.2.2	Determinación fenoles totales	17
6.2.3	Determinación de la capacidad de inhibir radical superóxido.....	18
6.3	Protocolo experimental <i>in vivo</i>	19
6.4	Marcadores estrés oxidativo.....	19
6.4.1	Lipoperoxidación.....	19
6.4.2	Daño oxidativo a proteínas.....	20
6.4.3	Niveles de peróxido de hidrógeno.....	21
6.5	Actividad enzimas antioxidantes.....	21
6.5.1	Catalasa.....	21
6.5.2	Superóxido dismutasa.....	22
6.5.3	Glutación peroxidasa.....	22
6.6	Activación del Factor de Transcripción NF-kB.....	23
6.7	Análisis estadístico.....	24
VII	RESULTADOS	25
7.1	Extracto de tamarindo.....	25
7.2	Protocolo experimental <i>in vivo</i>	26
7.3	Marcadores de estrés oxidativo.....	26
7.3.1	Daño oxidativo a lípidos.....	26
7.3.2	Daño oxidativo a proteínas.....	27
7.3.3	Concentración de peróxido de hidrógeno.....	28
7.4	Actividad enzimas antioxidantes.....	28
7.4.1	Catalasa.....	28
7.4.2	Superóxido dismutasa.....	29
7.4.3	Glutación peroxidasa.....	30
7.5	Actividad del factor de transcripción NF-kB (niveles I κ B- α).....	31
VIII	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32
IX	CONCLUSIONES	35

X	APÉNDICE	36
10.1	Preparación extracto etanólico de tamarindo.....	36
10.2	Cuantificación de fenoles totales.....	36
10.3	Inactivación de radical superóxido.....	37
10.4	Preparación del carcinógeno renal FeNTA.....	38
10.5	Oxidación de lípidos.....	38
10.6	Oxidación de proteínas.....	40
10.7	Concentración peróxido de hidrógeno.....	43
10.8	Medición de proteínas totales.....	45
10.9	Actividad de enzimas antioxidantes.....	46
10.9.1	Catalasa.....	46
10.9.2	Superóxido dismutasa.....	48
10.9.3	Glutación peroxidasa.....	51
10.10	Western blot.....	53
XI	BIBLIOGRAFÍA	60

I RESUMEN

Efecto del tratamiento con un extracto de Tamarindus indica sobre el daño inducido por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)

El cáncer renal es uno de los tipos de cáncer menos estudiados, y el modelo experimental más utilizado para este fin es el tratamiento de roedores con nitrilotriacetato de hierro (Fe-NTA). Existen evidencias que relacionan la carcinogenicidad del FeNTA con su capacidad de generar estrés oxidativo aunque no se conocen los mecanismos moleculares. Por esta razón es importante probar el uso de antioxidantes para combatir el estrés oxidativo generado por el FeNTA. Entre las moléculas con mayor actividad antioxidante están los compuestos polifenólicos, que se encuentran presentes en los vegetales y frutos que consume el ser humano. Se sabe que el fruto del tamarindo posee gran cantidad de estos compuestos. Por lo tanto, se desea probar si un extracto del fruto del tamarindo es capaz de prevenir los efectos del carcinógeno FeNTA en roedores, y determinar si entre los mecanismos moleculares de carcinogenicidad de este compuesto se encuentra involucrado el factor de transcripción NF-kB.

Para ello se preparó un extracto de tamarindo, el cual contiene aproximadamente 3.3 mg de fenoles totales/mL y posee capacidad de inactivar al radical superóxido *in vitro* con una IC₅₀ de 2.4 ug fenoles/mL, el cual es 8 veces mayor IC₅₀ de la vitamina C.

Una vez que se determinó la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto, se probó su efecto *in vivo*. Para ello, se administró en ratas macho Wistar cada 24 h durante 15 días a una dosis de 25 mg de fenoles totales/kg vía ig. Al término de este tratamiento se administró el carcinógeno FeNTA vía ip a una dosis de 15 mg de Fe/kg de peso. Una hora después se sacrificaron los animales tomándose muestras de corteza renal y sangre para determinar el daño oxidativo, la actividad de enzimas las antioxidantes y la activación del factor de transcripción NF-kB.

El pretratamiento con el extracto de tamarindo mostró protección parcial en la oxidación de lípidos y proteínas, y previno el incremento de los niveles de peróxido de hidrógeno y la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes.

En cuanto a los resultados de la activación de NF- κ B no se observaron cambios en la expresión de I κ B- α , por lo que no se puede concluir acerca de la participación de este factor de transcripción en el mecanismo molecular de carcinogénesis por FeNTA.

Con base en estos resultados se puede decir que el extracto de tamarindo preparado en nuestras instalaciones tiene una alta capacidad antioxidante. El pretratamiento de ratas con este extracto fue capaz de proteger contra las alteraciones en la corteza renal causadas por la exposición a FeNTA.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Estrés Oxidativo y Defensas Antioxidantes

En el metabolismo de los organismos aerobios normalmente se forman especies reactivas de oxígeno (ERO) que, en concentraciones fisiológicas, son esenciales para el funcionamiento adecuado de la célula; por ejemplo, el peróxido de hidrógeno se ha identificado como regulador de factores de transcripción sensibles al estado redox [Nordberg J, *et al.*, 2001; Loo G., 2003].

Existen varios procesos celulares donde se producen ERO, una de las principales vías es la respiración celular, donde se lleva a cabo la reducción univalente del oxígeno que sigue los pasos mostrados en la figura 1.

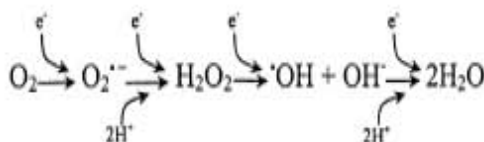


Fig.1. Reducción univalente del oxígeno

Las ERO incluyen a varias moléculas, entre las más importantes están el radical superóxido formado por la adición de un electrón a una molécula de oxígeno, el peróxido de hidrógeno que, a pesar de no ser un radical, es una especie tóxica que atraviesa libremente las membranas biológicas, y a partir de él pueden generarse otras especies como el radical hidroxilo, una de las moléculas más reactivas. Las ERO son capaces de generar daño oxidativo a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ADN [Conner EM, *et al.*, 1996; Halliwell B., 2006].

A su vez, la célula cuenta con defensas para evitar el daño oxidativo; estos sistemas de detoxificación involucran enzimas y antioxidantes no enzimáticos. Entre los sistemas no enzimáticos podemos mencionar al GSH y las vitaminas E y C, entre otros, mientras que entre las enzimas antioxidantes más estudiadas se encuentran: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), su función fisiológica se esquematiza en la figura 2 [Sun Y, *et al.*, 1990; Nordberg J, *et al.*, 2001].

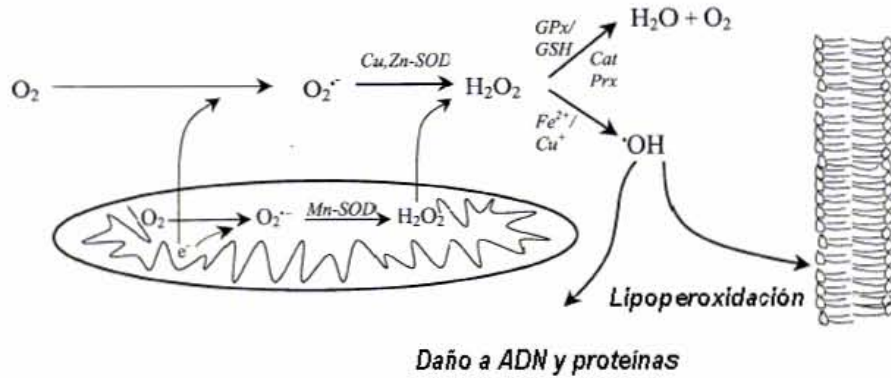


Fig.2. Función fisiológica de la SOD, la CAT y la GPx.

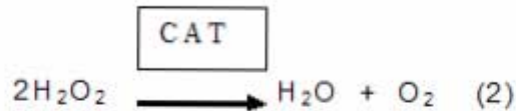
La SOD es una enzima cuya función es metabolizar el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (reacción 1).



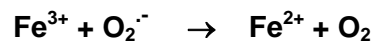
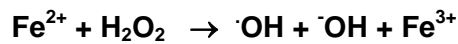
La SOD no es realmente una enzima detoxificante ya que el producto de su actividad, el H_2O_2 , es un agente tóxico. Sin embargo, es el primer paso de una cascada enzimática que conduce a su inactivación completa [Halliwell B, 2006].

En las células eucarióticas existen tres isoenzimas de SOD, de las cuales dos contienen en su sitio activo cobre y zinc (Cu, Zn-SOD), y la tercera manganeso (Mn-SOD). La Cu,Zn-SOD tiene dos isoformas, una de ellas se localiza principalmente en el citosol, aunque también se encuentra en lisosomas, núcleo y espacio intermembranoso mitocondrial; la otra isoforma es extracelular (EC-SOD) y se localiza en fluidos como plasma, líquido sinovial y linfa. La Mn-SOD se localiza en la matriz mitocondrial [Weisiger RA, *et al.*, 1973].

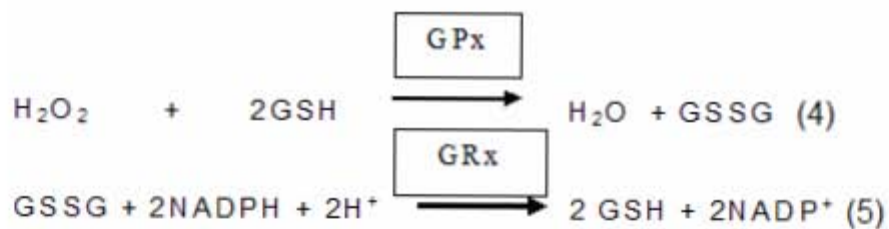
La CAT es una hemoproteína con cuatro ferriprotoporfirinas por molécula, se encuentra en altas concentraciones en los peroxisomas de hígado y riñón, y bajas en tejido conectivo. Posee dos funciones: la descomposición del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno (reacción 2), a la cual se le conoce como actividad catalítica, y la oxidación de donadores de protones como metanol, etanol y fenoles, a la cual se le conoce como actividad de peroxidasa [Matés JM, *et al.*, 1999].



Una consecuencia importante de la función de CAT es disminuir el riesgo de formación de radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno vía reacción de Fenton (reacción 3) catalizada por iones de Fe y Cu [Nordberg J, *et al.*, 2001].



La GPx cataliza la reducción de H_2O_2 a agua utilizando glutatión reducido (GSH) como sustrato (reacción 4), también puede reducir otros peróxidos y transformarlos a alcoholes. El GSH, a su vez, es regenerado por la glutatión reductasa en presencia de NADPH dando como resultado una reacción acoplada [Matés JM, *et al.*, 1999] (reacción 5).



En los mamíferos existen dos tipos de GPx, una es dependiente de selenio y la otra no. De la forma dependiente de selenio existen cuatro tipos: GPx citosólica, extracelular, gastrointestinal y membranal [Valko M, *et al.*, 2006].

Si se altera el balance entre la formación de ERO y los mecanismos antioxidantes celulares, ya sea por el aumento de los primeros o el debilitamiento de los segundos, se produce un estado de estrés oxidativo, donde las ERO inducen reacciones en cadena que pueden dañar moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos dando lugar al desarrollo de diversos padecimientos como diabetes, aterosclerosis y cáncer [Sun Y, *et al.*, 1990; Nordberg J, *et al.*, 2001; Valko M, *et al.*, 2006; Halliwell B., 2007].

2.2 Cáncer

Una de las patologías que está relacionada con el estrés oxidativo es el cáncer, que está definido como la reproducción de células de forma descontrolada, las cuales pueden presentar capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Este padecimiento es un conjunto de enfermedades con diversos signos y síntomas, que se clasifica de acuerdo al tejido y célula origen [Alberts B, *et al.*, 2002].

El desarrollo del cáncer comprende un conjunto de etapas en donde ocurren diferentes cambios genéticos. La mayoría de los tumores se derivan de una sola célula en la que ocurrieron varias mutaciones que le confirieron algunas ventajas para proliferar. De esta forma, todas las células derivadas de la primera heredan su genotipo y les ocurren otras mutaciones que van acumulándose de tal forma que se da una transformación progresiva hacia células cancerosas malignas [Hanahan D, 2000].

La aparición del cáncer está relacionada con cambios en el ADN que pueden ser provocados por diferentes agentes: a) carcinógenos que, entre otras lesiones, provocan cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN; b) radiaciones, que generalmente causan rupturas en los cromosomas y traslocaciones; y c) virus, que introducen a la célula ADN extraño que contiene genes que controlan el ciclo celular [Alberts B, *et al.*, 2002].

Existen muchas evidencias que relacionan el estrés oxidativo con el cáncer. Se sabe que las modificaciones al ADN resultantes del daño oxidativo representan los primeros pasos en el proceso de carcinogénesis. Está demostrado que las ERO, especialmente el radical hidroxilo, causan daño directo al ADN, y se han identificado más de 100 productos de oxidación, entre los que se encuentran las rupturas de una y dos hebras, modificaciones en el esqueleto del ADN, daño oxidativo a las bases, creación de sitios AP y transversiones G-T [Cadenas S, *et al.*, 1999; Valko M, *et al.*, 2006].

Por otro lado, las ERO producen daño oxidativo a lípidos, generándose especies como el malondialdehído (MDA), que es uno de los productos principales de este proceso, el cual se ha demostrado que es mutagénico en bacterias y células de mamífero, y carcinógeno en ratas, ya que puede formar aductos con la adenina, la guanina y la citosina (figura 3) [Marnett MJ, 1999].

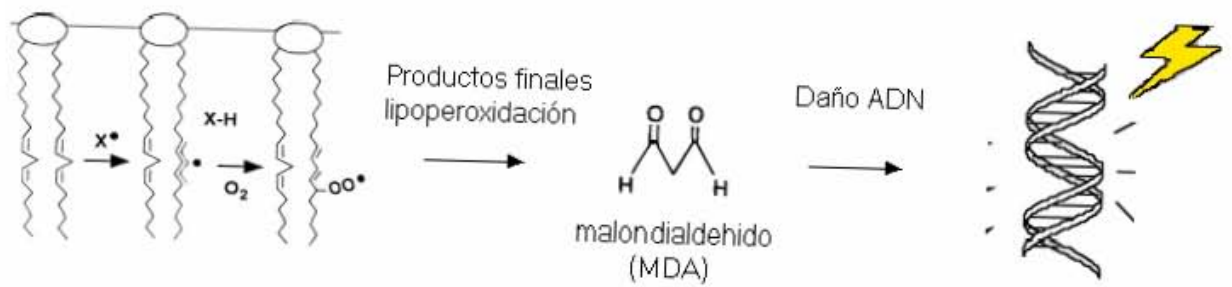


Fig. 3. Lipoperoxidación. Productos finales de la lipoperoxidación como el malondialdehído pueden reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN específicamente la adenina, la citosina y la guanina [Marnett MJ, 1999].

Además de causar daño oxidativo a macromoléculas, las ERO también pueden tener un importante papel en la señalización intracelular, como en la regulación de algunos factores de transcripción sensibles al estado redox, que intervienen en procesos biológicos relacionados con el desarrollo de cáncer.

En muchas células cancerosas se ha encontrado una alta producción de ERO, especialmente H_2O_2 [Loo G, 2003]. Estas altas concentraciones de H_2O_2 pueden explicar algunas de las características anormales de las células cancerosas; dado que esta molécula actualmente se reconoce como parte importante en la transducción de señales [Khan AU, *et al.*, 1995], se piensa que la gran cantidad de H_2O_2 producido por las células cancerosas es necesaria para activar y mediar las señales que llevan a la activación de factores de transcripción sensibles al estado redox y genes que están involucrados en el crecimiento, proliferación y supervivencia de las células cancerosas [Loo G, 2003].

2.3 Factor de Transcripción NF- κ B

Entre los factores de transcripción sensibles al estado redox y que están íntimamente relacionados con el cáncer, se encuentra el NF- κ B. Este término se utiliza para referirse a una superfamilia de proteínas diméricas con un dominio de homología denominado Rel. En los mamíferos, los dímeros más comunes son el NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100) y la combinación de las proteínas RelA (p65), c-Rel y RelB en forma de homo o heterodímeros. El NF- κ B se encuentra en el citoplasma de

la mayoría de las células donde se encuentra unido a IκB (IκBα, IκBβ, IκBγ), proteína inhibitoria que forma parte de su regulación [Gilmore TD, 2006; Bubici C, 2006].

Existen múltiples vías de activación del NF-κB y cada una difiere dependiendo de la naturaleza del estímulo; por lo menos dos de ellas son bien conocidas y han sido denominadas: clásica y alternativa (figura 4). La vía clásica se da principalmente por la presencia de citocinas, productos microbianos como lipopolisacáridos, y estrés; esta vía consiste en la activación del complejo cinasa de IκB (IKK) formado por la subunidad catalítica IKKα e IKKβ y el modulador de NF-κB (NEMO), el cual tiene como función fosforilar a IκB para su consecuente degradación. La vía alternativa se ha visto principalmente en células del sistema inmune y se da por la presencia del factor de necrosis tumoral (TNF); en este caso, se activa la cinasa inductora de NF-κB (NIK), la cual fosforila directamente al NF-κB provocando una proteólisis parcial en una de las proteínas del dímero. La activación del NF-κB por cualquiera de las dos vías tiene como resultado su traslocación al núcleo, donde regula la transcripción de genes involucrados en respuesta inmune, estrés, inflamación, reparación y muerte tisular [Li N, *et al.*, 1999; Gilmore TD, 2006; Bubici C, 2006].

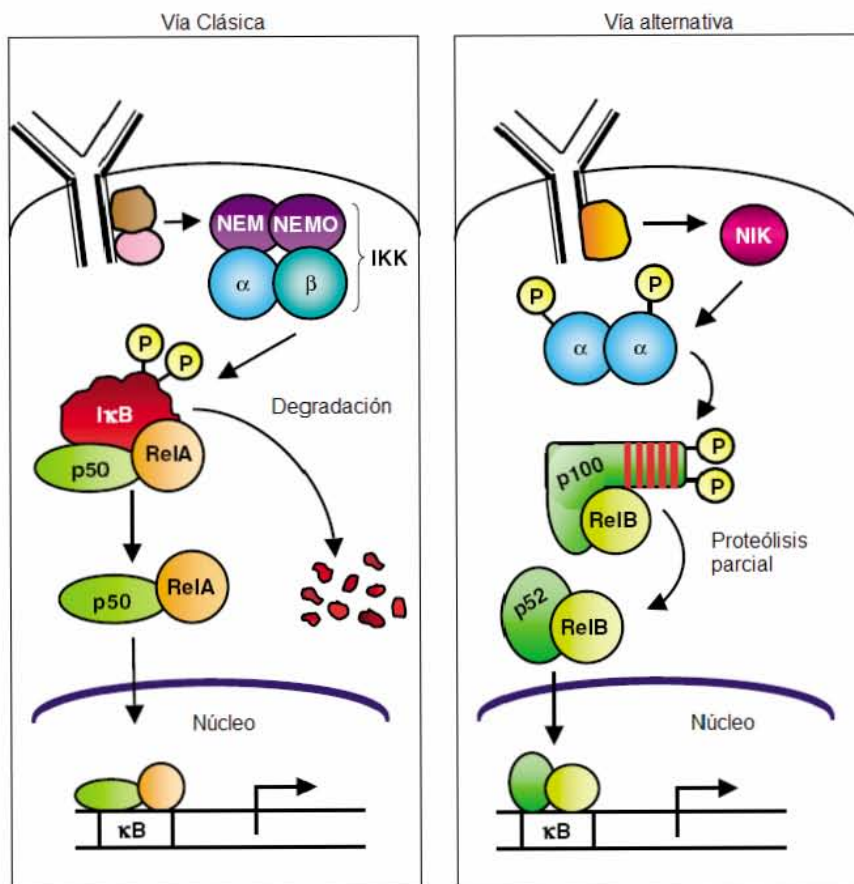


Fig. 4. Vía clásica y alternativa de la activación de NF- κ B. NEMO= modulador esencial de NF- κ B; I κ B= inhibidor de NF- κ B; NIK= cinasa inductora de NF- κ B; p50, p100, p52, Rel A y Rel B= proteínas que conforman NF- κ B [Gilmore TD, 2006].

En la mayoría de los casos, la activación del NF- κ B se da a tiempos cortos después del estímulo activador [Li N, *et al.*, 1999], y recientemente se ha encontrado evidencia en fibroblastos de ratón de que esta activación es cíclica, o sea que en presencia del estímulo activador, como podría ser el TNF, NF- κ B se asocia y disocia del ADN aproximadamente cada 30-60 min, y esto se debe a la repetida degradación y síntesis de I κ B [Hoffmann A, *et al.*, 2006].

Existen varios estudios que demuestran la activación del NF- κ B en presencia de ERO, principalmente de peróxido de hidrógeno, y que el tratamiento con agentes antioxidantes bloquea esta activación, aunque el mecanismo molecular aún no está bien establecido [Li N, *et al.*, 1999; Gilmore TD, 2006, Bubic C, 2006].

El NF- κ B es un factor de transcripción íntimamente relacionado con el cáncer ya que está involucrado con la regulación de genes de adhesión, inflamación, diferenciación, apoptosis y crecimiento celular [Bharti A C, 2002].

2.4 Cáncer Renal

Entre los distintos tipos de cáncer renal el de mayor incidencia es el carcinoma de células renales, que se presenta en un 80-85% de los casos. El diagnóstico de cáncer renal es complicado ya que es una enfermedad asintomática en las etapas iniciales, por lo que generalmente se detecta en estadios avanzados donde el tratamiento es ineficaz, pues muchas veces los tumores son resistentes a la quimioterapia [Brenner BM, *et al.*, 2000]. A pesar de esto el cáncer renal es uno de los tipos de cáncer menos estudiados.

En el 2002 se registraron mundialmente más de 100 000 defunciones a causa de este tipo de cáncer [Atkins MB, *et al.*, 2002] y su mortalidad está aumentando, ese mismo año se presentaron 208, 480 casos nuevos [Staehler M, *et al.*, 2005], ubicándolo en el tercer lugar entre todos los tumores del tracto urinario.

En México, de acuerdo a los datos obtenidos del Registro Histopatológico de Neoplasias de 2001, se presentaron un total de 1,577 casos, de los cuales fallecieron

1,289 pacientes a consecuencia del tumor, lo que representa una mortalidad del 81.7%. Esta alta mortalidad se debe a: 1) su difícil diagnóstico en etapas tempranas, 2) a que gran parte de la población mexicana no tiene acceso a servicios de salud adecuados, y 3) a la falta de promoción de una dieta sana y actividad física para prevención de enfermedades.

Para el estudio del cáncer renal, el modelo experimental más utilizado es el cáncer inducido por el nitrilotriacetato de hierro (FeNTA), que es equivalente al carcinoma de células renales. [Li N, *et al.*, 1987; Toyokuni S, *et al.*, 1994; Bahneman R, *et al.*, 1998, Cadenas S, *et al.*, 1999; Leibold E, *et al.*, 2002; Khan N, *et al.*, 2003].

2.5 Nitrilotriacetato de Hierro (FeNTA)

El nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) es un complejo (figura 5) de tamaño pequeño y fácil absorción, su órgano blanco es el riñón y se sabe que provoca daño oxidativo a biomoléculas. Se ha demostrado que una sola dosis de FeNTA administrada vía i.p. es capaz de aumentar los productos de lipoperoxidación, las proteínas oxidadas, el H_2O_2 intracelular y los productos de daño al DNA en roedores [Bahnemann R, 1998; Ansar S, *et al.*, 1999; Oberley T, 2002]. Además, se ha reportado que induce la disminución de las defensas antioxidantes no enzimáticas como el GSH y altera el funcionamiento de las enzimas antioxidantes metabolizadoras de ERO como son SOD, CAT y GPx [Rahman A, *et al.*, 2003].

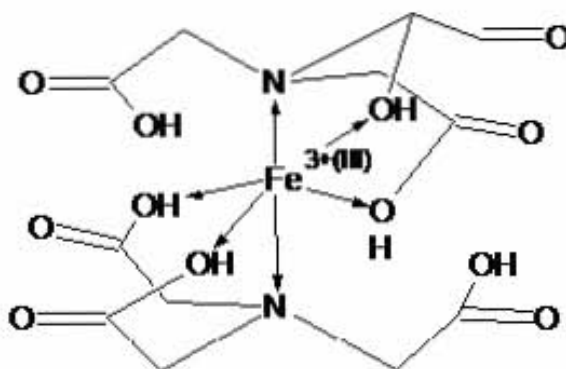


Fig.5. Estructura química del FeNTA.

Una vez en la sangre, el FeNTA es capaz de pasar a través del glomérulo por ser una molécula de bajo peso molecular. En el lumen de los túbulos proximales el

Fe^{3+} -NTA es reducido a Fe^{2+} -NTA por los productos de degradación del glutatión: cisteína y cisteína-glicina. Ya reducido, el hierro es capaz de generar radical hidroxilo vía reacción de Fenton-Haber-Weiss (reacción 3) [Umemura T, *et al.*, 1990; Iqbal M, *et al.*, 2003; Singh D, *et al.*, 2003].

Si el compuesto se administra de manera crónica se produce carcinoma de células renales [Okada S, *et al.*, 1989, Athar M, *et al.*, 1998, Khan N. *et al.*, 2005], con una alta incidencia de tumores (30-90%), con metástasis pulmonar e invasión peritoneal en roedores. Los tumores renales inducidos parecen ser la contraparte del carcinoma de células renales humano [Li N, *et al.*, 1987]. Similar a lo que ocurre en el ser humano, la incidencia de cáncer renal en ratas macho es dos veces mayor que en hembras [Li N, *et al.*, 1987; Deguchi J, *et al.*, 1995].

2.6 Antioxidantes polifenólicos

Los polifenoles son compuestos esenciales en la fisiología y la morfología de las plantas, ya que contribuyen a la pigmentación y son un mecanismo de defensa contra patógenos y depredadores. Al encontrarse en las plantas, son parte integral de la dieta del hombre, y por lo tanto se han hecho numerosos estudios para conocer sus propiedades [Bravo L, 1998; Fine M, 2000; Pourmorad F, *et al.*, 2006].

Las plantas con gran cantidad de polifenoles tienen diversos usos en la medicina tradicional como antiinflamatorios, antibióticos, antidiarreicos, antiúlceras, o bien como auxiliares en el tratamiento de hipertensión y diabetes; todas estas propiedades se han atribuido en gran parte a la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos [Bravo L, 1998].

Se sabe que existen más de 8000 estructuras distintas de polifenoles. Estas son producto del metabolismo secundario de las plantas, específicamente de las rutas del Shikimato y acetato [Bravo L, 1998]. Las estructuras polifenólicas pueden ser simples o complicadas y muchas veces asociarse a azúcares como glucosa. Los polifenoles tienen distintas propiedades debidas principalmente a esta variedad estructural de acuerdo a la cual se encuentran clasificados en diez categorías, siendo una de ellas los flavonoides [Bravo L, 1998].

2.6.1 Flavonoides

El grupo o categoría más importante de polifenoles son los flavonoides, pues son los más abundantes en la naturaleza. Son moléculas de bajo peso molecular y con fórmula base $C_6-C_3-C_6$ que consiste en dos anillos aromáticos unidos por tres carbonos que normalmente están formando un heterociclo con un oxígeno como se muestra en la figura 6 [Bravo L, 1998; Fine A, 2000].

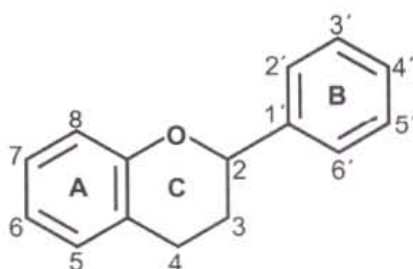


Fig.6. Estructura de los flavonoides y sistema de numeración. El anillo A se sintetiza en la ruta metabólica del acetato y el anillo B en la del Shikimato [Fine A. 2000].

El estudio de la biodisponibilidad de los flavonoides, y en general de los polifenoles, es complicado ya que las plantas tienen una mezcla compleja de estas sustancias. La absorción y el metabolismo de los polifenoles está determinado principalmente por su estructura, conjugación con otros fenoles, tamaño molecular, polimerización y solubilidad. Se sabe que los polifenoles se metabolizan en el tracto gastrointestinal; dependiendo de su naturaleza química y su tamaño pueden ser absorbidos sin sufrir cambio alguno, o antes de absorberse ser metabolizados por enzimas gástricas o de la microflora [Bravo L., 1998].

Desde hace años se ha observado una relación entre un alto consumo de frutas y vegetales, con la disminución de la incidencia de padecimientos relacionados con el estrés oxidativo como son las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y el cáncer. En consecuencia a estas observaciones, se han realizado estudios donde se demuestra que una gran variedad de flavonoides poseen capacidad antioxidante, pues disminuyen e incluso detienen la oxidación de moléculas biológicas como lípidos,

lipoproteínas de baja densidad (LDL) y ADN en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* [Bravo L. 1998; Fine A. 2000].

Múltiples estudios han demostrado la capacidad de los flavonoides de atrapar ERO y especies reactivas de nitrógeno, así como de quelar iones metálicos [Rice-Evans C, 2001; Won Lee K, 2006; Urquiaga I, *et al.*, 2000]. La estructura química de los flavonoides los hace moléculas ideales para atrapar radicales libres, como se mencionó anteriormente. Esta habilidad aumenta o disminuye de acuerdo al número de grupos hidroxilo unidos al anillo aromático y a su arreglo espacial dentro de la molécula. De esta forma, este tipo de compuestos tienen la habilidad de donar electrones (H^+) a radicales libres sin perder estabilidad, lo que hace que una nueva cadena de radicales libres sea difícil de iniciar. En la figura 7 se ilustra el mecanismo de acción antioxidante de los flavonoides [Rice-Evans C, 2001].

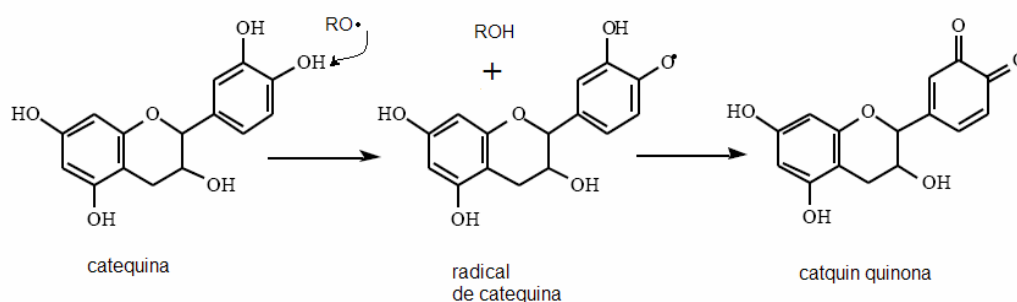


Fig.7. Oxidación de la catequina (un flavonoide muy común) por un radical. La forma oxidada es muy estable por lo que no permite se inicie una nueva cadena [Rice-Evans C, 2001].

Por lo tanto, se han investigado múltiples derivados vegetales con el fin de encontrar compuestos con alta capacidad antioxidante. Entre las plantas analizadas con gran contenido polifenólico, y por consiguiente actividad antioxidante, se encuentra el tamarindo.

2.7 Tamarindus indica

Es un árbol de gran tamaño, nativo de África y Asia. Conocido comúnmente como tamarindo, pertenece a la familia leguminosae caesalpinioideae, es una planta adaptada extensamente en las regiones tropicales y subtropicales como el Caribe, América Central y el norte de América del Sur. Los individuos maduros de esta especie crecen hasta 25 m, se caracterizan por una copa redondeada y densa, hojas parapinadas y corteza gruesa color gris [Parrota J, 2001].

Los productos derivados del tamarindo se usan en la medicina tradicional de la India y África. Como ejemplos de sus distintas aplicaciones tenemos: la cocción de la corteza, en el tratamiento contra la diarrea; la ceniza de la corteza, como digestivo; las hojas para el tratamiento de llagas y heridas para disminuir inflamación; el jugo de las hojas hervido con aceite, se aplica como tratamiento para el reumatismo y la hinchazón externa; las semillas molidas, como astringentes para el tratamiento de la disentería; la cáscara de las semillas para el tratamiento de la diabetes, etc [Parrota J, 2001; Komutarin T, *et al.*, 2004; Maiti R, *et al.*, 2004].

Este fruto se conoce en Europa desde la edad media por sus propiedades medicinales y degustativas; fue introducido a este continente gracias al comercio con grupos árabes, y a su vez, los europeos lo trajeron a América durante y después de la conquista. Hoy en día en América el fruto se utiliza principalmente para la preparación de aguas frescas y dulces tradicionales [Parrota J., 2001].

La pulpa de la fruta, que comprende alrededor de la mitad del peso de la vaina tiene sabor agridulce; contiene azúcares (30 a 40 % del peso), ácidos orgánicos tales como cítrico, acético, tartárico y ascórbico, y otros compuestos como pectinas, vitaminas y minerales, y una gran variedad de antioxidantes polifenólicos [Parrota J., 2001].

Estudios recientes demostraron que en el fruto del tamarindo se encuentran presentes compuestos polifenólicos en una proporción de 2.8 g/kg de pulpa aproximadamente, entre ellos se encuentran catequina, taxifolina, apigenina, luteolina, naringenina y procianidinas de distintos tamaños, las estructuras de estos compuestos se muestran en la figura 8 [Sudjaroen Y, *et al.*, 2005]. Gran parte de la actividad antioxidante de los derivados del tamarindo se debe a la presencia de estos compuestos polifenólicos y estudios recientes han comprobado que extractos de tamarindo pueden atenuar los daños causados por un estrés oxidativo exacerbado en modelos animales [Martinello F, *et al.*, 2006; Landi Librandi A P, *et al.*, 2007; Komutarin T, *et al.*, 2003].

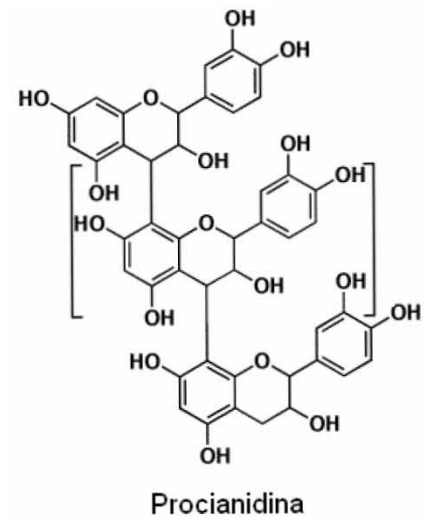
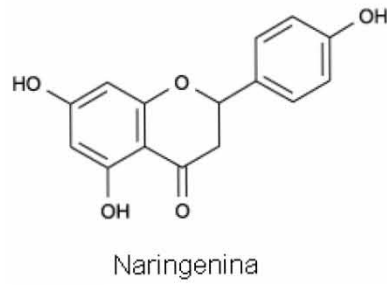
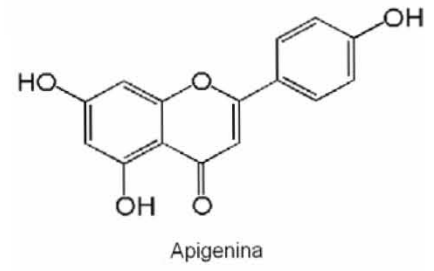
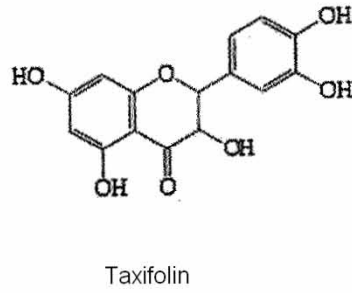
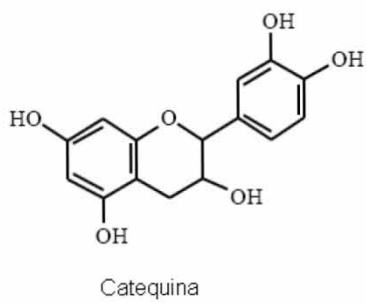


Figura 8. Estructura química de algunos polifenoles contenidos en el extracto de tamarindo utilizado en el presente trabajo [Sudjaroen Y, *et al.*,2005].

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado una relación entre el estrés oxidativo y el desarrollo de cáncer; así mismo, se ha visto que algunos antioxidantes pueden proteger contra el desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Entre los compuestos con mayor capacidad antioxidante se encuentran los polifenoles, productos del metabolismo secundario de las plantas.

El cáncer renal es uno de los tipos de cáncer menos estudiados, y el modelo experimental más utilizado para este fin es la exposición de roedores al carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). Existen evidencias que relacionan la carcinogenicidad del FeNTA con su capacidad de generar estrés oxidativo; aunque, el mecanismo molecular no se ha esclarecido.

Por lo anterior, se considera importante evaluar si un extracto del fruto de tamarindo, rico en compuestos polifenólicos, previene el daño oxidativo a biomoléculas inducido por nitrilotriacetato de hierro; así como, determinar si la exposición a este carcinógeno altera la activación del factor de transcripción NF-kB, que es sensible al estado redox y está involucrado en procesos de carcinogénesis, y si el extracto tiene algún efecto sobre esta alteración.

IV. HIPÓTESIS

Un extracto de tamarindo rico en polifenoles tendrá una buena capacidad antioxidante, por lo que un pretratamiento con éste podrá disminuir los efectos agudos del carcinógeno renal FeNTA.

V. OBJETIVOS

- Preparar un extracto de tamarindo y caracterizar su capacidad antioxidante *in vitro*.
- Investigar si el pretratamiento con el extracto de tamarindo preparado puede proteger contra el daño oxidativo renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en un estudio agudo en ratas de laboratorio.
- Evaluar si la exposición al nitrilotriacetato de hierro altera la activación del factor de transcripción NF-kB como probable mecanismo de carcinogenicidad, y si el extracto tiene efecto sobre esta alteración.

VI. METODOLOGÍA

El procedimiento detallado para cada uno de los métodos descritos a continuación se encuentra en el apéndice.

6.1 Preparación del extracto de tamarindo

Se estableció en el laboratorio una metodología para la preparación de un extracto del fruto de tamarindo. Este fruto se obtuvo del mercado local, al cual se le separó la pulpa y el pericarpio. Por cada 100 g de este material vegetal se agregaron 400 mL de ETOH al 70%, se maceró a 4°C durante 5 días y al término de este tiempo se evaporó el etanol por roto-evaporación. El producto resultante se centrifugó a 8000 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos; posteriormente se retiró el sobrenadante, que principalmente está compuesto de grasas, utilizando cuatro capas gasa. [Martinello F, *et al.*, 2006].

6.2 Caracterización del extracto de tamarindo

6.2.1 Determinación de la densidad

La densidad del extracto se determinó utilizando un picnómetro de 10 mL de volumen. El picnómetro se pesó vacío y lleno de extracto para obtener por diferencia el peso correspondiente a 10 mL de extracto. Utilizando la fórmula $\rho = m/V$ donde ρ =densidad, m =masa y V = volumen, se obtuvo la densidad del extracto.

6.2.2 Determinación de fenoles totales

Las plantas sintetizan compuestos fenólicos como parte de su metabolismo secundario, los cuales presentan un núcleo aromático que contiene al menos un grupo hidroxilo libre o sustituido; existe una gran variedad de estructuras fenólicas entre las cuales se puede mencionar a los fenoles sencillos como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, taninos, quinonas y flavonoides. En el presente trabajo se utilizó un método para cuantificar la presencia en conjunto de estos compuestos en extractos vegetales. El método utiliza una curva patrón construida a partir de diferentes concentraciones de ácido gálico, donde se interpola la absorbancia obtenida de la muestra. Se basa en la reacción en medio básico de los compuestos fenólicos con el reactivo Folin Ciocalteu, que da como resultado un complejo colorido que absorbe a 765 nm. El método

proporciona una medida aproximada de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en una muestra vegetal [Singleton L, 1974; Pourmorad F, *et al.*, 2006].

6.2.3 Determinación de la capacidad de inhibir radical superóxido (O_2^-)

El fundamento de este método radica en que un compuesto con actividad antioxidante inhibe la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT). Esta reducción se da por la presencia de radicales superóxido, que son generados en el sistema xantina-xantina oxidasa [Bielski B *et al.*, 1980], como se ilustra en la figura 9. Para esta determinación el extracto de tamarindo se adiciona a una mezcla de reacción que contiene NBT y el sistema xantina-xantina oxidasa; si el compuesto antioxidante adicionado a la mezcla de reacción, en este caso el extracto de tamarindo, inhibe al radical superóxido, el NBT no será reducido y por lo tanto no se observará cambio de coloración en la solución. Posteriormente se realizan los cálculos para obtener el porcentaje de inhibición utilizando como valor de 100% de reducción los tubos control a los cuales no se adiciona antioxidante y por lo tanto equivalen al 100% de reducción de NBT.

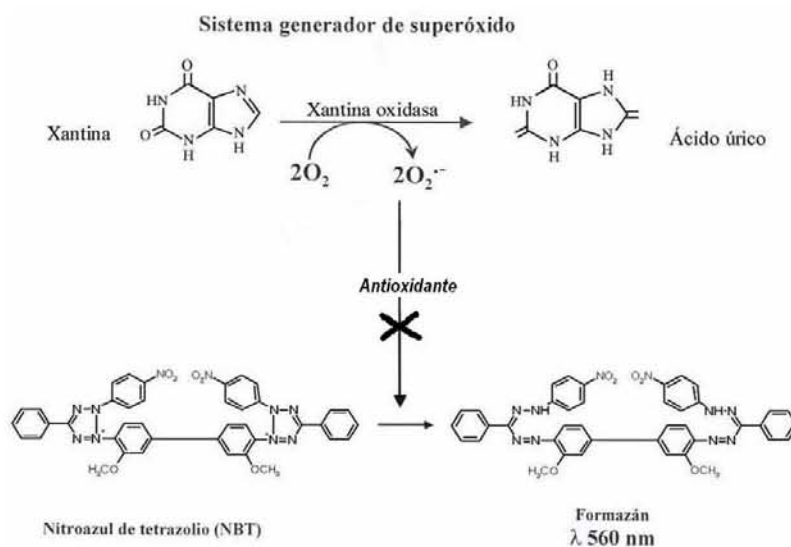


Fig.9. Sistema generador de anión superóxido a través de la enzima xantina oxidasa y la consecuente oxidación del NBT por el radical formado.

6.3 Protocolo experimental *in vivo*

Una vez determinada la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales del extracto de tamarindo, se llevó a cabo el protocolo *in vivo*. Se utilizaron

ratas macho Wistar de aproximadamente 250 g distribuidas en cuatro grupos: 1) Control, n=5; 2) Tamarindo, n=5; 3) FeNTA, n=5; y 4) Tam+FeNTA, n=6. Al grupo Control se le administró el vehículo del antioxidante vía ig y del carcinógeno vía ip (agua y bicarbonato de sodio 0.12 M pH 7.4 respectivamente); el grupo Tamarindo recibió el antioxidante vía ig a una dosis aproximada de 25 mg de fenoles/kg de peso/día durante 15 días consecutivos, y se le administró el vehículo del carcinógeno; al grupo FeNTA se le administró el vehículo del antioxidante, y recibió una dosis única del carcinógeno vía ip 15 mg Fe/kg de peso [Toyokuni S, *et al.*, 1994]; finalmente, el grupo Tam+FeNTA recibió ambos compuestos.

Los animales se sacrificaron por decapitación una hora después de la administración de FeNTA, tiempo en el que se presenta el mayor estrés oxidativo. Se extrajeron ambos riñones obteniéndose la corteza renal, y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, se realizaron las siguientes determinaciones: 1) Daño oxidativo a lípidos, 2) daño oxidativo a proteínas, 3) niveles de H₂O₂, 4) actividad de las enzimas antioxidantes: CAT, GPx y SOD total, y 5) activación del factor de transcripción NF-κB.

Este protocolo se repitió para corroborar los resultados, manejándose las mismas condiciones, pero con un mayor número de animales en cada grupo: 1) Control, n=6; 2) Tamarindo, n=5; 3) FeNTA, n=6; 4) Tamarindo+ FeNTA n=7.

La preparación del carcinógeno se describe detalladamente en el apéndice.

6.4 Marcadores de estrés oxidativo

Todas las determinaciones se realizaron a partir de homogenados de muestras de corteza renal y los procedimientos detallados se encuentran en el apéndice.

6.4.1 Lipoperoxidación

Uno de los marcadores clásicos de estrés oxidativo es la determinación de productos de peroxidación de lípidos, que finalmente llevan a la pérdida de la función e integridad de las membranas biológicas. El malondialdehído (MDA) es uno de los productos derivados de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados. Esta determinación se llevó a cabo con un método colorimétrico específico para MDA, donde se construye una curva patrón con diferentes concentraciones de 1,1,3,3

tetrametoxipropano como estándar y posteriormente se interpola la absorbancia obtenida de la muestra para obtener un valor de concentración. El MDA o el estándar reaccionan con N-metil-2-fenilindol en medio ácido a 45°C, lo que genera un compuesto colorido que absorbe luz a 586 nm (figura 10). 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 I, *et al.*, 1998, Gerard-Monier D, *et al.*, 1998].

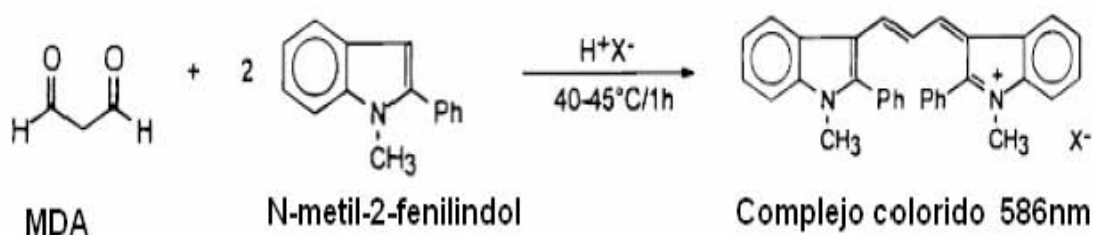


Fig.10. Reacción del malondialdehído (MDA) con N-metil-fenilindol.

6.4.2 Daño oxidativo a proteínas

Los grupos carbonilo (C=O) que se originan por acción de las ERO sobre las proteínas, convirtiendo algunos grupos hidroxilo de aminoácidos (leucina, valina, lisina, arginina, prolina, treonina e isoleucina) en derivados carbonilo. Además, los grupos carbonilo también se producen por reacciones de rompimiento de enlaces peptídicos, y por la interacción de los residuos de aminoácidos con productos de lipoperoxidación como el 4-hidroxinonal o el MDA [Nyström T, 2005]. Esta determinación se llevó a cabo basándose en la reactividad de los grupos carbonilo con dinitrofenilhidrazina (DNPH), para formar hidrazonas de proteína (figura 11), las cuales absorben a 370 nm. Para calcular la cantidad de grupos carbonilo se usa el coeficiente de absorción de la dinitrofenilhidrazona ($22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) siguiendo la ecuación de Lambert y Beer. En las mismas muestras se determinó el contenido de proteínas por absorción a 280 nm, para expresar el contenido de grupos carbonilo en nmol/mg proteína [Reznick AZ, *et al.*, 1994; Levine RL, *et al.*, 1994].

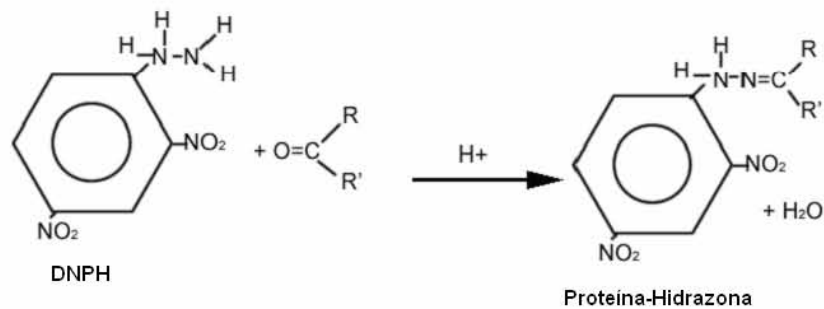
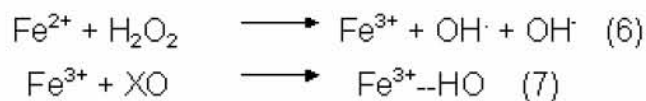


Fig.11. Reacción de la dinitrofenilhidrazina y el grupo carbonilo.

6.4.3 Niveles de peróxido de hidrógeno

Esta determinación se llevó a cabo por el método de Hierro-Naranja de Xilenol (FOX), basado en la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} por el peróxido de hidrógeno en condiciones ácidas (Reacción 6). 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 colorido que se puede medir a 560 nm (Reacción 7). Para ello se construye una curva patrón con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno y posteriormente se interpola la absorbancia de la muestra para obtener un valor de concentración. En estas muestras se determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry, para expresar el resultado en nmol de H_2O_2 /mg proteína [Banerjee D et al., 1999].



6.5 Actividad enzimas antioxidantes

6.5.1 Catalasa (CAT)

La determinación de la actividad de la CAT se realizó de acuerdo al método de Aebi, basado en la disminución de la absorbancia del H_2O_2 debida a su degradación por acción de la CAT presente en la muestra [Aebi HE., 1983; 1984]. Se lee la absorbancia a 240 nm cada 15 s durante 30 s, que es el período en el que la descomposición de H_2O_2 sigue una cinética de primer orden. De acuerdo a Aebi, se

usó la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT, definida de acuerdo a la siguiente fórmula: $k=(1/t) (2.3 \times \log A_1/A_2)$; donde t = intervalo de tiempo medido, y A_1 y A_2 son las absorbancias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 . Los resultados se expresan como k/mg proteína.

6.5.2 Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se midió por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT), al metabolizar a H_2O_2 los aniones superóxido generados por el sistema xantina-xantina oxidasa (figura 9) [Oberley y Spitz1984]. La actividad de SOD se calcula tomando como referencia de 100% de reducción de NBT a los tubos control a los cuales no se adiciona muestra. Una unidad de SOD (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT. En estas muestras se determinó también el contenido de proteínas por el método de Lowry, para expresar los resultados en U/mg proteína.

6.5.3 Glutación peroxidasa (GPx)

La actividad de GPx se midió de manera indirecta por una reacción acoplada con la glutación reductasa [Lawrence RA et al., 1976]. Este método se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debida a la desaparición de NADPH. La GPx consume glutación reducido, el cual es regenerado por la glutación reductasa a partir de glutación oxidado, proceso que consume NADPH (Figura 12). La actividad GPx se determina midiendo cada minuto durante cuatro minutos la absorbancia de la muestra, posteriormente se promedian los cambios de absorbancia y se calcula la actividad utilizando el coeficiente de absorción milimolar del NADPH. Una unidad de GPx (U) se define como la cantidad de enzima que oxida un μmol de NADPH por minuto. Los datos se expresan como U/mg proteína, por lo que es necesario cuantificar la cantidad de proteínas en el ensayo por el método de Lowry.

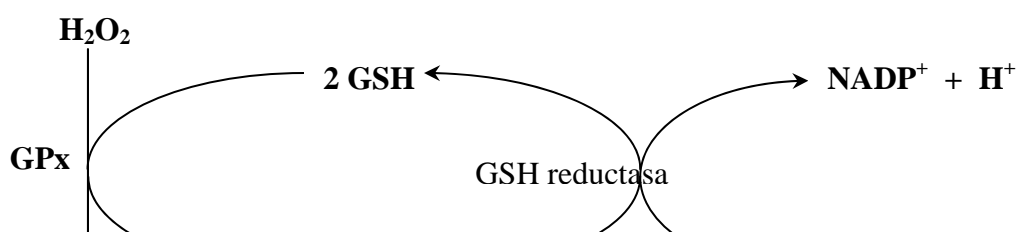


Fig. 12. Ciclo de oxidación-reducción del glutatión. Sistema en el que se basa la determinación de actividad de GPx. GSH= glutatión reducido, GSSG= glutatión oxidado, GPx= glutatión peroxidasa.

6.6 Activación del factor de transcripción NF- κ B

Una de las formas más comunes, aunque indirecta, para determinar la activación de NF- κ B es determinando la cantidad de I κ B por Western blot. El NF- κ B inactivo se encuentra en el citoplasma unido a su inhibidor el I κ B, el cual es degradado tras la presencia de un estímulo activador; por lo que, al cuantificar los niveles de I κ B presente en el citoplasma, se realiza una medida indirecta de la activación de NF- κ B; es decir, si la cantidad de I κ B en citoplasma disminuye se infiere que el NF- κ B fue activado. El proceso molecular se muestra en la figura 13.

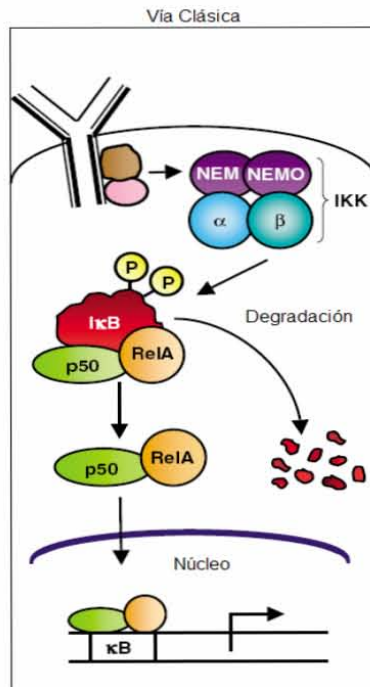


Figura 13. Vía clásica de activación de NF- κ B. La presencia de citocinas, productos microbianos o estrés, activa a IKK (cinasa de I κ B), ésta fosforila a I κ B dando la señal para su degradación por el proteosoma, de esta forma NF- κ B queda libre para traslocarse al núcleo.

El método de Western blot comprende una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida para separar proteínas desnaturizadas por su peso molecular.

Posteriormente, estas proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa que se incuba con el anticuerpo primario anti-IkB α de tipo IgG de cabra. Después, se incuba con un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado con una peroxidasa, permitiendo determinar la presencia de IkB α por quimioluminiscencia al adicionar el sustrato. La detección de la quimioluminiscencia se realiza exponiendo una placa fotográfica a la membrana durante algunos minutos, y posteriormente se realiza el revelado. Con ayuda de un programa computacional se analiza la autorradiografía de la membrana y se calculan los niveles de IkB por densitometría. La detección de actina se utilizó como control de carga y se realizó de forma simultánea a la detección de IkB- α [Towbin H, *et al.*,1979; Sambrok J, *et al.*, 1989].

6.7 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Los datos se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de comparaciones múltiples, y después se aplicó una post-prueba de Newman Keuls. Para esto se utilizó el programa Prism 2.01 (Graph Pad, PRISMA).

VII. RESULTADOS

7.1 Extracto de tamarindo

Las características del extracto preparado fueron las siguientes: es un líquido viscoso de color café oscuro, al rayo de luz es translúcido con olor característico al fruto de tamarindo y una densidad de 1.21 g/mL.

Para caracterizar el extracto de tamarindo se determinó la cantidad de fenoles totales por un método colorimétrico el cual se montó exitosamente. El extracto mostró una concentración de 3.3 mg de fenoles totales/mL de extracto. Por otro lado, se determinó la capacidad del extracto de inactivar al radical superóxido, para ello se utilizó también un método colorimétrico. Se hicieron distintas diluciones del extracto con concentraciones finales de 0-80 μ g fenoles/mL y se construyó una curva de porcentaje de inactivación contra concentración. Se observó un efecto dependiente de la concentración de comportamiento logarítmico (figura 14) y se calculó la IC_{50} mediante una regresión resultando ser de 2.4 μ g/mL. Para tener un punto de comparación se realizó el mismo procedimiento con la vitamina C, obteniéndose bajo nuestras condiciones de estudio una IC_{50} de 20.8 μ g/mL.

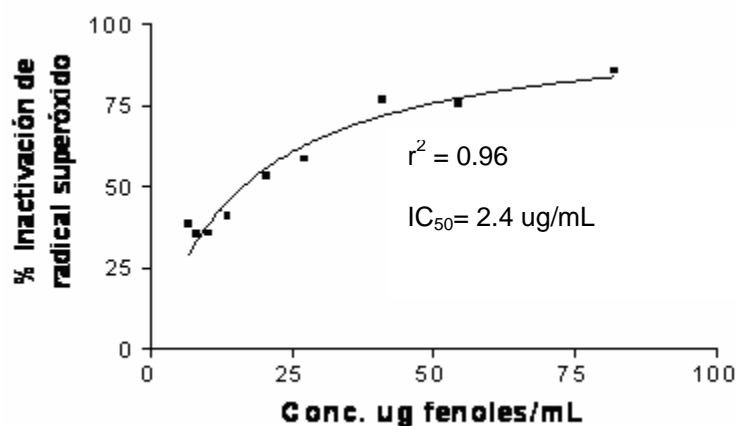


Figura 14. Inactivación (%) de radical superóxido con distintas concentraciones de extracto de tamarindo.

La capacidad antioxidante del extracto se determinó mensualmente por 6 meses. Se observó una disminución paulatina de la inactivación de radical superóxido ya que la IC_{50} registrada al sexto mes fue de 4.25 μ g de fenoles/mL.

7.2 Protocolo experimental *in vivo*

Durante el tiempo de tratamiento con el extracto de tamarindo previo a la administración del carcinógeno, se registró diariamente el peso corporal de los animales, observándose que la administración del extracto de tamarindo no tuvo efecto significativo en el crecimiento. Esto se muestra en la figura 15.

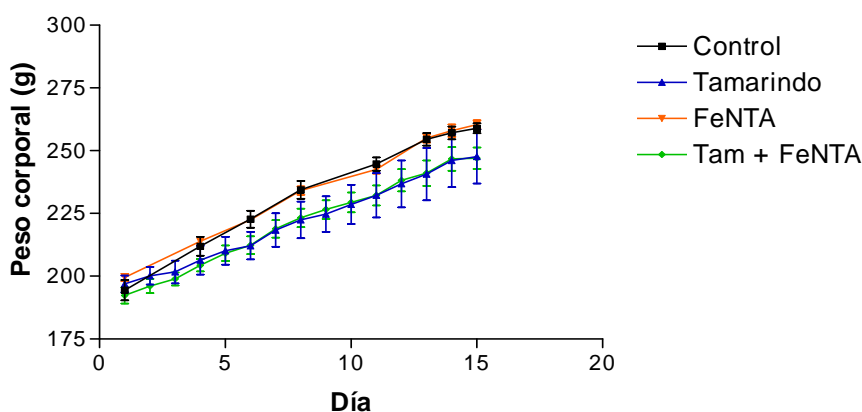


Figura 15. Peso corporal de los grupos estudiados durante el tratamiento previo a la administración de FeNTA. A los grupos Tamarindo y Tam+FeNTA se les administró el extracto vía ig y los grupos Control y FeNTA recibieron agua. Cada punto en la gráfica representa el promedio de 10-13 datos \pm EE.

7.3 Marcadores de estrés oxidativo

7.3.1. Daño oxidativo a lípidos

La figura 16 muestra los resultados de la determinación del contenido de malondialdehído (MDA) en corteza renal, indicador de lipoperoxidación. El grupo Tamarindo presentó niveles de MDA iguales al grupo Control, por lo tanto la administración del extracto no afectó el contenido de MDA. La administración de FeNTA provocó un incremento en la lipoperoxidación, pues los niveles de MDA fueron 10 veces mayores al grupo Control. Se observó un efecto protector por parte del extracto de tamarindo, pues el grupo Tam+FeNTA mostró una disminución significativa del 24% del contenido de MDA respecto al grupo tratado solo con FeNTA, aunque el valor no llegó a ser igual a los valores control; por lo tanto, se puede decir que el extracto protegió parcialmente contra los efectos inducidos por el carcinógeno sobre el daño a los lípidos.

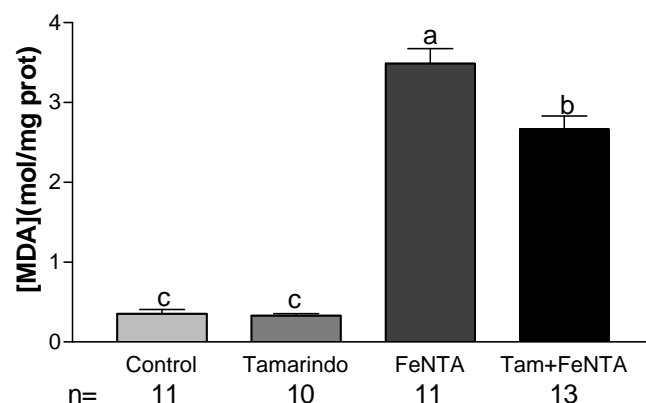


Figura 16. Efecto del pretratamiento con el extracto de tamarindo y la administración de FeNTA sobre los niveles en corteza renal de MDA, marcador de daño oxidativo a lípidos. Cada barra representa la media \pm EE. El valor de n por cada grupo se muestra en la base de cada columna. Los grupos con diferente letra presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

7.3.2 Daño oxidativo a proteínas

Los resultados de la determinación del daño oxidativo a proteínas muestran un comportamiento similar al daño oxidativo a lípidos; es decir, también se obtuvo una protección parcial por parte del extracto de tamarindo contra los efectos del carcinógeno, ya que se observó una disminución del 18.5% del daño a proteínas en el grupo Tamarindo+FeNTA comparado contra el grupo de FeNTA. En el grupo pretratado con tamarindo no se observó ningún cambio con respecto al Control. Estos resultados se muestran en la figura 17.

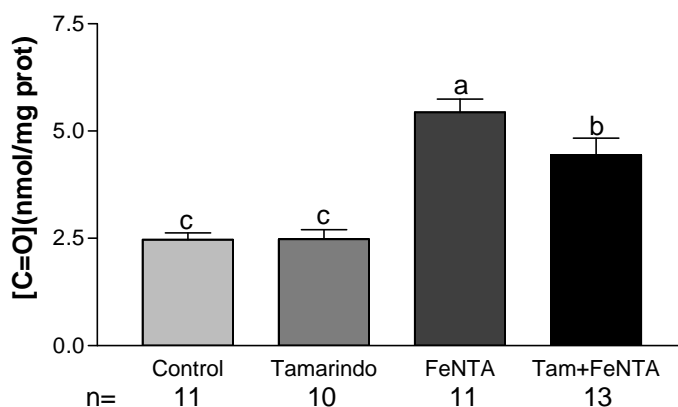


Figura 17. Efecto del pretratamiento con el extracto de tamarindo y la administración de FeNTA sobre el contenido en corteza renal de grupos carbonilo, marcador de daño oxidativo a proteínas. Cada barra representa la media \pm EE. El valor de n para cada grupo se muestra en la base de cada columna. Los grupos con diferente letra presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

7.3.3 Concentración de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El pretratamiento con el extracto de tamarindo no modificó el contenido renal de H₂O₂, pues los grupos Control y Tamarindo mostraron valores similares estadísticamente. En el grupo FeNTA se puede observar un aumento significativo de H₂O₂, pues el contenido de esta ERO es 2.5 veces mayor al grupo Control. Por parte del extracto de tamarindo se observó un efecto protector, pues el grupo Tam+FeNTA mostró una disminución significativa del 40.5% en los niveles de H₂O₂ con respecto al grupo de FeNTA; el grupo de Tamarindo+FeNTA, en este caso, presentó valores estadísticamente iguales al control, por lo que se concluye que el extracto de tamarindo previno totalmente el incremento de los niveles de H₂O₂ inducidos por el carcinógeno (figura 18).

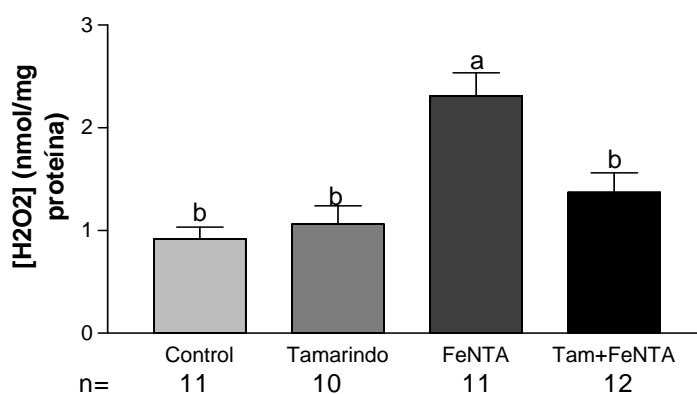


Figura 18. Efecto del pretratamiento con el extracto de tamarindo y la administración de FeNTA sobre el contenido en corteza renal de H₂O₂. Cada barra representa la media \pm EE. El valor de *n* para cada grupo se presenta en la base de cada columna. Los grupos con diferente letra presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

7.4 Actividad enzimas antioxidantes

7.4.1 Catalasa (CAT)

La actividad de la CAT no se modificó por la administración del extracto de tamarindo, pero sí por la administración del carcinógeno, pues el grupo tratado con FeNTA presentó una disminución significativa del 25 % con respecto al grupo Control. Esta disminución fue prevenida totalmente por el pretratamiento con el extracto de tamarindo, pues el valor de actividad de la CAT del grupo Tamarindo+FeNTA fue igual a la del grupo Control (figura 19).

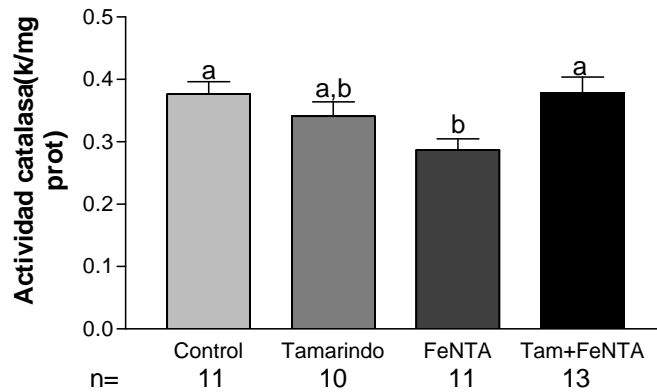


Figura 19. Efecto del pretratamiento con el extracto de tamarindo y la administración de FeNTA sobre la actividad de CAT en corteza renal. Cada barra representa la media \pm EE. El valor de n para cada grupo se muestra en la base de cada columna. Los grupos con diferente letra presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

7.4.2 Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD se modificó por la administración del extracto, pues el valor del grupo Tamarindo fue significativamente menor con respecto al Control. De igual forma, el grupo FeNTA mostró una disminución del 11.2 % en la actividad de esta enzima, pero en el caso del grupo Tamarindo+FeNTA el valor de actividad enzimática es igual al control; por lo tanto, se puede decir que el extracto evitó la disminución de la actividad de esta enzima (figura 20).

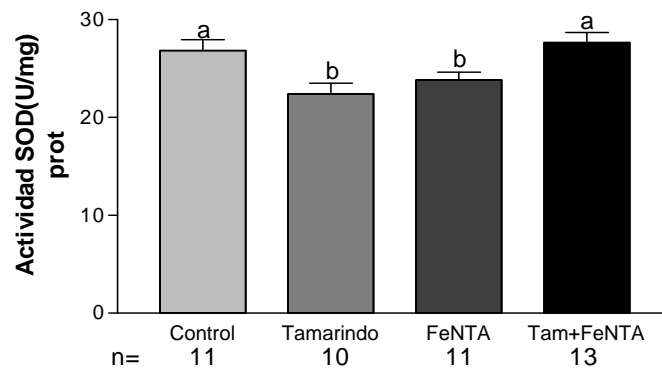


Figura 20. Efecto del pretratamiento con el extracto de tamarindo y la administración de FeNTA sobre la actividad de la SOD en corteza renal. Cada barra representa la media \pm EE. El valor de n para cada grupo se muestra en la base de cada columna. Los grupos con diferente letra presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

7.4.3 Glutati3n Peroxidasa (GPx)

Los resultados de la actividad de la GPx se muestran de forma relativa, pues al corroborar los resultados con un segundo grupo de animales se obtuvo el mismo comportamiento, pero el valor absoluto presentó diferencias. En la figura 21 los gráficos A y B muestran los resultados de cada uno de los protocolos realizados. El gráfico C se construyó tomando el promedio de los grupos control como 100% de actividad, y a partir de este se calculó el porcentaje de actividad correspondiente a los promedios de los demás grupos estudiados. Se observa que el tratamiento con el extracto no tuvo efecto sobre la actividad de la GPx. La administración del carcinógeno disminuyó un 26% la actividad con respecto al grupo Control, y el pretratamiento con el extracto de tamarindo logró prevenir totalmente la disminución inducida por el FeNTA.

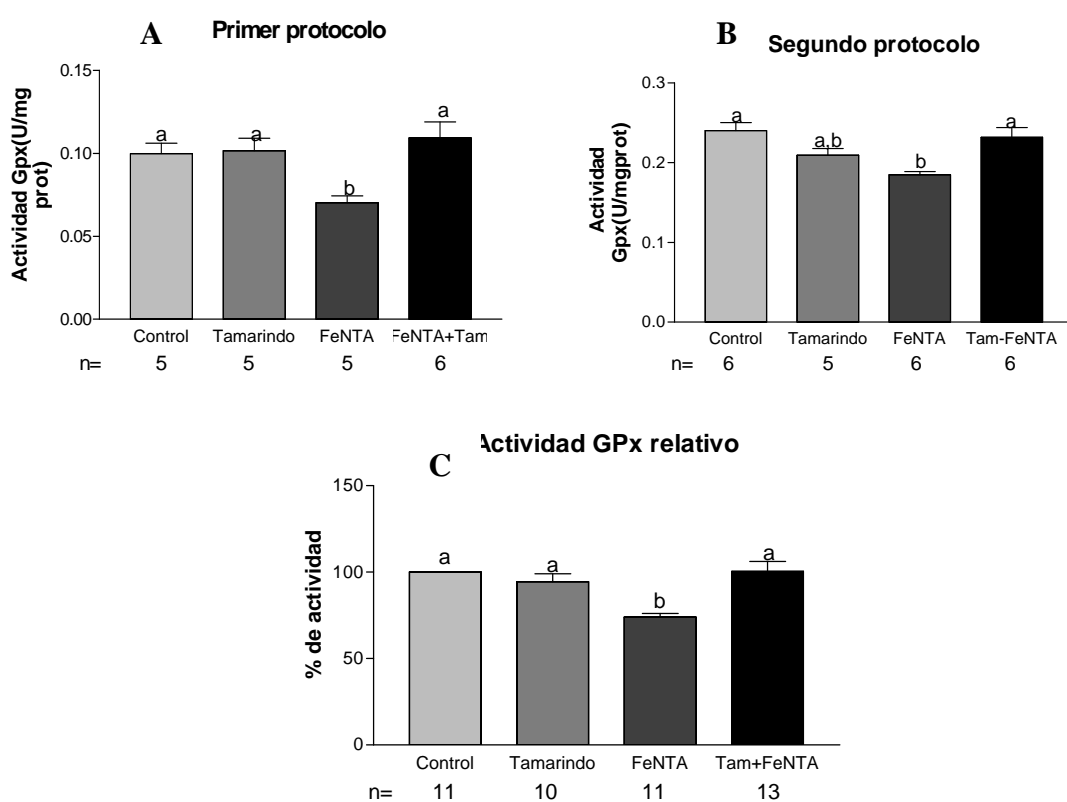


Figura 21. Efecto del pretratamiento con el extracto de tamarindo y la administración de FeNTA sobre la actividad de glutatión peroxidasa en corteza renal. Las gráficas A y B corresponden al primer y segundo protocolo respectivamente, y la gráfica C es el promedio de ambos, expresado en forma de porcentaje de actividad tomando como 100% el promedio de los grupos Control. Cada barra representa la media \pm EE. El valor de n para cada grupo se muestra en la base de cada columna. Los grupos con diferente letra presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

7.5 Activación del factor de transcripción NF- κ B (niveles I κ B- α)

Con el propósito de investigar probables mecanismos moleculares involucrados en la carcinogenicidad del FeNTA se determinó la activación del factor NF- κ B. Por medio de la técnica de Western blot se determinaron los niveles en corteza renal de I κ B- α , una de las proteínas inhibitorias del factor de transcripción NF- κ B. En la figura 22 se muestra una imagen representativa de los ensayos realizados, donde se observan las bandas de una autorradiografía de la membrana donde se detectó inmunológicamente I κ B- α . Como control de carga se determinó actina de forma simultánea a la detección de I κ B- α .

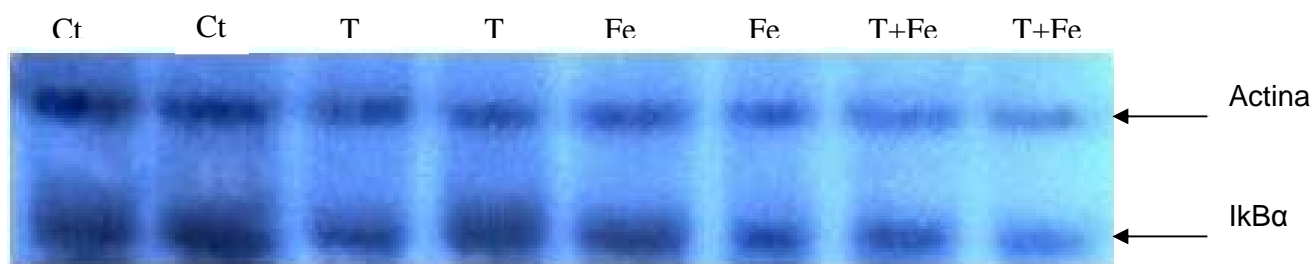


Figura 22. Niveles de I κ B (37KDa) y actina (42KDa) en corteza renal determinados por Western blot. La imagen es representativa de los ensayos realizados. Ct=control, T=tamarindo, Fe= FeNTA, T+Fe= Tamarindo+FeNTA.

Se realizó un análisis densitométrico de las bandas de las autorradiografías y los datos obtenidos se analizaron estadísticamente. Los resultados se muestran en la figura 23. En los grupos experimentales estudiados no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo Control; por lo tanto, se puede decir que el extracto de tamarindo y el carcinógeno no alteraron los niveles en corteza renal de I κ B- α bajo las condiciones experimentales utilizadas en el presente trabajo.

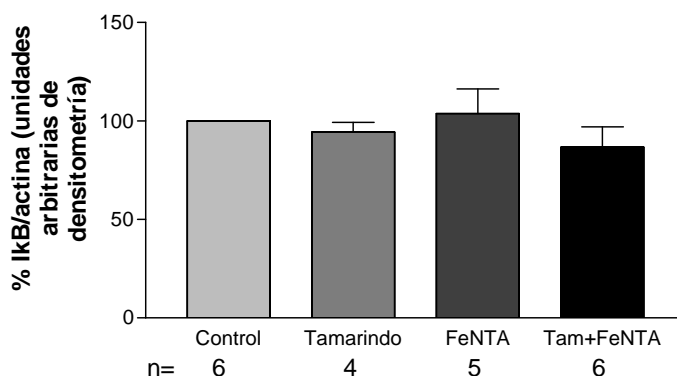


Figura 23. Efecto del pretratamiento del extracto de tamarindo y la administración del carcinógeno renal FeNTA sobre los niveles en corteza renal de I κ B- α determinados por Western blot. Cada barra representa la media \pm EE. El valor de n para cada grupo se muestra en la base de cada columna.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se ha aceptado que el estrés oxidativo juega un papel importante en el proceso de carcinogénesis. De hecho, se ha observado que el uso de antioxidantes puede proteger contra el desarrollo de ciertos tipos de cáncer [Valco M *et al.*, 2006]. En el cáncer renal inducido por la exposición a nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) se sabe que participa el estrés oxidativo [Bahnmann R, 1998; Ansar S, *et al.*, 1999; Oberley T, 2002], por lo que en el presente trabajo se consideró de gran interés probar si un extracto de tamarindo rico en compuestos antioxidantes, como son los polifenoles, tiene la capacidad de prevenir los efectos del carcinógeno renal FeNTA.

El primer paso en esta investigación fue obtener y caracterizar el extracto de tamarindo. Para ello, se realizó una extracción etanólica de pulpa de tamarindo y al producto resultante se le determinó la cantidad de fenoles totales, obteniéndose 3.3 mg de fenoles/mL de extracto. Para medir la capacidad antioxidante se determinó la inactivación del radical superóxido, obteniéndose una IC₅₀ de 2.4 ug fenoles/mL. Estos resultados concuerdan con la bibliografía, ya que anteriormente se reportaron valores similares de contenido fenólico y capacidad de inactivación de radical superóxido para un extracto de fruto del tamarindo [Martinello F, *et al.*, 2006]. Incluso, se ha analizado la composición de extractos similares, reportándose la presencia de polifenoles como: naringenina, catequina, epicatequina, taxifolin y distintas procianidinas [Sudjaroen Y, *et al.*, 2005]. Los resultados de inactivación de radical superóxido se compararon con vitamina C, un antioxidante ampliamente utilizado y bien caracterizado [Bagchi D, *et al.*, 1997] que bajo nuestras condiciones de estudio presentó una IC₅₀ de 20.8 ug/mL. El extracto de tamarindo resultó ser 8 veces más potente que la vitamina C. Por lo tanto se puede decir que el extracto tiene una excelente capacidad antioxidante.

Una vez comprobada la excelente capacidad antioxidante *in vitro* del extracto de tamarindo se evaluó *in vivo*. En el protocolo experimental se administró el extracto de tamarindo a una dosis de 25 mg de fenoles/kg de peso corporal. Esta dosis se eligió con base en la literatura y de acuerdo a estudios realizados previamente en nuestro laboratorio con otros antioxidantes de carácter polifenólico, donde se observó que dosis mayores de 200 mg/kg tienen efectos negativos [Martinello F, *et al.*, 2006; Landi-Librandi AP, *et al.*, 2007].

El grupo administrado únicamente con el extracto de tamarindo no mostró alteraciones en el crecimiento, niveles de marcadores de estrés oxidativo, actividad de

enzimas antioxidantes y activación de NF- κ B. Estos datos indican que la administración de este extracto no tiene efectos nocivos para la salud de los animales bajo las condiciones de estudio utilizadas.

Los resultados obtenidos en el grupo de animales tratados únicamente con FeNTA, muestran aumento en el daño oxidativo a lípidos y proteínas, y en los niveles de peróxido de hidrógeno, así como una disminución en la actividad renal de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx). Estos efectos han sido reportados en la literatura anteriormente y son característicos de la exposición de roedores al FeNTA [Umemura T, *et al.*, 1990; Qi W, *et al.*, 1996; Toyokuni S, *et al.*, 1996]. Entre las teorías que explican el efecto oxidativo del FeNTA se ha propuesto que la molécula de Fe³⁺NTA es reducida a Fe²⁺NTA al llegar al lumen de los túbulos proximales renales por los productos de degradación del glutatión reducido (GSH), cisteína y cisteínglicina; en este estado de reducción el FeNTA, en presencia de H₂O₂, produce radical hidroxilo (OH[•]) vía reacción de Fenton-Haber Weiss (reacción 3) [Chopra K, *et al.*, 2004]; además, se ha comprobado que la autooxidación del Fe²⁺NTA genera radical superóxido (O₂⁻) [Singh D, *et al.*, 2004].

Por otro lado, se observó protección en todas las determinaciones de marcadores de estrés oxidativo por el pretratamiento con el extracto de tamarindo: parcial en la oxidación de lípidos y proteínas, y total en el aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno. Estos resultados pueden indicar que el extracto de tamarindo tiene el potencial de prevenir el desarrollo de cáncer, ya que el aumento de peróxido de hidrógeno y daño oxidativo a lípidos son factores de riesgo a la carcinogénesis [Loo G., 2003; Valco M, *et al.*, 2006]. Otros autores han encontrado protección por parte de extractos polifenólicos en la oxidación de lípidos y en el aumento de H₂O₂ causados por la administración de FeNTA, pero en estos casos la disminución del daño fue menor que la obtenida con el extracto de tamarindo; la oxidación de lípidos disminuyó 24% con la administración del extracto de tamarindo, mientras que un extracto polifenólico de *Ficus racemosa* solamente logró disminuir el 17.3%. Los niveles de peróxido de hidrógeno disminuyeron un 40.5% con el extracto de tamarindo y con el otro extracto solo 26.3% [Khan N, *et al.*, 2005]. En cuanto a la oxidación de proteínas no hay datos reportados en la literatura de compuestos antioxidantes que muestren protección sobre este parámetro, por lo que esta es nueva información aportada por el presente trabajo.

Las enzimas antioxidantes SOD y CAT mostraron una actividad disminuida en los grupos tratados únicamente con extracto de tamarindo. En otros estudios donde se administran flavonoides es evidente una disminución en los grupos tratados únicamente con el antioxidante, sin embargo los autores no discuten estos hallazgos [Chopra K *et al.*; 2004; Singh D *et al.*, 2004]. Una explicación lógica a este comportamiento, es que la administración del extracto reduce la concentración de especies reactivas de oxígeno, lo cual disminuye la cantidad de sustrato disponible para las enzimas, por lo tanto la actividad enzimática disminuye al no ser requerida. En cuanto a la actividad de GPx, no se observó ningún cambio en el grupo administrado solo con el extracto de tamarindo. Por otro lado, la actividad de las tres enzimas estudiadas disminuyó con la administración de FeNTA, y en todos los casos se previno totalmente esta disminución por el pretratamiento con el extracto de tamarindo. Esto indica que la administración del extracto de tamarindo, bajo las condiciones de estudio utilizadas, no daña a las enzimas como se ha observado en otros estudios, donde la administración de polifenoles en altas dosis propicia un efecto prooxidante sobre proteínas y otras biomoléculas [Bravo 1998; Yang CS *et al.*, 2001]. El extracto de alguna forma regula la actividad de CAT y SOD, y cuando la célula se enfrenta a un reto oxidativo es capaz de recuperar la actividad de ambas enzimas.

En cuanto a la actividad del factor de transcripción NF- κ B no se observó ningún cambio significativo entre los grupos estudiados. Esto no descarta la posibilidad de que este factor esté involucrado en la carcinogenicidad del FeNTA. La vía clásica de activación por degradación de I κ B es la más común, razón por la cual se decidió determinar los niveles de I κ B- α , aunque se sabe existen por lo menos dos isoformas más de esta proteína. Además, existen otras vías de activación distintas a la clásica que no involucran a I κ B, una de ellas la activación de la cinasa inductora de NF- κ B (NIK), la cual fosforila directamente a NF- κ B [Bubici C, 2006; Gilmore TD, 2006]. Por otro lado, la variación de los niveles de I κ B podrían darse a tiempos distintos al determinado en este estudio, ya que la activación de NF- κ B es un proceso finamente regulado. Por lo tanto para concluir si NF- κ B está involucrado en el mecanismo de carcinogenicidad del FeNTA debe considerarse la determinación de I κ B- α a distintos tiempos después de la administración de FeNTA, y realizarse la determinación de la actividad de este factor de transcripción mediante geles de retardo o un ensayo electroforético de movilidad retardada (EMSA).

IX. CONCLUSIONES

- Se preparó un extracto del fruto de tamarindo rico en compuestos polifenólicos con excelente capacidad antioxidante.
- El pretratamiento de roedores con dicho extracto previno el daño oxidativo renal inducido por la exposición a FeNTA en un estudio agudo.
- La exposición a FeNTA no alteró la activación del factor de transcripción NF- κ B bajo las condiciones de estudio utilizadas, por lo que es necesario realizar otros estudios para concluir si este factor de transcripción está involucrado en el mecanismo molecular de carcinogenicidad del FeNTA.
- Estos resultados indican que el fruto del tamarindo podría ser una importante fuente de moléculas antioxidantes con probable actividad quimiopreventiva.

X. APÉNDICE

10.1 PREPARACIÓN EXTRACTO ETANÓLICO DE TAMARINDO [Martinello F, *et al.*, 2006]

1. Utilizar tamarindo de colima (al comprarlo así se pide en el mercado, los marchantes saben de donde proviene).
2. Las vainas de tamarindo se pelan y se les quita la semilla
3. Por cada kilogramo de tamarindo se obtienen aproximadamente 500 g de pulpa y pericarpio.
4. Preparar una solución de etanol al 70%.
5. En la maceración se agregan 400 ml de ETOH al 70% por cada 100 g de material vegetal.
6. Macerar durante 3 a 5 días agitando periódicamente. Mantenerse en refrigeración a 4° C.
7. El macerado se destila por rotoevaporación para eliminar el ETOH. La temperatura a la cual empieza a destilar el sistema es aproximadamente a 80° C. Al principio de la destilación se deja una pequeña fuga en el refrigerante del rotavapor para evitar que el extracto sea vomitado.
8. La cantidad de etanol obtenido después de la destilación debe ser aproximadamente el 70 % del volumen total de solución de ETOH adicionado al material vegetal inicialmente.
9. Centrifugar el extracto en tubos de vidrio de 25 ml con tapa de rosca. Estos tubos deben meterse a la centrifuga con una camisa de hule. (los tubos son marca Costar).
10. Centrifugar a 8000rpm durante 20 minutos.
11. Como sobrenadante se obtiene una capa grasosa color café-gris. Esta debe retirarse filtrando con gasa doblada 4 veces.
12. Almacenar el extracto en frasco de vidrio debidamente rotulado a 4° C.
13. Si se piensa almacenar por largo tiempo (mas de 2 meses) adicionar benzoato de sodio al 0.05%. Para ellos, se pesa la cantidad correspondiente de benzoato y se agrega al extracto en agitación constante a una temperatura de 40° C.

10.2 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES [Pourmorad F, *et al.*, 2006]

Procedimiento:

1. Utilizar tubos de ensayo 12x75.
 2. Agregar a cada tubo 400 µL de Na₂CO₃ 1M.
 3. Agregar 50 µL de estándar, agua (blanco) o muestra (extracto vegetal)*
 4. Adicionar 500 µL de reactivo Folin Ciocalteu diluído 1:10.
 5. Agitar 5" e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
 6. Leer a 765nm.
- El extracto a evaluar generalmente debe diluirse para que caiga dentro de la curva patrón. Para el extracto etanólico de tamarindo es suficiente realizar diluciones 1:10, 1:20 y 1:50.

Curva Patrón:

Concentración [$\mu\text{g/mL}$]	μL de estándar	μL H_2O destilada
50	5	995
100	10	990
150	15	985
200	20	980
250	25	975

Soluciones:

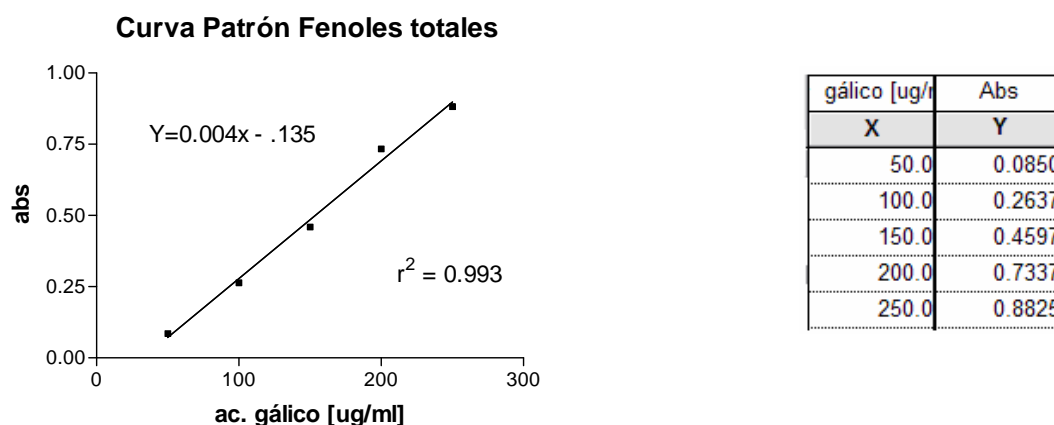
Carbonato de sodio 1M.

Pesar 26.5 g de Na_2CO_3 disolver en agua destilada y aforar a 250 mL .

Estándar para la curva patrón ácido gálico [10 mg/mL].

Pesar 50 mg de ácido gálico y disolver en 5 mL de metanol al 50%.

Ejemplo curva patrón



Para obtener la IC_{50} se obtiene la ecuación de la curva:

$$y = 24.177\text{Ln}(x) - 12.963$$

y se calcula el valor deseado.

10.3 INACTIVACIÓN DE RADICAL SUPERÓXIDO [Oberley y Spitz1984]

Se utilizó la misma técnica de actividad de SOD para realizar esta determinación (ver más adelante en este anexo). En este caso se obtiene el % de inactivación de radical superóxido.

Ejemplo de cálculo:

Tubo 100% reducción NBT absorbancia promedio= 0.2158

Muestra absorbancia= 0.154

$$0.2158 - 100\%$$

0.154-X X= 71.36% reducción de NBT por lo tanto se atrapó 100-71.36= 28.6% radical superóxido.

10.4 PREPARACIÓN DEL CARCINÓGENO RENAL NITRILOTRIACETATO DE HIERRO (FeNTA) [Toyokuni S et al., 1994]

Nitrato de hierro Fe(NO ₃) ₃ 160 mM	Ntrilotriacetato de sodio(NTANa) 320 mM	Bicarbonato de sodio NaHCO ₃ 120 mM
0.6464 g en 10 mL de NaHCO ₃ 120 mM	1.881 g en 25 mL de NaHCO ₃ 120 mM *	5.0406 g en 500 mL H ₂ O desionizada.

Todo debe prepararse en material de aforo.

Tener cuidado al disolver el nitrato de hierro ya que se crea efervescencia que puede ocasionar el derrame de la solución antes de completar el aforo

La solución de FeNTA siempre se prepara mezclando en proporción 1:2 solución de nitrato de hierro y ntrilotriacetato de sodio respectivamente. Ejemplo:

30 mL de FeNTA: mezcla de 10 mL de Fe(NO₃)₃ y 20 mL de NTANa 320 mM.
La solución de FeNTA debe mantenerse en la oscuridad ya que es fotolábil.

Para ajustar el pH de la solución de FeNTA a 7.4 se utilizan 0.2 g de NaHCO₃ aproximadamente. Siempre se observan pequeños cambios a lo largo del tiempo que se incrementan con la agitación.

El carbonato debe agregarse lentamente con constante agitación y debe observarse el incremento de pH de la solución, si es muy lento puede agregarse un poco mas de carbonato, cuando el pH llegue al punto deseado (7.3) debe dejar de agitarse la solución para mantener este pH constante por mayor tiempo.

Como el pH del FeNTA tiende a aumentar espontáneamente debe de tenerse otra solución a parte de FeNTA sin ajuste (sin haber agregado 0.2 g de carbonato) esto para disminuir el pH en caso de que este llegue a sobrepasar 7.4 y poder seguir inyectando a los animales sin tener que preparar una nueva solución.

Al realizar la operación de ajuste de pH a la solución de FeNTA el potenciometro debe de estar en modo Standby (donde todo el tiempo esta midiendo el cambio de pH) ya que esta solución nunca mantendrá el pH constante.

10.5 OXIDACIÓN DE LÍPIDOS [Erdelmeier *et al.*,1998]

Preparación del homogenizado

1. Lavar el riñón en solución salina isotónica fría (NaCl 0.9%)
2. Pesar 0.1 g de tejido
3. Preparar homogenizado en 1 mL de buffer de fosfatos 20 mM a pH 7.4
4. Centrifugar el homogenizado a 3000 xg a 4°C por 10 min para remover las partículas grandes
5. Tomar el sobrenadante
6. 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

1. Añadir 6 mL de metanol 100% a 18 mL de 1metil-2fenilindol 10 mM en acetinitrilo (reactivo A).
2. Poner en tubos de ensayo 200 μ L de muestra.
3. Añadir 650 μ L del reactivo A.
4. Agitar suavemente en el vortex.
5. Añadir 150 μ L de HCl 37% (12N).
6. Mezclar bien y tapar los tubos.
7. Incubar a $45^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 60 min.
8. Centrifugar los tubos a 15 000 xg por 10 min
9. Transferir el sobrenadante a una celda.
10. 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 μ L de acetonitrilo/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

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

Tubo	Stock (μ L)	Agua o buffer (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

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

Soluciones

Buffer de homogenización: Buffer de fosfatos 20 mM a pH 7.4.

Pesar

	500 mL
Na ₂ PO ₄	0.8626 g
KH ₂ PO ₄	0.5340 g

Disolver los componentes en agua destilada, ajustar el pH y aforar
Almacenar a 4°C

Tris – HCl 20 mM pH=7.4

Para preparar 100 mL

Pesar 0.3152 g 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 10 mM (TMOP)

Para preparar 10mL

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 1 0mM

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

10.6 OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS [Reznick *et al.*,1994]

Preparación del homogenizado y técnica

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

PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN

1. Preparar una 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

2. Leer solo los tubos blanco (con HCl) en esta curva. Para obtener el contenido de proteínas en el ensayo a 280 nm (UV)
3. 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

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

$$C = \frac{Abs}{\epsilon} = \frac{Abs}{2.2 \times 10^4 / 16^6} = \Delta Abs * 45.45$$

Soluciones

Buffer de homogenización: buffer de fosfatos 50 mM pH=7.4 con leupeptina (5 μg/mL), pepstatina A (7 μg/mL) y aprotinina (5 μg/mL) y EDTA 1 mM.

Pesar

	100 mL
NaH ₂ PO ₄	0.4194 g
Na ₂ HPO ₄	0.278 g
EDTA-Na ₂	0.0372 g
Leupeptina	0.0005 g
Pepstatina A	0.0005 g
Aprotinina	0.0007 g
Tritón	0.1 mL

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 buffer

Sulfato de estreptomycin 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

	25 mL
DNPH 10 mM	49.5 mg

Disolver en HCl 2.5 M y aforar

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

	200 mL
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.7584 g
KH ₂ PO ₄	0.092 g

Disolver en agua destilada, ajustar pH y llevar al volumen deseado.
Almacenar a temperatura ambiente

Guanidina-HCl 6.0M:

Pesar

	20 mL
Guanidina-HCl	11.4636 g

Disolver en solución de fosfatos 20 mM pH 2.3 y llevar al volumen deseado.

Albúmina sérica bovina 4mg/mL en guanidina 6M

Pesar 0.04 g de ABS, disolver y aforar a 10 mL con guanidina 6 M

Almacenar a 4°C

10.7 CONCENTRACIÓN DE H₂O₂ [Long y cols., 1999; Banerjee y cols., 2002].

Preparación del homogenizado

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

Técnica

1. Mezclar en tubos eppendorf nuevos de 1.5 mL:

Reactivos	Estándares	Muestra
Sol. FOX	900 µL	900 µL
St H ₂ O ₂	90 µL	-
Muestra	-	90 µL
Metanol (HPLC)	10 µL	10 µL

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

PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN

1. Diluir 285 µL de H₂O₂ 30% con H₂O desionizada hasta 100 mL. (hacerlo en matraz aforado) para obtener la solución "stock" de H₂O₂ 25 µM
2. Hacer una dilución 1:250 para obtener un estándar de H₂O₂ 100 µM
3. Hacer diluciones como sigue para obtener cada uno de los estándares de la curva

[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

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

Estándar de [H ₂ O ₂] µM	[H ₂ O ₂] en 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

1. Para expresar la cantidad de H_2O_2 por cada mg de proteína, primero se tiene que determinar el contenido total de proteína por el método de Lowry. El valor obtenido de H_2O_2 se divide entre el valor de Lowry (mg/mL) para que las unidades sean nmol/mg proteína

Soluciones

Buffer de homogenización: buffer de fosfatos 100 mM pH 7.4

Pesar:

	250 mL
KH_2PO_4	1.33 g
Na_2HPO_4	2.16 g

Disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar
Almacenar a 4°C

H_2SO_4 250 mM

Para preparar 200 mL
Tomar 2.7 mL de H_2SO_4 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 0.015686g 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
Pesar 2.0 mg de sulfato ferroso amoniacal
Disolver ambos en 2.0 mL de H_2SO_4 250 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 H_2O_2 25 μ M

Para preparar 100mL
Diluir 285 μ L de H_2O_2 30% con H_2O desionizada y aforar a 100 mL.
Preparar en el momento del ensayo

10.8 MEDICIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES [Lowry y cols., 1951]

Preparación de las muestras:

1. Diluir con agua 1:150 el sobrenadante del homogenado de las técnicas de Fox y lipoperoxidación

- Diluir con agua 1:50 el sobrenadante de la extracción de proteínas para Western blot.

Técnica

PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN

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

	[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

	1 L
Na ₂ CO ₃	20 g
NaOH	4 g
Tartrato de sodio y potasio	0.2 g

Almacenar a temperatura ambiente

CuSO₄ al 0.5% (Solución B)

Pesar 0.5g en 100 mL de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

Solución C.

Mezclar

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

Preparar en el momento del ensayo

Folín 1N (Solución D)

Mezclar volúmenes iguales de Folín 2N y agua destilada.

Preparar en el momento del ensayo

10.9 ACTIVIDAD ENZIMAS ANTIOXIDANTES

HOMOGENIZADO

1. Homogenizar 100 mg de tejido en 900 μ L de buffer de fosfatos 50 mM pH 7 tritón 1%
2. Centrifugar a 21000xg durante 1 hora a 4°C
3. Tomar el sobrenadante y hacer alícuotas de 300 μ L

NOTA: Las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa se deben determinar el mismo día que se hace el homogenizado, para determinar la superóxido dismutasa se puede descongelar una sola vez el homogenizado.

Buffer de homogenización: Buffer de fosfatos 50mM pH 7 tritón 1%

Pesar

	250mL
KH ₂ PO ₄	1.0524 g
Na ₂ HPO ₄	0.6745 g
Tritón	2.5 mL

Disolver los componentes en agua destilada, ajustar el pH y aforar
Almacenar a 4°C

10.9.1 CATALASA [Aebi H 1984]

Técnica

1. Diluir la muestra 1:30 con buffer de fosfatos 10 mM pH 7
2. Colocar en un tubo de 12 X 75 mm 25 μ L de la dilución de la muestra + 725 μ L de H₂O₂ 30 mM
3. Agitar en vortex
4. Vaciar el contenido del tubo por decantación a una celda
5. Leer la absorbancia a 240 nm cada 15 seg durante 30 seg.usando un programa de cinética
6. Calibrar con buffer de fosfatos 10 mM pH7

Cálculos

Se usa la constante de reacción de primer orden (κ) como la unidad de actividad de la catalasa, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\kappa = (1/\Delta t)(2.3 \times \log [A_1]/[A_2])$$

donde t = intervalo de tiempo medido, $[A_1]$ y $[A_2]$ son las absorbencias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 .

Para un intervalo de 30 seg se aplica la fórmula:

$$k = 0.033 \times \ln [A_1/A_2]$$

Para un intervalo de 15 segundos se aplica la siguiente fórmula:

$$k = 0.0667 \times \ln [A_1/A_2]$$

Finalmente se calcula la actividad específica al dividir el valor de k entre los mg de proteína adicionados al ensayo*.

*Es necesario medir la concentración de proteínas totales en la muestra.

Para obtener la cantidad de proteína en el ensayo se divide la concentración de proteínas obtenida por el método de Lowry entre 1,200 (valor que se obtiene de multiplicar 30 (dilución de la muestra en el ensayo) por 40 (obtenido de $1 \text{ mL} \div 0.025 \text{ ml}$ que es el volumen de muestra colocada en el ensayo).

Ejemplos.

Muestra	Segundos	D.O.	k (0-15) k (15-30) k (0-30)	Proteínas totales (mg/ml)	Proteína en ensayo	k /mg proteína
1	0	1.4060	0.0039	20.55	0.017	0.229
	15	1.3250	0.0038			0.223
	30	1.2520	0.0038			<u>0.227</u>

Se reporta el intervalo de 0-30 seg en k / mg proteína, este valor debe ser aproximadamente el promedio de los dos valores de los intervalos de 15 segundos.

Soluciones

Amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0

Pesar

	250 mL
KH_2PO_4	0.2105 g
Na_2HPO_4	0.135 g

Disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar

Almacenar a temperatura ambiente

H_2O_2 30 mM

Para preparar 50 mL

Medir 170 μL de peróxido de hidrógeno al 30%, disolverlos en amortiguador de fosfatos 10 mM y aforar.

Preparar al momento del ensayo

10.9.2 SUPEROXIDO DISMUTASA [Oberley y Spitz1984]

Técnica

1. Diluir la muestra 1:100 con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0
2. Preparar 3 tubos por cada muestra: 1 tubo blanco y 2 tubos problema.
3. Considerar 4 tubos adicionales además de los correspondientes a las muestras: 2 al principio de la serie y 2 al final de la misma. Estos 4 tubos son los tubos del 100% de reducción del NBT.
4. Adicionar a cada tubo 815 μL de mezcla de reacción.

		(M)	muestra	(0.5)100%		ensayo *	
100% de reducción	0.4700	0.4700					
100% de reducción	0.4700						
Blanco de muestra 1	0.0180						
Problema de muestra 1	0.2360	0.2450	0.2270	1.0340	20.55	0.0678	15.25
Problema de muestra 1	0.2540						

100% = Promedio de los 4 tubos del 100% de reducción.

* los mg de proteína en el ensayo se calculan de la siguiente manera:
 Proteínas totales x 0.33 ml colocados en el ensayo / dilución de la muestra.
 1:100 fue la dilución usada en las muestras de este ejemplo, así que:
 Proteínas totales x 0.33 / 100 ó Proteínas totales x 0.0033

Soluciones

Na₂CO₃ 400 mM

Para preparar 500 mL
 Pesar 21.2 g, disolver en agua destilada y aforar.
 Almacenar a 4°C

Xantina 0.3 mM.

Para preparar 1L
 Disolver 0.0456 g de xantina en 5 mL de Na₂CO₃ 400 mM, poner en agitación y esperar que se disuelva completamente. Se añade esta solución a 980 mL de agua destilada y se afora
 Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente
NOTA: Se debe probar el reactivo cada vez que se vaya a utilizar.

EDTA 0.6 mM.

Para preparar 500 mL
 Pesar 0.1118 g, disolver en agua destilada..
 Almacenar a 4°C

Nitroazul de tetrazolio (NBT) 150 M.

Para preparar 300 mL
 Pesar 0.0368 g disolver en de agua destilada.
 Almacenar a 4°C en frasco ámbar.

Albúmina 0.1 %.

Para preparar 250 mL

Pesar 0.25 g disolver en agua destilada y aforar.
Almacenar a 4°C

Mezcla de reacción

Xantina 0.3mM (mL)	2.5	5	10	15	20	25	30	40
EDTA 0.6mM (mL)	1.25	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20
NBT 150 µM (mL)	1.25	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20
Na ₂ CO ₃ 400mM (mL)	0.75	1.5	3	3.75	6	7.5	9	12
ABS 0.1% (mL)	0.33	0.75	1.5	2.25	3	3.8	4.5	6
Total (mL)	6	12	24	36	49	61	73	98

CuCl₂·2H₂O 0.8 mM.

Para preparar 500 mL
Pesar 0.070 g, disolver en agua destilada y aforar.
Almacenar a 4°C

Sulfato de amonio 2M.

Para preparar 250 mL
Pesar 66 g, disolver en agua destilada y aforar..
Almacenar a 4°C

Xantina oxidasa (168 U/L).

Para preparar 2 mL (que contengan 168 U/L) se debe calcular la cantidad de enzima que se debe pesar dependiendo de las especificaciones de cada lote.

Ejemplo

Lote con 0.16U/mg sólido:

$$\begin{array}{ll} 0.16 \text{ U} - 1 \text{ mg} & 1050 \text{ mg} - 1000 \text{ mL} \\ 168 \text{ U} - x \text{ mg} & x \text{ mg} - 2 \text{ mL} \\ x = 1050 \text{ mg} & x = \mathbf{2.1 \text{ mg}} \end{array}$$

Así entonces, para lote en particular, disolver 2.1 mg de xantina oxidasa en sulfato de amonio.

Preparar al momento del ensayo
Mantener a 4°C hasta su uso.

NOTA: No se debe abrir el frasco de xantina oxidasa inmediatamente después de sacarlo del refrigerador, sino hasta que esté a temperatura ambiente.

10.9.3 GLUTATIÓN PEROXIDASA [Harris., 1992; Ichikawa y cols., 1994]

Técnica

1. Diluir la muestra 1:10 utilizando buffer de fosfatos 50 mM pH 7
2. En tubos de 12 X 75 mm se colocan los siguientes reactivos:
3. Tubo inespecífico:
800 µL de mezcla de reacción + 100 µL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7

4. Agitar en vortex
5. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente
6. Cuando se cumplan 2 minutos de incubación del tubo inespecífico añadir al siguiente tubo (muestra #1):
800 μL de mezcla de reacción + 100 μL de dilución de la muestra
7. Agitar en vortex
8. Cumplidos los 5 minutos de incubación del tubo inespecífico adicionar a este 100 μL de H_2O_2 0.25 mM
9. Agitar en vortex
10. Vaciar por decantación a una celda
11. Leer la absorbancia de la muestra a 340 nm cada minuto durante 3 minutos usando un programa de cinética
12. Calibrar con buffer de fosfatos 50 mM pH 7
13. En el primer minuto de lectura del inespecífico preparar el tubo de la muestra #2:
800 μL de mezcla de reacción + 100 μL de dilución de la muestra
14. Al terminar de leerse el tubo inespecífico ya se han cumplido los 5 minutos de incubación de la muestra #1 (y se han cumplido 2 minutos de incubación de la muestra #2).
15. Sacar la celda del espectrofotómetro, tirar su contenido a un recipiente de plástico y lavarla con agua destilada usando una piseta.
16. Añadir 100 μL de H_2O_2 0.25 mM al tubo de la muestra #1.
17. Agitar en vortex.
18. Vaciar por decantación a la celda.
19. Leer muestra #1.
20. En el primer minuto de lectura de la muestra #1 preparar el tubo de la muestra #3 (se repite el procedimiento explicado anteriormente para cada una de las muestras, hasta terminar la lectura de todas ellas).

Cálculos:

La actividad de la glutatión peroxidasa se determina promediando los cambios de absorbancia por minuto, multiplicando este promedio por 0.16 (este factor se obtiene tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar del NADPH a 340 nm es de $6.22 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y dividiendo el resultado entre los mg de proteína adicionados en el ensayo. Así se obtiene la actividad específica expresada en U/mg de proteína, donde $1 \text{ U} = \mu\text{mol}$ de NADPH oxidado/min)

Finalmente se divide este resultado entre los mg de proteína adicionados al ensayo. Los datos se expresan como μmoles de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína. Es necesario medir la concentración de proteínas totales en la muestra.

Ejemplos.

	D.O.	Δ D.O.	Promedio	Promedio - Inespecífico	X 0.16	Proteína (mg/ml)	Proteína en ensayo	U/mg proteína
Inespecífico	0.819 0.776 0.728	0.043 0.048 0.047	0.0475					

	0.68 1							
Problema 1	0.84 5 0.72 7 0.60 1 0.47 0	0.118 0.123 0.131	0.128	0.0805	0.012 9	19.0	0.19	0.0678

La cantidad de proteína en el ensayo se calcula considerando que se agregan 0.1 ml de muestra diluido 1:10. Esto equivale a añadir 10 µL del homogenado sin diluir. Por lo tanto hay que dividir entre 100 el valor de concentración de proteínas totales (en mg/ml) para obtener el valor de proteínas en esos 10 µL.

Soluciones

Buffer de fosfatos 50mM pH 7

Pesar

	250mL
KH ₂ PO ₄	1.0524 g
Na ₂ HPO ₄	0.6745 g

Disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar
Almacenar a 4°C

EDTA 1 mM, Azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, Glutatión reducido 1 mM, Glutatión reductasa 1 U/ml en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0 (Mezcla de reacción)

Pesar

	31 tubos	40 tubos	62 tubos
EDTA	0.0093 g	0.0119 g	0.0186 g
Azida de sodio	0.00165 g	0.0021 g	0.0033 g
NADPH	0.00415 g	0.0065 g	0.0083 g
Glutatión reducido	0.0077 g	0.0098 g	0.0154 g
Glutatión reductasa	Calcular*	Calcular*	Calcular*
Amort. de fosfatos 50 mM pH 7.0	25 mL	32 mL	50 mL

* La cantidad de glutatión reductasa a añadir a la mezcla de reacción depende del número de muestras y del # de lote de esta enzima.
Mantener en hielo durante el ensayo

glutatión reductasa 1 U/mL.

Para preparar 25 ml de mezcla de reacción (y que contengan por lo tanto 25 U), se debe calcular la cantidad de enzima que se agregará dependiendo de las especificaciones de cada lote.

Ejemplo:

# de lote de GSH reductasa	Unidades en frasco	Volumen en frasco	mg prot/mL	U/mg prot
79H7470	2500	6.0 ml	3.2	131

2500 unidades – 6.0 ml

25 unidades - x mL

x = 0.06 ml

Así entonces, para este lote en particular, añadir 60µL de glutatión reductasa a la mezcla de reacción.

H₂O₂ 2.5 mM

Para preparar 10 mL

Tomar 2 µl de H₂O₂ al 30%.y añadirlos a 10 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0

Preparar al momento del ensayo

10.10 WESTERN BLOT [Towbin y cols., 1979; Sambrok y cols., 1989]

Extracción de proteínas totales

1. Homogenizar 100 mg de tejido en 600µL de buffer de DTT 1mM, Tris HCl pH 7.4 10mM, glicerol 30%, EDTA pH 8 1mM, Triton X100 1%, ortovanadato de sodio 1mM, PMSF 1 mM, Azida de sodio 15 mM e Inhibidores de proteasas (1 comprimido de COMPLETE por cada 10ml de solución).
2. Centrifugar a 13000xg durante 45 min a 2°C
3. Tomar el sobrenadante
4. Determinar la cantidad de proteínas por la técnica de Lowry

Western blot

1. Preparar el "resolving gel" de acrilamida al 12 % a partir de acrilamida al 30%
2. Agitar suavemente.
3. Vaciar la mezcla del "resolving gel" al molde (sin llenarlo)
4. Añadir cuidadosamente agua (para "aplanar" la superficie del gel).
5. Esperar 20'.
6. Eliminar el agua por decantación.
7. Lavar con agua para eliminar la acrilamida no polimerizada.
8. Secar el exceso de agua con papel (sin tocar el gel).
9. Preparar el "stacking gel" al 5%
10. Colocar la mezcla sobre el "resolving gel" (sin llenar el molde y dejando 4 mm de distancia del borde superior) EVITAR LA PRESENCIA DE BURBUJAS
11. Colocar el peine cuidadosamente (EVITAR LA PRESENCIA DE BURBUJAS).
12. Llenar hasta el borde superior con el "stacking gel" con ayuda de una micropipeta de 200 µL.
13. Esperar 20'.
14. Sacar el peine cuidadosamente
15. Lavar con agua SIN APUNTAR HACIA EL GEL para eliminar restos del gel y acrilamida no polimerizada.
16. Colocar el molde en posición vertical para que el exceso de agua escurra.
17. Eliminar el agua de cada pozo con tiras de papel absorbente recortadas.
18. Colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis
19. Vaciar A. de electroforesis (Tris 25mM, glicina 250mM y SDS 0.1% pH 8.3) en los depósitos superior e inferior de la cámara.

Preparación de las muestras:

1. En tubos eppendorf de 0.5 ml colocar la cantidad deseada de proteína (de 10 µg a 100 µg, depende de la proteína de interés) EVITAR LA PRESENCIA DE BURBUJAS.
2. Colocar buffer desnaturante (tris-HCl 50 mM pH 6.8, mercaptoetanol 1%, SDS 1%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%) EVITAR LA PRESENCIA DE BURBUJAS.
3. Mezclar suavemente
4. Colocar los tubos en agua hirviendo durante 5 minutos.
5. Colocar las muestras en los pozos con ayuda de una micropipeta.

Electroforesis:

1. Llenar el depósito superior de la cámara con A. de electroforesis.
2. Correr a 100volts por 10 minutos hasta que el frente de la electroforesis haya salido del stacking gel.
3. Cambiar el voltaje a 80-90 y correr el gel aproximadamente por 3 hrs.
4. Al termino abrir el molde.
5. Separar el stacking y el resolving gel, eliminar el primero.
6. Separar el resolving gel del molde y sumergirlo en buffer de transferencia durante 10-20 minutos para estabilizarlo.

SE DEBE TENER CUIDADO DE NO PERDER LA ORIENTACIÓN DEL GEL.

Transferencia a la membrana de nitrocelulosa

1. Recortar la membrana IMMOBILON-P cat# IPVH00010 (9 x 8 cm; usar guantes).
2. Sumergir la membrana en metanol al 100% durante 5 minutos.
3. Sumergir la membrana en agua durante 2 minutos.
4. Sumergir la membrana en el buffer de transferencia de 5-10 minutos.
5. Abrir el cassette de transferencia, colocar una esponja delgada.
6. Colocar papel filtro.
7. Colocar el gel. EVITAR LA PRESENCIA DE BURBUJAS
8. Colocar la membrana sobre el gel. EVITAR LA PRESENCIA DE BURBUJAS.
9. Colocar el papel filtro sobre la membrana evitando la presencia de burbujas.
10. Colocar otra esponja delgada
11. Cerrar el cassette.
12. Colocar el cassette en la cámara de transferencia que se ha llenado previamente con amortiguador de transferencia (Tris base 25mM, glicina 190mM, metanol 10% pH 8.3) .
13. Realizar la transferencia a 400 mA durante 1-1.5 horas a 4°C.
14. Bloquear la membrana con leche Svelty al 2% en PBS durante una hora a temperatura ambiente con agitación.

Incubación con anticuerpos.

1. Las membranas deben ser manejadas con pinzas sin dientes para no maltratarlas y debe usarse guantes.
2. Colocar la membrana en un toper sellable.

3. Añadir la sol. de anticuerpo primario diluído 1:750 con Na₂HPO₄ 80mM, NaH₂PO₄ 20 mM NaCl 100m m, tween-20 0.1% (PBS-T 0.1%), eliminar las burbujas.
4. Incubar 12 hrs a una temperatura de 4-8°C con agitación constante.
5. Al término de este periodo incubar a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora.
6. Enjuagar una sola vez con PBS y adicionar el anticuerpo primario para actina (diluido 1:750 con PBS). Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación.
7. Lavar 3 veces con 10 mL de PBS-T 0.1% por 10 min con agitación constante.
8. Añadir la sol. de anticuerpo secundario (diluído 1:15000 con PBS-T 0.1%), eliminar las burbujas.
9. Incubar 1 h a temperatura ambiente con agitación constante.
10. Lavar 3 veces con 10 mL PBS-T 0.1% por 15min con agitación constante.
11. Usar inmediatamente la membrana o guardarla a 4°C (preferentemente usarla inmediatamente).

Detección

Se utilizó el kit de detección de IMMOBILON (millipore #catálogo WBKLS0500)

1. Preparar el sustrato en un frasco de vidrio ámbar o de plástico 10 minutos antes de su uso para que esté a temperatura ambiente
 - mezclar cantidades iguales del bote #1 y del bote #2 (0.125 ml /cm² de membrana).
2. Cubrir las membranas con el sustrato
3. Incubar de 1 a 2 min.
4. Eliminar el sustrato por decantación lo más posible
5. En el cuarto oscuro colocar la membrana sobre una mitad de bolsa de plástico y cubrirla con la otra mitad de la bolsa.
6. Colocar la bolsa con las membranas en el cassette de exposición.
7. Apagar la luz blanca y encender la luz roja.
8. Colocar la placa de autorradiografía sobre la bolsa de plástico
9. Cerrar el cassette.
10. Exponer de 2-5 min según la intensidad de la señal.

Revelado:

1. Bajo luz roja vaciar el revelador y el fijador en charolas de plástico.
2. Sacar la placa del cassette de exposición.
3. Sumergir la placa en el revelador (usar guantes).
4. Mover continuamente (agitando la charola o la placa) siempre manteniéndola sumergida.
5. Constantemente, cada 10 seg, sacar la placa del revelador y observar si aparecen bandas en la placa (a contraluz con la luz roja).
6. Cuando se observen las bandas de manera nítida hay que sumergir la placa en el fijador y mover la placa continuamente.
7. Lavar la placa bajo el chorro del agua o en una charola con agua de la llave.
8. Secar la placa a temp. ambiente colgándola con ayuda de unas pinzas para que el agua escurra.

Soluciones:

Buffer de lisis DTT 1mM, Tris HCl pH 7.4 10mM, glicerol 30%, EDTA pH 8 1mM, Triton X100 1%, ortovanadato de sodio 1mM, PMSF 1 mM, Azida de sodio 15 mM, Inhibidores de proteasas

1. preparar stocks de los componentes del buffer

compuesto	[] stock	Vol stock (mL)	Pesar (g)	Diluir en
DTT	100mM	5	0.0772	Agua dest esteril
Tris HCL pH 7.4	100mM	100	1.576	Agua dest esteril
EDTA pH 8	100mM	10	0.3722	Agua dest esteril
Ortovanadato	100mM	10	0.1839	Agua dest esteril
PMSF	100mM	5	0.0871	isopropanol
Azida de sodio	1.5M	10	0.9152	Agua dest esteril

2. Mezclar los componentes como indica la siguiente tabla

compuesto	[] stock	mL agregar	[] final
DTT	100mM	0.1	1mM
Tris HCl pH 7.4	100mM	1	10mM
glicerol		3	30%
EDTA pH 8	100mM	0.1	1mM
Triton X100		0.1	1%
ortovanadato	10mM	0.1	1mM
PMSF	100mM (en isopropanol)	0.1	1mM
Azida de sodio	1.5M	0.1	15mM
Vol final		4.6	

NOTA: Para preparar el Buffer se diluye 1 tableta de complete mini en 5 mL de PBS pH 7.4 y se agregan uno a uno los componentes, finalmente se agregan 0.4mL de PBS pH 7.4 para obtener el volumen final de 10mL.

Acrilamida al 30%

	50 mL
Acrilamida	14.5 g
Bis-acrilamida	0.5 g

Disolver y aforar con agua destilada
Almacenar protegido de la luz a 4°C

Tris base 1.5 M pH 8.8

Para preparar 25 mL
Pesar 4.5427g, disolver en agua destilada y aforar
Almacenar a temperatura ambiente

Tris base 1.0 M pH 6.8

Para preparar 25 mL
Pesar 3.028 g disolver en agua destilada y aforar
Almacenar a temperatura ambiente

Duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

Para preparar 10 mL

Pesar 1 g de SDS, disolver en 10 ml de agua destilada.
Almacenar a temperatura ambiente.

Persulfato de amonio al 10%

Pesar 0.1g de persulfato y disolver en 1 mL
Preparar al momento del ensayo

Preparación del “resolving gel”

Mezclar

	al 12% (mL)
H ₂ O	2.5
Acrilamida 30%	3.04
Tris 1.5 M pH 8.8	1.9
SDS 10%	0.076
Persulfato de amonio al 10%	0.076
TEMED	0.003

NOTA: Mezclar los componentes en el orden indicado en la tabla

Preparación del “stacking gel”:

Mezclar

	al 5% (mL)
H ₂ O	1.4
Acrilamida 30%	0.33
Tris 0.5 M pH 6.8	0.25
SDS 10%	0.02
Persulfato de amonio 10%	0.02
TEMED	0.002

NOTA: Mezclar los componentes en el orden indicado en la tabla

Tris 25mM, glicina 250mM, SDS 0.1% pH 8.3 (A. de electroforesis)

Pesar

	1 L
Tris base	3.0285 g
Glicina	18.8 g
SDS	0.1 g

Disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar.
Almacenar a 4°C

Tris HCl 50mM pH 6.8

Para preparar 10mL

Pesar 0.0788g, disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar
Almacenar temperatura ambiente

Tris-HCl, 50 mM, pH 6.8, mercaptoetanol 1%, SDS 2%, Azul de bromofenol al 0.1%, Glicerol al 10%. (Buffer desnaturizante).

Pesar

	50 mL
Tris-HCl	6.25 mL
Mercaptoetanol	0.5 mL
SDS	1 g
Glicerol	5 mL
Azul de bromofenol	Una punta de espátula

Disolver todos los componentes, aforar y hacer alícuotas
Almacenar a -20°C .

Tris base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%, Metanol 10% pH 8.3-8.4 (Buffer de transferencia)

Pesar

	2 L
Tris base	6 g
Glicina	28.8 g
SDS	2 g
Metanol	200 mL

Disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar.
Almacenar a temperatura ambiente.

Na_2HPO_4 80 mM, NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 0.1% pH 7.5 (PBS-T 0.1%)

Pesar:

	1 L
Na_2HPO_4	11.5 g
NaH_2PO_4	2.96 g
NaCl	5.84 g
Tween-20	1 mL

Disolver en agua destilada, ajustar el pH y aforar.
Almacenar a temperatura ambiente.

Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	# catalogo Santa Cruz biotechnology
IkB= α	sc=371=g
Actina	sc=1616
Control positivo IkB	sc= 4094
Anticuerpo secundario	sc=2020

PBS-T0.1%+ Leche descremada 2%

Para preparar 5 mL

Pesar 0.1g de leche descremada "Svelty", disolver en 5 mL de PBS-T0.1%.

Revelador 1:30

Tomar 10 mL de revelador concentrado y llevarlos a 300 mL con agua destilada

Almacenar en botella ambar a temperatura ambiente.

Fijador 1:10

Para preparar 200 mL

Tomar 20 mL de fijador comercial y llevarlos a 200 mL con agua destilada

Almacenar en botella ambar a temperatura ambiente.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- **Aebi HE, Bergmeyer J, Grabi M, Weinheim F.** Catalase, in Methods of Enzymatic Analysis. Eds. Verlag Chemie. 1983; 3: 273-286.
- **Aebi HE.** Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 1984; 105:121-126.
- **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Wlatter A.** Molecular Biology of the cell 4^a edición. Gerald Science Taylor and Francis Group. 2002, 1313-1362.
- **[Ansar S](#), [Iqbal M](#), [Athar M](#).** Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitrosotriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. [Carcinogenesis](#). 1999, 20(4):599-606.
- **Athar M, Iqbal M.** Ferric nitrosotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. [Carcinogenesis](#). 1998 ;19(6):1133-1139
- **Atkins MB, George DJ, Jonasch E.** Renal neoplasia en Brenner & Rector's. The kidney, Vol. 2, 6th edition WB Saunder's company, 2001; 1844-1862
- **[Bahnemann R](#), [Leibold E](#), [Kittel B](#), [Mellert W](#), [Jäckh R](#).** Different patterns of kidney toxicity after subacute administration of Na-nitrosotriacetic acid and Fe-nitrosotriacetic acid to Wistar rats. [Toxicol Sci](#). 1998, 46(1):166-175.
- **Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ.** Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. [Res Commun Mol Pathol Pharmacol](#). 1997, 95(2):179-189.
- **Banerjee D, Kumar PA, Kumar B, Madhudoanan UK, Nayak S, Jacob J.** Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. [Current Sci](#). 2002; 83:1193-1194.
- **Bharti A.C., Aggarwal B. B.** Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. [Biochem Pharma](#). 2002; 64:883-888.
- **Bielski BHj, Shlue GG, Bajuk S.** Tree-dimentional characteristics of the radicals. [J Phys Chem](#). 1980; 84:830-833.
- **Bravo L.** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, Metabolism, and nutritional significance. [Nutritional Rev](#) 1998; 56(11): 317-333.
- **Brenner BM.** The Kidney. Saunders Company. 6a ed. 2000. USA.

- [Bubici C](#), [Papa S](#), [Dean K](#), [Franzoso G](#). Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. [Oncogene](#). 2006, 30;25(51):6731-48.
- **Cadenas S, Barja G**. Resveratrol, melatonin, vitamin e, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO3 Free Rad Biol Med.1999; 26: 1531–1537.
- **Chopra K, Singh D, Chander V**. Nephrotoxicity and its prevention by catechin in ferric nitrilotriacetate promoted oxidative stress in rats. Hum Exp Toxicol. 2004; 23(3):137-143.
- **Conner E.M. Grisham M.B.** Inflammation, free radicals, and antioxidants, Nutrition. 1996;12: 274-277.
- **Deguchi J, Miyamoto M, Okada S**. Sex hormone-dependent renal cell carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in Wistar rats. Jpn J Cancer Res. 1995 86(11):1068-1071
- **Erdelmeier I, Gerard-Monnier D, Yadan JC, Chaudiere J**. Reactions of N-methyl-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. Chem Res Toxicol. 1998; 10:1184-1194.
- **Fine A.M.** Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, stucture, and phytopharmaceutical applications. Alter med rev. 2000; 5(2):144-151.
- **George Loo**. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. J Nutr Biochem. 2003,14(2):64-73.
- **Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudiere J**. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. Chem Res Toxicol. 1998; 10:1176-1183.
- [Gilmore TD](#). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. [Oncogene](#). 2006 30; 25(51):6680-6684.
- **Halliwell B**. Reactive Species and Antioxidant. Redox Biology is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiol. 2006;141:312-322.
- **Hanahan Douglas, Weinberg A. R**. The Hallmarks of cancer. [Cell](#). 2000 100(1):57-70.
- **Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G**. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. Oncogene. 2006, 25(51):6706-6716.
- [Iqbal M](#), [Sharma SD](#), [Mizote A](#), [Fujisawa M](#), [Okada S](#). Differential role of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides in augmenting ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-

mediated DNA damage: implications for carcinogenesis. Teratog Carcinog Mutagen. 2003;1:13-21

- **Khan AU, Wilson T.** Reactive oxygen species as cellular messengers, *Chems Biol* 1995; 2: 437-445.
- **Khan N, Sultana S (a).** Anticarcinogenic effect of *Nymphaea alba* against oxidative damage, hyperproliferative response and renal carcinogenesis in Wistar rats. *Mol Cell Biochem*. 2005;271(1-2):1-11
- **Khan N, Sultana S (b).** Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sci*. 2005; 77(11):1194-1210.
- **[Komutarin T](#), [Azadi S](#), [Butterworth L](#), [Keil D](#), [Chitsomboon B](#), [Suttajit M](#), [Meade BJ](#).** Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo. [Food Chem Toxicol](#). 2004, 42(4):649-658.
- **Landi Librandi AP, Chrysóstomo TN, Azzolini AE, Recchia CG, Uyemura SA, de Assis-Pandochi AI.** Effect of the extract of the tamarind (*Tamarindus indica*) fruit on the complement system: Studies in vitro and in hamsters submitted to a cholesterol-enriched diet. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45(8):1487-95.
- **Lawrence RA, Burk RF:** Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res*. 1976; 71:952-958.
- **Leibold E, Deckardt K, Mellert W, Potthoff-Karl B, Grundler O, Jäckh R.** NTA and Fe(III)NTA: differential patterns of renal toxicity in subchronic studies. *Hum Exp Toxicol*. 2002 Aug;21(8):445-52.
- **Levine RL, William JA, Stadman ER, Shacter E.** Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 1994; 223: 343-357.
- **Li N, Karin M.** Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 1999, 13:1137- 1143.
- **[Maiti R](#), [Jana D](#), [Das UK](#), [Ghosh D](#).** Antidiabetic effect of aqueous extract of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin-induced diabetic rats. [J Ethnopharmacol](#). 2004, 92(1):85-91.
- **Marnett, L.J.** Lipid Peroxidation, DNA damage by malondialdehyde, *Mutation research* 1999, 8 424(1-2):83-95.
- **Martinello F, Soares SM, Franco JJ, Santos AC, Sugohara A, Garcia SB, Curti C.** Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica L.* pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44(6):810-818.

- [Nordberg J, Arnér ES](#). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. [Free Radic Biol Med](#). 2001;31(11):1287-312
- **Nyström T**. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J*. 2005; 24(7):1311-1317.
- **Oberley LW, Spitz DR**: Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth.Enzymol*. 1984; 105:457-464.
- [Oberley TD](#). Oxidative damage and cancer. [Am J Pathol](#). 2002 Feb;160(2):403-8.
- **Okada S, Hamazaki S, Toyokuni S, Midorikawa O**. Induction of mesothelioma by intraperitoneal injections of ferric saccharate in male Wistar rats. *Br J Cancer*.1989;60(5):708-711.
- **Parrota J**. Healing Plants of Peninsular India, wallingford, UK, CAB International, ISBN 085799. 2001; 501-502.
- **Pourmorad F., Hosseinimehr S. J., Shahabimajd N**. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected iranian medicinal plants. *African J. Biotech*. 2006; 5 (11):1142-1145.
- **Pourmorad F., Hosseinimehr J., Shahabimajd N**. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr J Biotech*. 2006; 5(11): 1142-1145.
- **Preece NE, Hall DE, Howarth JA, King LJ, Parke DV**. Effects of acute and sub-chronic administration of iron nitrilotriacetate in the rat. *Toxicology*. 1989; 59(1):37-58.
- **Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Kim SJ, Garcia JJ**. Inhibitory effects of melatonin on ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation and oxidative DNA damage in the rat kidney. *Toxicology*. 1999; 139(1-2):81-91.
- **Rahman A, Ahmed S, Vasenwala SM, Athar M**. Glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor, abrogates ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress and renal damage. [Arch Biochem Biophys](#). 2003, 418(1):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 Antioxidant. *Current Med Chem* 2001, 8, 797-807.
- **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T**. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd. Ed. Vol. 3, Chapter 18, Chris Nolan (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

- **Singh D, Chander V, Chopra K.** Protective effect of naringin, a bioflavonoid on ferric nitrilotriacetate-induced oxidative renal damage in rat kidney. *Toxicology*. 2004; 201:1-8.
- **Singleton V. L., Orthofer R. and Lamuela-Raventós R.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol*. 1999; 299: 152-178.
- **Stahler M, Rohrman K, Bachmann A, Zaak D, Stief CG, Siebels M.** Therapeutic approaches in metastatic renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2005;95(8):1153-1161.
- **Sudjaroen Y, Haubner R, Würtele G, Hull WE, Erben G, Spiegelhalder B, Changbumrung S, Bartsch H, Owen RW.** Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food Chem Toxicol*. 2005; 43(11):1673-1682.
- **Sun Yi.** Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Rad Biol Med*. 1990; 8: 583-599.
- **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1979;76:4350-4353.
- **Toyokuni S, Uchida K, Okamoto K, Hattori-Nakakuki Y, Hiai H, Stadtman ER.** Formation of 4-hydroxy-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(7):2616-20.
- **Uchida K, Fukuda A, Kawakishi S, Hiai H, Toyokuni S.** A renal carcinogen ferric nitrilotriacetate mediates a temporary accumulation of aldehyde-modified proteins within cytosolic compartment of rat kidney. *Arch Biochem Biophys*. 1995; 317(2):405-11.
- **Umemura T, Sai K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y.** Oxidative DNA damage, lipid peroxidation and nephrotoxicity induced in the rat kidney after ferric nitrilotriacetate administration. *Cancer Lett*. 1990; 54(1-2):95-100
- **Urquiaga I, Leighton F.** Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol Res*. 2000; 33: 55-64.
- **Valko M, Rodees CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. [Chem Biol Interact](#). 2006, 10; 160(1):1-40.
- **Weisiger RA, Fridovich I.** Mitochondrial superoxide dismutase: Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol. Chem* 1973; 248: 4793-4796.

- **Won Lee K. et Al.** The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors* 26 (2006) 105-121.
- **Yang CS, Landau JM, Huang MT.** Newmark HL Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr.* 2001; 21:381-406.