



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

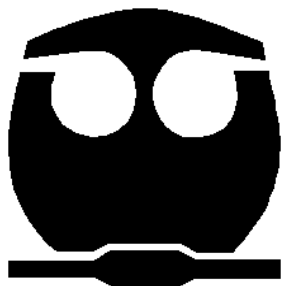
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFFECTO DE UN EXTRACTO DE SEMILLAS DE  
TAMARINDO (EST) SOBRE EL DESARROLLO  
DE CÁNCER RENAL INDUCIDO POR  
NITRILOTRIACETATO DE HIERRO (FeNTA)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A  
Q.F.B. CHABETTY YADIRA VARGAS OLVERA

Tutor: Dra. María Elena Ibarra Rubio



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## RECONOCIMIENTOS

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

El Comité Tutorial asignado estuvo integrado por:

Dra. María Elena Ibarra Rubio

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dr. Armando Tovar Palacio

Agradecemos también a las siguientes instituciones y personas que contribuyeron de manera importante al desarrollo del presente trabajo:

A DGAPA (Dirección general de Asuntos del Personal Académico de la UNAM) y a CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo económico otorgado a través de los proyectos IN214307, 81026 y 59893 para la realización del trabajo experimental de esta tesis.

A CONACYT por la beca otorgada número 20372 para los estudios de maestría.

Al **Dr. Javier Sánchez González**, Mayor médico cirujano y Jefe de la Subsección de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar por los análisis histológicos de las muestras de tejido renal.

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

Al **M. en C. José Dolores Solano Becerra** por su valiosa asesoría y asistencia técnica.

A la **Dra. María Elena Ibarra Rubio**, por su tutoría y dirección de este proyecto de investigación.

A los miembros de mi comité tutorial y al jurado asignado para la revisión de la tesis, por sus comentarios y observaciones.

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

PRESIDENTE	Dr. Alejandro García Carrancá
VOCAL	Dr. Armando Tovar Palacio
SECRETARIO	Dr. Alfonso Dueñas González
SUPLENTE	Dra. Norma Bobadilla Sandoval
SUPLENTE	Dra. Martha Patricia Coello Cutiño

## ÍNDICE

	Pág.
Lista de abreviaturas.....	III
Lista de figuras.....	V
Lista de tablas.....	VIII
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IX</b>
<b>I. ANTECEDENTES</b> .....	<b>1</b>
1.1 Participación del estrés oxidante en cáncer.....	1
1.2 Carcinoma de células renales.....	1
1.2.1 Clasificación histológica del CCR.....	2
1.2.2 Tratamiento del CCR.....	4
1.3 Modelo experimental de carcinogénesis renal.....	6
1.3.1 Mecanismos de nefrotoxicidad y carcinogenicidad inducidos por FeNTA.....	7
1.4 Compuestos antioxidantes.....	9
1.4.1 Fitoquímicos fenólicos.....	9
1.4.2 Flavonoides.....	10
1.5 Generalidades sobre la planta de estudio: <i>Tamarindus indica</i> L.....	14
1.5.1 Estudios biológicos y químicos sobre <i>Tamarindus indica</i> L.....	15
1.6 Justificación.....	18
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1 Diseño experimental.....	20
3.1.1 Preparación y análisis de los extractos de semillas de <i>Tamarindus indica</i> L.....	20
3.1.2 Determinación de la dosis a utilizar del extracto de cáscara de semillas de <i>T. indica</i> L. (EST).....	20
3.1.3 Desarrollo de cáncer renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).....	22
3.1.4 Determinación de marcadores de función renal.....	26
3.1.5 Determinación de marcadores de estrés oxidante en riñón.....	26
3.1.6 Determinación de la función de supervivencia.....	26
3.1.7 Análisis histológicos.....	27
3.2 Metodología.....	28
3.2.1 Preparación del extracto de pericarpio de <i>Tamarindus indica</i> L.....	28
3.2.2 Preparación del extracto etanólico al 70% y extracto etanólico anhidro a partir de la cáscara de semillas de <i>Tamarindus indica</i> L.....	28
3.2.3 Preparación del extracto en polvo a partir de la cáscara de semillas de <i>Tamarindus indica</i> L (EST).....	28
3.2.4 Análisis de los extractos de pericarpio y semilla de <i>Tamarindus indica</i> L.....	28
3.2.4.1 Cuantificación de fenoles totales.....	28
3.2.4.2 Inactivación del radical superóxido.....	29
3.2.5 Determinación de estrés oxidante.....	31
3.2.5.1 Evaluación de la peroxidación lipídica.....	31
3.2.5.2 Cuantificación de peróxido de hidrógeno.....	32
3.2.5.3 Cuantificación de proteínas oxidadas.....	33

	Pág.	
3.2.6	Determinación de la función renal.....	34
3.2.6.1	Cuantificación de creatinina.....	34
3.2.6.2	Cuantificación de nitrógeno ureico sanguíneo.....	35
3.2.6.3	Cuantificación de proteínas totales en orina.....	36
3.2.7	Cuantificación de proteínas totales.....	36
3.2.8	Obtención y preparación del tejido renal para los análisis histológicos.....	37
3.2.9	Análisis estadístico de los datos.....	37
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
4.1	Selección del extracto.....	38
4.1.1	Determinación de fenoles totales en los diferentes extractos de <i>T. indica</i> .....	38
4.1.2	Determinación de fenoles totales en el polvo de extracto de cáscara de semillas de <i>T. indica</i> (EST) obtenido con etanol anhidro.....	39
4.1.3	Determinación de la inactivación del radical superóxido de los extractos obtenidos.....	41
4.2	Caracterización de los extractos subsecuentes de cáscara de semillas de <i>T. indica</i> .....	43
4.2.1	Cuantificación de fenoles totales e inactivación del radical superóxido de los extractos subsecuentes.....	43
4.3	Determinación de la dosis a utilizar del extracto de semilla de <i>T. indica</i> L.....	46
4.3.1	Determinación de estrés oxidante en riñón.....	46
4.4	Protocolo I.....	49
4.4.1	Determinación de estrés oxidante en riñón.....	51
4.4.2	Determinación de función renal.....	52
4.5	Protocolo II.....	53
4.5.1	Esquema FeNTA fijo.....	57
4.5.1.1	Determinación de función renal.....	57
4.5.1.2	Determinación de estrés oxidante.....	58
4.5.1.3	Análisis de desarrollo de CCR en el esquema FeNTA fijo....	61
4.5.2	Esquema FeNTA gradual.....	62
4.5.2.1	Determinación de función renal.....	62
4.5.2.2	Determinación de estrés oxidante.....	63
4.5.2.3	Análisis de desarrollo de CCR en el esquema FeNTA gradual.....	65
4.5.2.4	Análisis histológicos.....	67
<b>V.</b>	<b>RESUMEN DE RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>VII.</b>	<b>APÉNDICE.....</b>	<b>74</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Albúmina sérica bovina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	Comité de la Unión Americana sobre Cáncer
AINTA	Nitrilotriacetato de aluminio
BHD	Birt-Hogg-Dubé
BHT	Hidroxitolueno butilado
BUN	Nitrógeno ureico sanguíneo
cc	Centímetros cúbicos
CCR	Carcinoma de células renales
ccCCR	Carcinoma de células renales de células claras
CD	Cúmulo de diferenciación
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria cincuenta
COX-2	Ciclooxigenasa-2
Cys	Cisteína
DE	Desviación estándar
DEN	N-dietilnitrosamina
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
edda	Diacetato de N,N'-etilendiamina
EE	Error estándar
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EST	Extracto de semillas de <i>Tamarindus indica</i> L.
FeNTA	Nitrilotriacetato de hierro
FH	Fumarato hidratasa
FOX	Naranja de xilenol-hierro <sup>3+</sup>
FT	Fenoles totales
γ-GTP	γ-glutamil transpeptidasa
γ-Glu	γ-glutamato
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
Gly	Glicina
GSPE	Extracto polifenólico de semillas de uva
HDL	Lipoproteína de alta densidad
hida	Diacetato de N,N'-hidroxietilamina
HIF	Factor inducible por hipoxia
8-OHdG	8-hidroxidesoxiguanosina
HNE	Hidroxinonenal
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IFN-γ	Interferón-γ
ida	Ácido iminodiacético
LOH	Pérdida de heterocigosidad
LPS	Lipopolisacárido

MAPK	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
MDA	Malondialdehído
MMP	Metaloproteinasas de matriz
mTOR	Sitio blanco de mamíferos para la rapamicina
NBT	Azul de nitrotetrazolio
pac	Diacetato de N,N'-piridilmetilamina
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI-3K	Cinasa de fosfatidil inositol-3
PTEN/MMAC1	Homólogo de tensina y fosfatasa/mutado en múltiples cánceres avanzados 1
rpm	Revoluciones por minuto
TCA	Ácido tricloroacético
TMPO	Tetrametoxipropano
STZ	Estreptozotocina
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
VHL	von Hippel-Lindau
WHO	Organización Mundial de la Salud

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Clasificación histológica del CCR por tinción con hematoxilina-eosina.....	2
<b>Figura 2.</b> Sitos blanco de las terapias del CCR.....	6
<b>Figura 3.</b> Generación de EROs vía reacción de Fenton-Haber Weiss.....	7
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de toxicidad renal inducida por el FeNTA.....	8
<b>Figura 5.</b> Estructura binuclear del FeNTA y formación del aducto (Fe <sup>3+</sup> binuclear-peróxido) en presencia del ciclo del glutatión y oxígeno.....	8
<b>Figura 6.</b> Estructura básica y numeración de los flavonoides.....	10
<b>Figura 7.</b> Ejemplos de flavonoides.....	11
<b>Figura 8.</b> Regiones que muestran el potencial antioxidante en la estructura de los flavonoides.....	11
<b>Figura 9.</b> Inhibición del desarrollo de cáncer por los compuestos polifenólicos gracias a su actividad contra el estrés oxidante.....	12
<b>Figura 10.</b> Actividad pro-oxidante de los compuestos polifenólicos.....	13
<b>Figura 11.</b> Actividad pro-oxidante de los compuestos polifenólicos en presencia de glutatión.....	13
<b>Figura 12.</b> Estructura macrosópica de la semilla de <i>Tamarindus indica</i> L.....	14
<b>Figura 13.</b> Compuestos aislados de la semilla de <i>Tamarindus indica</i> L.....	16
<b>Figura 14.</b> Diseño experimental para el protocolo I.....	23
<b>Figura 15.</b> Esquema de administración de FeNTA para los grupos de tratamiento con DEN+FeNTA fijo y EST+DEN+FeNTA fijo en función de los decesos ocurridos durante el protocolo II.....	25
<b>Figura 16.</b> Esquema de administración de FeNTA para los grupos de tratamiento con DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual en función de los decesos ocurridos durante el protocolo II.....	25
<b>Figura 17.</b> Clasificación Furhman basada en la morfología del núcleo y en la presencia de nucléolo.....	27
<b>Figura 18.</b> Fundamento para la determinación del radical superóxido y evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de <i>Tamarindus indica</i> L.....	30
<b>Figura 19.</b> Curva patrón con el estándar de ácido gálico para la determinación de fenoles totales (FT).....	38
<b>Figura 20.</b> Efecto del disolvente utilizado (etanol al 70% y etanol anhidro) y del procedimiento para la obtención del EST sobre la cantidad de fenoles totales obtenida en cada uno de los extractos.....	40
<b>Figura 21.</b> Curvas de inactivación del radical superóxido <i>in vitro</i> en función de la cantidad de fenoles totales de los distintos extractos estudiados.....	42
<b>Figura 22.</b> Cantidad de fenoles totales en cada uno de los extractos obtenidos en diferentes ocasiones.....	43
<b>Figura 23.</b> Rendimiento de la extracción de cada uno de los extractos utilizados en los protocolos realizados.....	44
<b>Figura 24.</b> Curvas de porcentaje de inactivación del radical superóxido para los extractos subsecuentes.....	45
<b>Figura 25.</b> Curvas de porcentaje de inactivación del radical superóxido a diferentes concentraciones de los extractos EST1 y EST5 a diferentes tiempos.....	45



	Pág.
<b>Figura 26.</b> Peso corporal de los animales de los diferentes grupos estudiados para la selección de la dosis de EST.....	46
<b>Figura 27.</b> Efecto de la administración de diferentes dosis del extracto de semillas de tamarindo (EST) durante 16 días sobre la lipoperoxidación, daño oxidante a proteínas y producción de peróxido de hidrógeno en riñón 1 hora después de la administración de FeNTA.....	48
<b>Figura 28.</b> Diseño experimental del protocolo I.....	49
<b>Figura 29.</b> Peso corporal para cada grupo de estudio del protocolo I.....	50
<b>Figura 30.</b> Gráfica de supervivencia Kaplan-Meier para los grupos de estudio del protocolo I.....	50
<b>Figura 31.</b> Marcadores de estrés oxidante en riñón al término del protocolo I.....	51
<b>Figura 32.</b> Determinación de nitrógeno ureico sanguíneo y creatinina en suero en diferentes días del desarrollo del protocolo I en los diferentes grupos estudiados.....	52
<b>Figura 33.</b> Peso corporal para los grupos de estudio durante el desarrollo del protocolo II.....	54
<b>Figura 34.</b> Gráfico de supervivencia Kaplan-Meier para los grupos de estudio del protocolo II.....	55
<b>Figura 35.</b> Determinación de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) durante el desarrollo del protocolo II en los grupos estudiados.....	57
<b>Figura 36.</b> Determinación de la excreción urinaria al término del protocolo II correspondientes al esquema de tratamiento FeNTA fijo.....	58
<b>Figura 37.</b> Marcadores de estrés oxidante en riñón al término del protocolo II correspondientes al esquema de exposición FeNTA fijo.....	59
<b>Figura 38.</b> Determinación de la lipoperoxidación en muestras de suero una hora después de la administración de FeNTA número 26 en la semana 13 de tratamiento con FeNTA fijo del protocolo II.....	60
<b>Figura 39.</b> Volumen de agua o extracto bebido y la dosis experimental promedio de fenoles totales administrada durante el protocolo II correspondientes al esquema FeNTA fijo.....	60
<b>Figura 40.</b> Apariencia macroscópica de los riñones en los distintos grupos de estudio correspondientes al esquema FeNTA fijo. Fotografías representativas de los riñones al final del protocolo II.....	61
<b>Figura 41.</b> Determinación de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) durante el desarrollo del protocolo II en los grupos estudiados.....	62
<b>Figura 42.</b> Determinación de la excreción urinaria de proteínas totales al término del protocolo II correspondiente al esquema de tratamiento FeNTA gradual.....	63
<b>Figura 43.</b> Marcadores de estrés oxidante en riñón al término del protocolo II correspondientes al esquema de tratamiento FeNTA gradual.....	64
<b>Figura 44.</b> Determinación de la lipoperoxidación en muestras de suero una hora después de la administración de FeNTA número 26 en la semana 13 de tratamiento con FeNTA gradual del protocolo II.....	65

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 45.</b> Volumen de agua o extracto bebido y la dosis experimental promedio de fenoles totales administrada durante el protocolo II correspondientes al esquema FeNTA gradual.....	<b>65</b>
<b>Figura 46.</b> Apariencia macroscópica de los riñones en los distintos grupos de estudio correspondientes al esquema FeNTA gradual. Fotografías representativas de riñones al final del protocolo II.....	<b>66</b>
<b>Figura 47.</b> Análisis histológicos de los tumores presentados en el esquema FeNTA gradual.....	<b>68</b>
<b>Figura 48.</b> Evaluación del grado de alteración en la morfología nuclear de tumores obtenidos en el grupo FeNTA gradual utilizando el criterio propuesto por Fuhrman. Fotomicrografías de los diferentes grados Fuhrman en los tumores obtenidos en el grupo DEN+FeNTA gradual.....	<b>69</b>
<b>Figura 49.</b> Efecto del EST sobre el grado Fuhrman presentado en los tumores obtenidos en los grupos DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual.	<b>70</b>
<b>Figura 50.</b> Efecto del EST sobre el tamaño de los tumores de CCR.....	<b>71</b>

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1.</b>	Principales clases de fitoquímicos fenólicos.....	10
<b>Tabla 2.</b>	Otros usos medicinales de la especie <i>Tamarindus indica</i> L.....	14
<b>Tabla 3.</b>	Contenido de compuestos fenólicos en las semillas de <i>T.indica</i> L.....	17
<b>Tabla 4.</b>	Grupos experimentales para la elección de la dosis de EST a utilizar.....	21
<b>Tabla 5.</b>	Grupos de estudio del protocolo I.....	22
<b>Tabla 6.</b>	Grupos de estudio del protocolo II.....	24
<b>Tabla 7.</b>	Diluciones del extracto polifenólico en la determinación de fenoles totales....	28
<b>Tabla 8.</b>	Diluciones de la solución stock 1 de EST.....	29
<b>Tabla 9.</b>	Diluciones de la solución stock 2 de EST.....	29
<b>Tabla 10.</b>	Concentraciones de ácido gálico de la curva patrón para la cuantificación de fenoles totales.....	29
<b>Tabla 11.</b>	Diluciones del extracto polifenólico en la determinación de inactivación del radical superóxido.....	30
<b>Tabla 12.</b>	Reactivos adicionados para cada dilución de extracto polifenólico en la determinación de la capacidad de inactivación del radical superóxido.....	31
<b>Tabla 13.</b>	Concentraciones de tetrametoxipropano de la curva patrón para la cuantificación de MDA presente en las muestras.....	32
<b>Tabla 14.</b>	Concentraciones de peróxido de hidrógeno de la curva patrón para la cuantificación de esta molécula en muestras de tejido renal mediante el método de FOX.....	33
<b>Tabla 15.</b>	Reactivos que deben agregarse a las muestras problema y blanco para la determinación de carbonilos en las proteínas.....	34
<b>Tabla 16.</b>	Concentraciones de albúmina sérica bovina para la obtención de la curva patrón para la cuantificación de proteínas totales.....	34
<b>Tabla 17.</b>	Concentraciones de albúmina sérica bovina al 0.05% de la curva patrón para la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry.....	37
<b>Tabla 18.</b>	Fenoles totales en los diferentes extractos de <i>T.indica</i> L.....	38
<b>Tabla 19.</b>	Protocolos en los que se utilizaron los diferentes extractos elaborados.....	43
<b>Tabla 20.</b>	Volumen de extracto bebido y dosis experimental de fenoles totales en los grupos estudiados del protocolo agudo.....	47
<b>Tabla 21.</b>	Incidencia de cáncer renal inducido con el esquema de exposición a FeNTA gradual.....	67

## RESUMEN

El carcinoma de células renales (CCR) es uno de los tipos de cáncer menos estudiados, su diagnóstico en etapas tempranas es difícil por ser asintomático y en la mayoría de los casos se detecta cuando la metástasis ya está presente. El tratamiento de este cáncer ha sido ineficiente hasta el momento debido, en parte, a que los diferentes subtipos histológicos que existen cursan con distintas alteraciones moleculares por lo que responden de manera diferente a las terapias. Estas complicaciones llevan a un alto índice de mortalidad, además de que la incidencia está en aumento. En este contexto, sería muy útil contar con un modelo experimental de carcinogénesis renal bien caracterizado que permita, por ejemplo, la elucidación de los mecanismos moleculares que causan el desarrollo de CCR y que facilite la búsqueda de marcadores en etapas tempranas que permitan su detección oportuna, así como de nuevos sitios blanco para el desarrollo de agentes terapéuticos más eficaces. El modelo experimental más utilizado, y en donde se ha demostrado la participación del estrés oxidante, es aquél inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA), sin embargo, no están claros, por ejemplo, los mecanismos involucrados en su carcinogenicidad, existen discrepancias sobre el subtipo histológico que se desarrolla y no se ha establecido el comportamiento del estrés oxidante a largo plazo inducido por este carcinógeno.

La participación del estrés oxidante en cáncer ha conducido al uso de compuestos antioxidantes, como es el caso de los fitoquímicos fenólicos, con la finalidad de prevenir o disminuir la incidencia de cáncer. Por esta razón, en el presente trabajo se preparó un extracto de cáscara de semillas de tamarindo (EST) que presentó un alto contenido de fenoles totales (FT), así como gran capacidad inactivante del radical superóxido. De igual forma, en este estudio se demostró que el método de extracción utilizado es reproducible y que la materia prima de la cual se está partiendo es muy similar. En estudios agudos *in vivo* en ratas macho Wistar, se encontró que el extracto administrado durante 15 días a dosis de 50 y 100 mg fenoles totales/Kg/día, disminuye el aumento en los niveles renales de peróxido de hidrógeno inducido una hora después de la administración de FeNTA (tiempo en que se ha encontrado el mayor estrés oxidante), pero con la dosis de 150 mg FT/Kg/día se encontró inducción de estrés oxidante. En estudios posteriores, el EST (100 mg FT/Kg/día) protegió de manera significativa contra la insuficiencia renal severa producida por dos administraciones con FeNTA (9 mg Fe/Kg). Por otro lado, en estudios crónicos (8 meses) se logró implementar un esquema de exposiciones repetidas a FeNTA (3-9 mg Fe/Kg) con el que se desarrolló CCR en las ratas sin alterar la función renal, comportamiento similar al curso de la enfermedad en el humano. En tejido renal adyacente al tumor no se encontró estrés oxidante, sin embargo, en muestras de suero tomadas una hora después de las administraciones de FeNTA, se comprobó la producción de estrés oxidante, esto confirma que la inducción de estrés oxidante se mantiene por un periodo breve de tiempo y posteriormente se disipa. Así mismo, se estableció que el subtipo histológico de los tumores inducidos por FeNTA corresponde al de células claras en todos los casos. Por último, con base en el tamaño de los tumores y el grado Fuhrman, se puede decir que el EST retardó el avance del CCR y que, aunque la diferencia entre los grupos tratados con o sin EST no fue estadísticamente significativa, el EST también disminuyó la incidencia de CCR en un 21.05%.

## I. ANTECEDENTES

### 1.1 PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDANTE EN CÁNCER

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) juegan un papel importante en una variedad de procesos que ocurren de manera natural en el organismo. Por ejemplo, se encuentran involucradas en la respuesta inmune contra patógenos, en eventos de señalización intracelular y en el control de la permeabilidad vascular (Valko, *et al.*, 2006). No obstante, la acumulación de EROs generadas como productos del metabolismo energético, por respuesta a condiciones inflamatorias o bien por factores de origen ambiental, se ha asociado con la patogénesis de cáncer en humanos, entre otras enfermedades. Hoy en día existen múltiples evidencias que relacionan el estrés oxidante con el cáncer. Está ampliamente demostrado que el daño directo a ADN está íntimamente relacionado con mutagénesis y el desarrollo de cáncer (Oberley, *et al.*, 2002). Hasta la fecha se han identificado una gran cantidad de productos de oxidación entre los que se encuentran ruptura de la cadena de ADN, modificaciones en las bases, creación de sitios AP y transversiones G-T (Chipman, *et al.*, 1998; Cadenas, *et al.*, 1999). El daño por oxidación al ADN puede resultar en la interrupción o inducción de la transcripción, en errores en la replicación y/o en inestabilidad genómica, y estas alteraciones se encuentran asociadas al proceso de carcinogénesis (Valko, *et al.*, 2006). Por otro lado, productos de la oxidación de lípidos (por ejemplo malondialdehído), pueden formar aductos con las bases nitrogenadas, que pueden conducir a mutaciones en proto-oncogenes y/o genes supresores de tumores e incrementar así la probabilidad de inducir células cancerosas por estrés oxidante (Umemura, *et al.*, 1996; Burcham, *et al.*, 1998). De hecho, se ha propuesto que el aumento en la lipoperoxidación observada en las personas obesas e hipertensas es el mecanismo responsable, al menos en parte, del aumento en el riesgo que tienen estos pacientes a desarrollar carcinoma de células renales (Gago-Domínguez, *et al.*, 2006). Por otra parte, las grandes cantidades de peróxido de hidrógeno producidas en células cancerosas aparentemente funcionan como moléculas de señalización, lo que conduce a la activación de factores de transcripción sensibles al estado redox y genes que están involucrados tanto en la supervivencia de las células cancerosas como en su proliferación (Loo, *et al.*, 2003).

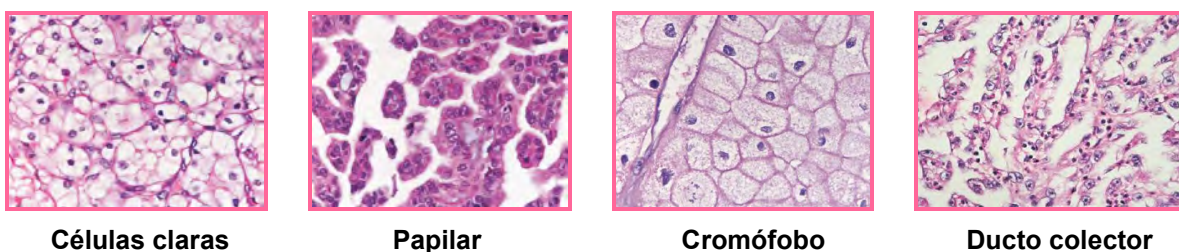
### 1.2 CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES

El carcinoma de células renales (CCR) es el cáncer renal más común, ya que representa del 70-80% de todas las neoplasias de riñón. Es uno de los tipos de cáncer urológico más letales y constituye el 3% de todos los tipos de cáncer en adultos (Jemal, *et al.*, 2007). El CCR, además de ser uno de los tipos de cáncer menos estudiados, tiene un alto índice de mortalidad, su incidencia continúa en aumento y presenta problemas terapéuticos. En el 2004 se reportó que en Europa se diagnostican 40 000 pacientes con CCR cada año, provocando 20 000 muertes (Levi, *et al.*, 2004). En Estados Unidos la incidencia de CCR incrementa del 2 al 3% anualmente (Mathew, *et al.*, 2002) y en el 2006 fue responsable de 12 890 muertes en ese país (Jemal, *et al.*, 2007; Reni, *et al.*, 2006). En México, aunque la estadística no se encuentra actualizada, se sabe que en el 2001 se presentaron un total de 1577 casos, de los cuales el 81.7% falleció a causa de este padecimiento (Compendio de Cáncer, Dirección General de Epidemiología en México, 2001).

El diagnóstico del CCR en etapas tempranas es difícil ya que este tipo de cáncer es asintomático, y la clásica triada (dolor en el flanco derecho o izquierdo, hematuria y palpación de una masa renal) sólo se manifiesta en etapas avanzadas de la enfermedad, es decir, usualmente cuando la metástasis está presente (Dalgin, *et al.*, 2007). La manifestación clínica más frecuente es la hematuria, no obstante, el CCR también puede manifestarse con dolor en el flanco y una masa palpable pero sólo cuando el tumor ha crecido lo suficiente. Así mismo, los pacientes frecuentemente presentan otros signos y síntomas en la enfermedad avanzada como pérdida de peso, fiebre de origen desconocido y sudoración nocturna, sin embargo estos signos y síntomas son inespecíficos por lo que se malinterpretan durante algún tiempo antes de que se aprecie su significado real (Richie, *et al.*, 2005). Los síntomas sistémicos pueden deberse a eventos de metástasis o síndromes paraneoplásicos (Chow, *et al.*, 2000). La diversidad de síndromes paraneoplásicos asociados con este cáncer es remarcable, se encuentran en aproximadamente del 10 al 40% de los pacientes con CCR y están relacionados con la respuesta inmune inducida por el tumor o debidos a la producción de hormonas específicas por las células tumorales como la hormona paratiroidea, gonadotropinas, lactógeno placentario, renina, eritropoyetina, glucagón, gonadotropina coriónica humana e insulina (Mc Dougal, *et al.*, 2000). Otra alteración que acompaña al CCR es la policitemia que afecta del 5-10% de los pacientes y se da por hecho que ésta se debe a la producción de eritropoyetina por el tumor renal. Otros hallazgos comunes incluyen la trombocitopenia y neutropenia. Cuando se presenta disfunción hepática, se manifiesta por elevación de la fosfatasa alcalina,  $\alpha$ 2-globulina, tromboplastina parcial prolongada o hipoalbuminemia, y en el 20-30% de los pacientes se presenta elevación de bilirrubina en suero y transaminasas (Novick, *et al.*, 2002).

### 1.2.1 Clasificación histológica del CCR

La clasificación histológica acordada en Heidelberg (1996) y por la Unión Internacional Contra el Cáncer/Comité de la Unión Americana sobre Cáncer (UICC/AJCC) distingue varios subtipos de CCR: células claras (75%), papilar (10-15%), cromóforo (5%), ducto colector (<1%) y no clasificado (4%) (Figura 1). Cada subtipo histológico presenta patrones de expresión genética diferentes y sus características morfológicas son únicas (Kovacs, *et al.*, 1997; Goldstein, *et al.*, 1997; Medeiros, *et al.*, 1997; Sobin, *et al.*, 1997; Srigley, *et al.*, 1997).



**Figura 1.** Clasificación histológica del CCR por tinción con hematoxilina-eosina (400X) (Mancini, *et al.*, 2008).

El CCR de células claras (ccCCR) es el subtipo histológico descrito con mayor frecuencia. En la mayoría de los casos, se pueden identificar células con citoplasma claro asociadas en pequeños grupos aún en

tumores compuestos principalmente de células con citoplasma eosinófilo (Mancini *et al.*, 2008). Los tumores de ccCCR son variables morfológicamente, caracterizados por un patrón de crecimiento que puede ser sólido, trabecular, alveolar o acinar con una red prominente de vasos delgados. La presencia de quistes es poco común, pero si se presentan, se cree que provienen de los ductos colectores (Storkel, 1997; Kovacs, 1997). El origen del ccCCR no está del todo claro, pero al parecer proviene, en su mayoría, de las células de los túbulos proximales (Walsh, *et al.*, 2002). Otros autores sostienen que el desarrollo del ccCCR se origina de los quistes renales, lo cual implicaría la participación de eventos diferentes a los oncogénicos (Russell, *et al.*, 2007). En este subtipo histológico, a diferencia de subtipo cromóforo y ducto colector, se conocen el conjunto de alteraciones cromosómicas. Aproximadamente en el 40-70% de los casos de ccCCR se presentan mutaciones en el gen supresor de tumores von Hippel-Lindau (VHL) (cromosoma 3p25-26) o hipermetilación en su región promotora. El gen VHL es importante en la vía de señalización por hipoxia, cuando se pierde la función de la proteína pVHL, el factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) se acumula y transactiva varios genes que permiten que la célula cancerosa se adapte a condiciones de hipoxia. En cuanto al pronóstico de la enfermedad, se ha visto que anomalías cromosómicas asociadas con tumores avanzados, como pérdida de heterocigosidad (LOH) en 9p13, 14q y 10q (PTEN/MMAC1), están asociadas con un mal pronóstico, mientras que la ganancia de 5q31-qter se correlaciona con un pronóstico más favorable (Gunawan, *et al.*, 2001). Dependiendo del subtipo histológico, el CCR presenta un pronóstico clínico diferente. Los pacientes con CCR de células claras tienen un peor pronóstico comparado con pacientes con CCR papilar o cromóforo (Mancini, *et al.*, 2008).

El CCR papilar a diferencia del ccCCR, no presenta anomalías en el cromosoma 3p, pero sí presenta polisomías de los cromosomas 7 o 17 y deficiencia del cromosoma Y. Las células que comprenden estos tumores pueden ser pequeñas con citoplasma escaso, pero frecuentemente tienen un citoplasma moderado a abundante con características eosinófilas o basófilas (Kovacs, 1989). Los tumores usualmente son multifocales, asociados frecuentemente con esclerosis de tejido renal adyacente no neoplásico y consisten en un núcleo central y fibrovascular con epitelio cubierto por papilas, también puede encontrarse una arquitectura compacta tubular o láminas de pequeñas papilas parecidas al glomérulo. Inmunohistoquímicamente, los tumores co-expresan vimentina y marcadores epiteliales, también son positivos para CD-10 (93%) y para la proteína S-100 (55%) (Mancini, *et al.*, 2008). Las mutaciones en el proto-oncogen MET y la fumarato hidratasa (FH) se han identificado como causas de predisposición a este cáncer (Zbar, *et al.*, 1994; Schmidt, *et al.*, 1997; Tomlinson, *et al.*, 2002).

El CCR cromóforo muestra un espectro histológico amplio, caracterizado por células típicas en forma de globo y con citoplasma pálido, granular y abundante; algunas veces los tumores se encuentran compuestos de células más pequeñas con citoplasma eosinófilo, parecido al citoplasma comúnmente asociado con el oncocitoma (Tickoo, *et al.*, 2000). Los tumores son hipodiploides, muestran frecuentemente pérdida de heterocigosidad involucrando varios cromosomas, pueden encontrarse monosomías en los cromosomas 1,2,6,10,13,17 y 21 (van den Berg, 1999) y pérdida de X o Y. De acuerdo a su patrón molecular, se cree que este subtipo se origina de las células intercaladas del ducto colector. El gen supresor responsable del síndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHD) se identificó como un gen que predispone al CCR cromóforo y al oncocitoma (Nickerson, *et al.*, 2002). El producto de este gen es la proteína foliculina, sin embargo su función no se ha

determinado todavía. La variante eosinófila del CCR cromóforo puede ser difícil de diferenciar del oncocitoma. De hecho, se ha sugerido la existencia de una variante donde ambos tipos de cáncer coexisten denominada oncocitomatosis. Los oncocitomas presentan estroma hipovascular en el fondo y un nido de células eosinófilas, presentan coloración café-caoba porque contienen abundantes cantidades de mitocondrias y se caracterizan por una variedad de LOH en los cromosomas 1, 6p, 14 y/o 21 en algunos tumores (Mancini, *et al.*, 2008).

El CCR de ducto colector es el subtipo menos común, pero es sin duda el más agresivo, su baja incidencia dificulta su estudio y no hay un criterio definitivo para su diagnóstico (Mancini, *et al.*, 2008), se caracteriza por tener células pleomórficas arregladas en túbulos irregulares dentro de un estroma desmoplásico (Fleming, *et al.*, 1986), las grandes masas neoplásicas involucran todo el órgano, frecuentemente infiltrando la grasa celular perirenal y el sistema pielocaliceal, con necrosis central; también se pueden encontrar signos de permeación vascular e inflamación perineoplásica. Estos tumores se originan en la médula renal pero el sitio de origen frecuentemente no está claro debido al estado tan avanzado del tumor en el momento del diagnóstico. Por otra parte, la inmunexpresión de la lectina de *Ulex europaeus* (característica importante para su diagnóstico) sugiere que este cáncer se origina del ducto colector (Kovacs, *et al.*, 1997). El conjunto de alteraciones cromosómicas para este subtipo no se ha encontrado debido a su baja incidencia, hasta el momento, se han descrito monosomías en los cromosomas 18 y 21, pérdida del cromosoma Y y ganancia en los cromosomas 7, 12, 17 y 20 (Cavazzana, *et al.*, 1996; Schoenberg *et al.*, 1995). Otros autores describen pérdida de heterocigosidad en los cromosomas 8p, 6p, 21q, y 13q y monosomías en los cromosomas 1, 6, 14, 15 y 22 (Fuzesi, *et al.*, 1992).

El CCR no clasificado se creó como una categoría para asignar a los carcinomas renales cuyas características no entran en ninguno de los subtipos de CCR descritos anteriormente, aún después de realizar análisis genéticos. En este subtipo se incluyen tumores con una variedad de apariencias y lesiones genéticas, no obstante, existen características que no pueden faltar para la asignación de un carcinoma en esta categoría, estas incluyen combinación de rasgos de los subtipos histológicos reconocidos, morfología sarcomatoide sin elementos epiteliales reconocibles, producción de mucina, mezclas de elementos de epitelio y estroma y tipos celulares no reconocibles (Kovacs, *et al.*, 1997).

### **1.2.2 Tratamiento del CCR**

El tratamiento para el CCR ha sido difícil hasta el momento debido a que cada subtipo histológico cursa con diferentes alteraciones moleculares, por lo que responden de manera distinta a las terapias (Stadler *et al.*, 2004; Libermann *et al.*, 2007; Mancini *et al.*, 2008). El CCR en etapas tempranas, es decir que no ha presentado metástasis, se puede tratar de manera exitosa mediante métodos quirúrgicos por nefrectomía parcial o radical, sin embargo el 40% de los casos de CCR se diagnostican incidentalmente o bien se da en etapas muy avanzadas. Se ha estimado que el 30% de los pacientes con CCR presentan metástasis en el momento del diagnóstico (Weiss, *et al.*, 2002) y tienen una tasa de supervivencia de 12 meses (Campbell, *et al.*, 2003). Más aún, los pacientes que han sido diagnosticados y tratados oportunamente tienen un alto índice de

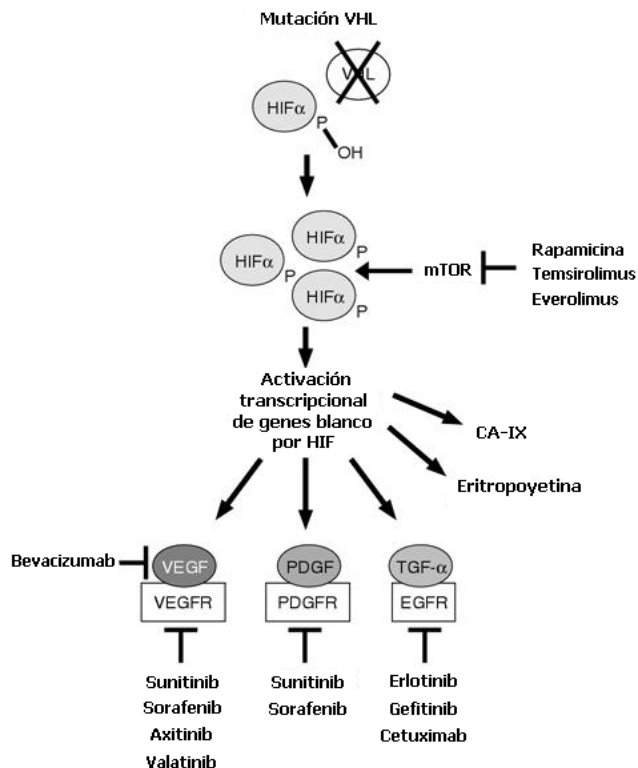


recurrencia (Janzen, *et al.*, 2003; Cohen, *et al.*, 2005), lo cual es un problema serio porque este tipo de cáncer es resistente a la quimioterapia convencional y la radioterapia es solamente paliativa (Liebermann *et al.*, 2007). El uso de fármacos que han tenido éxito en el tratamiento de otros tipos de cáncer como la vinblastina, 5-fluorouracilo (5-FU) o gemcitabina sólo han tenido efecto en el 5 al 8% de los pacientes con CCR (Samuels, *et al.*, 1997; Kish, *et al.*, 1994; Rini, *et al.*, 2000), aunque el tratamiento con floxuridina en el ccCCR metastásico ha dado resultados en el 18% de los pacientes (Volgelzang, *et al.*, 1998; Conroy, 1993; Wilkinson, *et al.*, 1993). Por otro lado, algunos estudios con inmunoterapia han mostrado mejor respuesta (13-20%) (Atzpodien, *et al.*, 2004; Coppin, *et al.*, 2005; Negrier, *et al.*, 2004), sin embargo el alcance de estas terapias sigue siendo limitado.

En años recientes, las terapias se han diseñado en función de algunas de las alteraciones en vías de señalización presentadas en el CCR. La inactivación del gen VHL en la vía de señalización por hipoxia en el CCR de células claras ha conducido al desarrollo de agentes terapéuticos que actúan en diferentes vías de señalización que convergen con ésta (Figura 2), como las vías del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus siglas en inglés), del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés) y la vía del factor de crecimiento epidermal (EGF por sus siglas en inglés) (cuyos receptores tienen actividad de cinasas de tirosina y también efectos anti-apoptóticos, por lo que proveen de un sitio blanco atractivo para su intervención) (Stadler, *et al.*, 2005; Lane, *et al.*, 2007). Los inhibidores de cinasas de tirosina como el sunitinib (SU011248) y el sorafenib (BAY 43-9006) tienen como blanco, los receptores de VEGF y PDGF; otras moléculas inhibitoras como el bevacizumab y el valatinib (PTK787) actúan sobre VEGF y el receptor de VEGF (VEGFR) respectivamente; y los agentes como el gefinitib, cetuximab, erlotinib y ABX-EGF bloquean la función del receptor de EGF. Por otra parte, la vía Raf/MEK/ERK también es un punto de convergencia importante con las vías de señalización por VEGFR, PDGFR y EGFR. Este módulo de señalización forma un vínculo entre las señales extracelulares y las moléculas efectoras del citoplasma y el núcleo, las cuales contribuyen a la diferenciación, proliferación celular y supervivencia (Hilger, *et al.*, 2002). Los fármacos como AZD6244, ISIS5132 y CI-1040 que han demostrado que inhiben a Ras, Raf y MEK respectivamente, se encuentran todavía bajo investigación clínica, (Stadler, *et al.*, 2005; Lindsey, *et al.*, 2006; LoRusso, *et al.*, 2005; Adjei, *et al.*, 2008). El sorafenib, además inhibe a nivel de la cinasa de Raf (Stadler *et al.*, 2005). La vía Akt/mTOR también puede regular el HIF y es otro blanco potencial para este tipo de cáncer (Lane, *et al.*, 2007). Los inhibidores como temsirolimus (CCI-779) y everolimus (RAD001) bloquean el sitio blanco de mamíferos para la rapamicina (mTOR) implicado en la angiogénesis y en la vía de la cinasa de fosfatidilinositol-3 (PI-3K) (Cho, *et al.*, 2007; Ravaut *et al.*, 2008). Todos estos agentes han mostrado tener una mejor respuesta (26-37%) siempre y cuando se aplique al paciente con el subtipo histológico de células claras (Thomas, *et al.*, 2008).

La baja incidencia y el conocimiento insuficiente de las alteraciones moleculares que se tiene hasta el momento, ha hecho difícil el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para los otros subtipos de CCR, por lo que sólo se ha evaluado la eficacia de los agentes terapéuticos que han funcionado para el subtipo histológico donde se tienen mejor estudiadas las vías de señalización (células claras). En estos estudios se ha reportado que sólo el 25% de los individuos con CCR crómofobo tratados con sorafenib y sunitinib presentan una respuesta al tratamiento (17% con sorafenib y 8% con sunitinib). En el caso del CCR papilar se ha informado

que el 68% de los pacientes tratados con sunitinib mantuvieron la enfermedad estable (Ravaud, *et al.*, 2008). Por todo esto, un mejor entendimiento de esta heterogeneidad es indispensable para elegir o diseñar terapias para este tipo de cáncer (Vogelzang, *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Sitios blanco de las terapias del CCR (Modificado de Lane *et al.*, 2007).

### 1.3 MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESIS RENAL

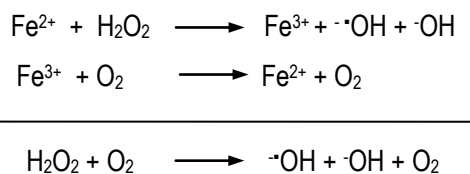
El modelo de carcinogénesis renal más utilizado es aquél inducido por el compuesto nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). El FeNTA es un compuesto formado por el complejo del ácido nitrilotriacético con Fe<sup>3+</sup> y se utilizó originalmente en modelos experimentales de hemocromatosis (Awai *et al.*, 1979). Estos autores encontraron que este compuesto se transporta eficientemente a las células del parénquima de varios órganos como el riñón y el páncreas. Un año después, Okada y Midorikawa (1982) descubrieron que el FeNTA inducía cáncer renal, al reproducir el modelo experimental de hemocromatosis con FeNTA, donde encontraron que varios animales morían de hemorragia peritoneal, de CCR o por metástasis pulmonar. En estudios posteriores se observó que este compuesto induce necrosis tubular proximal renal aguda y subaguda con la incidencia subsecuente del 60-92% de adenocarcinoma en ratas y ratones (Hamazaki, *et al.*, 1986). Otros estudios realizados con ratas macho y hembra han demostrado que las ratas macho son más susceptibles a la toxicidad subaguda y efectos carcinogénicos del FeNTA (Deguchi *et al.*, 1995). Por otro lado, en estudios en donde se administra una dosis única de N-dietilnitrosamina en el protocolo de inducción de cáncer renal por FeNTA, se ha visto que se requiere menor tiempo de tratamiento para inducir el cáncer y el número de animales con CCR aumenta (Athar *et al.*, 1998). Las nitrosaminas se han reconocido como moléculas inductoras de cáncer, son

compuestos N-alkilados que requieren de activación enzimática para transformarse en compuestos carcinógenos que actúen sobre el ADN. Estas biotransformaciones generalmente involucran reacciones de oxidación mediadas por el citocromo P450. La activación de este tipo de compuestos da lugar a moléculas como el diazometano, el cual se considera como intermediario en la acción sobre el ADN al transferir directamente el grupo metilo a ésta molécula (Bansal *et al.*, 2005).

### 1.3.1 Mecanismos de nefrotoxicidad y carcinogenicidad inducidos por FeNTA

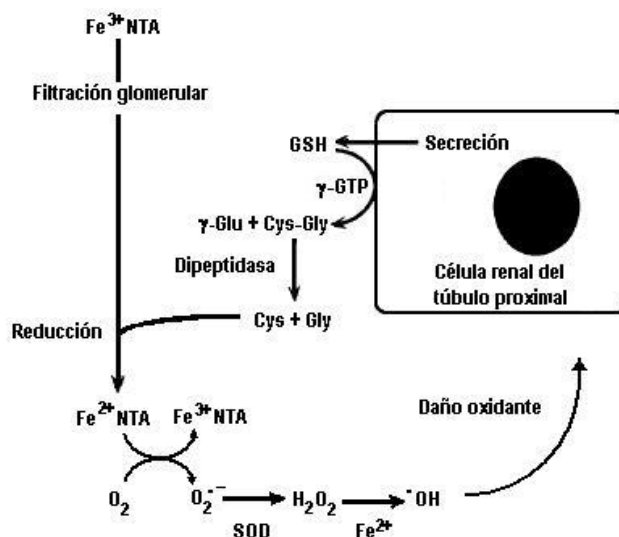
Hasta el momento no está totalmente claro el mecanismo por el cual el FeNTA ocasiona daño en los túbulos proximales del riñón. En 1997, Kawabata y colaboradores demostraron que el hierro se encontraba en el sitio apical del epitelio del túbulo contorneado proximal así como en la parte no contorneada 30 minutos después de la administración de FeNTA (7.5 mg Fe/Kg); conforme las células epiteliales de los túbulos proximales morían, el hierro desaparecía en las células muertas y se almacenaba en el citoplasma de las células del epitelio tubular más distales. También se demostró que el hierro iónico débilmente enlazado a ligandos puede catalizar las reacciones de producción de radicales libres causando daño y apoptosis de las células epiteliales de los túbulos proximales en riñones de ratón (Kawabata, *et al.*, 1997). Este daño producido por FeNTA, demostrado por el incremento en los niveles de los productos de peroxidación lipídica como el (MDA) e hidroxinonenal (HNE) y daño al ADN como la 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG), sólo se observa en los túbulos proximales, ya que no se detectó ninguna alteración en la porción distal de los túbulos renales aún cuando la cantidad del hierro era alta en esta región.

Por lo anterior se ha sugerido que el mecanismo de nefrotoxicidad del FeNTA es consecuencia de la generación de especies reactivas de oxígeno, producidas mediante la reacción de Fenton-Haber Weiss (Figura 3).



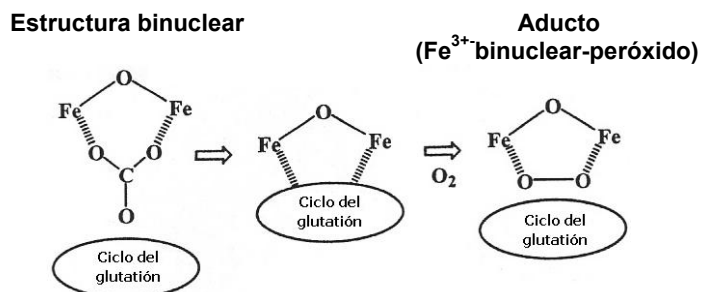
**Figura 3.** Generación de EROs vía reacción de Fenton-Haber Weiss.

El FeNTA, como molécula de bajo peso molecular, se filtra fácilmente a través del glomérulo hacia el lumen de los túbulos proximales renales (Toyokuni, *et al.*, 1996). En este compartimento el Fe<sup>3+</sup>NTA se reduce a Fe<sup>2+</sup>NTA por los productos de degradación del glutatión como la cisteína o la cisteinglicina. En la superficie del túbulo proximal, la enzima  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa hidroliza al glutatión a cisteinilglicina, la cual es degradada rápidamente a cisteína y glicina mediante una transpeptidasa. Se ha propuesto que los grupos tiol de estos aminoácidos actúan como reductores del Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. La oxidación del FeNTA genera radicales superóxido que potencian las reacciones de Haber-Weiss catalizadas por hierro para producir radicales hidroxilo, conduciendo a la peroxidación lipídica, daño a proteínas y al ADN (Tsuchiya, *et al.*, 2005) (Figura 4).



**Figura 4.** Mecanismo de toxicidad renal inducida por el FeNTA (Modificado de Toyokuni, *et al.* 1996).

Recientemente, Nishida y colaboradores (2007) propusieron que la carcinogénesis inducida por FeNTA puede deberse a la estructura binuclear única que puede formar este complejo, la cual puede producir un aducto ( $\text{Fe}^{3+}$ -binuclear-peróxido) capaz de ocasionar daño en los túbulos proximales renales en presencia del ciclo del glutatión y oxígeno (Figura 5). Estos autores, demostraron que el  $\text{Fe}^{3+}$  enlazado con otros agentes quelantes (diacetato de N,N'-piridilmetilamina (pac), ácido iminodiacético (ida), diacetato de N,N'-etilendiamina (edda), diacetato de N,N'-hidroxietilamina (hida)) no provocan daño tubular renal en ratas o el daño es menor al observado con FeNTA debido a que forman una estructura binuclear inestable y/o no son capaces de formar el aducto. Así mismo, también se ha demostrado que diferentes iones (Al, Cu) quelados con NTA tampoco producen el mismo efecto que el FeNTA. Estudios realizados con nitrilotriacetato de aluminio (Al-NTA) demuestran que este compuesto induce necrosis tubular aguda y subaguda sin producir CCR (Ebina, *et al.*, 1986; Okada, 1987) y el nitrilotriacetato de cobre (CuNTA) ocasiona CCR pero en menor proporción que el FeNTA y se requiere de un mayor tiempo para producirlo (Toyokuni, *et al.*, 1996).



**Figura 5.** Estructura binuclear del FeNTA y formación del aducto ( $\text{Fe}^{3+}$ -binuclear-peróxido) en presencia del ciclo del glutatión y oxígeno. Cuando el  $\text{Fe}^{3+}$  quelado entra en el ciclo del glutatión en el túbulo proximal renal, es probable que el complejo FeNTA interactúe fácilmente con la enzima glutatión reductasa, produzca peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno y el aducto  $\text{Fe}^{3+}$ -binuclear-peróxido formado destruya las proteínas que se encuentran próximas (Nishida, *et al.*, 2007).

Este modelo de carcinogénesis renal inducido por FeNTA, aunque es un modelo experimental de CCR aceptado, aún no está totalmente caracterizado y se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en la carcinogenicidad del FeNTA. La mayoría de las investigaciones realizadas con este compuesto se han enfocado en estudios agudos (Hermanns, 1998; Bahnmann, 1998; Fukuda, 1996; Ansar, 1999; Umemura, 1990; Tanaka, 2008), y en aquellas que involucran el tratamiento crónico (Ebina, 1986; Deguchi, 1995; Nishiyama, 1995; Toyokuni, 1996; Tanaka, 1998; Athar, 1998; Jahangir, 2006) no está claro, el subtipo histológico de CCR que se induce (Athar, 1998; Toyokuni, 1998), se desconocen las alteraciones a nivel molecular y no se ha establecido el comportamiento del estrés oxidante a largo plazo provocado por FeNTA. La caracterización de este modelo permitiría compararlo con el CCR humano y definir sus alcances como equivalente experimental. El modelo, entonces, sería una herramienta para la búsqueda de alteraciones específicas y para identificar nuevos marcadores, sobre todo en etapas tempranas con la finalidad de detectar el CCR de manera oportuna, lo cual es muy difícil en el humano, ya que frecuentemente cuando se diagnostica esta enfermedad se encuentra en estado muy avanzado, o bien, para tener una predicción más acertada de la supervivencia y calidad de vida del paciente con CCR. Así mismo, se facilitaría la determinación de nuevos sitios blanco para el desarrollo de agentes terapéuticos más eficaces.


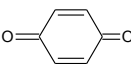
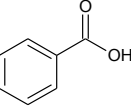
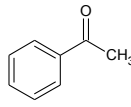
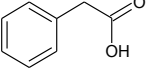
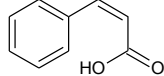
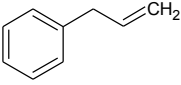
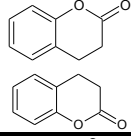
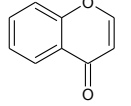
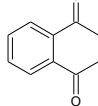
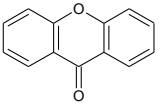
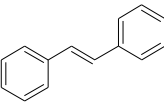
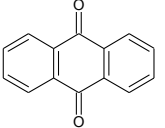
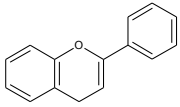
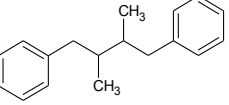
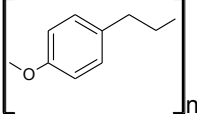
#### **1.4 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES**

El término antioxidante se refiere a todos aquellos compuestos que pueden retardar o inhibir la oxidación de biomoléculas mediante la inhibición de la iniciación y/o propagación de reacciones oxidativas en cadena (Velioglu *et al.*, 1998). Entre los compuestos químicos que han mostrado tener mayor capacidad antioxidante se encuentran los compuestos polifenólicos; se ha demostrado que estos compuestos protegen contra el daño oxidante por inhibición o atrapamiento de radicales libres y especies reactivas de oxígeno tanto *in vitro* (Rice-Evans y Miller *et al.*, 1996) como *in vivo* (Frei, *et al.*, 2003).

##### **1.4.1 Fitoquímicos fenólicos**

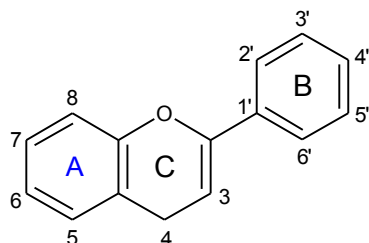
Son una familia de fitoquímicos que se producen a partir del metabolismo secundario de las plantas y son parte integral de la dieta en animales y humanos. Su diversidad va desde moléculas fenólicas simples hasta compuestos altamente polimerizados con peso molecular mayor a los 30,000 Da y están ampliamente distribuidos en las plantas. Fisiológicamente se encuentran involucrados en el crecimiento y reproducción, proveen resistencia a patógenos y predadores, por lo que protegen los plantíos de las plagas, ayudan a la germinación de la semilla y a su conservación antes de su cultivo. Tienen grandes aplicaciones en la industria, por ejemplo, se utilizan en el procesamiento de pinturas, papel y cosméticos, en la industria alimenticia como conservadores y colorantes naturales, en la industria farmacéutica como antibióticos, antidiarreicos y como anti-inflamatorios; también se utilizan en el tratamiento de alteraciones como hipertensión, fragilidad vascular, alergias e hipercolesterolemia, entre otros (Bravo, *et al.*, 1998). De acuerdo a su estructura química básica, los fitoquímicos fenólicos pueden dividirse en diferentes clases (Tabla 1).

**Tabla 1.** Principales clases de fitoquímicos fenólicos

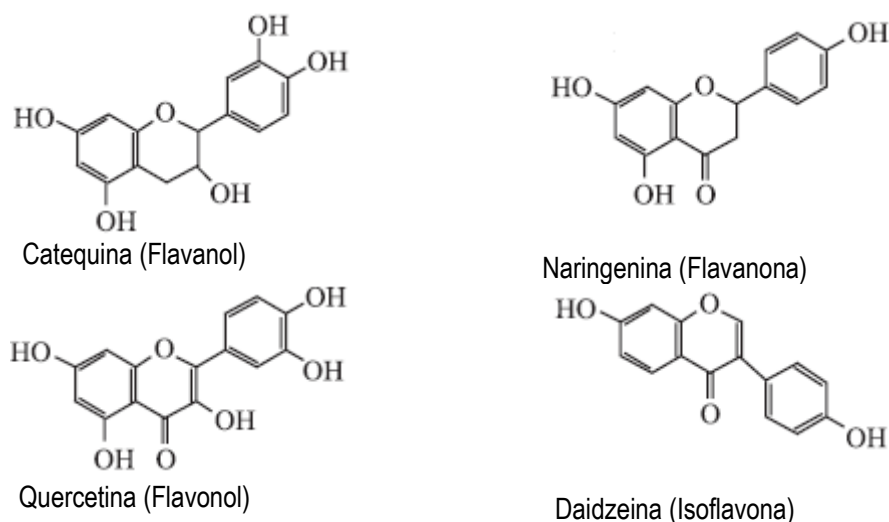
Clase	Estructura	Clase	Estructura
Fenoles simples	$C_6$ 	Benzoquinonas	$C_6$ 
Ácidos fenólicos	$C_6C_1$ 	Acetofenonas	$C_6C_2$ 
Ácidos fenilacéticos	$C_6C_2$ 	Ácidos hidroxicinámicos	$C_6C_3$ 
Fenilpropenos	$C_6C_3$ 	Cumarinas, Isocumarinas	$C_6C_3$ 
Cromonas	$C_6C_3$ 	Naftoquinonas	$C_6C_4$ 
Xantonas	$C_6C_1C_6$ 	Estilbenos	$C_6C_2C_6$ 
Antraquinonas	$C_6C_2C_6$ 	Flavonoides	$C_6C_3C_6$ 
Lignanos, neolignanos	$(C_6C_3)_2$ 	Ligninas	$(C_6C_3)_n$ 

### 1.4.2 Flavonoides

Una de las clases de compuestos fenólicos más abundantes es la de los flavonoides. Estos fitoquímicos son parte integral de la dieta en humanos y se encuentran presentes en muchas plantas medicinales. Químicamente son moléculas planares y su variedad estructural se encuentra dada por el patrón de sustitución: hidroxilación, metoxilación, prenilación o glucosilación. Las agliconas de los flavonoides se subdividen en flavonas, flavonoles y flavanoles dependiendo de la presencia de un grupo carbonilo en C-4, un grupo hidroxilo en C-3 y un solo enlace saturado entre C-2 y C-3, así como la combinación de un grupo hidroxilo en C-3 y la ausencia del grupo carbonilo en C-4 respectivamente (Prasain, *et al.*, 2004) (Figuras 6 y 7).

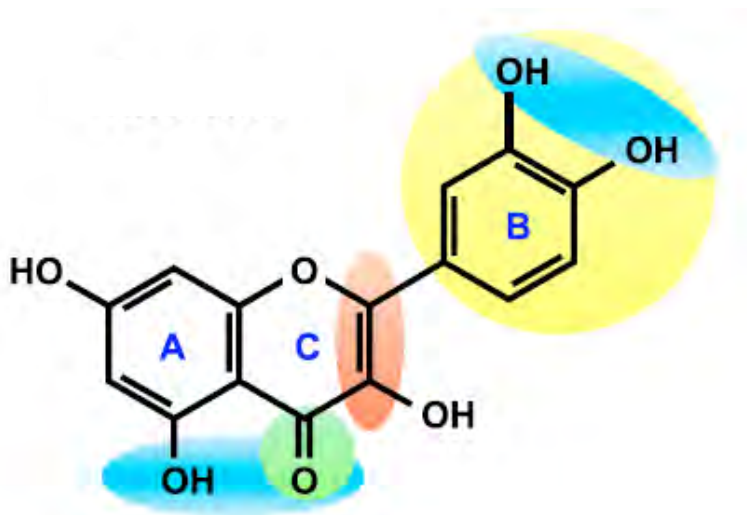


**Figura 6.** Estructura básica y numeración de los flavonoides.



**Figura 7.** Ejemplos de flavonoides

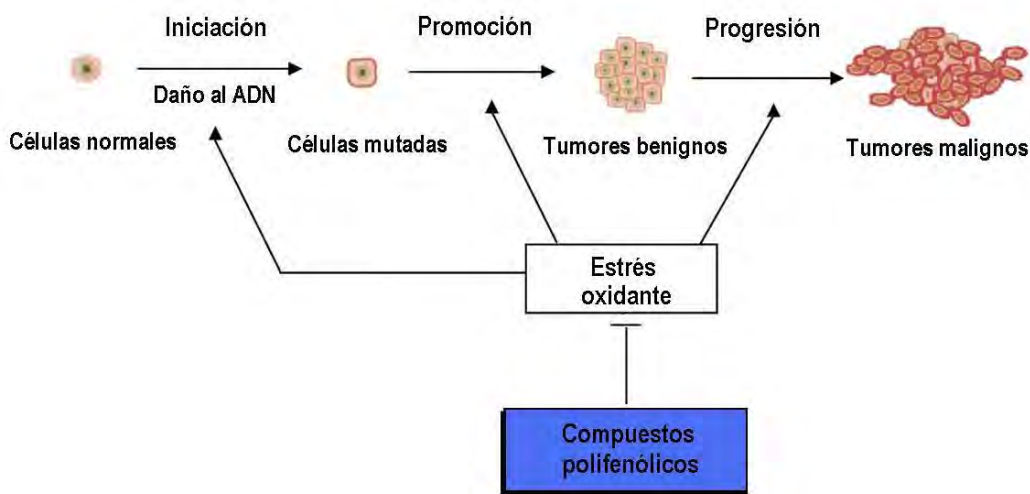
Varios estudios han demostrado que la actividad antioxidante de los flavonoides se debe principalmente a la presencia de insaturaciones, grupos carbonilo y grupos hidroxilo en su estructura (Figura 8). Estos grupos les permiten actuar como agentes reductores, antioxidantes donadores de grupo hidrógeno o como atrapadores de especies reactivas de oxígeno (Rice-Evans y Miller, *et al.*, 1996).



**Figura 8.** Regiones que muestran el potencial antioxidante en la estructura de los flavonoides: hidroxilaciones del anillo B (en amarillo), la presencia de insaturaciones del anillo C en la posición C-2-C-3 (en rojo) y la presencia del grupo carbonilo en C-4 (en verde). El grupo catecol y otras funciones también pueden mostrar la habilidad para quelar metales de transición como el cobre y el hierro (en azul) (Williams, *et al.*, 2004).

Por otro lado, se ha demostrado que los flavonoides pueden inhibir la carcinogénesis gracias a su actividad como antioxidantes (Figura 9), o por modulación del metabolismo de los carcinógenos originados por modificaciones de ciertos alimentos, a través de la inhibición y/o inducción de las enzimas de fase I y II; así

mismo, se ha visto que los flavonoides inhiben la proliferación celular anormal de lesiones preneoplásicas, lo que puede ser consecuencia de la inhibición de varias enzimas involucradas en la respuesta celular a factores de crecimiento, incluyendo la cinasa de proteína C, las cinasas de tirosina y la cinasa de fosfatidilinositol-3, inhibiendo así la expresión de varios genes relacionados con el desarrollo de tumores como los genes de proteínas antioxidantes o los genes supresores de tumores como p53 (Soobrattee *et al.*, 2005).

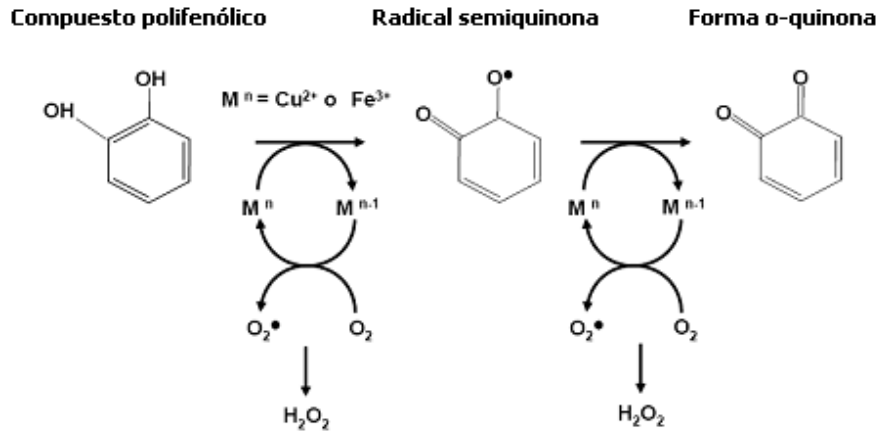


**Figura 9.** Inhibición del desarrollo de cáncer por los compuestos polifenólicos gracias a su actividad contra el estrés oxidante (Modificado de Moon, *et al.*, 2006).

En contraste con su actividad antioxidante, los compuestos polifenólicos también pueden actuar como agentes pro-oxidantes cuando son utilizados en dosis altas o bajo ciertas condiciones (Lee, *et al.*, 2006; Rietjens, *et al.*, 2002). Por ejemplo, la autooxidación química o enzimática de los polifenoles en presencia de metales, glutatión (GSH) o algunas peroxidasas puede conducir a la formación de especies reactivas de oxígeno y de otros radicales.

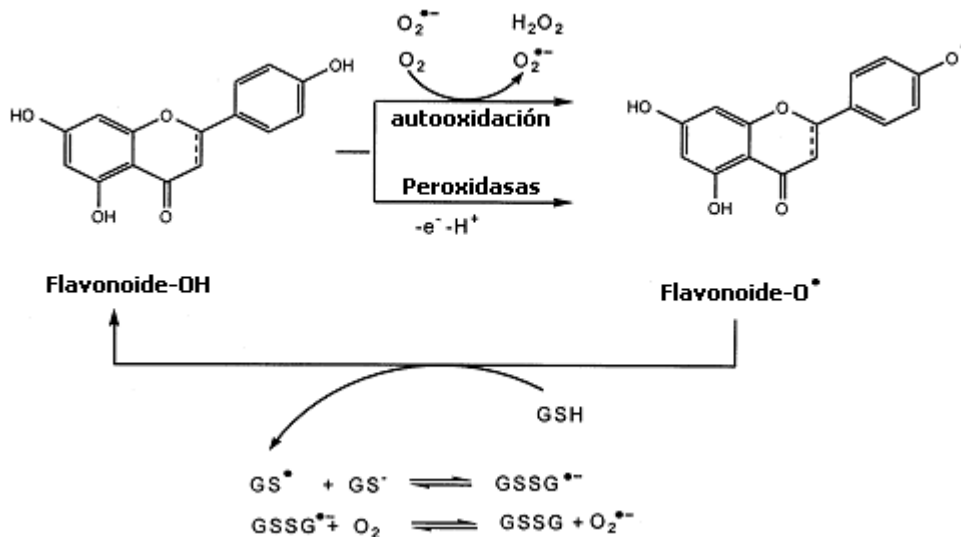
En presencia de oxígeno molecular, los metales como Cu (II) y Fe (II) catalizan la oxidación de los polifenoles. Esta oxidación inicial genera un radical semiquinona que puede reaccionar con el oxígeno molecular para formar radical superóxido, esta reacción es de carácter autocatalítico ya que el oxígeno oxida al compuesto inicial para generar el radical semiquinona y peróxido de hidrógeno, el cual puede también formarse por dismutación del anión superóxido y puede convertirse rápidamente a radical hidroxilo mediante la reacción tipo Fenton (Figura 10) (Sakihama, *et al.*, 2002; Lee, *et al.*, 2006). Los radicales semiquinona generados por la autooxidación de los polifenoles también pueden ser atrapados por el GSH, regenerando de esta forma al polifenol y generando un radical tiol del glutatión. Este radical tiol, a su vez, puede reaccionar con el glutatión para generar un radical disulfuro que rápidamente reduce el oxígeno molecular a anión superóxido (Figura 11) (Rietjens, *et al.*, 2002).





**Figura 10.** Actividad pro-oxidante de los compuestos polifenólicos (Adaptado de Lee, *et al.*, 2006).

No obstante, el potencial pro-oxidante intrínseco de algunos polifenoles puede contribuir también a sus propiedades quimiopreventivas. Un nivel moderado de estrés oxidante parece ser esencial para la transducción de señales que inducen o potencian ciertos sistemas de defensa antioxidantes. En este caso, es importante que se identifique bajo qué condiciones puede ocurrir la actividad antioxidante o el efecto pro-oxidante de los compuestos polifenólicos y cuándo y cómo estos compuestos pueden ejercer su actividad antitumoral, mostrar toxicidad aguda o carcinogenicidad (Lee, *et al.*, 2006).



**Figura 11.** Actividad pro-oxidante de los compuestos polifenólicos en presencia de glutatión (Adaptado de Reijters, *et al.*, 2002).

## 1.5 GENERALIDADES SOBRE LA PLANTA DE ESTUDIO: *Tamarindus indica* L.

La especie *Tamarindus indica* L., conocida popularmente como tamarindo, proviene de la familia Leguminosae, se considera especie nativa de Africa y crece de manera natural en regiones tropicales y subtropicales. En varios países, el tamarindo es un recurso importante, ya que se cultiva por su fruto que es comestible, como planta ornamental y/o como árbol de sombra. La pulpa se utiliza como condimento, en aderezos o como golosina. Las flores y las hojas se consumen como vegetales, mientras que el cotiledón obtenido de la semilla (Figura 12) se utiliza para la elaboración de goma de tamarindo, un componente de la jalea. También se utiliza en varios tipos de comida japonesa para mejorar la viscosidad (Phakruschaphan, *et al.*, 1982; Tsuda, *et al.*, 1994). En la medicina tradicional, *Tamarindus indica* L. es aceptada en varias partes del mundo, principalmente como digestivo, carminativo, laxante, expectorante y revitalizante; además, las semillas se han utilizado como antihelmínticos y eméticos, y su cáscara para el tratamiento de quemaduras y heridas así como para la disenteria (Farnsworth *et al.*, 1992). Los usos medicinales de esta especie se resumen en la Tabla 2 (Ross, *et al.*, 2003).

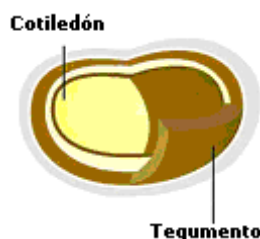


Figura 12. Estructura macroscópica de la semilla de *Tamarindus indica* L.

Tabla 2. Otros usos medicinales de la especie *Tamarindus indica* L.

Parte utilizada	Uso en la medicina tradicional	Modo de empleo	Vía de administración	País en donde se utiliza
Fruto seco	Fiebrífugo	Decocción	Oral	Brazil
	Inducción del vómito	Infusión	Oral	Fiji
	Infecciones del tracto urinario, piel y mucosas	Extracto acuoso caliente	Oral	Guatemala
Fruto fresco	Dolores menstruales	Jugo combinado con latex de <i>Calotropis gigantea</i>	Oral	India
	Laxante		Oral	West Indies
Hojas secas	Inflamación y dolencias del riñón	Extracto acuoso caliente	Oral	República Dominicana, India
	Torceduras	Cataplasma	Cutánea tópica	Fiji
	Catártico	Extracto acuoso caliente	Oral	Tailandia
Hojas	Artritis reumatoide	Jugo con latex de <i>C. gigantea</i> , leche y aceite.	Cutánea	India
	Fiebre causada por malaria	Decocción	Oral	Nigeria Tanzania
Pulpa seca	Infecciones fúngicas	Extracto acuoso caliente		Guatemala
	Expectorante	Extracto acuoso caliente	Oral	Tailandia

**Tabla 2.** Otros usos medicinales de la especie *Tamarindus indica* L. (continuación)

Parte utilizada	Uso en la medicina tradicional	Modo de empleo	Vía de administración	País en donde se utiliza
Corteza	Complicaciones durante el embarazo	Extracto acuoso junto con <i>Azelia africana</i>	Oral	Guinea
	Cólicos e indigestión	Cenizas obtenidas de la corteza con sal	Oral	India
	Cicatrizante	Extracto acuoso caliente	Cutánea	Senegal
	Amenorrea	Extracto acuoso caliente	Oral	Madagascar
Raíces	Problemas para dormir	Extracto acuoso caliente con las hojas	Oral	Ivory Coast
	Lepra	Decocción del extracto acuoso	Oral	Tanzania
	Disenteria	Decocción	Oral	Tanzania
Cáscara de la vaina	Lepra	Extracto acuoso caliente de la cáscara y corteza	Oral	Nigeria
Semilla seca	Antihelmítico	Extracto acuoso	Oral	Tailandia

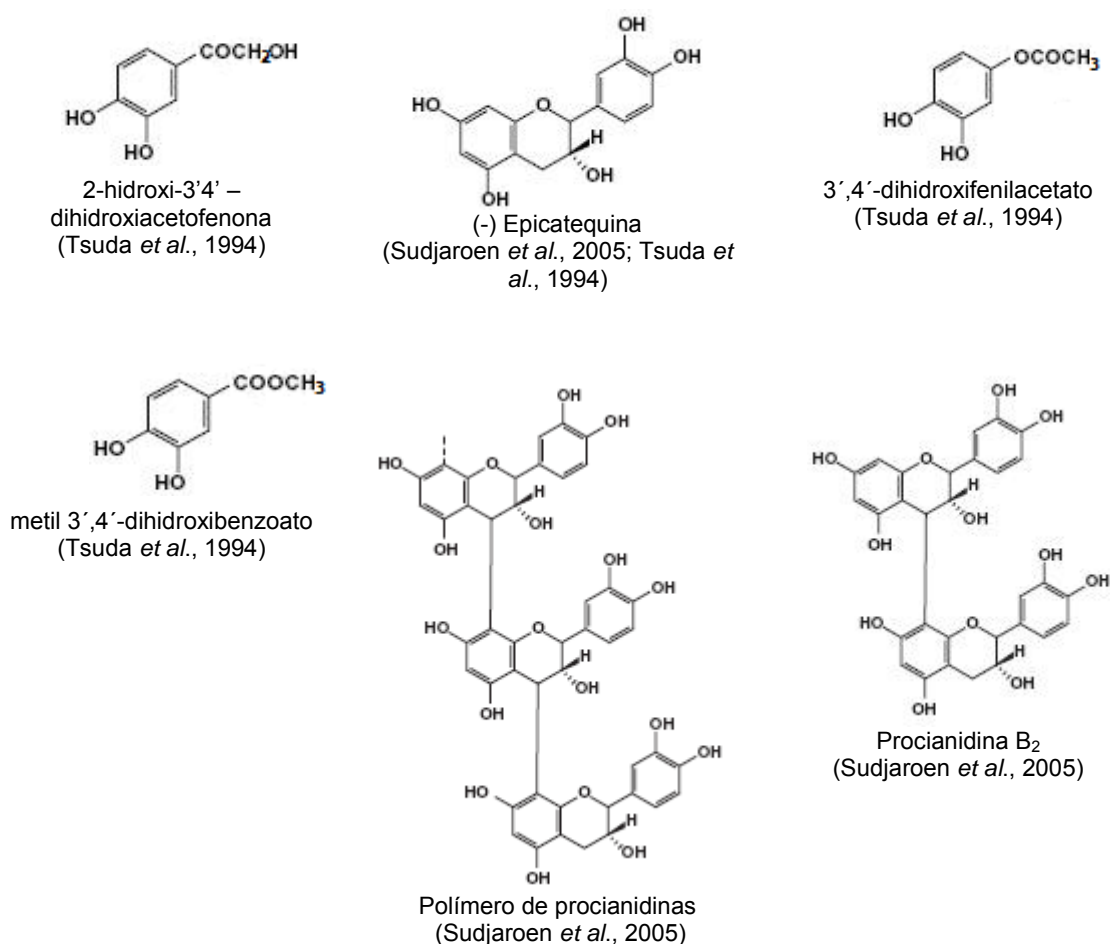
### 1.5.1 Estudios biológicos y químicos sobre *Tamarindus indica* L.

Los estudios biológicos realizados con *Tamarindus indica* han sido dirigidos de manera general hacia la confirmación de algunos de sus usos en la medicina tradicional, estos estudios incluyen principalmente actividad antimicrobiana, antihiperlipidémica, antidiabética, antiinflamatoria y antioxidante.

Las propiedades antimicrobianas de esta especie han sido reconocidas ampliamente; diversos estudios demuestran que el tamarindo tiene actividad antimicrobiana de amplio espectro contra patógenos como *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, y *Burkholderia pseudomallei*, entre otros, de hecho se ha reportado que esta capacidad es incluso superior respecto a otras especies de plantas (Srinavasan, *et al.*, 2001; Esaki, *et al.*, 2005). De y colaboradores (1999) también describen una actividad potente contra microorganismos como *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 10536) y *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), comprobando de esta forma su uso como conservador, desinfectante y antiséptico.

En estudios realizados con los extractos de pericarpio y semilla de tamarindo también se describe su actividad como hipolipemiantes. La administración del extracto de pericarpio de tamarindo en hamsters hipercolesterolémicos, disminuye los niveles totales de colesterol en suero (50%) y triacilgliceroles (60%) e incrementa los niveles de HDL (61%) (Martinello, *et al.*, 2006). También se ha demostrado que el extracto acuoso de la semilla de tamarindo, además de reducir los niveles de colesterol total y triacilgliceroles, tiene propiedades antidiabéticas potentes y antiinflamatorias, ya que reduce la hiperglucemia en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) (Maiti, *et al.*, 2004 y 2005), y disminuye de manera significativa la producción de óxido nítrico inducida por lipopolisacárido (LPS) e IFN- $\gamma$  tanto *in vitro* como *in vivo* (Komutarin, *et al.*, 2004).

Así mismo, se ha reportado que tanto el pericarpio como la semilla de tamarindo presentan actividad antioxidante. El extracto elaborado a partir del pericarpio tiene la capacidad de inactivar radicales como el anión superóxido y el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH por sus siglas en inglés) *in vitro*, y mejora la eficiencia de los sistemas de defensa antioxidante al aumentar la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa *in vivo*. De igual forma, la capacidad antioxidante de los diferentes extractos elaborados a partir de la semilla de tamarindo se ha comprobado en diferentes sistemas *in vitro*, algunos de los cuales demostraron que aquella tiene mayor actividad antioxidante que el ácido ascórbico (Siddhuraju, *et al.*, 2007). En otros estudios se encontró que la capacidad antioxidante de las semillas es mayor que en el pericarpio (Sudjaroen, *et al.*, 2005; Soong, *et al.*, 2004). En el caso de las semillas, Tsuda y colaboradores (1994) encontraron una mayor inhibición de la peroxidación lipídica *in vitro* con extractos obtenidos del tegumento que con extractos obtenidos del cotiledón (Figura 12). Posteriormente se demostró que la capacidad antioxidante del tegumento de semillas de tamarindo se debe a los antioxidantes fenólicos encontrados como 2-hidroxi-3',4'-dihidroxiacetofenona, metil 3,4-dihidroxibenzoato, 3,4-dihidroxifenilacetato y epicatequina (Tsuda, *et al.*, 1994) (Figura 13). En 1999 Pumthong y colaboradores reportaron la presencia de taninos y procianidinas



**Figura 13.** Compuestos aislados de la semilla de *Tamarindus indica* L.

oligoméricas principalmente, sin embargo en su estudio este tipo de componentes no fueron identificados o caracterizados de manera cuantitativa. Muchos de estos flavonoides son componentes del Pycnogenol<sup>®</sup>, un extracto estandarizado de la corteza de la especie *Pinus marítima*, el cual ha demostrado tener actividad vasorelajante, inducir incremento de la permeabilidad capilar, participar en el sistema celular antioxidante por su habilidad de regenerar el radical ascorbilo y proteger la vitamina E endógena y el glutatión del estrés oxidante (Packer, *et al.*, 1999; Rohdewald, 2002). En el 2005, el perfil de los compuestos polifenólicos en las semillas de *T. indica* L. realizado en estudios por HPLC, reveló la presencia de 8 compuestos principales, procianidina B<sub>2</sub> (5.5%), (-)epicatequina (4.8%), trímero (18.1%), tetrámero (30.2%), pentámero (17.6%) y hexámero (23.8%) de procianidina y polímeros de taninos en la semilla (Tabla 3). También se demostró que las semillas tienen un mayor contenido de fenoles totales con respecto al pericarpio (Sudjaroen, *et al.*, 2005).

**Tabla 3.** Contenido de compuestos fenólicos en las semillas de *T. indica* L.

Compuesto	Contenido de compuestos fenólicos (mg/Kg(DE))
Procianidina B <sub>2</sub>	359 (4.2)
(-)- Epicatequina	315 (1.4)
Trímero de procianidina	1180 (5.0)
Tetrámero de procianidina	1975 (5.0)
Pentámero de procianidina	1149 (0)
Hexámero de procianidina	1559 (3.5)
Taninos poliméricos	2340 (4.3)
Total (g)	6537 (0.5)

Los taninos poliméricos no se encuentran incluidos en el total (Sudjaroen, *et al.*, 2005).

## 1.5 JUSTIFICACIÓN

La participación del estrés oxidante en cáncer se ha demostrado ampliamente (Mates, *et al.*, 1999), de hecho, se ha visto que las especies reactivas de oxígeno (EROs) pueden actuar como iniciadores y/o promotores de tumores ocasionando daño directo a distintas moléculas biológicas como ADN, proteínas y lípidos o actuando como moléculas de señalización que llevan a la inducción de factores de transcripción y a la regulación de genes que participan en el crecimiento y proliferación de células cancerosas (Loo, *et al.*, 2003).

El cáncer de células renales es uno de los tipos de cáncer menos estudiados, su diagnóstico temprano es difícil y por lo tanto presenta un alto índice de mortalidad (Jones, *et al.*, 2007). El CCR en etapas tempranas se puede tratar de manera exitosa mediante métodos quirúrgicos, sin embargo, el diagnóstico en esta etapa es difícil ya que este tipo de cáncer no presenta sintomatología. La terapia para este tipo de cáncer en etapas intermedias o avanzadas es ineficiente hasta el momento; una de las razones de esto es que existen distintos subtipos histológicos y cada uno cursa con diferentes alteraciones moleculares, por lo que responden de manera diferente a los tratamientos.

En este contexto, el contar con un modelo experimental de carcinogénesis renal bien caracterizado sería muy valioso, por ejemplo, para la búsqueda de marcadores en etapas tempranas para poder hacer un diagnóstico oportuno, para identificar nuevos sitios blanco y desarrollar mejores agentes terapéuticos, o bien encontrar determinaciones confiables para una prognosis más acertada. Uno de los modelos más utilizados en el estudio del cáncer renal, y donde se ha encontrado la participación del estrés oxidante, es el modelo de carcinoma de túbulo proximal renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) (Toyokuni, *et al.*, 1994). La administración intraperitoneal de este compuesto produce necrosis tubular aguda y subaguda, y la exposición crónica induce el desarrollo de carcinoma de células renales (Okada y Midorikawa, 1982). A pesar de que se ha utilizado desde hace tiempo como modelo experimental de cáncer renal, aún no está totalmente caracterizado. No está claro qué subtipo de CCR se desarrolla, se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en la malignización celular y no se ha establecido el comportamiento del estrés oxidante a largo plazo provocado por FeNTA.

La demostración de la participación del estrés oxidante en el desarrollo de cáncer ha conducido al uso de antioxidantes como alternativa de tratamiento (Halliwell, 2008). Los compuestos polifenólicos han mostrado tener gran capacidad antioxidante, muchos de los cuales, además, presentan propiedades anticancerígenas. Entre las plantas con alto contenido de compuestos polifenólicos, se encuentra *Tamarindus indica* L. (Tsuda, *et al.*, 1993; Chanwitheesuk, *et al.*, 2005). Esta especie se utiliza ampliamente en la medicina tradicional en varias partes del mundo, sin embargo, los estudios científicos sobre sus aplicaciones terapéuticas hasta la fecha son escasos y no se han estudiado sus posibles propiedades preventivas en el desarrollo de cáncer. Las semillas de esta especie contienen una gran cantidad de compuestos polifenólicos diversos (Tsuda, *et al.*, 1994; Sudjaroen, *et al.*, 2005; Chanwitheesuk, *et al.*, 2005), incluso mayor que el pericarpio (Soong, *et al.*, 2004), por lo que, las semillas en vez de eliminarse como producto de desecho, podrían constituir un recurso importante de agentes antioxidantes y/o con potencial quimiopreventivo, y de bajo costo (Gerhauser, *et al.*, 2003).

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Con base en lo anteriormente expuesto se ha planteado la siguiente hipótesis:

En un esquema de tratamiento crónico con inyecciones repetidas de FeNTA se desarrollará carcinoma de células renales en ratas y un extracto polifenólico de semillas de tamarindo disminuirá la incidencia de cáncer al evitar o disminuir el estrés oxidante.

### OBJETIVO GENERAL

Implementar un modelo experimental de carcinogénesis renal inducida por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) e investigar si un extracto polifenólico de semillas de tamarindo puede proteger contra el desarrollo de tumores.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener un extracto rico en polifenoles a partir de las semillas de la especie *Tamarindus indica* L (EST).
- Determinar la dosis de EST a administrar utilizando estudios de exposición aguda a FeNTA.
- Implementar en nuestro laboratorio un modelo experimental de carcinogénesis renal inducida por exposición crónica a FeNTA.
- Determinar el tipo histológico de CCR que se desarrolla en este modelo para reforzar su valor como herramienta de estudio de CCR.
- Investigar si el extracto polifenólico puede prevenir o disminuir el desarrollo de cáncer renal.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

##### 3.1.1 Preparación y análisis de los extractos de semillas de *Tamarindus indica* L.

Se prepararon varios tipos de extractos a partir de la semilla de *Tamarindus indica* L., y se caracterizaron mediante la determinación de su capacidad de inactivación del radical superóxido (Parejo, 2002), así como del contenido de fenoles totales (FT) (Soares, 2006). La capacidad de inactivación de anión superóxido se determinó para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos, y la determinación de fenoles totales nos permitió establecer con qué extracto (pericarpio o semillas) obtendríamos mayor cantidad de estos compuestos y con qué disolvente se alcanzaría una mayor eficiencia en la extracción. Adicionalmente, estas determinaciones se realizaron de manera periódica para verificar que la cantidad de fenoles totales y la actividad antioxidante del extracto se mantuviera constante durante los ensayos biológicos. Los resultados obtenidos en estas determinaciones también se compararon con estudios realizados en un extracto de pericarpio de *T. indica* L. preparado previamente en nuestro laboratorio (Torres, *et al.*, 2007), ya que este extracto, aunque demostró tener buena capacidad antioxidante, presentaba ciertas complicaciones para su elaboración, su tiempo de conservación era limitado y características como el sabor hacían difícil su administración oral. La elección del extracto más adecuado se describe en la sección de resultados y se basó en la cantidad de fenoles totales obtenida por materia prima, la capacidad de inactivación del radical superóxido, así como su estabilidad.

##### 3.1.2 Determinación de la dosis a utilizar del extracto de cáscara de semillas de *T. indica* L. (EST).

La dosis de extracto en polvo de cáscara de semillas de tamarindo (EST) utilizada en el protocolo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA (protocolos I y II), se eligió de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio agudo descrito a continuación:

Los grupos experimentales se describen en la tabla 4. En cada grupo de estudio se utilizaron 5 ratas macho de la cepa Wistar (175-180 g) alimentadas con dieta estándar y agua *ad libitum*. El EST se administró en el agua de beber utilizando dosis de 50, 100 y 150 mg de fenoles totales/Kg/día 16 días previos a la administración del carcinógeno (FeNTA). Las dosis de fenoles totales administradas se eligieron de acuerdo a estudios de toxicidad y actividad antioxidante realizados por Komutarin (2004) y a resultados previos realizados con otros extractos polifenólicos en nuestro laboratorio (Cruz, 2007; Torres, 2007; López, 2007). Para determinar la cantidad de EST necesaria para administrar la dosis de 50, 100 y 150 mg FT/Kg/día, se realizó un estudio previo (datos no mostrados) en el que se estableció el volumen promedio de agua bebido por rata/día. De acuerdo a dicho estudio, el volumen promedio de agua consumido por día respecto al peso promedio de las ratas (240 g) fue aproximadamente de 30 mL. Posteriormente, el cálculo de la cantidad de EST a disolver en el agua de beber se realizó tomando en consideración la determinación de fenoles totales descrita en la sección 3.2.4.1. A continuación se da un ejemplo de estos cálculos:



- **Si se requiere preparar una solución con EST para administrar una dosis de 100 mg FT/Kg/día a 5 ratas acomodadas en un jaula durante 3 días:**

Jaula con 5 ratas      Peso promedio por rata: 126.03 g equivalente a 0.126 Kg.

Dosis: 100 mg FT - - - - Kg/día

x= 12.603 mg FT      0.126 Kg

Por tanto se requerirán: 12.603 mg FT por rata/día

63.015 mg FT para 5 ratas/día

189.045 mg FT para 5 ratas y para 3 días

Volumen promedio consumido por rata/día: 30 mL

Volumen que consumirán las 5 ratas durante 3 días: 450 mL

Para agregar 189.045 mg FT en 450 mL de agua debe tomarse en cuenta la cantidad de fenoles totales que contiene el EST:

De acuerdo a la determinación de fenoles totales el EST contiene 1.082 mg FT/mg EST, entonces, 189.05 mg FT equivalen a 174.72 mg de EST ó 0.175 g de EST.

**Sería necesario pesar 0.175 g EST y disolverlos en 450 mL de agua para que 5 ratas que están en la misma jaula y cuyo peso promedio es de 126.03 g, reciban una dosis de 100 mg FT/Kg/día.**

**Tabla 4.** Grupos experimentales para la elección de la dosis de EST a utilizar.

Grupo	No. de animales	Tratamiento
Control	5	Vehículos
100EST	5	Extracto de semillas de tamarindo vía oral durante 16 días (100 mg de fenoles totales/Kg/día)
150EST	5	Extracto de semillas de tamarindo vía oral durante 16 días (150 mg de fenoles totales/Kg/día)
FeNTA	5	FeNTA i.p. (9 mg Fe/Kg) 1 hora antes del sacrificio
50EST+F	5	Extracto de semillas de tamarindo vía oral durante 16 días (50 mg de fenoles totales/Kg/día) + FeNTA i.p. (9 mg Fe/Kg) 1 hora antes del sacrificio
100EST+F	5	Extracto de semillas de tamarindo vía oral durante 16 días (100 mg de fenoles totales/Kg/día) + FeNTA i.p. (9 mg Fe/Kg) 1 hora antes del sacrificio
150EST+F	5	Extracto de semillas de tamarindo vía oral durante 16 días (150 mg de fenoles totales/Kg/día) + FeNTA i.p. (9 mg Fe/Kg) 1 hora antes del sacrificio

Al término de los tratamientos descritos en la tabla 4, las ratas se sacrificaron por decapitación una hora después de la administración de FeNTA, tiempo en el que se observa mayor estrés oxidante de acuerdo a

estudios realizados por Cruz (2007) y Torres (2007). Posteriormente se evaluó el daño oxidante en riñón mediante las determinaciones de peroxidación lipídica, proteínas oxidadas y niveles de peróxido de hidrógeno. La selección de la dosis de fenoles totales de EST a utilizar en el desarrollo de cáncer renal se basó en la capacidad de ésta para disminuir el estrés oxidante provocado por FeNTA.

### 3.1.3 Desarrollo de cáncer renal inducido con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)

En la literatura se han reportado dos esquemas de tratamiento para el desarrollo de cáncer renal. Uno de ellos consiste en la administración de FeNTA a una dosis de 9 mg Fe/Kg dos veces a la semana durante 16 semanas (Jahangir *et al.*, 2006; Khan, *et al.*, 2005), que fue el esquema que se eligió para la realización del protocolo I por ser el reportado con mayor frecuencia. El otro esquema consistió en la administración de dosis bajas desde 3 o 5 mg Fe/Kg hasta llegar a la dosis de 9 mg Fe/Kg dos veces por semana, que fue el esquema utilizado en el protocolo II (Athar, *et al.*, 1998).

#### ➤ Protocolo I

En la tabla 5 se describen los diferentes tratamientos que recibieron los grupos estudiados. En cada grupo de estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (106-112g) las cuales se alimentaron con dieta estándar y agua *ad libitum*. El EST se disolvió en el agua de beber de acuerdo a la dosis seleccionada en la prueba piloto (100 mg de fenoles totales/Kg/día) y se administró desde 16 días previos a la administración de la N-dietilnitrosamina (200 mg/Kg) y durante todo el protocolo (Figura 14). La N-dietilnitrosamina se utilizó como iniciador ya que se ha visto que se requiere menor tiempo de tratamiento para inducir cáncer y aumenta el número de animales con CCR. Posteriormente se siguió el esquema de exposición a FeNTA reportado en la literatura en donde se indica que diez días después de la administración de DEN se comienza el tratamiento intraperitoneal con el carcinógeno (FeNTA) a una dosis de 9 mg Fe/Kg 2 veces a la semana durante 16 semanas (Jahangir, *et al.*, 2006; Khan, *et al.*, 2005).

**Tabla 5.** Grupos de estudio del protocolo I.

Grupo	No. de animales	Esquema de tratamiento
Control	10	Vehículos
EST	10	Extracto de semillas de tamarindo (100 mg de fenoles totales/Kg/día)
DEN	10	Administración única de N-dietilnitrosamina i.p. (200 mg/Kg)
DEN+FeNTA	25	Administración única de N-dietilnitrosamina i.p. (200 mg/Kg) + FeNTA i.p. (9 mg Fe/Kg)
EST+DEN+FeNTA	25	Extracto de semillas de tamarindo (100 mg de fenoles totales/Kg/día) + Administración única de N-dietilnitrosamina i.p. (200 mg/Kg) + FeNTA i.p. (9 mg Fe/Kg)

Las ratas se sacrifican por decapitación 8 semanas después de haber terminado el esquema de tratamiento con FeNTA (24 semanas después de la iniciación de la administración del FeNTA en los grupos de estudio respectivos). En el presente trabajo también se planeó la determinación de marcadores de función renal ya que se sabe que el FeNTA puede inducir insuficiencia renal aguda (Okada, 1982), entonces, para comprobar que se estuviera desarrollando un modelo de carcinogénesis renal y no un modelo de insuficiencia renal se tomaron muestras de suero y orina periódicamente en 5 ratas de cada grupo estudiado.

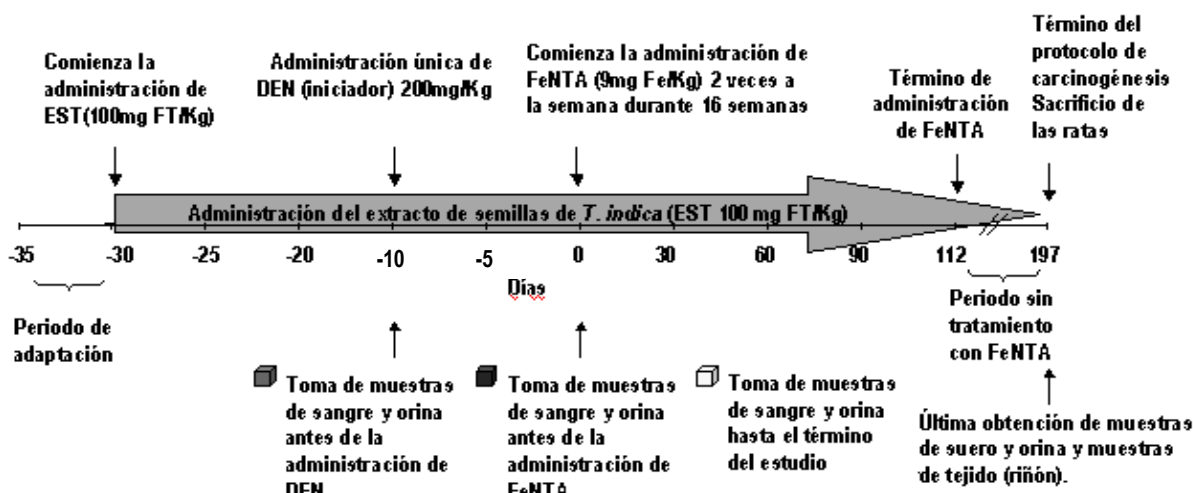


Figura 14. Diseño experimental para el protocolo I.

### ➤ Protocolo II

Por los resultados obtenidos con el esquema de tratamiento del Protocolo I (sección 4.4), se decidió seguir el otro esquema reportado en la literatura con algunas modificaciones (Athar, *et al.*, 1998; Takizawa, *et al.*, 2004). Este protocolo, incluyó los tratamientos descritos en la Tabla 6. En cada grupo de estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (70-80 g) con alimentación en base a una dieta estándar y agua *ad libitum*. Para este protocolo se había decidido incluir nuevamente grupos de tratamiento con FeNTA a dosis fijas de 9 mg Fe/Kg (grupos DEN+FeNTA fijo y EST+DEN+FeNTA fijo) para corroborar los resultados del protocolo I, sin embargo, se comenzó con dosis más bajas de FeNTA por la alta mortalidad presentada otra vez en un grupo piloto tratado con dosis de 9 mg Fe/Kg (datos no mostrados). La dosis inicial de FeNTA de 7 mg Fe/Kg (la cual se tenía planeado administrar durante todo el protocolo) aún fue muy alta, por lo que se fue cambiando en función del comportamiento de peso corporal, apariencia general y mortalidad presentada en los animales de experimentación hasta llegar a la dosis de 9 mg Fe/Kg de acuerdo al esquema presentado en la figura 15.

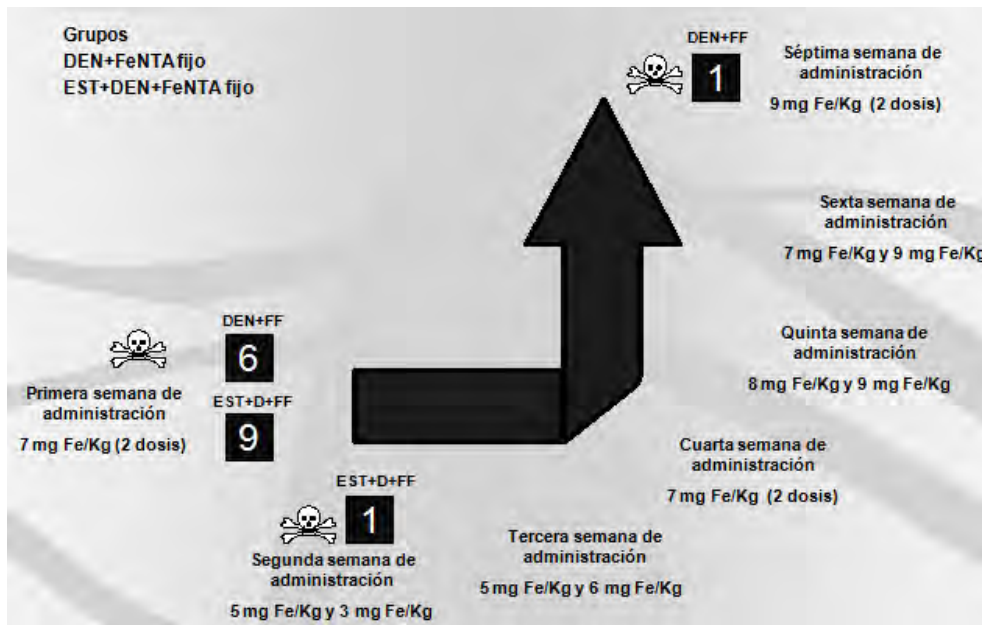
En este protocolo también se incluyó un esquema diferente de exposición a FeNTA, donde se administró una dosis inicial de 3 mg Fe/Kg que se fue aumentando de manera gradual hasta llegar a la dosis de 9 mg Fe/Kg (grupos FeNTA gradual, DEN+FeNTA gradual, EST+DEN+FeNTA gradual). En este esquema de tratamiento se llegó a la dosis de 9 mg Fe/Kg algunas semanas después de lo planteado, ya que, al igual que

en los tratamientos con FeNTA fijo, se tuvo el cuidado de disminuir un poco la dosis en función de la mortalidad presentada y el estado general de los animales en los grupos de estudio (Figura 16).

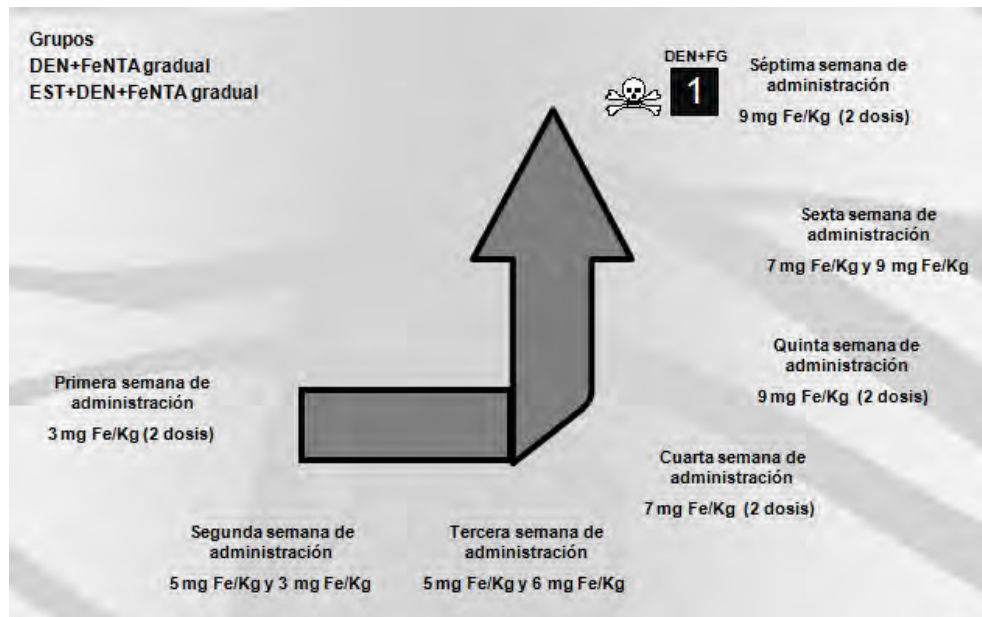
**Tabla 6.** Grupos de estudio del protocolo II.

<b>Grupo</b>	<b>No. de animales</b>	<b>Esquema de tratamiento</b>
Control	6	Vehículos
EST	5	Extracto de semillas de tamarindo (100 mg de fenoles totales/Kg/día) 16 días antes y durante todo el estudio
DEN	5	Administración única de N-dietilnitrosamina i.p. (200 mg/Kg) al mismo tiempo que los otros grupos tratados con DEN
DEN+FeNTA fijo	15	Administración única de N-dietilnitrosamina i.p. (200 mg/Kg) 14 días antes de la administración del FeNTA + FeNTA i.p. (7 mg Fe/Kg) 2 veces a la semana durante 16 semanas
EST+DEN+FeNTA fijo	15	Extracto de semillas de tamarindo (100 mg de fenoles totales/Kg/día) 16 días antes y durante todo el estudio + Administración única de N-dietilnitrosamina i.p. (200 mg/Kg) 10 días antes de la administración del FeNTA + FeNTA i.p. (7 mg Fe/Kg) 2 veces a la semana durante 16 semanas
FeNTA gradual	8	FeNTA i.p. (Dosis gradual* mg Fe/Kg) 2 veces a la semana durante 16 semanas
DEN+FeNTA gradual	24	Administración única de N-dietilnitrosamina i.p. (200 mg/Kg) 14 días antes de la administración del FeNTA + FeNTA i.p. (Dosis gradual* mg Fe/Kg) 2 veces a la semana durante 16 semanas
EST+DEN+FeNTA gradual	24	Extracto de semillas de tamarindo (100 mg de fenoles totales/Kg/día) 16 días antes y durante todo el estudio + Administración única de N-dietilnitrosamina i.p. (200 mg/Kg) 14 días antes de la administración del FeNTA + FeNTA i.p. (Dosis gradual* mg Fe/Kg) 2 veces a la semana durante 16 semanas

\*Véase esquema de la figura 16.



**Figura 15.** Esquema de administración de FeNTA para los grupos de tratamiento con DEN+FeNTA fijo y EST+DEN+FeNTA fijo en función de los decesos ocurridos durante el protocolo II. Los números dentro del recuadro representan los decesos ocurridos en la semana de tratamiento correspondiente.



**Figura 16.** Esquema de administración de FeNTA para los grupos de tratamiento con DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual del protocolo II. Los números dentro del recuadro representan los decesos ocurridos en la semana de tratamiento correspondiente.

Durante el desarrollo de este protocolo se obtuvieron muestras de suero y orina (4-6 ratas por grupo de estudio) para determinar marcadores de función renal (Hermmans, *et al.*, 1998). Las ratas se sacrificaron por decapitación 16 semanas después de haber terminado el esquema de tratamiento con FeNTA (32 semanas después de la iniciación de la administración del FeNTA en los grupos de estudio respectivos), y los riñones se extrajeron para determinar marcadores de estrés oxidante y para los análisis histológicos por tinción con hematoxilina-eosina.

### 3. 1. 4 Determinación de marcadores de función renal

Los riñones están involucrados en diversas funciones críticas del organismo como son la regulación del volumen de fluidos, electrolitos y estado ácido-base, así como en la eliminación de productos de desecho. Una de las consecuencias más comunes en la alteración en la función renal es la excreción inadecuada de diversos metabolitos, así como la pérdida anormal de proteínas. Con base en esto, durante los protocolos de inducción de CCR con FeNTA se decidió medir nitrógeno ureico sanguíneo (BUN por sus siglas en inglés), creatinina en suero y proteinuria como marcadores de función renal bajo los procedimientos descritos en la metodología (secciones 3.2.6.1 a 3.2.6.3).

### 3. 1. 5 Determinación de marcadores de estrés oxidante en riñón

Las determinaciones que se consideraron para evaluar el estrés oxidante fueron la cuantificación de peróxido de hidrógeno, la peroxidación lipídica y el daño oxidante a proteínas en el tejido renal al final de cada protocolo. Así mismo, se realizó la determinación de lipoperoxidación en suero una hora después de la administración de FeNTA para comprobar el estrés oxidante inducido por este carcinógeno en los protocolos crónicos. La cuantificación de peróxido de hidrógeno se llevó a cabo mediante el método de naranja de xilenol-hierro<sup>3+</sup> (FOX) descrito en la sección 3.2.5.2, el daño oxidante a proteínas se determinó mediante la cuantificación de grupos carbonilo (sección 3.2.5.3) y el daño oxidante a lípidos mediante la determinación de malondialdehído (sección 3.2.5.1).

### 3.1.6 Determinación de la función de supervivencia

El parámetro que representa la probabilidad que tiene un individuo dentro de una población para sobrevivir en función del tiempo es la función de supervivencia estimada  $\hat{S}(t)$ , la cual también puede utilizarse como una medida de la fracción de los individuos vivos en un periodo de tiempo determinado después de un tratamiento. En términos matemáticos, la función de supervivencia estimada está definida como la fracción de individuos que están vivos en un tiempo dado y los individuos que están vivos en un tiempo 0:

$$\hat{S}(t) = \frac{\text{Número de individuos que sobreviven después de un tiempo } t}{\text{Número total de individuos en una población}}$$

La supervivencia estimada durante el protocolo de desarrollo de cáncer renal se calculó de acuerdo al método de Kaplan-Meier, el cual consiste en obtener el producto de las fracciones de individuos vivos con respecto al número total de individuos en el tiempo en que algunos individuos mueren, mediante la siguiente fórmula:

$$S(t_j) = \prod \left( \frac{n_i - d_i}{n_i} \right)$$

donde:

$n_i$  = número de individuos vivos antes del tiempo  $t$

$d_i$  = número de muertes que ocurrieron en el tiempo  $t_i$

$\Pi$  = Producto de todos los tiempos,  $t_i$ , en el que las muertes ocurren después e incluyendo el tiempo  $t_j$ .

La gráfica de supervivencia se obtiene calculando el producto límite estimado Kaplan-Meier en función del tiempo. Ejemplo:

Grupo DEN+FeNTA gradual (Día 4)

$$S(t_j) = \pi \left( \frac{25-13}{25} \right) \left( \frac{12-9}{12} \right) = 0.12$$

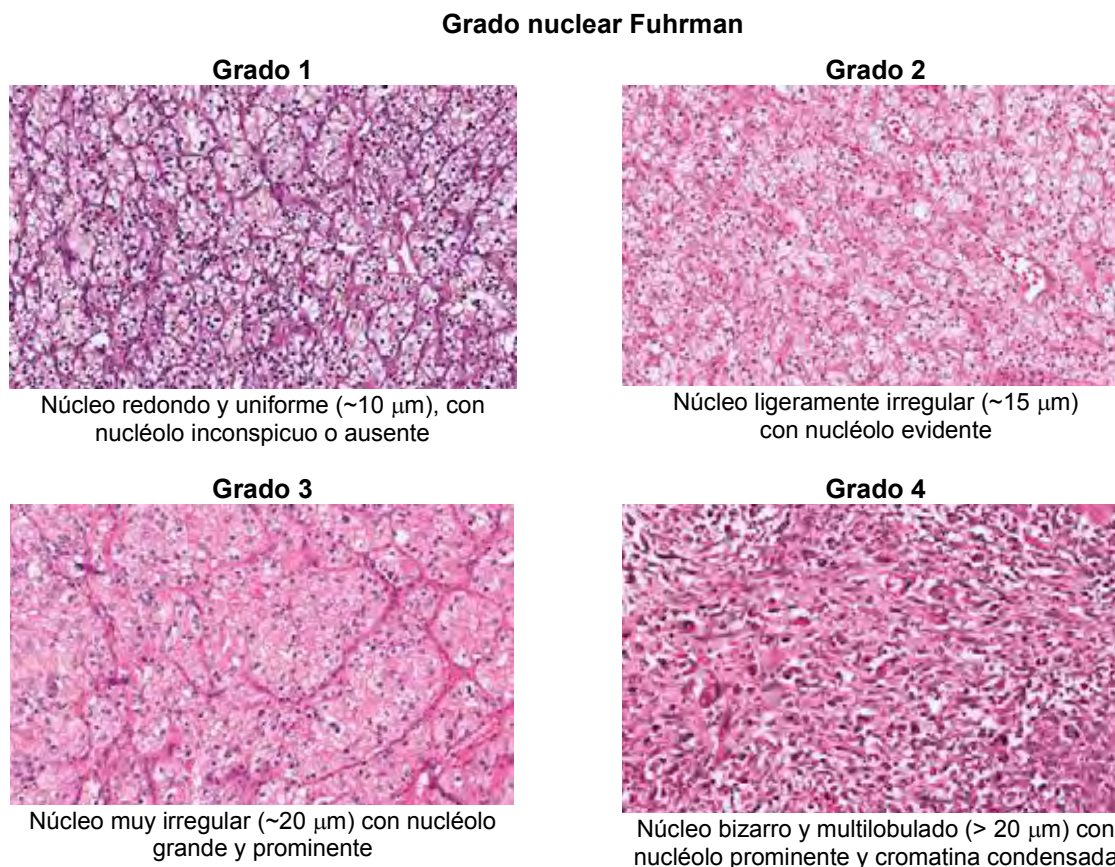
$n_i = 25$  ratas (Día 0)    $d_i = 13$  ratas (Día 1)  
 $n_i = 12$  ratas (Día 3)    $d_i = 9$  ratas (Día 4)

Fracción viva justo antes del día 4 y que sobrevivió después del día 4 = 0.12

El tiempo de supervivencia medio, definido como el tiempo en el cual la mitad de la población está viva y la mitad muerta, se obtuvo encontrando el tiempo de supervivencia más pequeño observado para el cual la función de supervivencia estimada  $\hat{S}(t)$  es menor a 0.5 para cada grupo de estudio. Posteriormente, los tiempos de supervivencia se compararon usando la prueba log-rank.

### 3.1.7 Análisis histológicos

Los análisis histológicos se realizaron en un número representativo de muestras de tejido renal por cada grupo de estudio del protocolo II. El subtipo histológico de CCR inducido por FeNTA se determinó de acuerdo a la morfología presentada en las células tumorales teñidas con hematoxilina-eosina (Mancini *et al.*, 2008; WHO, 2004) y el grado de avance del tumor se evaluó utilizando el sistema de grado nuclear Fuhrman (Fuhrman, *et al.*, 1982; Skinner, 1971; Thomas *et al.*, 2008) descrito en la figura 17. Así mismo, los análisis histológicos nos permitieron determinar el efecto del tratamiento con EST sobre el desarrollo de CCR.



**Figura 17.** Clasificación Fuhrman basada en la morfología del núcleo y en la presencia del nucleólo. Fotomicrografías de ccCCR teñidas con hematoxilina-eosina (10X) (Thomas, *et al.*, 2008).

## 3.2 METODOLOGÍA

### 3.2.1 Preparación del extracto de pericarpio de *Tamarindus indica* L.

Cien gramos de pulpa de tamarindo se someten a maceración durante 3 días en 400 mL de etanol al 70% a 4°C. El extracto resultante se filtra a través de un cedazo y se concentra al vacío hasta la evaporación completa del etanol. Posteriormente se centrifuga a 12000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente para remover los restos de grasa, y el extracto acuoso resultante se almacena a 4°C.

### 3.2.2 Preparación del extracto etanólico al 70% y extracto etanólico anhidro a partir de la cáscara de semillas de *Tamarindus indica* L.

Veinticinco gramos de cáscara de semillas de tamarindo se someten a maceración durante 24 horas en 500 mL de etanol anhidro o etanol al 70% a temperatura ambiente. El extracto líquido resultante se separa de las semillas por decantación y se almacena a 4°C.

### 3.2.3 Preparación del extracto en polvo a partir de la cáscara de semillas de *Tamarindus indica* L (EST).

Veinticinco gramos de cáscara de semillas de tamarindo se someten a maceración durante 24 horas en 500 mL de etanol anhidro a temperatura ambiente. El extracto resultante se separa de las semillas por decantación y se concentra al vacío hasta la evaporación completa del etanol obteniéndose 8.066 g de un residuo seco café claro. El polvo de extracto obtenido a partir de este procedimiento se denominará como extracto de semillas de tamarindo (EST).

### 3.2.4 Análisis de los extractos del pericarpio y semilla de *Tamarindus indica* L.

#### 3.2.4.1 Cuantificación de fenoles totales

##### ➤ Fundamento

Los compuestos polifenólicos son parte integral en la dieta de los humanos, se distribuyen en las plantas y pueden ser desde moléculas sencillas hasta compuestos altamente polimerizados. En la técnica de Folin Ciocalteu los fenoles se oxidan por el reactivo de Folin, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, los cuales se reducen por acción de los fenoles, formando una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno que puede leerse espectrofotométricamente a 765 nm (Soares, 2006).

##### ➤ Preparación de las muestras

Las diluciones de los diferentes extractos polifenólicos en agua se muestran en la tabla 7:

Tabla 7. Diluciones del extracto polifenólico en la determinación de fenoles totales.

Diluciones	Extracto polifenólico (µL)	Agua (µL)
1:10	100	900
1:20	50	950
1:50	20	980
1:75	10	740
1:100	10	990
1:125	8	992
1:200	5	995
1:250	4	996



Para la determinación de fenoles totales de los EST subsecuentes, las diluciones se realizan a partir de una solución “stock” de concentración alta (solución “stock” 1) y otra con concentración baja (solución “stock” 2). La preparación de estas dos soluciones “stock” permite cuantificar de manera confiable la concentración de fenoles totales presentes en los extractos.

- Solución stock 1 de EST.

0.015g de polvo de extracto se disuelven en 5 mL de agua y realizan las diluciones de la tabla 8.

**Tabla 8.** Diluciones de la solución stock 1 de EST.

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

- Solución stock 2 de EST.

0.08g de polvo de extracto se disuelven en 5 mL de agua y se realizan las diluciones de la tabla 9.

**Tabla 9.** Diluciones de la solución stock 2 de EST.

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

- Procedimiento

A 50 μL de estándar de ácido gálico (10mg/mL) o de las diluciones del extracto preparadas de acuerdo a las tablas 7, 8 o 9 se les agregan 400 μL de carbonato de sodio 1M y 500 μL de Folin 2N (1:10). Las lecturas se realizan en un espectrofotómetro a 765 nm 15 minutos después de adicionar el Folin. La concentración de fenoles totales del extracto se calcula interpolando la absorbancia obtenida de cada dilución en la curva patrón de ácido gálico que se describe en la tabla 10, y los resultados se expresan en miligramos de fenoles totales por mL o g de extracto.

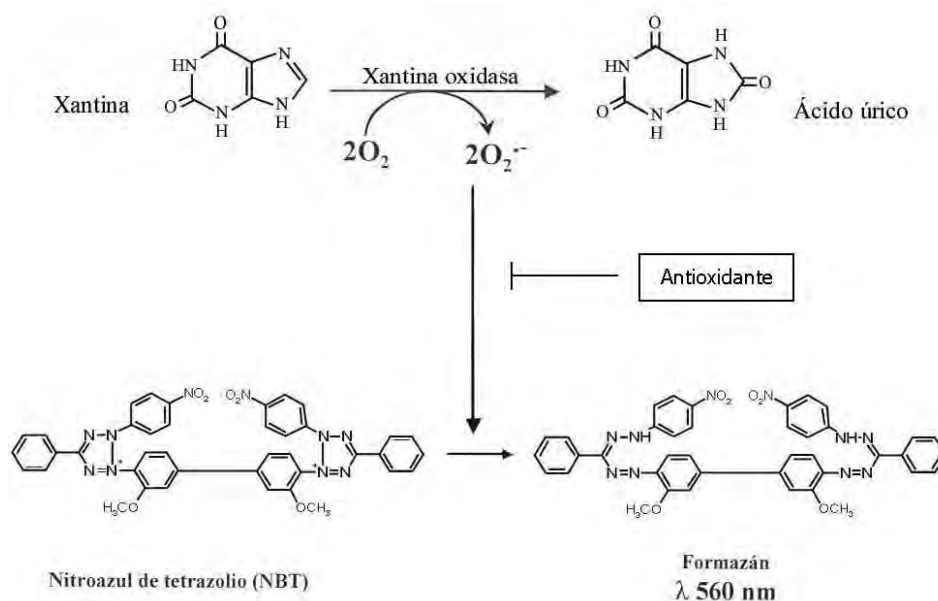
**Tabla 10.** Concentraciones de ácido gálico de la curva patrón para la cuantificación de fenoles totales.

Ácido gálico [μg/mL]	μL de estándar	mL H <sub>2</sub> O destilada
50	5	995
100	10	990
150	15	985
200	20	980
250	25	975

### 3.2.4.2 Inactivación del radical superóxido

- Fundamento

La inactivación del radical superóxido se mide indirectamente gracias a la capacidad del antioxidante para evitar la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los radicales superóxido generados *in vitro* en el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Figura 18). La reducción de NBT por efecto del radical superóxido se determina por la formación de formazán el cual puede medirse espectrofotométricamente a 560 nm (Parejo *et al.*, 2002).



**Figura 18.** Fundamento para la determinación del radical superóxido y evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de *Tamarindus indica* L.

➤ Preparación de las muestras

Las diluciones del extracto polifenólico se realizan en agua como se indica en la tabla 11 a partir de las soluciones “stock” mencionadas en la sección 3.2.4.1. La preparación de estas dos soluciones “stock” permite cubrir todo el rango para expresar el porcentaje de inactivación del radical superóxido en función de concentración de fenoles totales presentes en los extractos..

**Tabla 11.** Diluciones del extracto polifenólico en la determinación de inactivación del radical superóxido.

Diluciones	Agua (μL)	Extracto polifenólico (μL)
1:50	1960	40
1:75	1480	20
1:100	1000	1000 de 1:50
1:150	1000	1000 de 1:75
1:200	1000	1000 de 1:100
1:250	1494	6
1:300	1000	1000 de 1:150
1:400	1000	1000 de 1:200
1:500	500	500 de 1:250
1:600	500	500 de 1:300

➤ Procedimiento

Por cada determinación se agregan 815 μL de la mezcla de reacción (ver apéndice) y se añaden los reactivos en la forma como se indica en la tabla 12 preparando un C-100%\*, un blanco problema y un problema por cada dilución de extracto polifenólico. El tiempo de incubación se contabiliza desde que se agregan los reactivos de manera simultánea en el primer tubo. Los tubos se incuban 15 min en un baño a 27°C, y la

reacción se detiene con 330  $\mu\text{L}$  de cloruro de cobre. La cuantificación se realiza espectrofotométricamente a 560 nm y los resultados se expresan como porcentaje de inactivación del radical superóxido en función de la cantidad de fenoles totales presentes en los 165  $\mu\text{L}$  de muestra para cada una de las diluciones utilizadas.

**Tabla 12.** Reactivos adicionados para cada dilución de extracto polifenólico en la determinación de la capacidad de inactivación del radical superóxido.

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

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

### 3.2.5 Determinación de estrés oxidante

#### 3.2.5.1 Evaluación de la peroxidación lipídica

##### ➤ Fundamento

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

##### ➤ Preparación de las muestras

Para este ensayo, la preparación de los homogenados de corteza renal se realiza en el momento del sacrificio de los animales. El riñón extraído se lava rápidamente en solución salina isotónica estéril en baño de hielo, se separan aproximadamente 300 mg de corteza y se homogenizan en 3 mL de amortiguador de fosfatos (20 mM, pH: 7.4, en baño de hielo). El homogenado resultante se congela a  $-80^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 1 mL hasta la realización de la determinación.

Las muestras de sangre se obtienen mediante punción retro-orbital. Para ello, las ratas se anestesian previamente con éter colocándolas en una cámara en la que inhalan el anestésico, se colocan sobre una superficie sólida y se introduce un capilar (tubo de hematocrito) no heparinizado justo detrás del ojo y la muestra de sangre (aproximadamente 1 mL) se recolecta por capilaridad en un tubo. Minutos después de la formación del coágulo, la muestra de sangre se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El suero obtenido bajo este procedimiento se separa en alícuotas de 200  $\mu\text{L}$ , las cuales se almacenan a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

➤ Procedimiento

El día del ensayo, una alícuota de cada muestra de homogenado se descongela y se centrifuga a 3000 rpm a 4°C por 10 min. El sobrenadante obtenido se separa y se realizan las diluciones convenientes para que el valor obtenido de absorbancia pueda interpolarse en la curva patrón de tetrametoxipropano (TMPO). Posteriormente, a 200 µL de homogenado o 160 µL de suero de cada una de las muestras se les agrega 650 µL de mezcla 1-metil-2-fenilindol/metanol 10 mM y 150 µL de HCl (37%). Los tubos se incuban en un baño a 45°C durante 1 hora y se centrifugan a 10000 rpm durante 10 min para obtener un sobrenadante claro que se lee a 586 nm. La concentración de proteínas de las alícuotas se cuantifica mediante el método de Lowry que se describe más adelante (Lowry *et al.*, 1951). La concentración de MDA presente en las muestras se calcula interpolando la absorbancia obtenida en la curva patrón de TMPO (Tabla 13), y los resultados se expresan en nmol de MDA por miligramo de proteína.

**Tabla 13.** Concentraciones de tetrametoxipropano de la curva patrón para la cuantificación de MDA presente en las muestras.

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

3.2.5.2 Cuantificación de peróxido de hidrógeno

➤ Fundamento

Esta determinación está basada en la oxidación de Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> por el peróxido de hidrógeno en condiciones ácidas. El ión férrico se une al naranja de xilenol (3.3'-bis[N,N-di(carboximetil)-aminometil]-o-cresolsulfona-fenoltaleína, sal sódica) para formar un complejo estable colorido que puede medirse espectrofotométricamente a 560 nm (Long, *et al.*, 1999).

➤ Preparación de las muestras

El riñón extraído en el momento del sacrificio se lava en solución isotónica estéril (en baño de hielo), se separan aproximadamente 100 mg de corteza y se homogenizan en 900 µL de amortiguador de fosfatos (100 mM, pH: 7.4, en baño de hielo). El homogenado resultante se centrifuga a 15000 rpm, a 4°C durante 20 min, se separa el sobrenadante y se congela a -80°C en alícuotas no menores de 200 µL.

➤ Procedimiento

El día del ensayo, una alícuota de cada muestra se descongela y se colocan 90 µL de muestra de tejido o del estándar de peróxido de hidrógeno 100µM en los tubos de reacción. Posteriormente, se agregan 900 µL del reactivo de FOX (ver apéndice) y 10 µL de metanol de manera simultánea a las muestras y a los estándares, e inmediatamente después de la adición de los reactivos, se agita y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo, sólo los tubos de las muestras se centrifugan a 10000 rpm por

10 min, y las lecturas de todos los tubos se realizan en un espectrofotómetro a 586 nm. La concentración de peróxido de hidrógeno se calcula interpolando la absorbancia obtenida de cada dilución en la curva patrón de peróxido de hidrógeno descrita en la tabla 14, la concentración de proteínas totales se cuantifica mediante el método de Lowry (Lowry, *et al.*, 1951) y los resultados se expresan en nmol de peróxido de hidrógeno por mg de proteína.

**Tabla 14.** Concentraciones de peróxido de hidrógeno de la curva patrón para la cuantificación de esta molécula en muestras de tejido renal mediante el método de FOX.

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

### 3.2.5.3 Cuantificación de proteínas oxidadas

#### ➤ Fundamento

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

#### ➤ Preparación de las muestras

En el momento del sacrificio de los animales, el riñón se lava en solución salina isotónica estéril (en baño de hielo), se separan fragmentos de aproximadamente 100 mg de corteza, se congelan rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C. La preparación de los homogenados se realiza el día anterior al ensayo colocando 100 mg de tejido de cada muestra en 900 µL de amortiguador de fosfatos (50 mM, pH: 7.4, en baño de hielo) con inhibidores de proteasas, EDTA 1mM y Tritón 0.1%. Los homogenados resultantes se centrifugan a 15300 rpm a 4°C durante 20 minutos y posteriormente se tratan con sulfato de estreptomicina al 10% durante 12 horas, colocando 200 µL del antibiótico más 600 µL del homogenado.

#### ➤ Procedimiento

Las muestras tratadas con sulfato de estreptomicina se centrifugan a 5000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se hace un blanco y un problema por muestra (Tabla 15).

**Tabla 15.** Reactivos que deben agregarse a las muestras problema y blanco para la determinación de carbonilos en las proteínas.

Blanco	Problema
150 $\mu$ L homogenado	150 $\mu$ L homogenado
600 $\mu$ L HCl 2.5 M	600 $\mu$ L DNPH 10 mM

Después de agregar los reactivos citados en la tabla 15, las muestras problema y blanco se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente protegidas de la luz. Durante esa hora, todos los tubos se agitan cada 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionan 750  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se incuban todas las muestras a 4°C durante 10 min y se centrifugan a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se descarta y se resuspende el botón con 600  $\mu$ L de TCA al 10%. Se centrifuga a 5000 rpm durante 10 min a 4°C, se descarta el sobrenadante y se realizan 3 lavados con 600  $\mu$ L de mezcla etanol/acetato de etilo (1:1), centrifugando en cada lavado a 7000 rpm durante 15 min. En el último lavado se deja que la mezcla de etanol/acetato de etilo (1:1) se evapore y se resuspende el botón con 1 mL de guanidina 6M. La concentración de carbonilos se determina restando la absorbancia de las muestras problema y los tubos blanco a 370 nm y multiplicando por el factor 45.45 obtenido a partir del coeficiente de extinción molar del DNPH. La concentración de proteínas en las muestras se calcula por interpolación de las absorbancias obtenidas en los tubos blanco a 280 nm en una curva patrón de albúmina (Tabla 16). Los resultados se expresan en nmol de carbonilos por miligramo de proteína.

**Tabla 16.** Concentraciones de albúmina sérica bovina para la obtención de la curva patrón para la cuantificación de proteínas totales.

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

### 3.2.6 Determinación de la función renal

#### 3.2.6.1 Cuantificación de creatinina

La creatinina es un producto de desecho de la creatina del músculo, la velocidad de producción de creatinina está relacionada con la actividad y la masa muscular, así como de la ingesta total de proteínas. Este metabolito es ampliamente aceptado como una medida de la tasa de filtración glomerular, se excreta por filtración a través del glomérulo y en menor proporción por secreción tubular. Los niveles altos de creatinina son indicativos de que existe una patología renal. Un daño en el aparato de filtración glomerular conduce a una disminución de la tasa de filtración glomerular provocando una acumulación importante de este producto de desecho.

#### ➤ Fundamento

Esta determinación está basada en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino para formar un complejo estable colorido que puede medirse espectrofotométricamente a 510 nm. El desarrollo del color es

proporcional a la concentración de creatinina en la muestra (Murray, 1984). Esta determinación se hizo utilizando un estuche comercial Creatinine-J, Spinreact® (España).

➤ Preparación de las muestras

Las muestras de sangre se recolectaron siguiendo el mismo procedimiento descrito en la preparación de las muestras en la sección 3.2.5.1.

➤ Procedimiento

La determinación de creatinina se realiza según las instrucciones del fabricante. El reactivo de trabajo se prepara mezclando volúmenes iguales de una solución de ácido pícrico 17.5 mM con una de hidróxido de sodio 0.29 M. 50  $\mu$ L de muestra o estándar de creatinina se colocan en tubo de reacción que contiene 500 $\mu$ L del reactivo de trabajo, el cronómetro se pone en marcha en el momento de adicionar la muestra y se lee la absorbancia a 492 nm a los 30 y 90 segundos de la adición de la muestra.

La concentración de creatinina en la muestra se calcula dividiendo la  $\Delta A$  de la muestra entre la  $\Delta A$  del patrón primario, este resultado se multiplica por la concentración del estándar de creatinina (2mg/dL) y los valores se expresan en mg de creatinina/dL. El intervalo de valores de referencia de creatinina en sangre en ratas es: 0.39-2.29 mg/dL (Krinke, *et al.*, 2000).

### 3.2.6.2 Cuantificación de nitrógeno ureico sanguíneo

La urea es un producto final del metabolismo de las proteínas y es excretada por el riñón. El nitrógeno ureico sanguíneo es inversamente proporcional a la tasa de excreción de urea, por lo que su acumulación en sangre nos indica que la urea no es excretada de manera eficiente y por tanto también es indicativo de insuficiencia renal.

➤ Fundamento

La urea presente en la muestra reacciona con el o-ftalaldehído en medio ácido originando un compuesto colorido –isoindolina- que puede leerse espectrofotométricamente a 510 nm. La intensidad de color producido es directamente proporcional a la cantidad de urea presente en la muestra (Kaplan, 1984). Esta determinación se hizo utilizando un estuche comercial Urea-37, Spinreact® (España).

➤ Preparación de las muestras

Las muestras de sangre se recolectan siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección 3.2.5.1.

➤ Procedimiento

La técnica se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. 25  $\mu$ L de muestra o patrón primario se colocan en tubo de reacción que contiene 500 $\mu$ L de o-ftalaldehído 4.8 mM; inmediatamente después se agregan 500  $\mu$ L de la solución de borato 87 mM, se agita la mezcla de reacción y se incuba durante 15 minutos a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se lee la absorbancia a 510 nm.

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

### 3.2.6.3 Cuantificación de proteínas totales en orina

La cuantificación de proteínas totales en orina se realizó mediante la determinación de proteínas totales por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) descrita en la sección 3.2.7.

#### ➤ Preparación de la muestra

Para la obtención de las muestras de orina las ratas se colocan en jaulas metabólicas y se recolecta la orina durante 24 horas, se mide el volumen de la orina y se centrifuga a 3000 rpm durante 10 min a 4°C; el sobrenadante se separa en 3 alícuotas de 1 mL y se almacenan a -80°C.

#### ➤ Procedimiento

El día del ensayo, las muestras de orina se descongelan, se toman 200 µL de cada muestra y se añade 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10%; posteriormente se agitan en un vortex, se centrifugan a 2500 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente, se desecha el sobrenadante por decantación y se agrega TCA al 10% nuevamente al precipitado. El proceso anterior se repite hasta que la solución con TCA tenga un aspecto transparente. El precipitado se resuspende en 1 mL de NaOH 0.1 M o en el volumen requerido para que el valor obtenido de absorbancia (una vez realizada la cuantificación de proteínas totales descrita en la sección 3.2.7), pueda interpolarse en la curva estándar de albúmina sérica bovina (Tabla 17). El valor de proteínas totales en las muestras de orina (mg/mL de orina) se multiplica por el volumen de orina (mL) excretado en 24 horas.

### 3.2.7 **Cuantificación de proteínas totales**

#### ➤ Fundamento

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

#### ➤ Preparación de la muestra

La preparación de las muestras se realiza conforme a cada metodología utilizada (peroxidación lipídica, proteínas oxidadas, peróxido de hidrógeno y proteínas totales en orina) y se realizan las diluciones adecuadas para el ensayo.

#### ➤ Procedimiento

En el ensayo se colocan 200 µL de muestra de homogenado de tejido, precipitado urinario (sección



3.2.6.3) o estándar de albúmina sérica bovina al 0.05% por cada tubo. Posteriormente se adiciona a todas las muestras 1 mL de la solución C (ver apéndice), se incuba durante 10 minutos y se agrega 100  $\mu$ L de la solución D con agitación simultánea. La absorbancia de las muestras se obtiene espectrofotométricamente a 660 nm 30 minutos después de la adición de la solución D. La concentración de proteínas totales se calcula interpolando la absorbancia obtenida en la curva patrón de albúmina sérica bovina (Tabla 17), y los resultados se expresan en mg de proteína/mL de muestra.

**Tabla 17.** Concentraciones de albúmina sérica bovina al 0.05% de la curva patrón para la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry.

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

### 3.2.8 Obtención y preparación de tejido renal para los análisis histológicos

Las ratas se anestesian con una dosis de pentobarbital sódico de 0.025g/Kg y los riñones se perfunden con solución Krebs Ringer y EDTA 250 mM, para la cual se emplea un catéter semirígido para canular la arteria renal y se pasa un volumen promedio de 40 mL con un flujo constante de 2.2 cc/min con la ayuda de una bomba peristáltica. Posteriormente se fijan pasando una solución de formalina, se extraen y se embeben en parafina para su preservación, corte y tinción con hematoxilina-eosina.

### 3.2.9 Análisis estadístico de los datos

Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se complementaron con la prueba Newman-Keuls. La supervivencia específica durante el protocolo de desarrollo de cáncer renal, se calculó de acuerdo al método de Kaplan-Meier y los tiempos de supervivencia se compararon usando la prueba log-rank. El efecto del disolvente utilizado y del procedimiento para la obtención del EST se analizó mediante t student no pareada. El efecto del EST sobre la incidencia y grado de avance del CCR se analizó con la prueba de Fisher. En todos los casos un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró significativo.

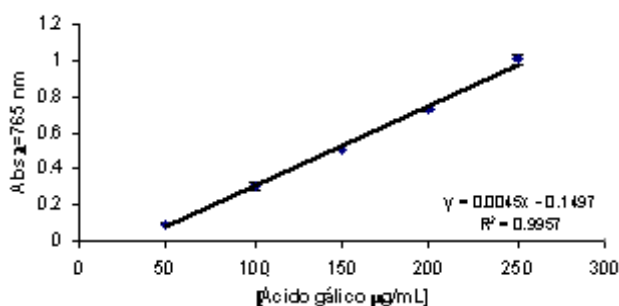
## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 SELECCIÓN DEL EXTRACTO

Con la finalidad de seleccionar el extracto de *Tamarindus indica* L. a utilizar, se prepararon varios tipos de extractos de semillas y se caracterizaron midiendo su capacidad de inactivación del radical superóxido, así como su contenido de fenoles totales. Los resultados obtenidos mediante estas determinaciones también se compararon con los de un extracto de pericarpio de *T. indica* L. preparado previamente en nuestro laboratorio. Adicionalmente, la determinación de fenoles totales nos permitió expresar la inactivación del radical superóxido por mg de fenoles totales, establecer con qué extracto (pericarpio o semillas) obtendríamos mayor cantidad de estos compuestos y con qué disolvente utilizado en la elaboración de extractos de semillas se alcanzaría una mayor eficiencia en la extracción.

#### 4.1.1 Determinación de fenoles totales en los diferentes extractos de *T. indica*

Para determinar la cantidad de fenoles totales del extracto acuoso obtenido a partir del pericarpio de esta especie, así como de los extractos de cáscara de semilla de tamarindo en etanol al 70% y etanol anhidro se realizaron diluciones seriadas, y se utilizaron aquellas cuya absorbancia pudo interpolarse en el gráfico estándar de ácido gálico (Figura 19).



**Figura 19.** Curva patrón con el estándar de ácido gálico para la determinación de fenoles totales (FT).

En la tabla 18 se muestran los resultados de la cuantificación de fenoles totales, los cuales representan el promedio de las concentraciones obtenidas con las diferentes diluciones analizadas de los extractos.

**Tabla 18.** Fenoles totales en los diferentes extractos de *T. indica*

Extracto	Fenoles totales
Pericarpio	4.33±0.624 mg FT/mL
Etanólico al 70%	15.19±0.284 mg FT/mL
Etanólico anhidro	19.63±1.310 mg FT/mL

En conjunto, los resultados de la tabla 18 muestran que la cantidad de fenoles totales en los extractos de semilla de tamarindo fue mayor que aquella obtenida en el extracto de pericarpio. Así mismo, se pudo establecer que utilizando etanol anhidro se incrementa la eficiencia de extracción de fenoles totales con

respecto al etanol al 70% (véase también figura 20). Por lo anterior se siguió trabajando sólo con el extracto de semillas de tamarindo obtenido con etanol anhidro.

#### **4.1.2 Determinación de fenoles totales en el polvo de extracto de cáscara de semillas de *T. indica* (EST) obtenido con etanol anhidro**

La administración de extractos utilizando disolventes diferentes al agua podría tener efectos adversos en los animales, aún cuando la toxicidad del disolvente utilizado sea baja, sobre todo si se administran por periodos largos de tiempo. Por otro lado, las características sensoriales de la mayoría de los disolventes diferentes al agua no son las adecuadas para una administración por vía oral. En el caso de los extractos acuosos, además de que pueden tener trazas del disolvente con el cual se extrajeron cuando se utilizaron mezclas de agua con otros disolventes en la extracción, tienen por lo general menor estabilidad porque son más susceptibles a la contaminación por microorganismos y por ende tienen menor tiempo de conservación. Con base en esto nos propusimos preparar un extracto en polvo, ya que además de evitar los inconvenientes mencionados que presentan los extractos acuosos, se facilitaría su administración en el agua de beber, se tendría un mejor control de la dosis y su estabilidad nos permitiría una mayor producción del mismo para protocolos en donde se requiere su administración por periodos prolongados.

Diversos estudios han demostrado que la estabilidad y el potencial antioxidante de los compuestos polifenólicos se modifican cuando se someten a procedimientos en los que está involucrada la temperatura (Wang, *et al.*, 2008; Siddhuraju, *et al.*, 2007; Komatsu, *et al.*, 1993). Es por ello que determinamos si la cantidad de fenoles totales así como su capacidad de inactivación del radical superóxido cambiaban por efecto de la temperatura cuando el extracto etanólico anhidro se concentraba al vacío en un rotaevaporador hasta la evaporación completa del disolvente para la obtención del EST en polvo.

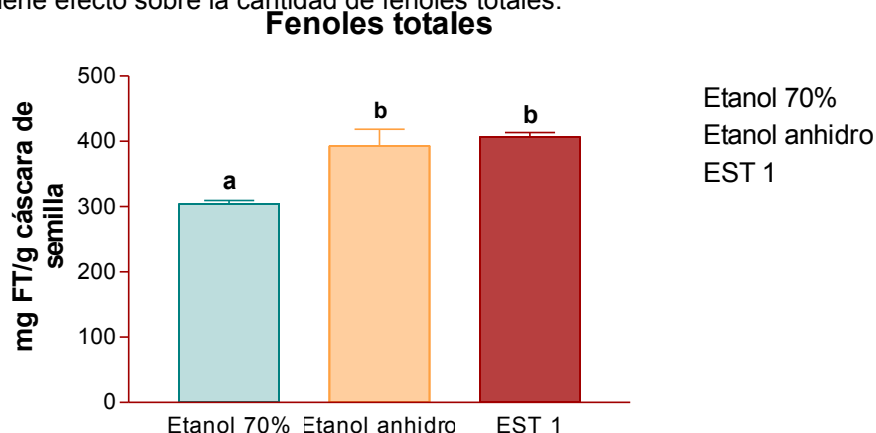
##### **➤ Ensayo 1**

Para determinar la cantidad de fenoles totales, el extracto en polvo (EST) se disolvió en agua a una concentración de 0.013 g/mL, y las diferentes diluciones a partir de esta solución nos permitieron obtener la cantidad de fenoles totales al promediar la concentración de fenoles totales obtenida en cada dilución.

La cantidad de fenoles totales en el EST en polvo disuelto en agua (0.013g/mL) en este ensayo fue de  $16.50 \pm 0.392$  mg FT/mL de solución y el rendimiento de la extracción fue de  $406.5 \pm 9.71$  mg de fenoles totales por gramo de cáscara de semilla. Para expresar la cantidad de fenoles totales por gramo de EST en polvo, se dividió la cantidad de fenoles totales ( $16.50 \pm 0.392$  mg FT/mL) entre la concentración del EST (0.013g/mL), obteniéndose como resultado  $1269 \pm 30.32$  mg FT/g EST en polvo.

En la figura 20 se muestra la cantidad de fenoles totales por gramo de cáscara de semilla de los diferentes extractos obtenidos. La cantidad de fenoles totales determinada en el extracto en polvo (EST) disuelto en agua no mostró cambio estadísticamente significativo respecto a la cantidad de fenoles totales del

extracto en etanol anhidro; esto nos indica que el procedimiento para obtener el EST en polvo a partir del extracto etanólico anhidro no tiene efecto sobre la cantidad de fenoles totales.



**Figura 20.** Efecto del disolvente utilizado (etanol al 70% y etanol anhidro) y del procedimiento para la obtención del EST sobre la cantidad de fenoles totales obtenida en cada uno de los extractos. La utilización de etanol anhidro en la elaboración del extracto incrementa la eficiencia de extracción de fenoles totales respecto al etanol al 70%. Así mismo, el procedimiento para obtener el EST en polvo a partir del extracto etanólico anhidro no tiene efecto sobre la cantidad de fenoles totales. Las barras representan la media  $\pm$  EE. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas mediante t student no pareada del extracto etanólico al 70% vs extracto etanólico anhidro y del extracto etanólico anhidro vs EST1. Columnas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa.

Para determinar que la cantidad de polvo de EST pesada realmente represente la cantidad de fenoles totales requerida, se evaluó el contenido de fenoles totales del extracto en polvo disuelto en agua a dos concentraciones, una menor y una mayor a la utilizada en el Ensayo 1 y a las cuales denominamos concentración baja y alta respectivamente y que se describen a continuación:

➤ **Concentración baja del EST (Ensayo 2)**

El cálculo teórico de fenoles totales para esta prueba se realizó a partir de los resultados obtenidos en el ensayo 1.

0.013g de extracto/mL de agua corresponden a  $16.50 \pm 0.392$  mg FT/mL de agua, por tanto:

0.013 g de extracto contienen 16.50 mg de fenoles totales

Si, por ejemplo, se desea obtener 4 mg de fenoles/mL, la cantidad que se requiere pesar del extracto en polvo por mililitro de agua es: 0.003 g

Para determinar experimentalmente la cantidad de fenoles totales, 0.03 g de polvo de EST se disolvieron en 10 mL de agua, y se realizaron las diluciones descritas en la metodología (sección 3.2.4.1). Las diluciones que pudieron interpolarse en el gráfico estándar de ácido gálico nos permitieron obtener la concentración de fenoles totales al promediar la cantidad de éstos en cada dilución.

La cantidad de fenoles totales para la concentración baja de EST fue de  $3.63 \pm 0.301$  mg/mL de solución. La cantidad de fenoles totales por gramo de extracto ( $1210 \pm 101.1$  mg FT/g EST), se obtuvo dividiendo la cantidad de fenoles totales ( $3.63 \pm 0.301$  mg/mL) entre la concentración de la solución realizada de polvo de extracto (0.003g/mL).

### ➤ **Concentración alta del EST (Ensayo 3)**

El cálculo teórico de fenoles totales para esta prueba también se realizó a partir de los resultados obtenidos en el ensayo 1.

0.013g de extracto/mL de agua corresponden a  $16.50 \pm 0.392$  mg FT/mL de agua por tanto:

0.013 g de extracto contienen 16.50 mg de fenoles totales

Si se desea obtener 20 mg de fenoles totales/mL, la cantidad que se requiere pesar del extracto en polvo por mililitro de agua es: 0.016 g

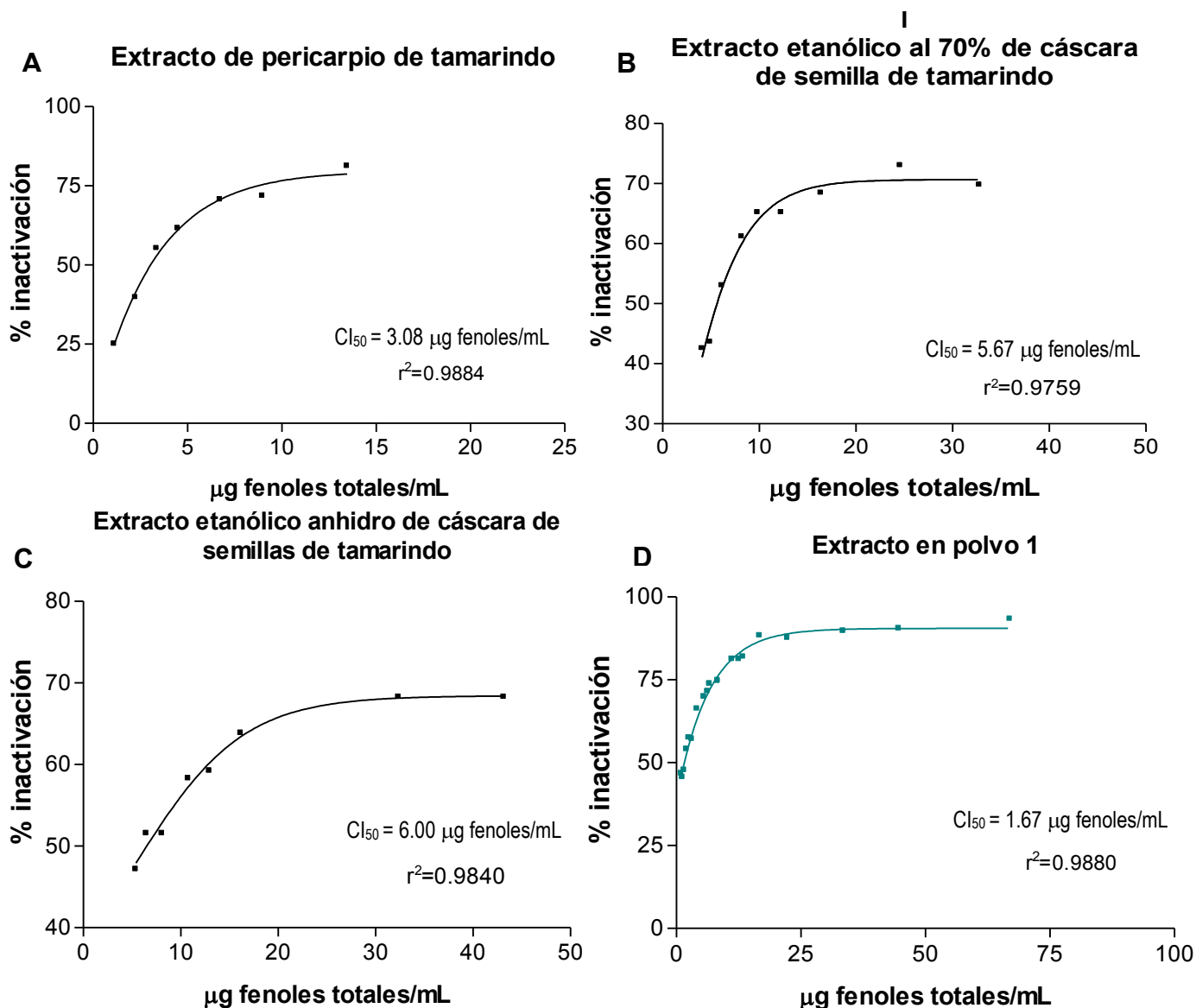
Para la determinación experimental de la cantidad de fenoles totales, 0.16 g de polvo de EST se disolvieron en 10 mL de agua, y se realizaron las diluciones descritas en la metodología (sección 3.2.4.1). Las diluciones que pudieron interpolarse en el gráfico estándar de ácido gálico nos permitieron obtener la concentración de fenoles totales al promediar la cantidad de estos en cada dilución.

La cantidad de fenoles totales por gramo de extracto ( $1146.25 \pm 105.54$  mg/g) se obtuvo dividiendo la cantidad de fenoles totales obtenida ( $18.34 \pm 0.638$  mg/mL de solución) entre la concentración de polvo de extracto en la solución realizada (0.016g EST/mL).

Los resultados de los ensayos 2 y 3 indican que la cantidad EST en polvo pesada representa la cantidad de fenoles totales requerida, es decir, la cantidad de fenoles totales que se puede obtener de manera experimental tanto a concentraciones bajas como a concentraciones altas de EST disuelto en agua, coincide con la cantidad de fenoles totales obtenida a partir del cálculo teórico.

#### **4.1.3 Determinación de la inactivación del radical superóxido por efecto de los extractos obtenidos**

Para evaluar el potencial antioxidante de los extractos obtenidos, se midió la capacidad de inactivación del radical superóxido *in vitro*, esto, a su vez, nos permitió identificar en qué extractos del tamarindo (semilla o pericarpio) se obtenía una mayor inactivación de este radical y determinar el efecto del disolvente utilizado en el procedimiento de extracción. En la figura 21 se muestra la inactivación de radical superóxido en función de la cantidad de fenoles totales en la celda de reacción, así como la concentración de fenoles totales necesaria para inhibir en un 50% la producción del radical superóxido ( $CI_{50}$ ) de cada uno de los extractos. Estos resultados demuestran que los extractos tanto de la semilla, como del pericarpio de *T. indica* L. tienen una  $CI_{50}$  muy similar (1.08 - 4.41  $\mu$ g FT/mL) y que la capacidad de inactivación del radical superóxido es muy buena, ya que es mayor que la de otros extractos polifenólicos también evaluados en nuestro laboratorio, como el extracto polifenólico de semillas de uva (GSPE) ( $CI_{50}=17.5$   $\mu$ g de extracto/mL), y la de antioxidantes comúnmente utilizados como la vitamina C ( $CI_{50}=120$   $\mu$ g/mL) (Cruz, 2007).



**Figura 21.** Curvas de inactivación del radical superóxido *in vitro* en función de la cantidad de fenoles totales del extracto de pericarpio (Panel A), extracto etanólico al 70% de cáscara de semilla (Panel B), extracto etanólico anhidro de cáscara de semilla (Panel C) y extracto en polvo de cáscara de semilla (EST 1) (Panel D). Los diferentes extractos presentan una notable capacidad de inactivación de radical superóxido.

De acuerdo a todos estos resultados, y a las siguientes ventajas, se decidió utilizar el extracto en polvo de semillas de *T. indica* en nuestros estudios:

- Menor número de horas requerido para el proceso de maceración.
- Menor cantidad de disolvente utilizado.
- Obtención de mayor cantidad de fenoles totales por materia prima.
- Eliminación total del disolvente (disminuyendo de esta forma los riesgos de toxicidad inherentes).
- Mayor tiempo de conservación.
- Mejoramiento de las características sensoriales (pH, sabor) haciendo más fácil su administración en el agua de beber, así como el control de la dosis.

## 4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS SUBSECUENTES DE CÁSCARA DE SEMILLAS DE *T. indica*

Durante el desarrollo de los diferentes protocolos fue necesario preparar varios extractos subsecuentes de semillas de *Tamarindus indica* L. (EST) (Tabla 19). La caracterización de cada extracto se realizó también mediante la determinación de fenoles totales e inactivación del radical superóxido.

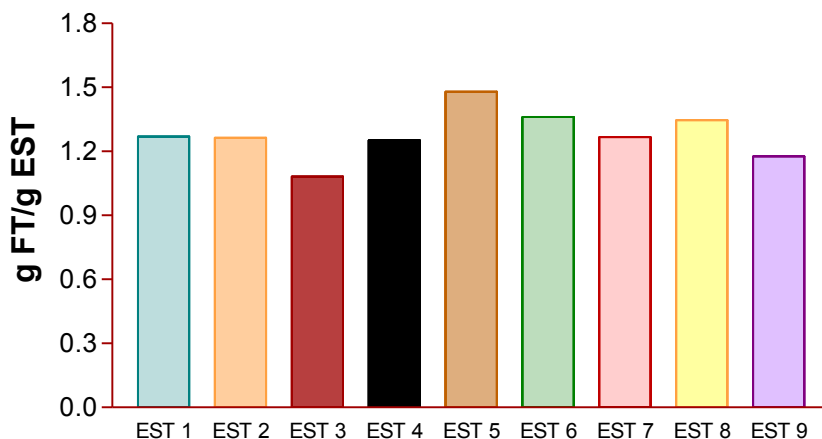
**Tabla 19.** Protocolos en los que se utilizaron los diferentes extractos elaborados.

No. de extracto (EST)	Protocolo
1	Dosis fenoles totales
2	Protocolo crónico I
3	Protocolo crónico I
4	Protocolo crónico II
5	Protocolo crónico II
6	Protocolo crónico II
7	Protocolo crónico II
8	Protocolo crónico II
9	Protocolo crónico II

### 4.2.1 Cuantificación de fenoles totales e inactivación del radical superóxido de los extractos subsecuentes

Para realizar la determinación de fenoles totales e inactivación del radical superóxido se prepararon las diluciones descritas en la sección de metodología a partir de una solución “stock” de concentración alta (solución “stock” 1) y otra con concentración baja (solución “stock” 2). La realización de estas dos soluciones “stock” permitió cubrir todo el rango para expresar el porcentaje de inactivación del radical superóxido en función de concentración de fenoles totales presentes en los extractos.

En la figura 22 están los resultados de la cantidad de fenoles totales obtenida para cada EST elaborado en distintas ocasiones. Los resultados presentados indican que la cantidad de fenoles totales de los EST preparados en diferentes ocasiones es muy similar (Fenoles totales) lo que se puede interpretar como

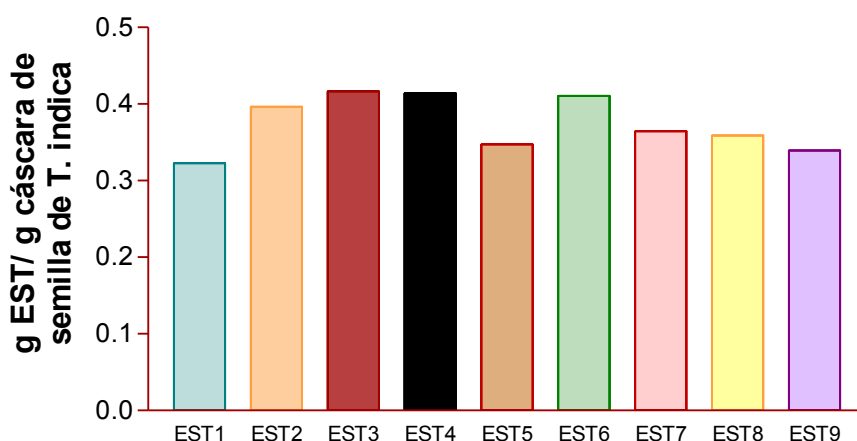


**Figura 22.** Cantidad de fenoles totales en cada uno de los extractos obtenidos en diferentes ocasiones. El valor de fenoles totales por gramo de EST indica que la materia prima utilizada para la elaboración de cada EST es muy similar.

una reproducibilidad de la técnica de extracción. Por otro lado, los valores de fenoles totales por gramo de EST obtenidos nos indicaría que todo el EST está compuesto de polifenoles, lo cual es poco probable ya que se sabe que la cáscara de semillas tiene otros componentes además de los polifenoles (Bhattacharya, *et al.*, 1994), y que se pueden extraer con el procedimiento para la obtención del EST. Esto se puede explicar por la inespecificidad de la reacción en el método que utilizamos para la determinación de fenoles totales, ya que se ha reportado en la literatura que varios compuestos reductores pueden interactuar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, lo que podría conducir a la sobreestimación del contenido de los polifenoles (Georg, *et al.*, 2005).

Además de la cantidad de fenoles totales obtenida para cada EST, se determinó la cantidad de EST obtenida por g de cáscara de semillas, es decir el rendimiento de cada extracción. En la figura 23 se puede observar la comparación del rendimiento de extracción para cada uno de los extractos preparados y podemos concluir que la cantidad de EST obtenido por gramo de cáscara de semilla utilizada se mantuvo constante ( $0.374 \pm 0.036$  g EST/g cáscara de semilla), lo que confirma que la técnica de extracción es reproducible y que la materia prima de la cual se está partiendo es similar al respecto.

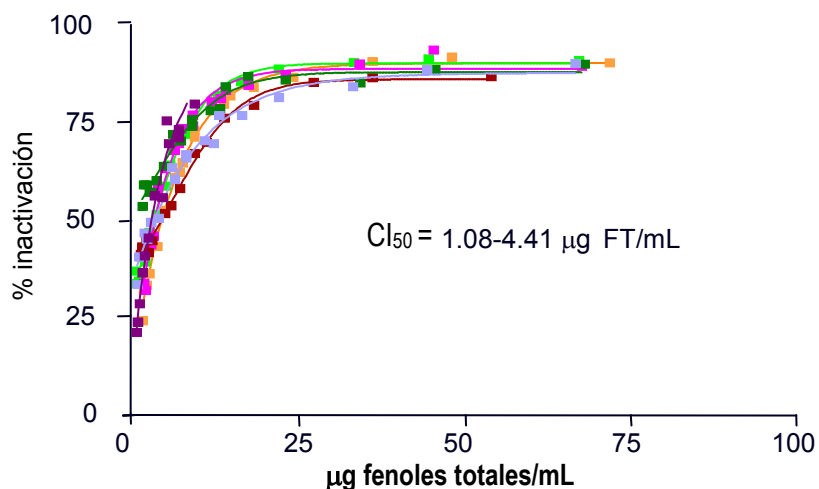
### Rendimiento de la extracción



**Figura 23.** Rendimiento de la extracción de cada uno de los extractos utilizados en los protocolos realizados. La similitud en la cantidad de EST obtenido por gramo de cáscara de semilla de los ESTs preparados en diferentes ocasiones indica que el método de extracción es reproducible y la materia prima es similar al respecto.

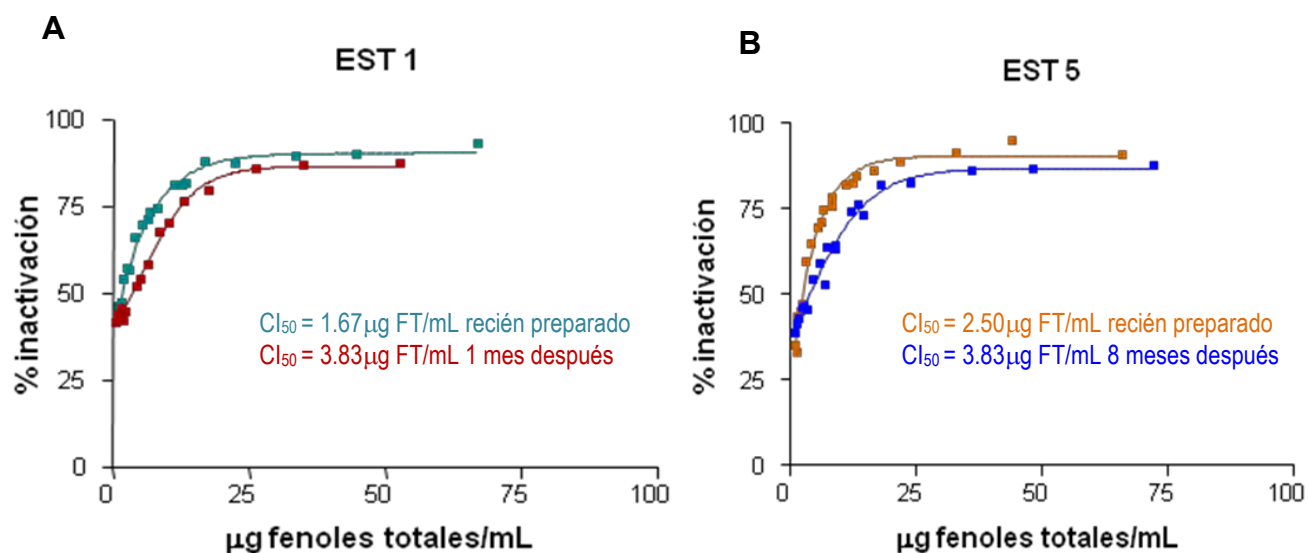
Otra de las determinaciones que nos permitieron la caracterización de los EST elaborados en distintas ocasiones, fue la inactivación del radical superóxido. Esta prueba se realizó para cada EST recién preparado. Las curvas de inactivación del radical superóxido presentadas en la figura 24 para los diferentes extractos (EST) muestran valores de  $CI_{50}$  de 1.08-4.41  $\mu$ g de fenoles totales/mL. Estos resultados nos permiten concluir que la capacidad antioxidante entre los extractos es muy similar y son una evidencia más de la reproducibilidad del método de extracción y de la similitud de la materia prima.





**Figura 24.** Curvas de porcentaje de inactivación de radical superóxido para los extractos subsecuentes. La  $CI_{50}$  de los EST obtenidos en diferentes ocasiones indica que la capacidad de inactivación del radical superóxido es muy similar.

De igual forma, se determinó la inactivación de radical superóxido en algunos de los ESTs a diferentes tiempos para evaluar su estabilidad a largo plazo. La figura 25 presenta la inactivación de radical superóxido del EST 1 en el momento de su obtención y un mes después de su preparación (Panel A) y del EST 5 en el momento de su obtención y 8 meses después de su preparación (Panel B). Los valores de  $CI_{50}$  de los ESTs 1 y 5 determinada 1 y 8 meses después de su preparación, respectivamente, son muy similares y todavía están dentro del rango de  $CI_{50}$  obtenido en el momento de la preparación de cada uno de los extractos realizados para los diferentes protocolos (Figura 24), por lo que, a partir de estos resultados, podemos concluir que el EST presenta buena estabilidad a largo plazo.

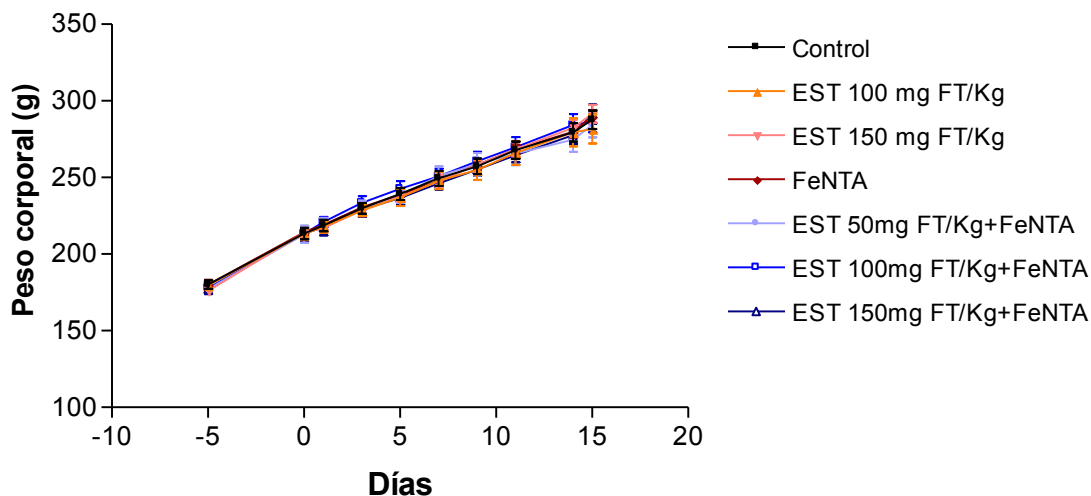


**Figura 25.** Curvas de porcentaje de inactivación del radical superóxido a diferentes concentraciones de los extractos EST1 (Panel A) y EST5 (Panel B) a diferentes tiempos. La  $CI_{50}$  obtenida para cada EST en diferentes tiempos indica que la capacidad de inactivación del radical superóxido no cambió sustancialmente y por tanto se concluye que los ESTs presentan buena estabilidad a largo plazo.

### 4.3 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS A UTILIZAR DEL EXTRACTO DE SEMILLAS DE *T. indica*

Con la finalidad de seleccionar la dosis más adecuada de EST a utilizar en el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal, se realizó un protocolo agudo en donde se indujo estrés oxidante por exposición a FeNTA. En este protocolo el EST se administró en el agua de beber utilizando dosis de 50, 100 y 150 mg de fenoles totales/Kg/día durante 16 días previos a la administración del FeNTA. Las ratas se sacrificaron por decapitación 1 hora después de la administración del carcinógeno (véase sección 3.1.2). La selección de la dosis más adecuada se realizó con base en los resultados obtenidos en las pruebas de daño oxidante a lípidos y proteínas y de niveles de peróxido de hidrógeno en riñón. En esta selección también se consideraron los efectos negativos que se pudieran observar con las diferentes dosis de extracto, como efectos de toxicidad, disminución en el consumo del extracto a dosis altas, inducción de estrés oxidante *per se* o exacerbación del estrés oxidante inducido por FeNTA.

En la figura 26 se muestra el crecimiento de los grupos estudiados desde la administración del EST hasta el término de este estudio. Con base en estos resultados se puede decir que el consumo de las diferentes dosis utilizadas del extracto de semillas de tamarindo (EST) no afecta el crecimiento de las ratas durante los 16 días de su administración. Además, no se observó diferencia en el volumen de agua consumido entre los diferentes grupos. Esto es muy importante ya que gracias a estos resultados las dosis recibidas de EST fueron muy cercanas a las dosis deseadas (Tabla 20).



**Figura 26.** Peso corporal de los animales de los diferentes grupos estudiados para la selección de la dosis de EST. El EST a las concentraciones de 50, 100 y 150 mg FT/Kg/día no afecta el peso corporal de las ratas durante los 16 días de su administración indicando que el EST no presenta efectos antinutricionales. Cada punto representa la media de acuerdo al número de ratas por grupo mostrados en la Tabla 4  $\pm$  EE.

#### 4.3.1 Determinación de estrés oxidante en riñón

Las determinaciones de estrés oxidante en este estudio agudo nos permitieron establecer si las diferentes dosis del extracto de semillas de tamarindo ofrecen protección *in vivo*, ya que, a pesar de que se ha demostrado que los extractos de la semilla de tamarindo tienen actividad antioxidante *in vitro* (Tsuda, *et al.*, 1994; Soong, *et al.*,

2004; Komutarin, *et al.*, 2004; Sudjaroen, *et al.*, 2005; Chanwitheesuk, *et al.*, 2005; Ramos, *et al.*, 2003; Siddhuraju *et al.*, 2007), la actividad antioxidante *in vivo* está poco estudiada hasta el momento.

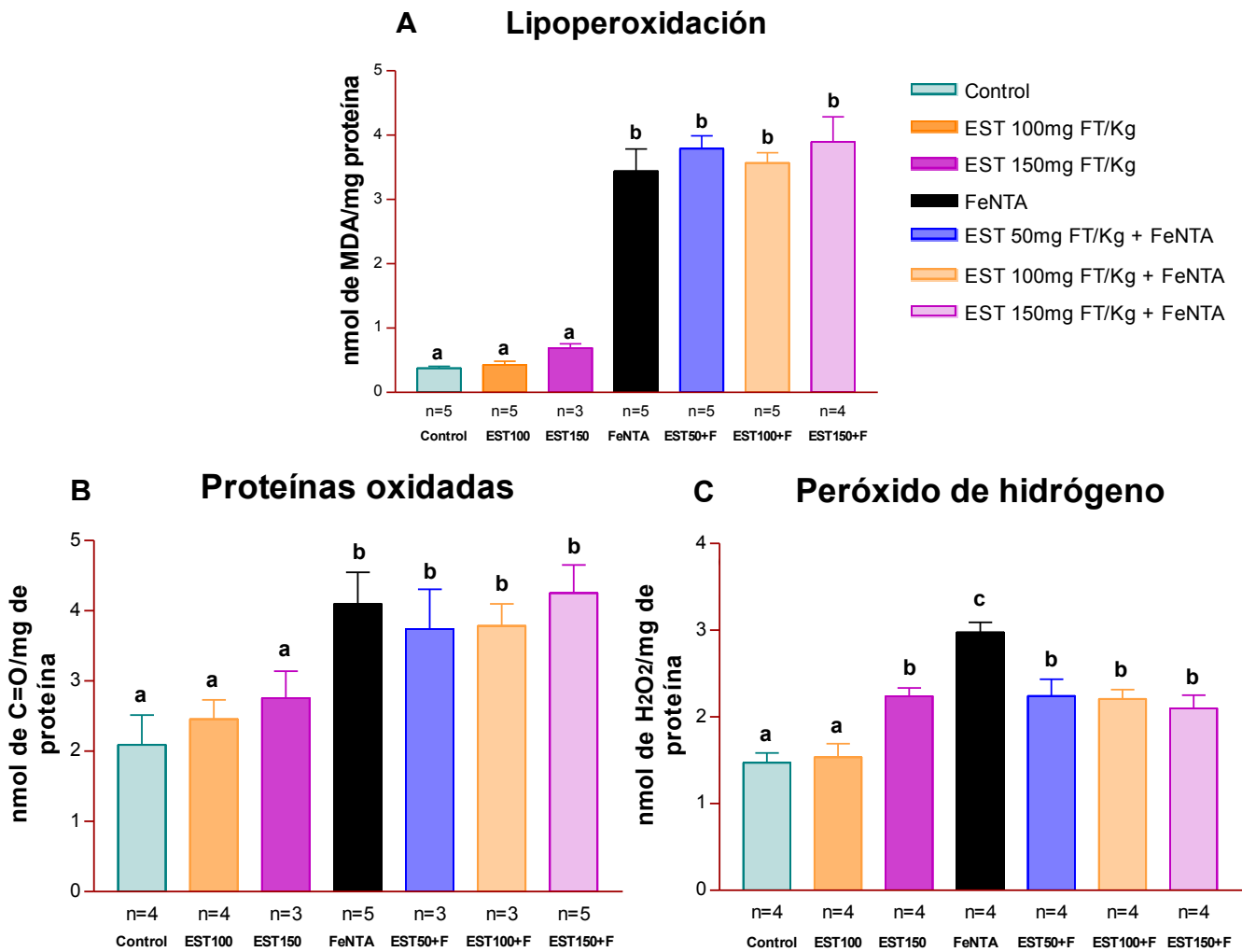
**Tabla 20.** Volumen del extracto bebido y dosis experimental de fenoles totales en los grupos estudiados del protocolo agudo.

Dosis teórica de fenoles totales	Vol. bebido de extracto o agua por día/rata	Dosis experimental de fenoles totales
Controles	29.8±2.18 mL	
EST 100 mg FT/Kg	31.58±7.50 mL	112.89 ± 35.56 mg FT/Kg
EST 150 mg FT/Kg	27.79±3.19 mL	149.04 ± 29.67 mg FT/Kg
FeNTA	31.49±3.09 mL	
EST 50 mg FT/Kg + FeNTA	29.99±3.42 mL	52.08 ± 8.88 mg FT/Kg
EST100 mg FT/Kg + FeNTA	34.227±5.414 mL	121.95 ± 28.30 mg FT/Kg
EST150 mg FT/Kg + FeNTA	28.93±3.91 mL	145.51 ± 32.22 mg FT/Kg

Los resultados presentados en la figura 27 muestran que el EST *per se* no tiene efecto pro-oxidante hasta una dosis de 100 mg FT/Kg. También cabe destacar que a dosis más altas (150 mg FT/Kg) el EST está induciendo un efecto pro-oxidante *per se*, ya que, se obtuvo diferencia estadísticamente significativa en la producción de peróxido de hidrógeno con respecto al grupo control. Por otro lado, podemos ver que el EST después de la administración de FeNTA no logró proteger contra la lipoperoxidación (Panel A) y daño oxidante a proteínas (Panel B) inducidos por el FeNTA con ninguna dosis. En cambio, los resultados de la cuantificación de peróxido de hidrógeno (Panel C) muestran que las diferentes dosis de EST disminuyeron parcialmente la producción incrementada de peróxido de hidrógeno por FeNTA. Esta disminución en la producción de peróxido de hidrógeno fue similar con las diferentes dosis estudiadas (EST 50, 100 y 150 mg FT/Kg + FeNTA).

En las pruebas de lipoperoxidación y proteínas oxidadas (Figura 27) se esperaba que el EST disminuyera el estrés oxidante producido por FeNTA, sin embargo, no se observó este efecto protector, lo cual puede deberse a que la dosis utilizada o el tiempo de administración del extracto no fueron suficientes para evitar el estrés oxidante tan alto provocado por la dosis de FeNTA; a pesar de esto, decidió utilizarse este extracto debido a que en los estudios crónicos se les estaría administrando a los animales durante mucho tiempo.

El hecho de que el EST a las diferentes dosis utilizadas en los grupos EST+FeNTA haya disminuido los niveles de peróxido de hidrógeno producidos por FeNTA (Figura 27, Panel C), pero no se haya tenido protección contra la lipoperoxidación y la oxidación de proteínas (Figura 27, Paneles A y B), podría deberse al tiempo que requieren los diferentes mecanismos de degradación o biotransformación a los cuales están sujetas estas biomoléculas; es decir, la eliminación de las proteínas oxidadas y el producto de la lipoperoxidación (malondialdehído) pueden llevarse a cabo en un tiempo mayor que la del peróxido de hidrógeno, ya que este último puede reaccionar muy rápido disminuyendo sus niveles y ocasionando por ejemplo la activación de vías de señalización (Neill *et al.*, 2002; Veal *et al.*, 2007). Por otro lado, el peróxido de hidrógeno no es la única especie involucrada en el estrés oxidante producido por FeNTA, por lo que puede haber otras EROs que aún estén produciendo el daño observado en los lípidos y las proteínas.



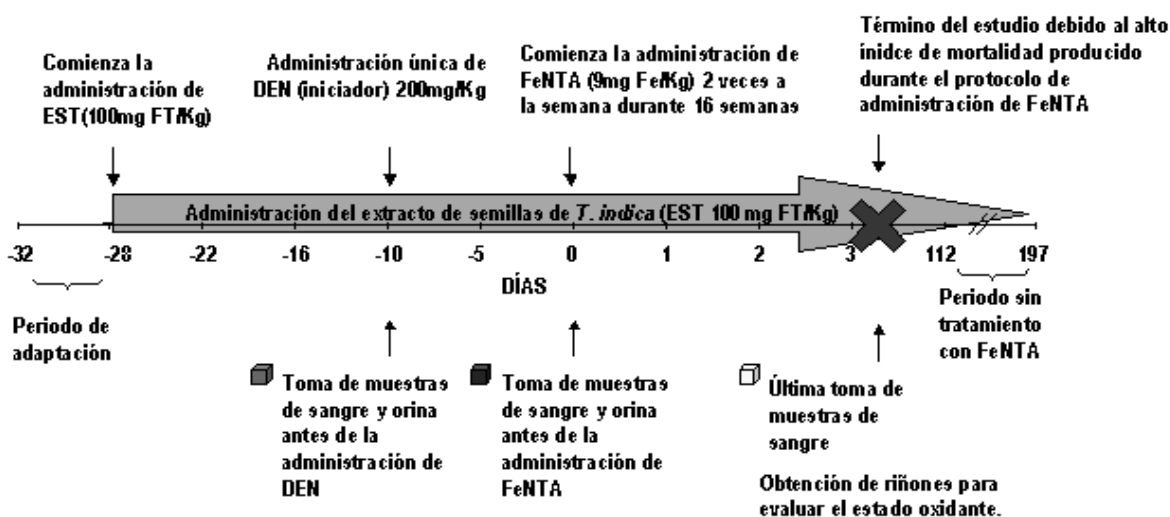
**Figura 27.** Efecto de la administración de diferentes dosis del extracto de semillas de tamarindo (EST) durante 15 días sobre la lipoperoxidación (Panel A), daño oxidante a proteínas (Panel B) y producción de peróxido de hidrógeno (Panel C) en riñón 1 hora después de la administración de FeNTA. Las diferentes dosis de EST no lograron proteger la lipoperoxidación y daño oxidante a proteínas producidas una hora después a la exposición a FeNTA. El EST a la dosis de 150 mg FT/Kg/día presentó efecto pro-oxidante en los resultados de cuantificación de peróxido de hidrógeno y las diferentes dosis de EST lograron disminuir la producción de peróxido de hidrógeno de manera parcial por exposición a FeNTA. Las barras representan la media  $\pm$  EE. Columnas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa.

El efecto pro-oxidante *per se* observado con la dosis más alta de EST utilizada (150 mg FT/Kg) en la cuantificación de peróxido de hidrógeno (Figura 27, Panel C), puede atribuirse a propiedades de los polifenoles diferentes a su capacidad antioxidante que se han reportado en la literatura como su actividad reductora de metales o del oxígeno molecular (Sakihama, *et al.*, 2002; Heim *et al.*, 2002; Lee, *et al.*, 2006; Rietjens, *et al.*, 2002). Por otro lado, la actividad pro-oxidante de los polifenoles no necesariamente es perjudicial, ya que es un mecanismo por el cual estas moléculas inducen la activación de defensas antioxidantes (López-Lázaro, *et al.*, 2007; Weber, *et al.*, 2007). De hecho, se observó que la dosis de EST que tuvo un efecto pro-oxidante, a su vez protegió contra el aumento en los niveles de peróxido de hidrógeno producidos por FeNTA, lo que puede deberse precisamente a la activación de las defensas antioxidantes, o bien que al encontrarse el EST en exceso parte de éste pueda reaccionar con el FeNTA bloqueando así sus efectos como pro-oxidante.

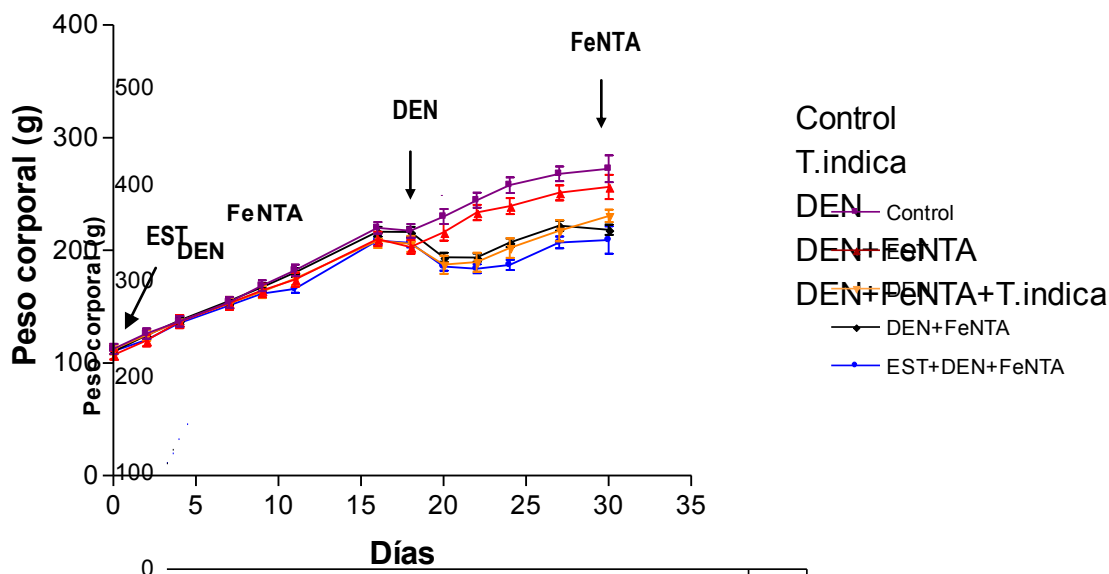
Entonces, con base en los resultados obtenidos en estas pruebas se seleccionó la dosis de EST de 100 mg FT/Kg para la realización de los protocolos de inducción de CCR por exposición crónica a FeNTA porque disminuyó de igual forma la producción de peróxido de hidrógeno con respecto a la dosis más alta y no indujo efecto pro-oxidante.

#### 4.4 PROTOCOLO I

Este protocolo contemplaba los pasos explicados en la sección de diseño experimental; sin embargo, el estudio se vio interrumpido debido a la alta mortalidad en las ratas producida por la administración de FeNTA (9 mg Fe/Kg). La primera administración de FeNTA indicada en el día 0 (Figura 28) produjo un índice de mortalidad del 64 y 60% para los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA respectivamente. A las ratas restantes (9 ratas del grupo DEN+FeNTA y 10 del grupo EST+DEN+FeNTA) se les administró una segunda dosis de FeNTA el día 3; no obstante, a las 24 horas murieron el 74% del grupo DEN+FeNTA y 70% del grupo EST+DEN+FeNTA, por lo que se decidió realizar el sacrificio de todas las ratas restantes de los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA así como las ratas de los grupos Control, DEN, EST en el día 4 de este estudio (24 horas después de la segunda administración de FeNTA 9 mg Fe/Kg), para la obtención de muestras y realizar las determinaciones de estrés oxidante y de función renal. El gráfico de crecimiento de los grupos estudiados en este protocolo (Figura 29) nos permitió observar una disminución considerable en el peso corporal en los grupos tratados con N-dietilnitrosamina (DEN), DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA desde el día siguiente de la administración de DEN. Este peso corporal se mantuvo en un nivel bajo hasta el final del estudio, aunque con la misma tendencia de crecimiento que el grupo control. Por otro lado, la curva de crecimiento del grupo tratado con EST (100 mg FT/Kg), no fue diferente estadísticamente a la del grupo control, por lo que podemos decir que el EST administrado durante el estudio (30 días aproximadamente) no tiene efectos antinutricionales.

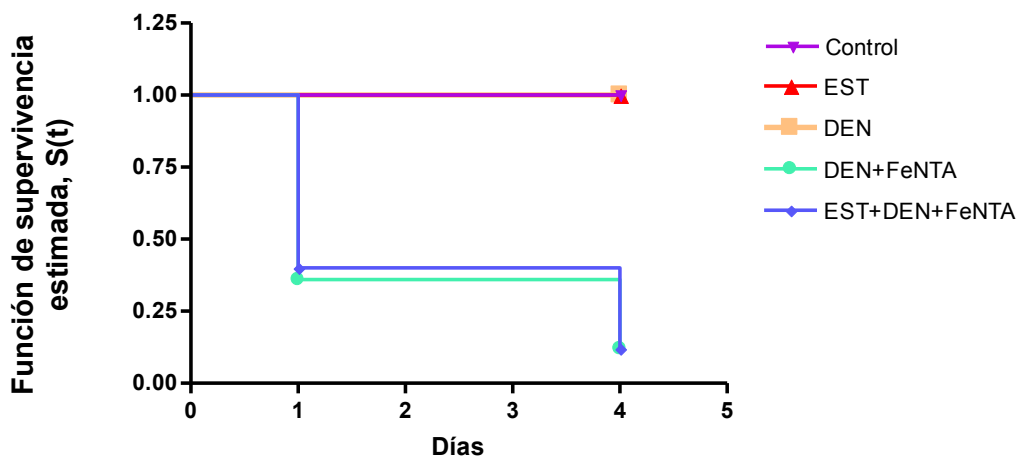


**Figura 28.** Diseño experimental del protocolo I. El estudio se vio interrumpido debido al alto índice de mortalidad en los animales producida por la administración de FeNTA (9 mg Fe/Kg).



**Figura 29.** Peso corporal para cada grupo de estudio del protocolo I. El EST a la dosis de 100 mg FT/Kg/día no afecta el peso corporal de las ratas durante los 30 días de su administración, indicando que el EST no tiene efectos antinutricionales. La exposición a la N-dietilnitrosamina (DEN) disminuyó de manera considerable el peso corporal de los animales desde el día siguiente de su administración en todos los casos. Cada punto representa la media  $\pm$  EE del número de ratas mostradas en la tabla 5.

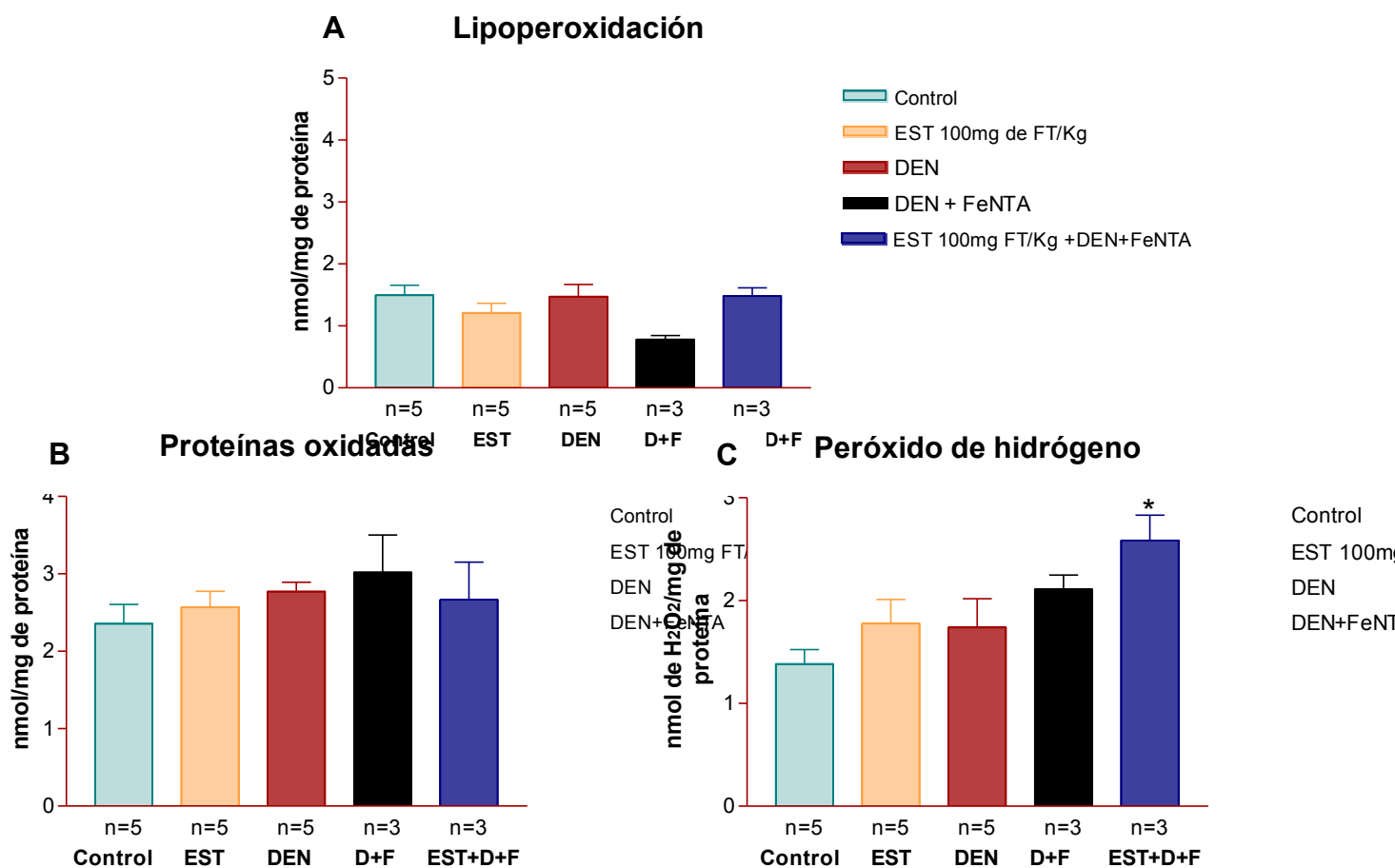
La gráfica de supervivencia de los grupos de estudio se obtuvo calculando el producto límite estimado Kaplan-Meier en función del tiempo, bajo el procedimiento descrito en la sección 3.1.6 (Figura 30). El tiempo de supervivencia medio para los grupos de estudio DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA fue de 1 día en ambos casos. Los resultados del análisis estadístico indican que no hay diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de estos dos grupos y ambos son diferentes con respecto al grupo control. Los grupos EST y DEN presentaron el mismo comportamiento que el grupo control. Por otro lado, el EST en el grupo EST+DEN+FeNTA tampoco revirtió la mortalidad producida por el tratamiento con DEN+FeNTA. El hecho de que no se haya encontrado protección por el EST en la supervivencia ni en la mortalidad era de esperarse ya que la dosis de FeNTA utilizada (9 mg Fe/Kg) fue demasiado alta y el daño producido por el carcinógeno evidentemente fue excesivo.



**Figura 30.** Gráfica de supervivencia Kaplan-Meier para los grupos de estudio del protocolo I. El tiempo de supervivencia para los grupos DEN+FeNTA y EST+DEN+FeNTA fue de 1 día. El análisis estadístico indica que no hay diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de estos dos grupos y ambos son diferentes respecto al grupo control, por lo que el EST no tuvo efecto en la supervivencia debido al daño excesivo producido por la dosis de FeNTA (9 mg Fe/Kg).

#### 4.4.1 Determinación del estrés oxidante en riñón

Ningún grupo de estudio presentó diferencia estadísticamente significativa en las determinaciones de peroxidación lipídica y proteínas oxidadas presentadas en la figura 31 (Panel A y B). Esto significa que al tiempo en que se sacrificaron las ratas (menos de 24 horas después de la segunda administración de 9 mg Fe/Kg de FeNTA) los niveles proteínas y lípidos oxidados están en sus niveles normales. También es importante señalar que la administración única de DEN no produjo daño oxidante bajo las condiciones de este estudio. Estos resultados concuerdan con los resultados ya obtenidos en el laboratorio donde ya se había encontrado que el FeNTA produce el mayor estrés oxidante una hora después de su administración el cual disminuye considerablemente a las 3 horas, incluso con una dosis mayor a la utilizada en este estudio (15 mg Fe/Kg), y llega a los niveles normales a las 6 horas (Cruz, 2007; Dávalos, 2006).



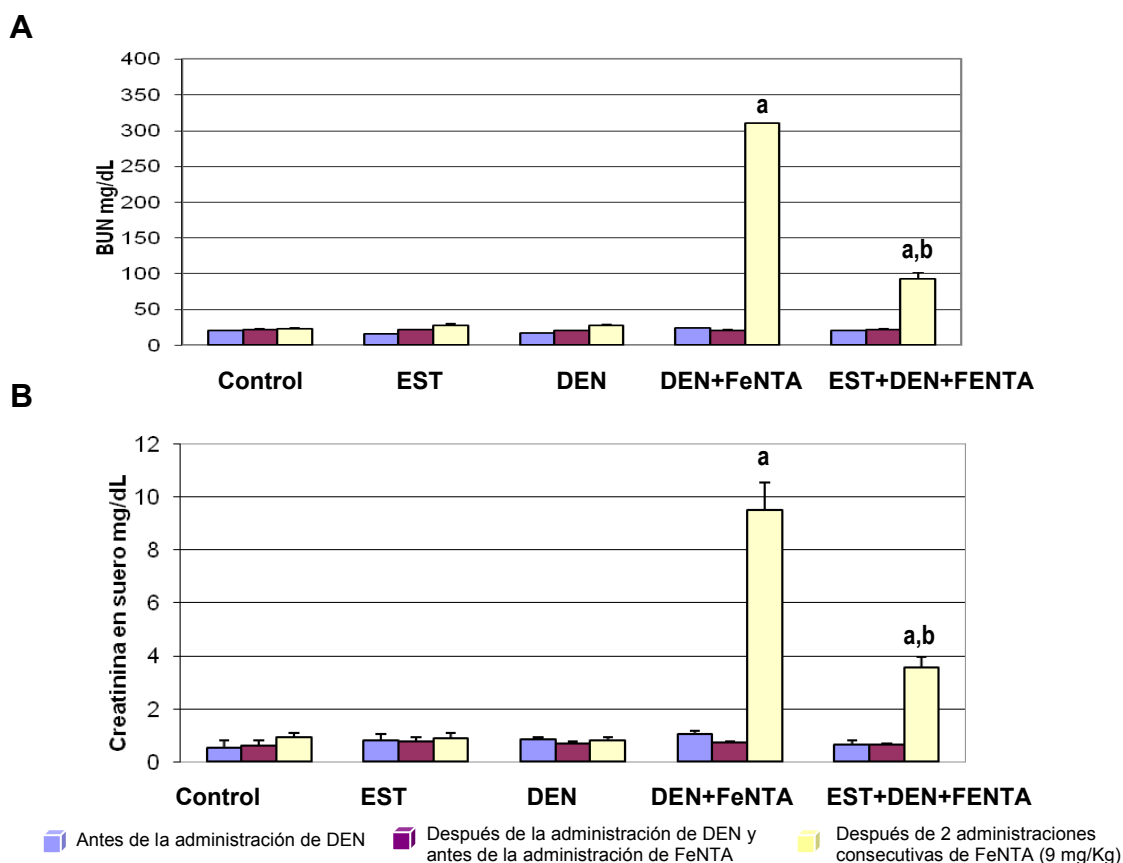
**Figura 31.** Marcadores de estrés oxidante en riñón al término del protocolo I. Lipoperoxidación (Panel A), proteínas oxidadas (Panel B) y producción de peróxido de hidrógeno (Panel C). Ningún grupo de estudio presentó alteraciones en los niveles de lipoperoxidación y proteínas oxidadas a las 24 horas después de la segunda administración de FeNTA a la dosis de 9 mg Fe/Kg. En el caso de la cuantificación de peróxido de hidrógeno la administración conjunta de EST(100 mg FT/Kg/día), DEN y FeNTA aumenta los niveles de peróxido de hidrógeno respecto al control. Las barras representan la media  $\pm$  EE. \* $p > 0.05$  vs Control.

Por otro lado, los resultados de cuantificación de peróxido de hidrógeno mostrados en el panel C de la figura 31 nos indican que sólo la administración conjunta de EST, DEN y FeNTA provocan un aumento de la concentración de peróxido de hidrógeno estadísticamente significativo con respecto al grupo control, ya que los otros grupos donde solo se administró EST, DEN o DEN+FeNTA son estadísticamente iguales al grupo control.

El aumento en los niveles de peróxido de hidrógeno en el grupo EST+DEN+FeNTA puede deberse, al menos en parte, a la combinación de los compuestos polifenólicos del EST y el Fe<sup>3+</sup> del FeNTA, ya que en presencia de metales se ha visto que estos compuestos pueden favorecer la formación de EROs, y entre estas, el peróxido de hidrógeno (Sakihama, *et al.*, 2002; Lee, *et al.*, 2006; Rietjens, *et al.*, 2002).

#### 4.4.2 Determinación de función renal

De acuerdo al esquema de la figura 28, se realizaron 3 tomas de muestra de sangre durante el desarrollo del protocolo I. En la figura 32 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de BUN (Panel A) y creatinina en suero (Panel B) donde la primera muestra de sangre se representa en barras de color azul, la cual se tomó 18 días después de que se inició de la administración del EST y justo antes de la administración de DEN a los grupos correspondientes. Los resultados de BUN y creatinina en suero de la segunda muestra de sangre, la cual se recolectó 10 días después de la administración de DEN y antes de la primera administración de FeNTA, se representan en barras color rojo, y los resultados de la última toma de muestra, que se realizó el día del sacrificio adelantado, es decir, 24 horas después de la administración de la segunda dosis de FeNTA, se representan en barras de color amarillo. Los niveles elevados de BUN y creatinina



**Figura 32.** Determinación de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) (Panel A) y creatinina en suero (Panel B) en diferentes días del desarrollo del protocolo I en los diferentes grupos estudiados. La insuficiencia renal severa producida por dos administraciones consecutivas de FeNTA (9 mg Fe/Kg) disminuyó considerablemente por el tratamiento con EST (100mg FT/Kg/día) en el grupo EST+DEN+FeNTA. Las barras representan la media ± EE. a= Diferente al control. b= Diferente a DEN+FeNTA.



en suero observados en el grupo DEN+FeNTA son indicativos de insuficiencia renal severa, la cual se previno de manera significativa con el EST a la dosis de 100mg FT/Kg en el grupo EST+DEN+FeNTA. También es importante indicar que el tratamiento sólo con el EST o con DEN no produce alteraciones en la función renal. Nuestros resultados coinciden con datos reportados en la literatura en donde los niveles de BUN y creatinina en suero de animales tratados con FeNTA han mostrado valores 3 veces más altos con respecto al control en estudios realizados a las 12 horas (Iqbal, *et al.*, 1998) y 18 horas (Jahangir, *et al.*, 2006) después de su administración a una dosis de 9 mg Fe/Kg en ratas Wistar; en nuestro caso, los niveles encontrados de estos marcadores fueron 10 veces más altos (cuando se administraron de manera conjunta el DEN y el FeNTA) con respecto al control, sugiriendo que el DEN podría tener efecto sinérgico sobre la insuficiencia renal aguda provocada por FeNTA.

Otra observación importante fue el daño a nivel macroscópico del riñón (resultados no mostrados). En el grupo al que se administró DEN+FeNTA se observó un cambio considerable en la morfología del riñón como aumento en el tamaño, cambio en la coloración e hinchazón. En cambio, el EST (EST+DEN+FeNTA) lo disminuyó de manera considerable.

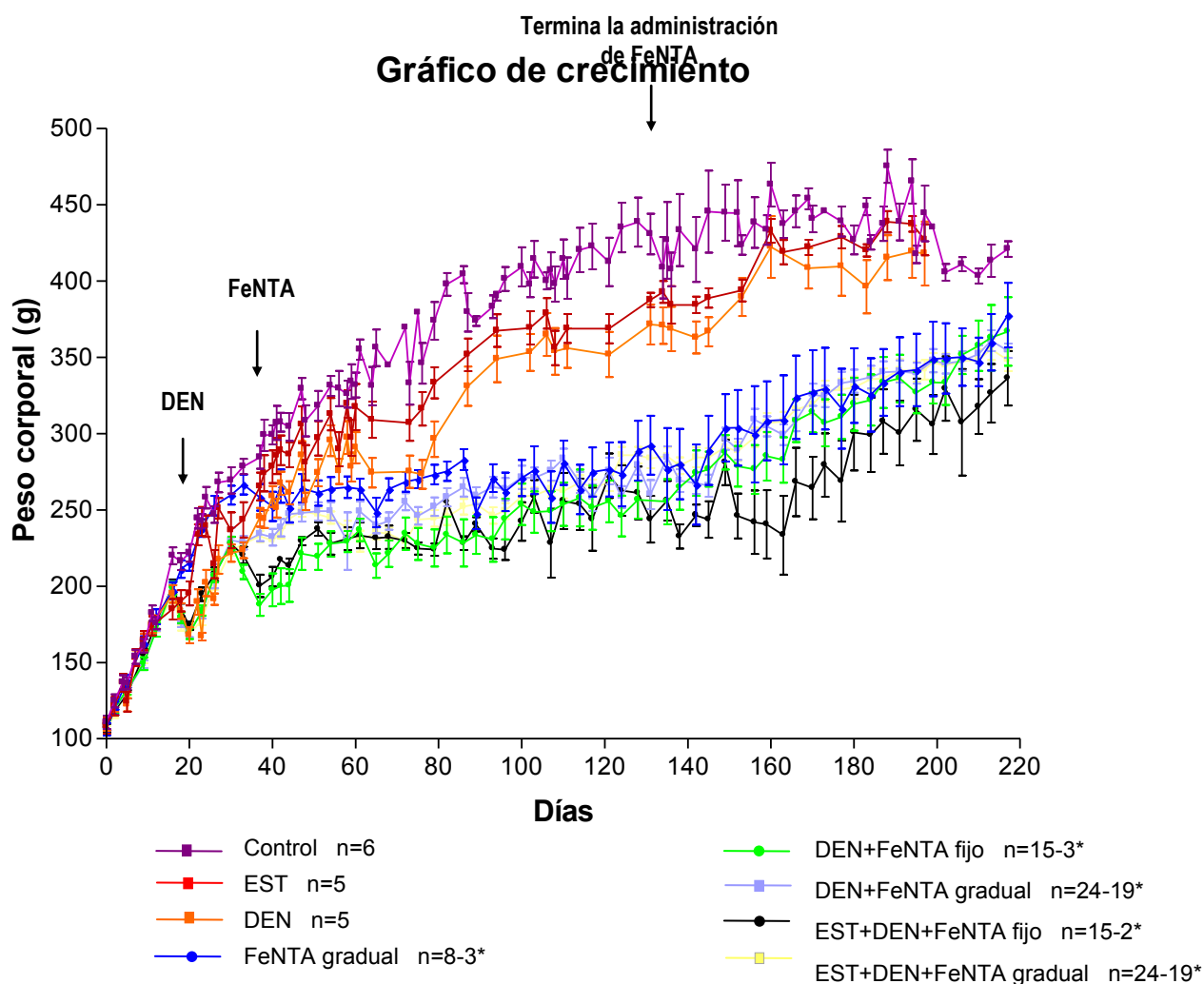
De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió seguir el otro esquema de tratamiento con FeNTA para la inducción de cáncer renal (Jahangir *et al.*, 2006; Khan, *et al.*, 2005), en donde se utilizaron dosis iniciales menores del carcinógeno que se incrementaron de manera paulatina hasta llegar a la dosis de 9 mg Fe/Kg.

#### **4.5 PROTOCOLO II**

En este protocolo se siguió el esquema de tratamiento que comienza con dosis bajas que van desde 3 o 5 mg Fe/Kg hasta llegar a la dosis de 9 mg Fe/Kg dos veces por semana (Athar *et al.*, 1998) debido a la alta mortalidad observada en el protocolo I (FeNTA gradual). No obstante, se decidió incluir grupos tratados con FeNTA a una dosis fija de 9 mg Fe/Kg (a los que denominamos FeNTA fijo) para corroborar los resultados obtenidos anteriormente. En realidad, en el esquema “FeNTA fijo” se comenzó con una dosis más baja de FeNTA (7 mg Fe/Kg) debido a la mortalidad producida otra vez en un grupo piloto tratado con 9 mg Fe/Kg (datos no mostrados).

El gráfico de crecimiento de los animales del protocolo II (Figura 33) nos permite observar una disminución notoria en el grupo de DEN a partir del día en que se administró este compuesto. El tratamiento con FeNTA también tiene efecto sobre el peso corporal, y al término de su administración, el peso corporal de las ratas comienza a reestablecerse. Sin embargo, al final del estudio la diferencia de peso entre los grupos con y sin FeNTA fue significativa, por lo que se puede decir que en los grupos tratados con EST+DEN+FeNTA gradual o fijo, el EST no evita el efecto en el peso corporal provocado por el FeNTA. En los grupos Control, DEN y EST no existe diferencia estadística al término del protocolo, demostrando así que tanto la administración del EST durante todo el protocolo como la administración única de DEN no tienen efecto sobre el peso corporal a largo plazo.

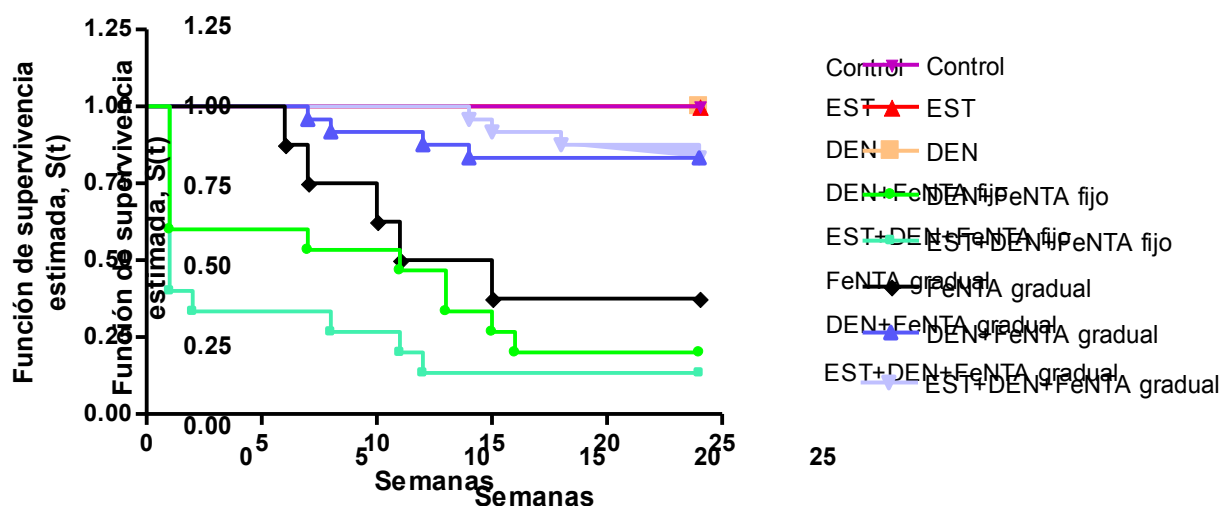
En ninguno de los esquemas de tratamiento se presentó mortalidad asociada al tratamiento únicamente con EST o DEN. La mortalidad en los grupos tratados con FeNTA fijo (86.6% para el grupo DEN+FeNTA fijo y 80% para el grupo EST+DEN+FeNTA fijo) fue muy alta, pero menor a la mortalidad presentada en el protocolo I. El EST en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo no disminuyó de manera considerable la mortalidad observada en el grupo DEN+FeNTA fijo. La alta mortalidad presentada en el grupo DEN+FeNTA fijo parece indicar que fue consecuencia de la dosis utilizada al inicio de este protocolo. Aunque este comportamiento coincide con los resultados obtenidos en el protocolo I, la mortalidad fue menor porque se utilizó inicialmente la dosis de 7 mg Fe/Kg en vez de 9 mg Fe/Kg. El EST no previno la mortalidad producida por el FeNTA en el esquema FeNTA fijo, ya que parece que la dosis utilizada sigue siendo muy alta para que el EST pueda revertir este efecto.



**Figura 33.** Peso corporal para los grupos de estudio durante el desarrollo del protocolo II. La exposición a la N-dietilnitrosamina (DEN) disminuyó de manera considerable el peso corporal de los animales desde el día siguiente de su administración. La exposición a FeNTA también tiene efecto sobre el peso corporal, el cual comienza a reestablecerse a partir de la última administración de FeNTA. El EST no evita la disminución en el peso corporal provocado por DEN o FeNTA y su administración durante todo el protocolo no tiene efecto sobre el peso corporal a largo plazo. Cada punto representa la media  $\pm$  EE. \*El número de animales fue variando en función de la mortalidad presentada.

Por otro lado, la mortalidad de los grupos tratados con DEN+FeNTA gradual (20.83%) y EST+DEN+FeNTA gradual (16.6%) fue mucho menor a la presentada en los grupos del esquema FeNTA fijo. El EST en el grupo EST+DEN+FeNTA gradual no pudo evitar la mortalidad observada en el grupo tratado con DEN+FeNTA gradual, sin embargo, la mortalidad presentada en el grupo EST+DEN+FeNTA gradual fue ligeramente menor al grupo DEN+FeNTA gradual.

En la figura 34 se presenta el gráfico de supervivencia, el cual se obtuvo calculando el producto límite estimado Kaplan-Meier en función del tiempo, bajo el procedimiento descrito en la sección 3.1.6. El tiempo de supervivencia medio para los grupos de estudio fue: DEN+FeNTA fijo: 13 semanas, EST+DEN+FeNTA fijo: 1 semana, FeNTA gradual: 15 semanas, DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual: >25 semanas.



**Figura 34.** Gráfico de supervivencia Kaplan-Meier para los grupos de estudio del protocolo II. El tiempo de supervivencia medio para los grupos de estudio fue: DEN+FeNTA fijo: 11 semanas, EST+DEN+FeNTA fijo: 1 semana, FeNTA gradual: 13 semanas, DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual: >25 semanas. El análisis estadístico de las curvas de supervivencia indica que el EST no tuvo efecto sobre el tiempo de supervivencia en los esquemas FeNTA fijo y FeNTA gradual. Todos los grupos tratados con FeNTA tuvieron una supervivencia estadísticamente menor a los grupos control, EST o DEN, y los grupos tratados con FeNTA gradual presentaron un tiempo de supervivencia mayor a los grupos tratados con FeNTA fijo.

Posteriormente, los tiempos de supervivencia se compararon mediante la prueba log-rank y se obtuvieron los siguientes resultados:

#### Esquema FeNTA fijo

- La supervivencia de los grupos DEN+FeNTA fijo y EST+DEN+FeNTA fijo es estadísticamente menor a la de los grupos Control, EST y DEN.
- No hubo diferencia estadísticamente significativa entre la supervivencia de los grupos DEN+FeNTA fijo y EST+DEN+FeNTA fijo.

### **Esquema FeNTA gradual**

- Los grupos FeNTA gradual, DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual presentaron una supervivencia estadísticamente menor a los grupos control, EST y DEN.
- El grupo FeNTA gradual, a su vez, tuvo una supervivencia mayor con respecto a los grupos DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual.
- No hubo diferencia estadísticamente significativa entre la supervivencia de los grupos DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual.
- Los grupos tratados con DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual tuvieron un mayor tiempo de supervivencia notorio que los grupos tratados con DEN+FeNTA fijo y EST+DEN+FeNTA fijo.

Los resultados del análisis estadístico de las curvas de supervivencia nos permitieron evaluar el efecto de cada uno de los tratamientos y determinar si el EST podría mejorar el tiempo de supervivencia de los grupos tratados con los esquemas FeNTA fijo y FeNTA gradual. En este protocolo la supervivencia del grupo FeNTA fijo fue baja, pero mayor a la supervivencia presentada en el protocolo I. Al comparar el tiempo de supervivencia del grupo EST+DEN+FeNTA fijo y DEN+FeNTA fijo, se puede decir que el EST no tuvo efecto sobre el tiempo de supervivencia, aún cuando el tiempo de supervivencia medio fue menor.

En el caso de los grupos DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual el tiempo de supervivencia medio exacto no se puede determinar, porque al término del protocolo nunca se llegó al valor para el cual la función de supervivencia estimada es menor a 0.5, es decir, el punto donde la mitad de la población está viva, por lo que el resultado presentado (>25 semanas) sólo es un estimado de la supervivencia de estos grupos. Sin embargo, al comparar ambos esquemas de tratamiento con FeNTA, sí se puede decir que el tiempo de supervivencia en el esquema FeNTA fijo fue notoriamente menor que en el esquema con FeNTA gradual.

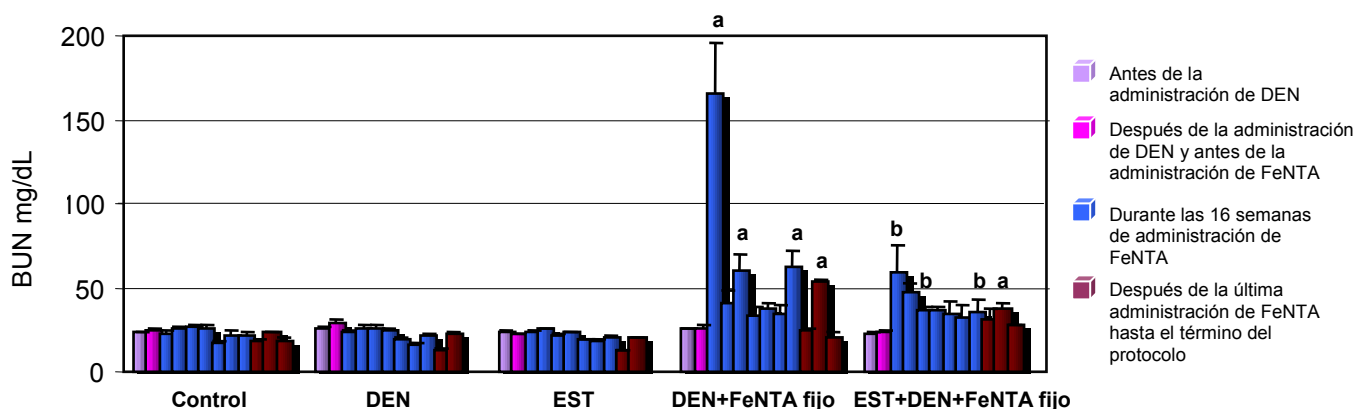
Al igual que la alta mortalidad, la baja supervivencia presentada en el grupo DEN+FeNTA fijo parece indicar que es consecuencia de la dosis utilizada al inicio de este protocolo. El aumento en la supervivencia de los grupos del esquema con FeNTA gradual respecto al FeNTA fijo coincide con el uso de dosis pequeñas desde el inicio del protocolo en el esquema FeNTA gradual las cuales podrían estar activando mecanismos de defensa en los animales de estudio, y esto les confiere una mayor resistencia a las dosis de 9 y 7 mg Fe/Kg que cuando se les administra estas dosis desde el inicio como es el caso del protocolo I y el esquema FeNTA fijo respectivamente.

En el caso de los grupos DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual sólo se pudo determinar que el EST no tuvo efectos negativos, sin embargo, se requeriría de un periodo más prolongado de estudio (hasta que todos los animales hayan fallecido) para evaluar realmente el efecto del EST sobre el tiempo de supervivencia en ambos grupos de estudio.

#### 4.5.1 ESQUEMA FeNTA FIJO

##### 4.5.1.1 Determinación de función renal

Durante el desarrollo de este protocolo II se realizaron varias tomas de muestra de sangre (aproximadamente cada 3 semanas) para la cuantificación de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN por sus siglas en inglés) (Figura 35). Los resultados para la determinación de BUN en el suero de la primer toma de sangre se representan en las barras de color morado; esta toma de muestra se realizó 16 días después del comienzo de la administración del EST y antes de la administración de DEN; la segunda barra (color violeta) representa la segunda toma de muestra de sangre realizada 14 días después de la administración de DEN y antes de la primera administración de FeNTA; las barras en color azul representan los niveles de BUN a diferentes tiempos durante las 16 semanas de administración de FeNTA; y las barras en color rojo representan los niveles de BUN después de la última administración de FeNTA hasta el término del protocolo II. En este gráfico se puede observar que en el grupo DEN+FeNTA fijo se eleva el nivel de BUN 96 horas después de la primera administración de FeNTA de 7 mg Fe/Kg (toma de muestra realizada en el periodo de administración de FeNTA, primera barra azul). Esta elevación sólo sucede con la administración conjunta de DEN y FeNTA si se comienza

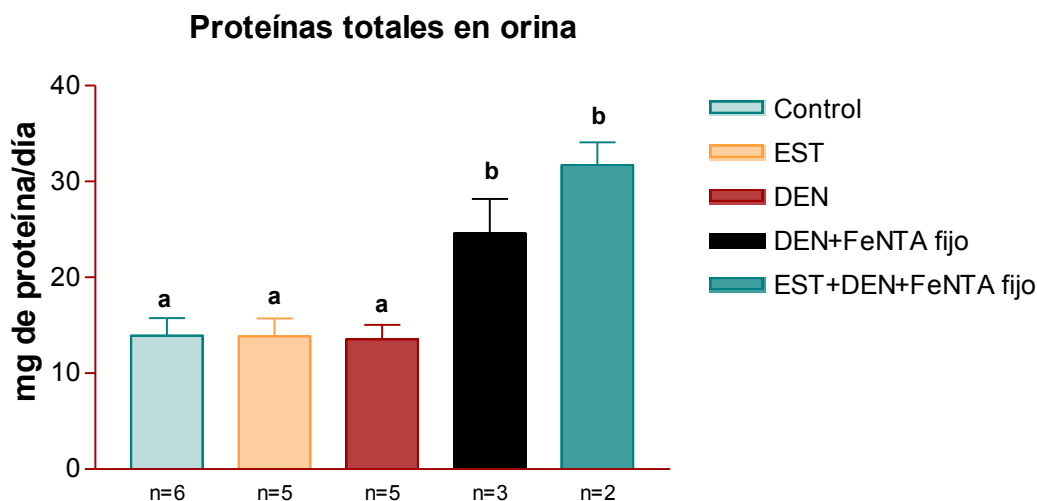


**Figura 35.** Determinación de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) durante el desarrollo del protocolo II en los grupos estudiados. Los niveles de BUN se encuentran elevados 96 horas después de la primera administración de FeNTA (7 mg Fe/Kg) y el EST en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo ofrece protección total durante las 16 semanas de administración de FeNTA. Las barras representan la media  $\pm$  EE. a= Diferente al grupo control b= Diferente a DEN+FeNTA fijo

con dosis altas del carcinógeno. Los niveles de BUN disminuyen posteriormente hasta llegar a los niveles presentados en el grupo control. El tratamiento con EST a la dosis utilizada (100mg FT/Kg/día) en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo ofrece protección total durante las 16 semanas de administración de FeNTA (barras azules), a diferencia del protocolo I donde sólo se tuvo una protección parcial. En el periodo donde se termina el tratamiento con FeNTA hasta el término del estudio el EST ofrece sólo protección parcial. Los niveles altos de BUN en el grupo DEN+FeNTA fijo (96 horas después de la primera administración de FeNTA) coinciden con los resultados obtenidos en el protocolo I donde a dosis altas de FeNTA se induce insuficiencia renal aguda, sin embargo, en esta ocasión el incremento no fue tan alto debido a que la dosis inicial utilizada en este esquema fue menor y posiblemente porque el tiempo transcurrido fue mayor entre la administración del FeNTA y la toma de muestra.

Con base en estos resultados podemos decir que la función renal está severamente alterada poco tiempo después de la exposición al FeNTA pero después se recupera, lo que nos indicaría una insuficiencia renal aguda, sin embargo en algunas de las determinaciones posteriores vuelven a subir los niveles de BUN por lo que probablemente se esté empezando a desarrollar insuficiencia renal crónica. Un punto muy importante a resaltar es la protección total que ejerce el EST (EST+DEN+FeNTA) contra la elevación de BUN incluso en la primera muestra después del inicio de la exposición al FeNTA cuando este fue dramático.

Otra determinación que nos permitió evaluar la función renal fue la excreción de proteínas totales en orina, la cual se realizó en una toma de muestra obtenida al final del estudio. En la figura 36 se puede observar un aumento en la excreción de proteínas en los grupos tratados con FeNTA fijo; la cantidad de proteínas totales en orina en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo es incluso un poco mayor que el grupo tratado sólo con DEN+FeNTA fijo. Los grupos tratados con EST o DEN no presentan diferencia significativa con respecto al control.

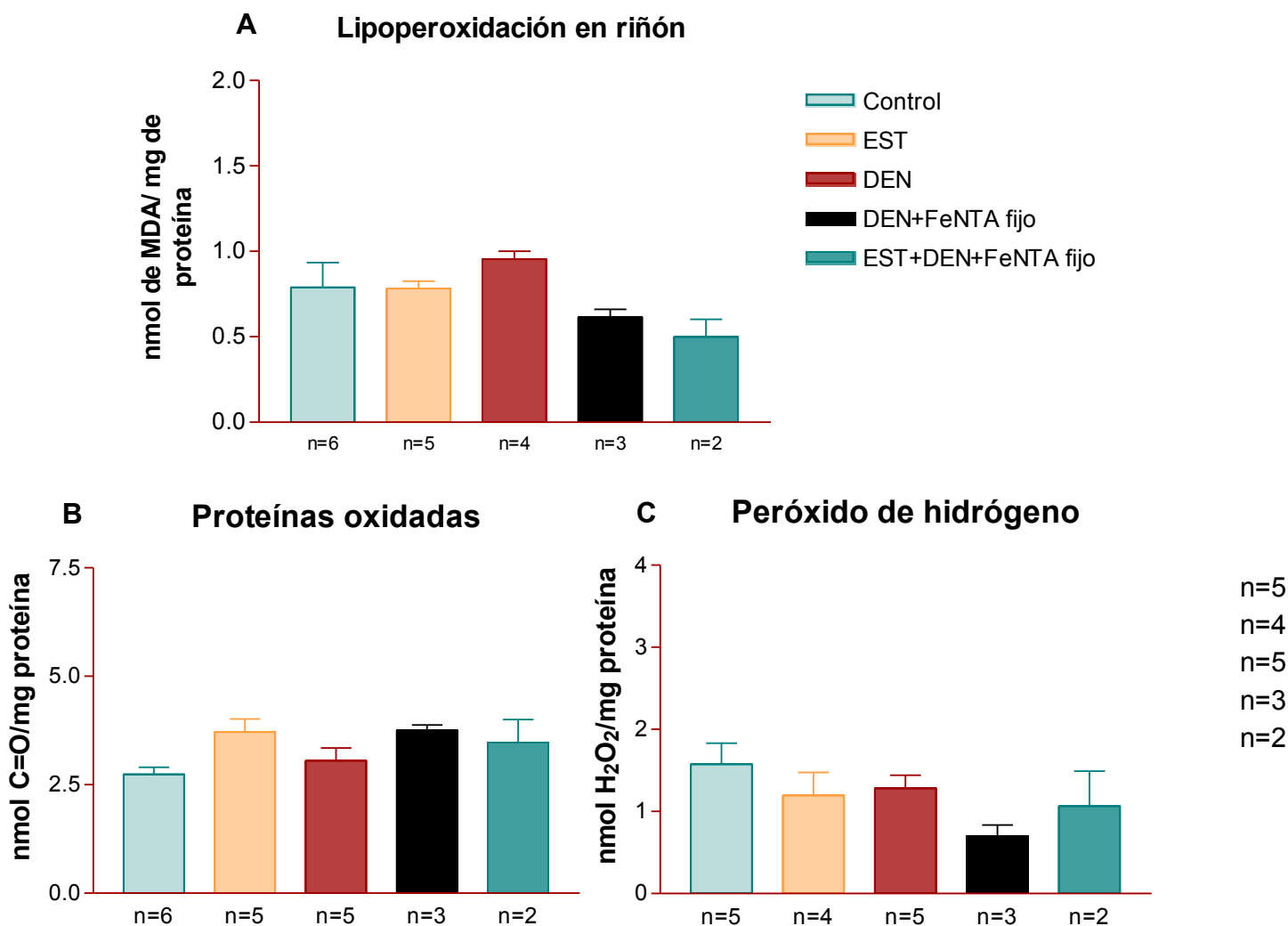


**Figura 36.** Determinación de la excreción urinaria de proteínas totales al término del protocolo II correspondientes al esquema de tratamiento FeNTA fijo. La excreción de proteínas totales en orina se encuentra aumentada en los grupos tratados con FeNTA fijo. En este esquema de exposición a FeNTA el EST en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo no disminuyó los niveles de proteínas totales en orina producidos por el tratamiento con DEN+FeNTA fijo. Las barras representan la media  $\pm$  EE. Columnas con letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa.

#### 4.5.1.2 Determinación de estrés oxidante

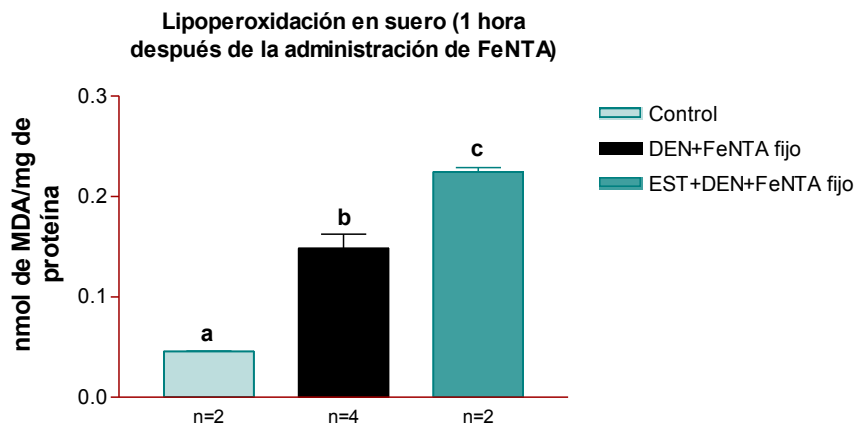
En este esquema de tratamiento con FeNTA fijo se midió el estrés oxidante en los riñones obtenidos al término del protocolo II. Los niveles de peroxidación lipídica (Panel A), proteínas oxidadas (Panel B) y peróxido de hidrógeno (Panel C) mostrados en la figura 37 indican que no hay un aumento en el estrés oxidante en el riñón al término del estudio. Estos resultados pueden explicarse con base en las observaciones de Dávalos (2006) y Cruz (2007), quienes encontraron que en estudios agudos con una administración única de FeNTA, el estrés oxidante aumenta significativamente una hora después y regresa a valores normales aproximadamente a las 6 horas, por lo tanto parece ser que el estrés oxidante en riñón también regresa a valores normales después de inyecciones repetidas como ocurrió en este protocolo (2 meses después de la última administración de FeNTA) así como en el protocolo anterior (24 horas después de la segunda exposición a FeNTA). Por esta

razón para demostrar que sí se estaba induciendo estrés oxidante durante el desarrollo de estos protocolos, se midió la lipoperoxidación en suero una hora después de una de las administraciones realizadas durante el periodo de exposición a FeNTA (administración número 26 de la semana 13). Los resultados obtenidos (Figura 38) permiten demostrar que efectivamente se está induciendo estrés oxidante en los grupos tratados con FeNTA fijo. El EST en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo exacerbó el estrés oxidante producido por el tratamiento con DEN+FeNTA fijo.



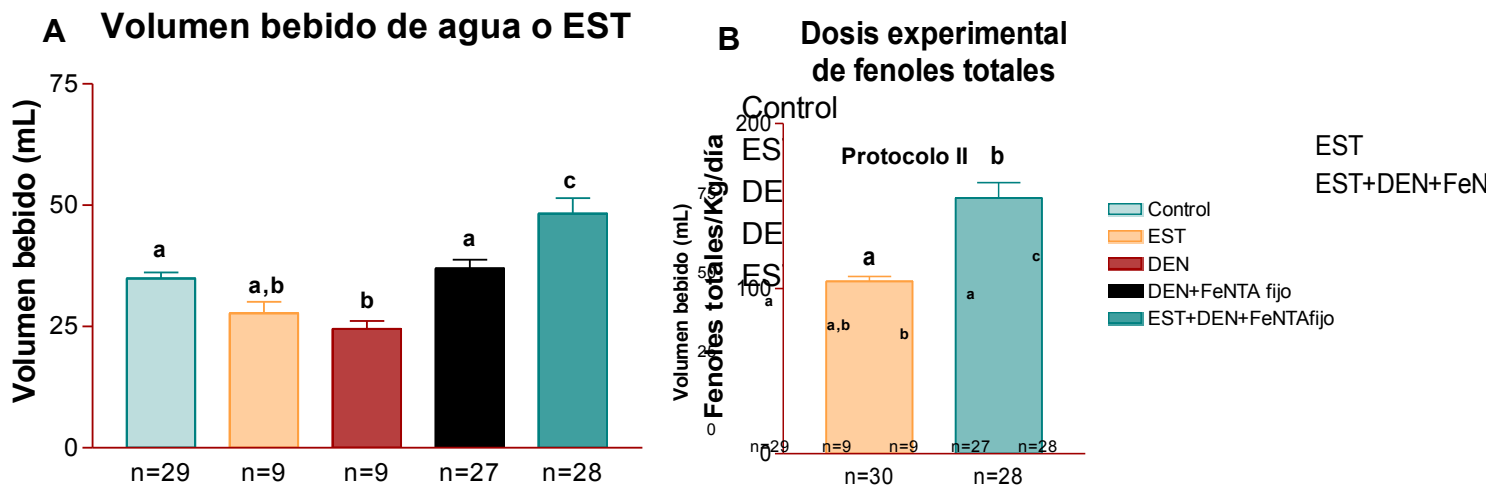
**Figura 37.** Marcadores de estrés oxidante en riñón al término del protocolo II correspondientes al esquema de exposición a FeNTA fijo. Lipoperoxidación (Panel A), proteínas oxidadas (Panel B) y niveles de peróxido de hidrógeno (Panel C). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los marcadores de estrés oxidante en ninguno de los grupos estudiados. Las muestras se tomaron aproximadamente 2 meses después de la última administración de FeNTA a la dosis de 9 mg Fe/Kg). Las barras representan la media  $\pm$  EE.

Los resultados de la determinación de proteínas totales en orina (Figura 36) y lipoperoxidación (Figura 38) nos hicieron cuestionar el efecto del EST en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo, en el cual se está produciendo mayor daño que en el grupo tratado sólo con DEN+FeNTA fijo en estas evaluaciones. Por esta razón, se decidió analizar el volumen de solución de EST consumido, lo que nos permitió conocer la dosis real (experimental) de fenoles totales administrada durante este estudio.



**Figura 38.** Determinación de la lipoperoxidación en muestras de suero una hora después de la administración de FeNTA número 26 en la semana 13 de tratamiento con FeNTA fijo del protocolo II. Los resultados demuestran la producción de estrés oxidante por FeNTA durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal. En este esquema de exposición a FeNTA el EST en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo exacerbó el estrés oxidante producido por el tratamiento con DEN+FeNTA fijo. Las barras representan la media  $\pm$  EE. Columnas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa.

En la figura 39 se muestra el volumen de agua o de EST bebido para cada grupo (Panel A), así como la dosis de fenoles totales recibida en los grupos correspondientes (Panel B). Los resultados obtenidos demuestran que el volumen de EST bebido en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo fue mayor que aquél en el grupo tratado sólo con EST, el cual fue similar al volumen de agua consumido por el grupo control. Este aumento en el consumo de EST provocó que la dosis experimental de fenoles totales en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo fuera mayor a la deseada.



**Figura 39.** Volumen de agua o extracto bebido (Panel A) y la dosis experimental promedio de fenoles totales administrada (Panel B) durante el protocolo II correspondientes al esquema FeNTA fijo. El volumen de EST bebido en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo fue mayor respecto al grupo tratado únicamente con EST y al grupo control. Este aumento en el volumen de EST bebido provocó que la dosis experimental de fenoles totales en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo fuera mayor a la calculada. Las barras representan la media  $\pm$  EE. Columnas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa.

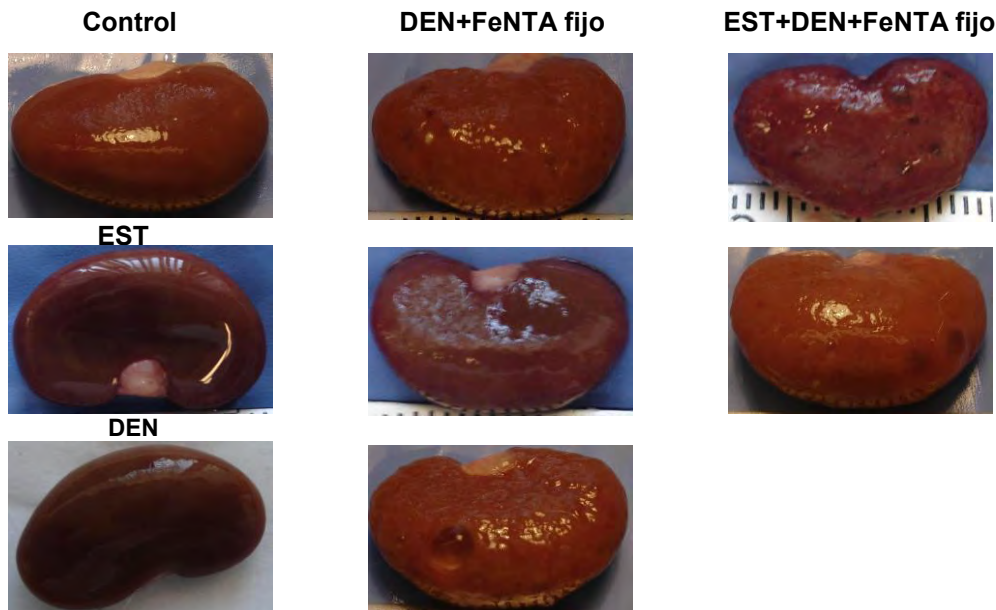
En el grupo EST+DEN+FeNTA fijo se detectó un incremento en el cantidad del EST bebido. En un principio se pensó que el aumento en el volumen se debía a pérdidas por mal funcionamiento de los bebederos y no por un incremento en el volumen real consumido por las ratas; para cuando se descartó esta posibilidad, las ratas ya habían consumido una dosis mayor de EST de la que se tenía contemplada. El aumento en el consumo de EST en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo no se esperaba ya que en estudios anteriores (véase tabla 20 de la sección 4.3) el EST por sí mismo no afecta el volumen de agua consumido a largo plazo, comportamiento que también



se confirmó con los resultados en la figura 39 (Panel A), donde el grupo tratado sólo con EST no presenta diferencias en el volumen consumido respecto al grupo control. Entonces, este aumento en la dosis de fenoles totales debida al exceso de EST ingerido por las ratas durante el desarrollo de este protocolo (Figura 39, Panel B), podría explicar los resultados de lipoperoxidación obtenidos en la figura 38, donde se obtuvo un mayor estrés oxidante en el grupo EST+DEN+FeNTA fijo con respecto al grupo DEN+FeNTA fijo, es decir, una dosis alta de EST podría estar provocando un efecto pro-oxidante que, en combinación con el estrés oxidante producido por el tratamiento DEN+FeNTA, podría estar induciendo la exacerbación de la lipoperoxidación observada. El aumento en el estrés oxidante podría estar provocando el daño en la función renal y esto explicaría los niveles ligeramente mayores de proteínas totales en orina al final del estudio en el grupo EST+DEN+FeNTA con respecto al grupo tratado sólo con DEN+FeNTA (Figura 36).

#### 4.5.1.3 Análisis del desarrollo de CCR en el esquema FeNTA fijo

Al término de este protocolo se analizó la apariencia macroscópica de los riñones con la finalidad de detectar la presencia de tumores o no. En la figura 40 se presentan fotografías representativas de los riñones en los grupos estudiados, donde se puede ver que los riñones de los grupos EST y DEN tienen una apariencia similar a la del grupo control. En los grupos DEN+FeNTA fijo y EST+DEN+FeNTA fijo se aprecia un daño macroscópico considerable pudiéndose observar incluso la formación de quistes renales, sin embargo no se encontró un desarrollo evidente de tumores. Estos resultados también se confirmaron a nivel microscópico mediante análisis histológicos.



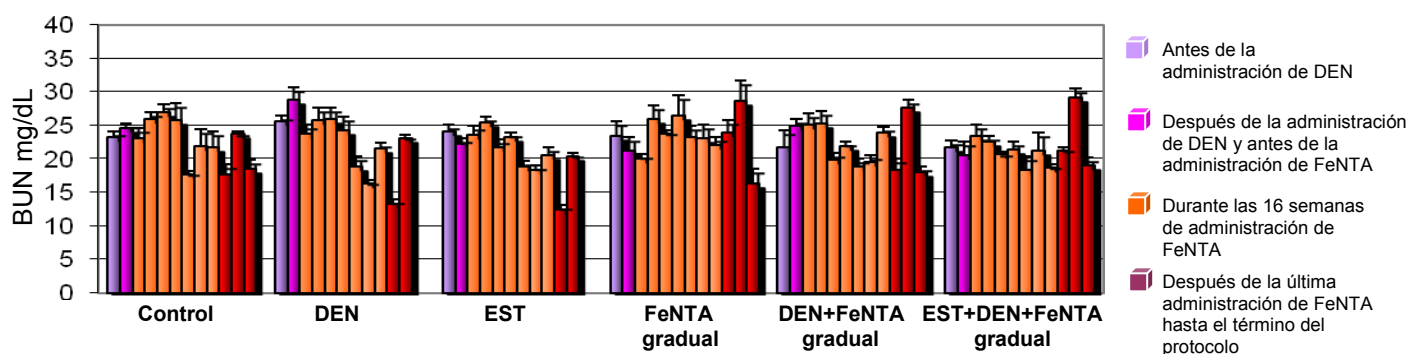
**Figura 40.** Apariencia macroscópica de los riñones en los distintos grupos de estudio correspondientes al esquema FeNTA fijo. Fotografías representativas de los riñones al final del protocolo II. Los grupos tratados con el esquema FeNTA fijo no presentaron un desarrollo evidente de tumores, es decir bajo este esquema de tratamiento no se logró inducir el CCR. En los grupos tratados con FeNTA la presencia de quistes fue la alteración más común. El daño macroscópico en los grupos de FeNTA fijo no se presenta en los grupos tratados con EST y N-dietilnitrosamina (DEN).

A partir de estos resultados podemos decir que bajo las condiciones utilizadas en este esquema de tratamiento no se logró obtener el desarrollo de CCR

## 4.5.2 ESQUEMA FeNTA GRADUAL

### 4.5.2.1 Determinación de función renal

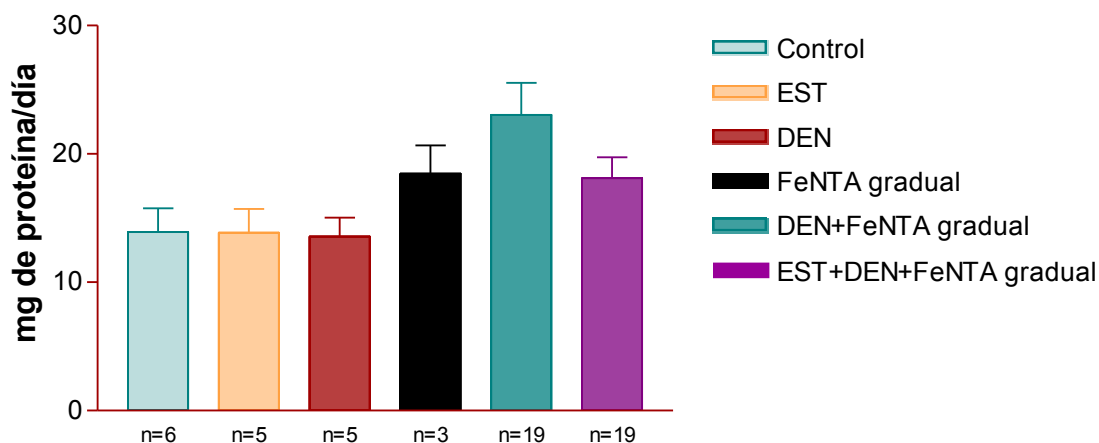
Durante este esquema también se realizaron varias tomas de muestra de sangre (aproximadamente cada 3 semanas) para la cuantificación de nitrógeno ureico sanguíneo (Figura 41). Los resultados de la primera toma de sangre se encuentran representados en las barras de color morado; esta toma de muestra se realizó 16 días después del comienzo de la administración del extracto y antes de la administración de DEN; la segunda barra (color violeta) representa la segunda toma de muestra de sangre realizada 14 días después de la administración de DEN y antes de la primera administración de FeNTA; las barras en color naranja representan los niveles de BUN a diferentes tiempos durante las 16 semanas de administración FeNTA; y las barras en color rojo representan los niveles de BUN durante los dos meses siguientes al término de las administraciones de FeNTA. Los resultados muestran que ningún grupo estudiado presenta alteraciones en los



**Figura 41.** Determinación de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) durante el desarrollo del protocolo II en los grupos estudiados. Ningún grupo de estudio presentó alteraciones en los niveles de BUN. El esquema de exposición a FeNTA gradual no provoca insuficiencia renal. Las barras presentan la media  $\pm$  EE.  $p > 0.05$ .

niveles de BUN a ningún tiempo. Entonces podemos decir que en este esquema de tratamiento con FeNTA (comenzando con dosis más pequeñas hasta llegar a 9 mg Fe/Kg) no se provoca daño en la función renal, a diferencia de lo observado en los grupos tratados con el esquema FeNTA fijo (Figura 35). Con esto concluimos que el esquema de tratamiento con FeNTA gradual probado no induce insuficiencia renal, ni aguda, ni crónica. La función renal también se evaluó mediante la determinación de excreción de proteínas totales en orina en una muestra obtenida al término del protocolo (Figura 42). En ningún grupo de estudio se observó diferencia estadísticamente significativa con respecto al control y, aunque se ve un ligero aumento en la proteinuria en el grupo DEN+FeNTA gradual, este no fue significativo. Esto confirma la conclusión de que no se está induciendo daño en la función renal, por lo que podemos decir que el comportamiento observado durante el esquema de tratamiento con dosis graduales de FeNTA es similar al curso de la enfermedad en el humano, donde el cáncer se desarrolla sin alterar la función renal.

## Proteínas totales en orina

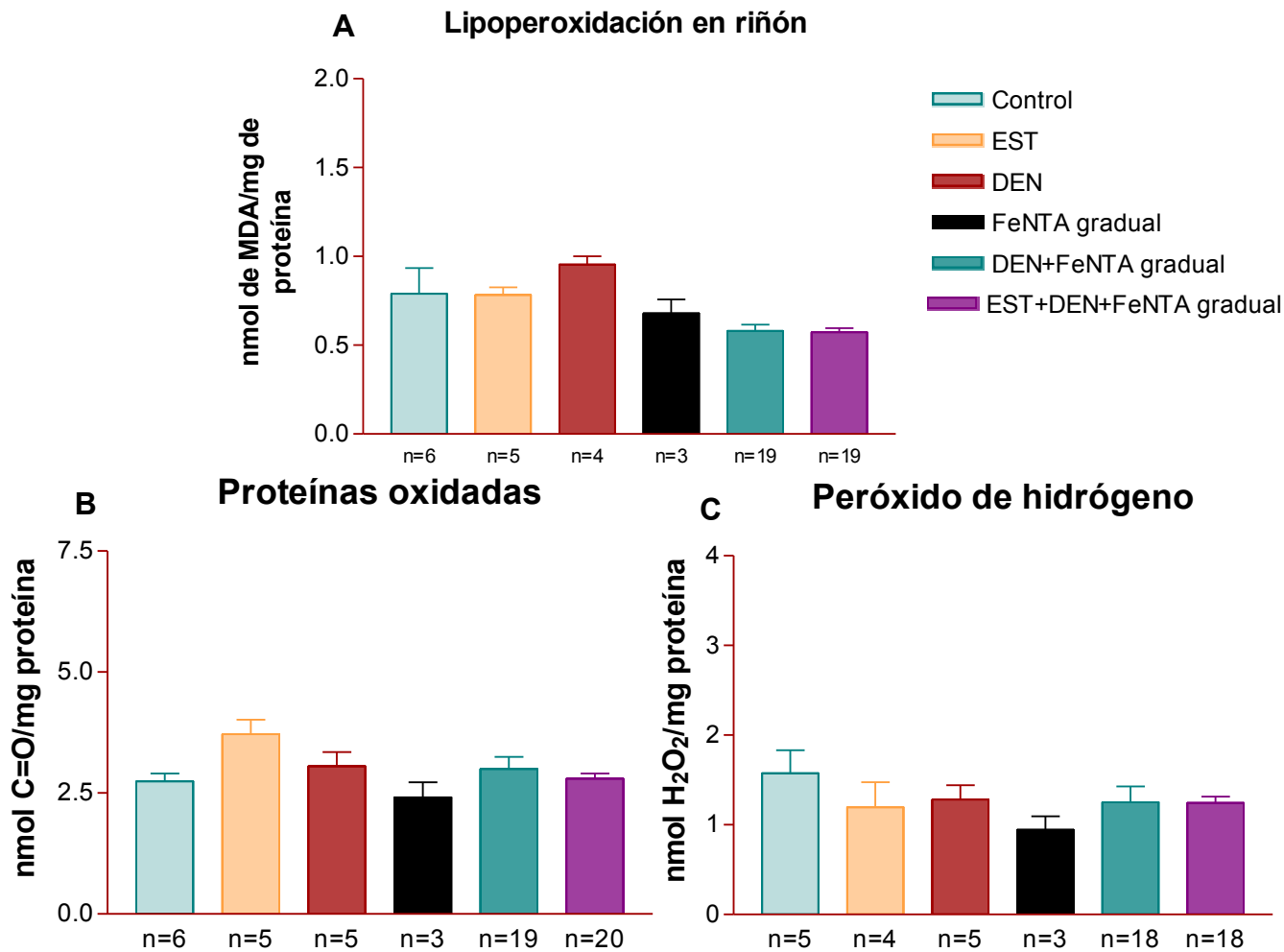


**Figura 42.** Determinación de la excreción urinaria de proteínas totales al término del protocolo II correspondiente al esquema de tratamiento FeNTA gradual. La excreción de proteínas totales no presentó cambios estadísticamente significativos en ninguno de los grupos estudiados. Las barras representan la media  $\pm$  EE.  $p > 0.05$ .

### 4.5.2.2 Determinación de estrés oxidante

El estrés oxidante se determinó en el tejido renal extraído al término del protocolo II. Con base en los resultados mostrados en la figura 43, podemos decir que al término del estudio los niveles de peroxidación lipídica, proteínas oxidadas y peróxido de hidrógeno fueron normales en todos los grupos. Estos resultados coinciden con los presentados en el esquema de FeNTA fijo (Figura 37). Al igual que en los otros estudios donde no se observó estrés oxidante, los resultados pueden explicarse con base en las observaciones de Dávalos (2006) y Cruz (2007), en donde el estrés oxidante inducido una hora después de la administración de FeNTA regresa a valores normales aproximadamente a las 6 horas y por tanto al tiempo que se tomaron las muestras en nuestros protocolos los parámetros analizados ya están en niveles normales.

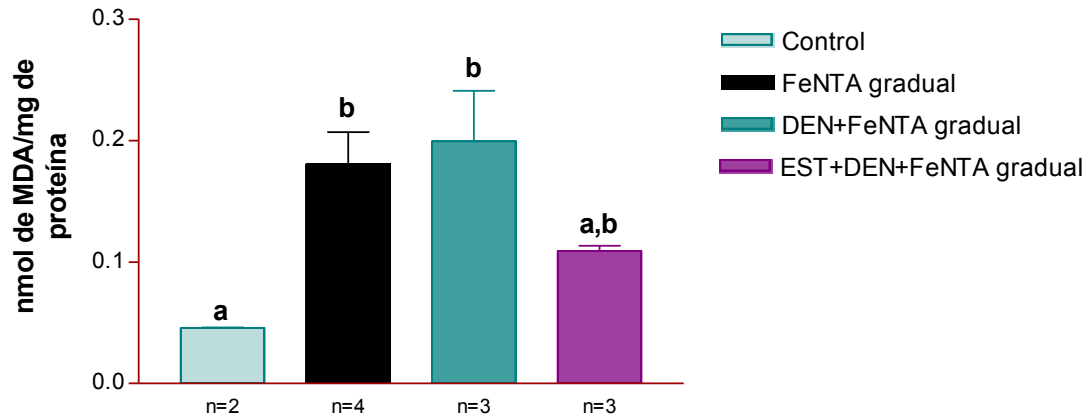
Entonces, para demostrar que se estaba induciendo daño oxidante durante el desarrollo del protocolo II, se midió la lipoperoxidación una hora después de la administración del carcinógeno en muestras de suero tomadas en la semana 13 (administración de FeNTA número 26). En la figura 44 se puede observar que los grupos tratados con FeNTA gradual y con DEN+FeNTA gradual se induce estrés oxidante, y que el EST en el grupo EST+DEN+FeNTA gradual, a dosis de 100 mg FT/Kg/día, reduce dicho estrés, aunque esta disminución no es suficiente para alcanzar los niveles normales observados en el grupo control. Estos resultados confirman la inducción de estrés oxidante y que éste se observa sólo poco tiempo después de la exposición al FeNTA. Por otro lado, la dosis experimental de EST no exacerbó el estrés oxidante (Figura 44) ni los niveles de proteínas totales en orina (Figura 42) como ocurrió en el esquema con FeNTA fijo. Para corroborar nuestra teoría de que la exacerbación del daño en el FeNTA fijo se podía explicar por un exceso de EST recibido, en este protocolo II también se midió el volumen bebido de agua con o sin EST para determinar la dosis experimental de fenoles



**Figura 43.** Marcadores de estrés oxidante en riñón al término del protocolo II correspondientes al esquema de tratamiento FeNTA gradual. Lipoperoxidación (Panel A), proteínas oxidadas (Panel B) y producción de peróxido de hidrógeno (Panel C). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los marcadores de estrés oxidante en ninguno de los grupos estudiados. Las muestras se tomaron aproximadamente 2 meses después de la última administración de FeNTA a la dosis de 9 mg Fe/Kg. Las barras representan la media  $\pm$  EE.

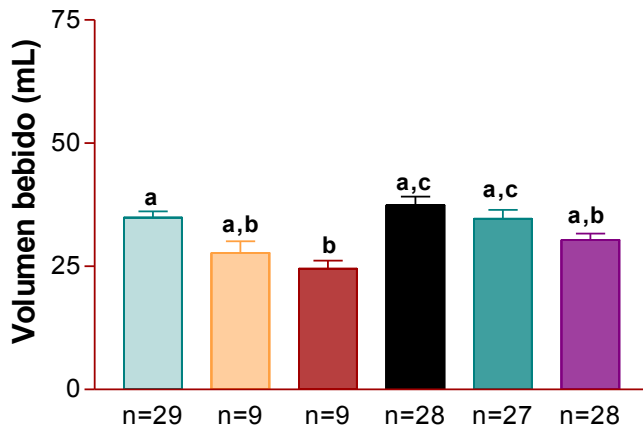
totales administrada (Figura 45). En este caso, a diferencia del esquema FeNTA fijo, en el grupo EST+DEN+FeNTA gradual no hubo cambios en el volumen de agua bebido (Figura 45, Panel A), y por tanto la dosis de EST administrada (104.4 mg FT/Kg/día) fue la misma a la calculada (Figura 45, Panel B). Estos resultados nos permiten concluir que la dosis de EST elegida (100 mg FT/Kg/día) disminuye el estrés provocado por FeNTA en el esquema FeNTA gradual, mientras que la combinación de dosis altas de FeNTA y de EST (154.9 mg FT/Kg/día) que se administraron en el esquema FeNTA fijo exacerbaron el estrés oxidante.

### Liperoxidación en suero (1 hora después de la administración de FeNTA)

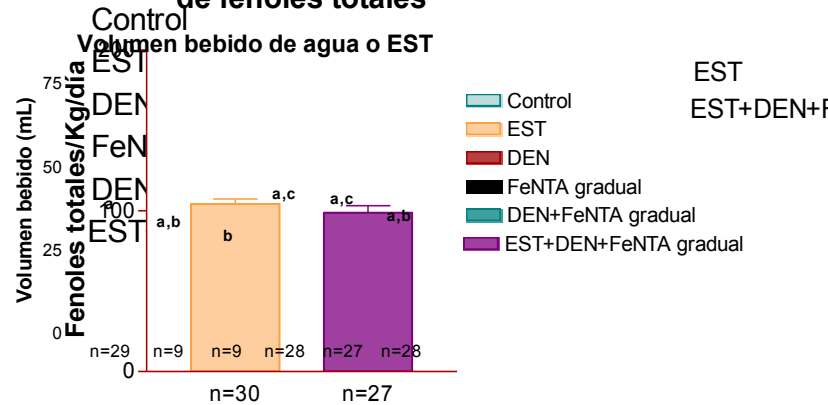


**Figura 44.** Determinación de la liperoxidación en muestras de suero una hora después de la administración de FeNTA número 26 en la semana 13 de tratamiento con FeNTA gradual del protocolo II. Los resultados demuestran la producción de estrés oxidante por FeNTA durante el desarrollo del protocolo de carcinogénesis renal. En este esquema de exposición a FeNTA el EST en el grupo EST+DEN+FeNTA gradual disminuyó parcialmente el estrés oxidante producido por el tratamiento con DEN+FeNTA gradual. Las barras representan la media  $\pm$  EE. Columnas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa.

### A Volumen bebido de agua o EST



### B Dosis experimental de fenoles totales

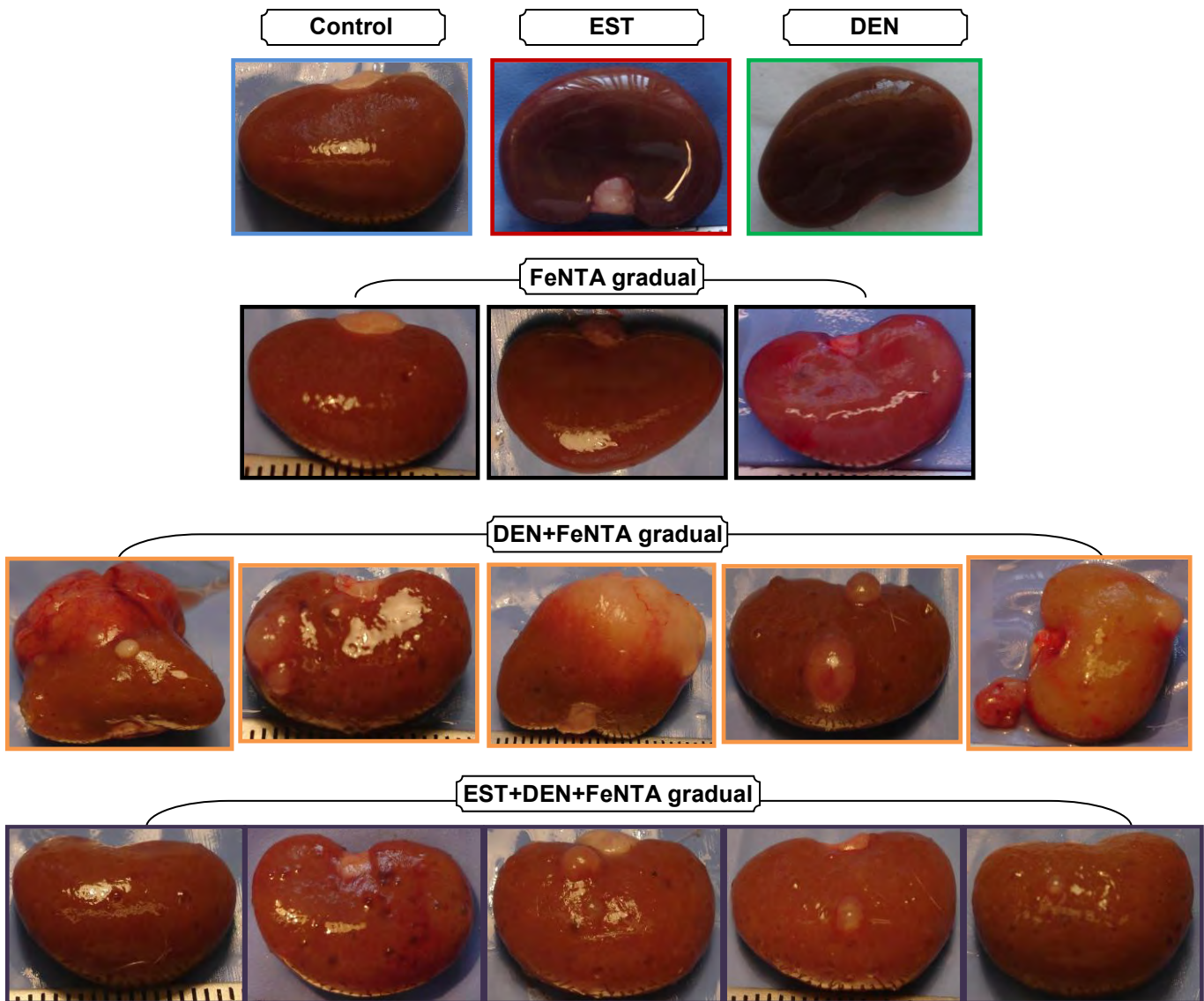


**Figura 45.** Volumen de agua o extracto bebido (Panel A) y la dosis experimental promedio de fenoles totales administrada (Panel B) durante el protocolo II correspondientes al esquema FeNTA gradual. El volumen de EST bebido en el grupo EST+DEN+FeNTA gradual fue estadísticamente igual al grupo control, por tanto en el grupo EST+DEN+FeNTA gradual no hubo cambios en el volumen de agua bebido y por tanto la dosis administrada fue igual a la calculada. Las barras representan la media  $\pm$  EE. Columnas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa.

#### 4.5.2.3 Análisis del desarrollo de CCR en el esquema FeNTA gradual

La figura 46 muestra fotografías representativas de la apariencia macroscópica de los riñones de los diferentes grupos de estudio (Control, EST, DEN, FeNTA gradual, DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual). Los riñones de los grupos tratados con EST y DEN mostraron una apariencia idéntica a aquéllos del grupo control. El grupo tratado sólo con FeNTA gradual no presentó tumores evidentes y mantuvo una apariencia similar a la mostrada en el grupo control, demostrando así que con este tratamiento no se indujo CCR. Este resultado está apoyado por la baja incidencia de CCR reportada en la literatura (12-20%) en ratas tratadas únicamente con FeNTA mediante un esquema de tratamiento similar (Athar, *et al.*, 1998; Ansar, *et al.*, 1999; Khan, *et al.*, 2005; Jahangir, *et al.*, 2006; Iqbal, *et al.*, 2007). Con este esquema se requiere mantener a los animales durante periodos más prolongados (mayores a un año) para que la incidencia del CCR aumente (Tanaka, *et al.*, 1998 y observaciones en nuestro laboratorio). En el grupo DEN+FeNTA gradual sí se

desarrollaron tumores, por lo que podemos afirmar que, a diferencia de los grupos tratados con el esquema DEN+FeNTA fijo y del grupo tratado únicamente con FeNTA gradual, con este esquema de tratamiento se indujo de manera exitosa el CCR. Probablemente en este caso los animales pudieron adaptar sus defensas antioxidantes evitando así el alto índice de mortalidad presentado en el tratamiento con FeNTA fijo y, por tanto, permitiendo el desarrollo de tumores. Por otro lado, el EST protegió contra el desarrollo de CCR, ya que los tumores en el grupo EST+DEN+FeNTA gradual se presentaron en menor proporción y fueron más pequeños que los observados en el grupo tratado con DEN+FeNTA gradual, como se puede apreciar en la figura 46. Para calcular la incidencia de CCR en los grupos que presentaron tumores, se determinó el número de animales con CCR y el número total de tumores en cada grupo apoyándonos en los resultados de los análisis histológicos. En la tabla 21 se presentan estos resultados, así como el porcentaje de animales con CCR respecto a la cantidad



**Figura 46.** Apariencia macroscópica de los riñones en los distintos grupos de estudio correspondientes al esquema FeNTA gradual. Fotografías representativas de riñones al final del protocolo II. Los grupos tratados con EST, DEN y FeNTA gradual no presentaron desarrollo evidente de tumores. En el grupo tratado con DEN+FeNTA gradual se logró inducir el CCR (en 13 de 19 animales estudiados). En el grupo EST+DEN+FeNTA gradual los tumores se presentaron en menor proporción (en 9 de 19 animales estudiados) y fueron más pequeños que los observados en el grupo tratado con DEN+FeNTA gradual.

total de animales tratados y la proporción de animales con tumores unilaterales o bilaterales. En estos resultados se puede observar que el EST disminuyó en un 21.05% la incidencia de CCR, sin embargo, de acuerdo a la prueba de Fisher, no hay diferencia estadísticamente significativa. Así mismo, el EST disminuyó el número total de tumores presentados en el grupo EST+DEN+FeNTA gradual (15 tumores) respecto al grupo DEN+FeNTA gradual (26 tumores).

**Tabla 21.** Incidencia de cáncer renal inducido con el esquema de exposición a FeNTA gradual

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

La disminución en la incidencia de CCR por el tratamiento con EST, puede atribuirse a la protección parcial que ejerce éste contra el estrés oxidante producido por FeNTA (Figura 44). Se requiere de estudios como la caracterización del EST para saber qué compuestos o qué combinación de éstos pudiera tener mayor efecto contra el estrés oxidante, o bien, modificar la dosis de EST a una intermedia entre utilizada y aquella en la que se obtuvo el efecto pro-oxidante para tener mayor protección contra el daño oxidante producido por el carcinógeno, y por tanto una mayor protección sobre la incidencia de CCR.

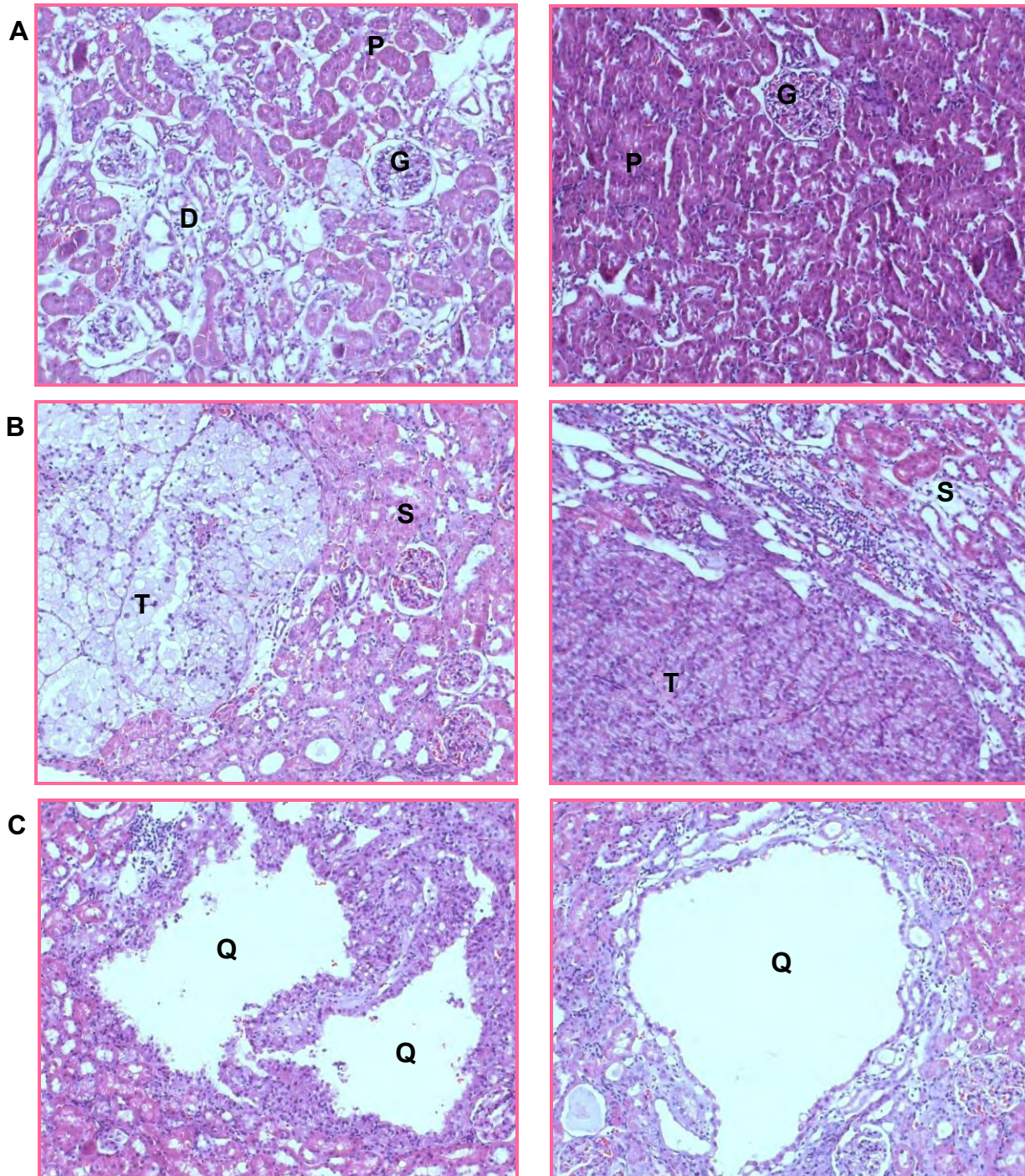
#### 4.5.2.4 Análisis histológicos

Para determinar el subtipo histológico en el modelo de carcinoma de células renales inducido por FeNTA, se realizaron análisis histológicos utilizando una tinción con hematoxilina y eosina. La asignación del subtipo histológico se realizó de acuerdo a la clasificación UICC/AJCC basada en las recomendaciones acordadas en Heidelberg (1996). En la figura 47 se muestran fotomicrografías representativas de la apariencia histológica de tejido sano, tejido tumoral y tejido con quistes renales. En las muestras de tejido sano (S) (Panel A) se puede apreciar la presencia de glomérulos (G) y túbulos proximales (P) y distales (D) bien definidos. En el panel B se muestran cortes de riñón en donde se identificó crecimiento tumoral; en la región donde se encuentra el tumor (T), a diferencia del tejido sano (S), no se observan las estructuras regulares de glomérulos o de túbulos; en cambio, se pueden observar células asociadas con un citoplasma claro, el cual es un patrón característico del CCR de células claras. En otras áreas del riñón también se encontraron quistes (Q), los cuales pueden identificarse por presentar una dilatación marcada del espacio glomerular o tubular y sin ninguna estructura en su interior (Panel C). Los resultados de los análisis histológicos de los tumores de CCR inducidos por FeNTA mostraron que el subtipo histológico fue de células claras en todos los casos.

La determinación del subtipo histológico es importante como primer paso para la caracterización del modelo, ya que existen algunas discrepancias en la literatura al respecto. Toyokuni y colaboradores (1998) reportaron que los tumores con histología del subtipo de células claras eran raros en este modelo, y que cuando se presentaban, no se encontraban en estado puro, ya que en el 17.6% de los tumores que estudiaron se encontraba mezclado con un subtipo de morfología granular. Otros estudios de histopatología en tumores de



cáncer renal inducidos con DEN y FeNTA revelaron adenocarcinoma con un patrón de crecimiento acinar o papilar en el 40% de los animales (Athar, *et al.*, 1998). De acuerdo a la clasificación actual de los subtipos histológicos (WHO, 2004; UICC/AJCC), la morfología granular encontrada por Toyokuni (1998) podría corresponder al subtipo cromóforo, en cambio, el patrón de crecimiento papilar encontrado en los estudios realizados por Athar (1998) correspondería al subtipo papilar, y el acinar al subtipo de células claras. En nuestro

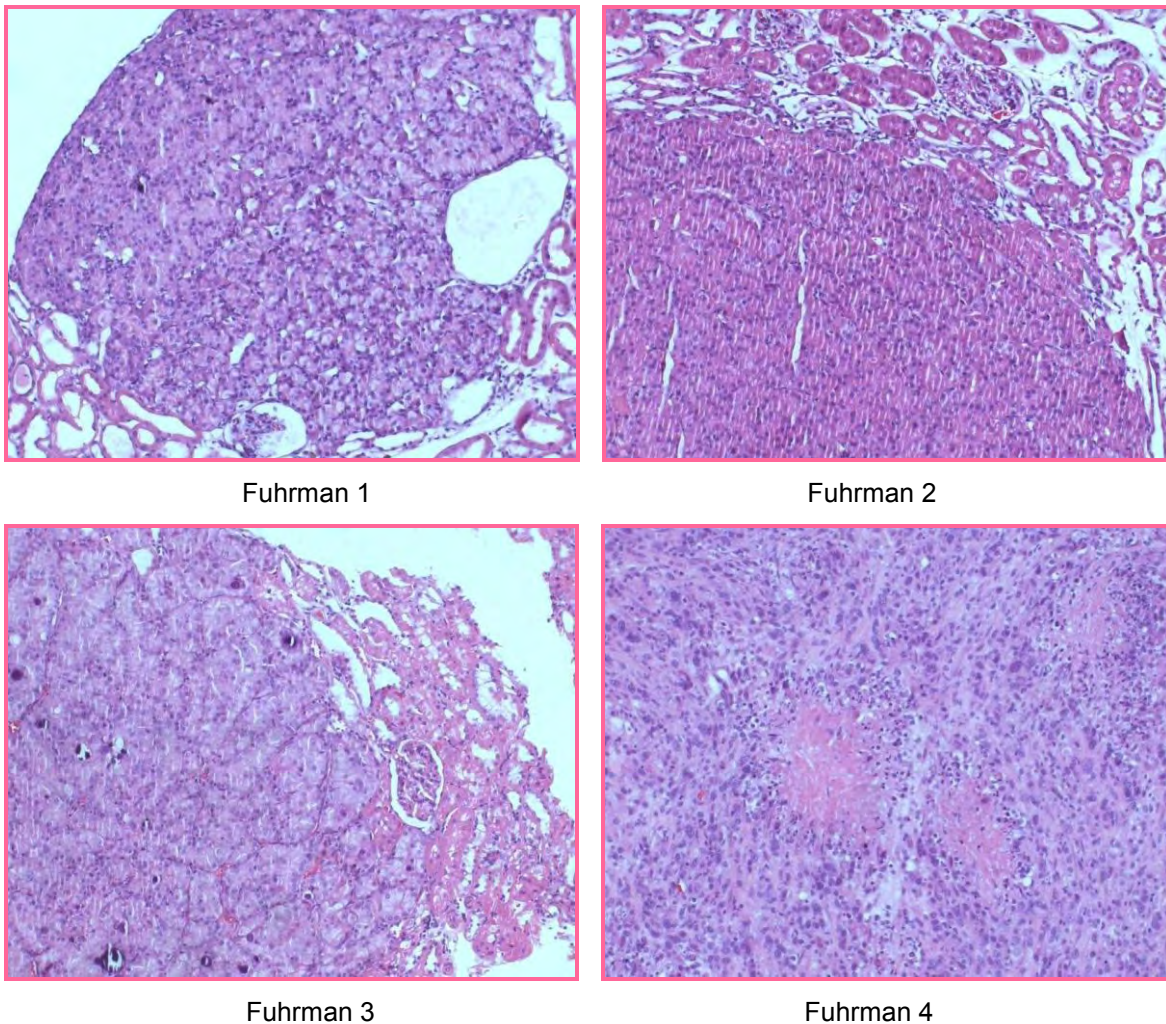


**Figura 47.** Análisis histológicos de los tumores presentados con el esquema FeNTA gradual. Fotomicrografías de tejido renal sano (S) (Panel A), tejido tumoral (T) (Panel B) y tejido con quistes renales (Q) (Panel C). Tinción con hematoxilina-eosina (200X). G= Glomérulo, P= Túbulo proximal, D= Túbulo distal. El subtipo histológico de los tumores inducidos por FeNTA fue de células claras en todos los casos (Panel B). Estudios realizados en colaboración con el Dr. Javier Sánchez González, Mayor Médico Cirujano y Jefe de la Subsección de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar.



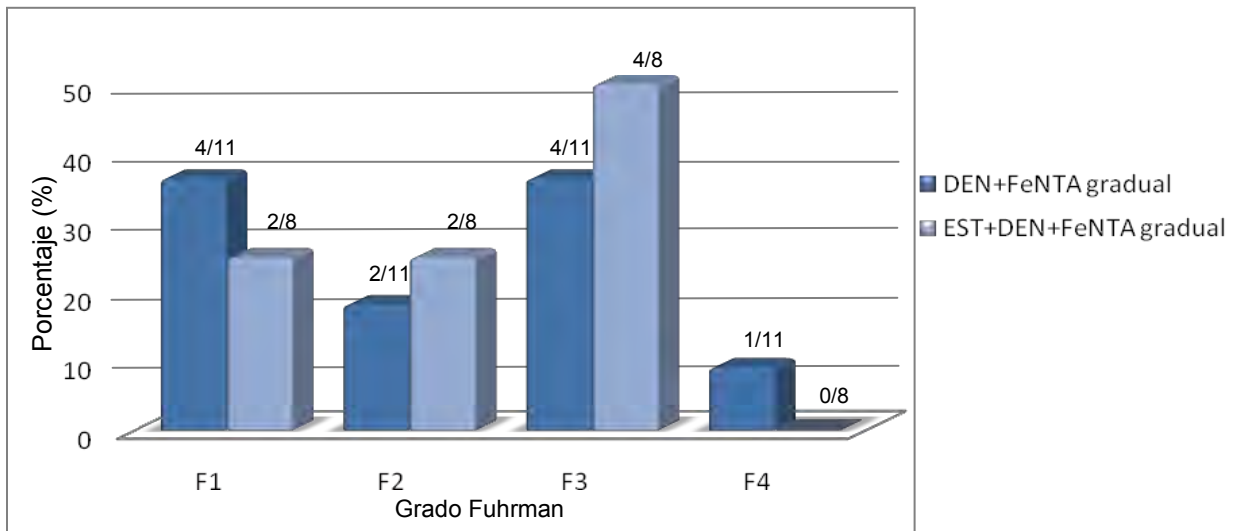
caso todos los tumores obtenidos fueron de células claras, y la diferencia entre nuestros resultados y aquéllos publicados por otros autores puede deberse a que en esa época la clasificación histológica no estaba totalmente definida.

Además de la identificación del subtipo histológico y de la incidencia, se evaluaron otras características como el grado nuclear y el tamaño de los tumores obtenidos. Estas características se eligieron debido a que diversos estudios, han demostrado que sólo las características patológicas como tamaño del tumor, grado Fuhrman e invasión tumoral microvascular siguen siendo los factores de predicción independientes de supervivencia más confiables en el humano (Dall'Oglio, *et al.*, 2007). Adicionalmente, el grado nuclear Fuhrman, debido a su simplicidad y a la correlación demostrada con el pronóstico del paciente, se considera un indicador del estado patológico del CCR (Serrano, *et al.*, 2008). Entonces, el grado de avance del tumor se asignó utilizando el criterio de grado nuclear propuesto por Fuhrman descrito en la sección 3.1.7 (Fuhrman, 1982; Skinner, 1971; Thomas *et al.*, 2008). En la figura 48 se muestran ejemplos de los distintos grados nucleares obtenidos en tumores del grupo DEN+FeNTA gradual. Posteriormente se comparó la proporción de



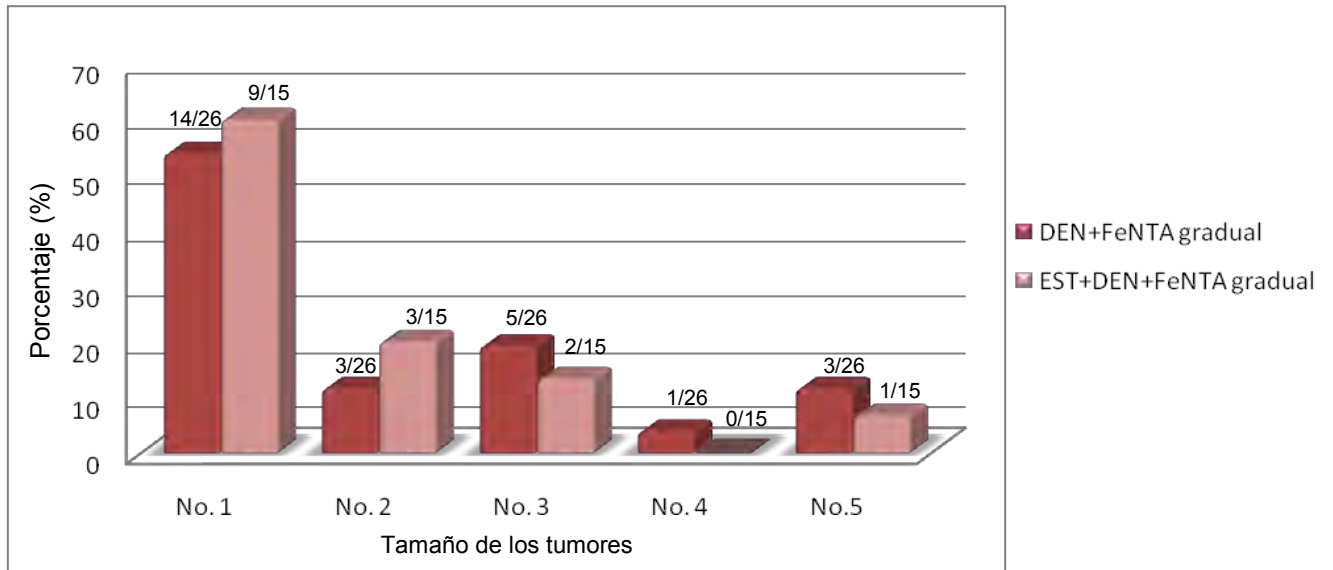
**Figura 48.** Evaluación del grado de alteración en la morfología nuclear de tumores obtenidos en el grupo FeNTA gradual utilizando el criterio propuesto por Fuhrman. Fotomicrografías representativas de los diferentes grados Fuhrman en los tumores obtenidos en el grupo DEN+FeNTA gradual teñidos con hematoxilina-eosina (200X). Estudios realizados en colaboración con el Dr. Javier Sánchez González, Mayor Médico Cirujano y Jefe de la Subsección de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar.

tumores que se presentó con cada grado Fuhrman en los grupos tratados con DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual para determinar el grado de avance de CCR. En la figura 49 se puede observar que en el grupo DEN+FeNTA gradual se obtuvieron tumores con grados Fuhrman 1 a 4, mientras en el grupo EST+DEN+FeNTA gradual sólo se obtuvieron tumores hasta el grado 3, es decir, no se obtuvo ningún tumor con el grado Fuhrman más avanzado (F4).



**Figura 49.** Efecto del EST sobre el grado Fuhrman presentado en los tumores obtenidos en los grupos DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual. Las cifras en la parte superior de cada columna representan la relación del número de tumores con el grado Fuhrman correspondiente (F1, F2, F3 o F4) con respecto al número de tumores analizados en cada grupo de estudio. En el grupo DEN+FeNTA gradual se obtuvieron tumores con grado Fuhrman 1-4 y con el EST sólo se obtuvieron tumores hasta el grado Fuhrman 3.

El tamaño del tumor también es importante por sí mismo como un factor de pronóstico en muchos tipos de cáncer, independiente del estado patológico; además, se ha demostrado que es uno de los factores de pronóstico más significativos en el CCR (Yoo, *et al.*, 2008). En la figura 50 se representa el porcentaje de tumores obtenidos con los diferentes tamaños en escala del 1 al 5 en los grupos DEN+FeNTA gradual y EST+DEN+FeNTA gradual. El número 1 representa el tumor más pequeño y el número 5 el tumor más grande. A partir de estos resultados se puede apreciar que el número de tumores con tamaños mayores (3, 4 y 5) disminuye con el tratamiento con EST. Este comportamiento indicaría que el EST retarda el grado de avance con respecto al encontrado en el grupo DEN+FeNTA gradual, y aunque no se observó diferencia significativa, estos resultados correlacionan con el estado patológico determinado por el grado Fuhrman, ya que en el grupo tratado con EST sólo se obtuvieron tumores hasta el grado Fuhrman 3. Por otro lado, un estado patológico



**Figura 50.** Efecto del EST sobre el tamaño de los tumores de CCR. Las barras representan el porcentaje de tumores con los diferentes tamaños en escala del 1 al 5 con respecto a los tumores totales donde el número 1 representa el tumor más pequeño y el número 5 representa el tumor más grande. Las cifras en la parte superior de cada columna representan la relación del número de casos presentados con el tamaño del tumor especificado con respecto al número total de tumores obtenidos en cada grupo de estudio. El tratamiento con EST disminuyó la proporción de tumores con tamaños más avanzados.

como factor de pronóstico puede disminuir marcadamente por la presencia o ausencia de otros factores (Mancini, *et al.*, 2008). Así mismo, estudios clínicos confirman que cualquiera de los puntos de corte definidos en diferentes actualizaciones de la clasificación “tumor, nodulación, metástasis” (TNM) concuerdan en que el tamaño del tumor se encuentra asociado con la supervivencia. Por lo anterior, se puede decir que el EST retardó el avance del CCR.

## V. RESUMEN DE RESULTADOS

### **Análisis del extracto de semillas de tamarindo**

- El extracto de semillas de *Tamarindus indica* L. (EST) presentó un alto contenido de compuestos fenólicos y una notable capacidad de inactivación del radical superóxido.
- El EST presentó buena estabilidad a largo plazo, el método de extracción fue reproducible y la materia prima fue similar.

### **Estudios agudos**

- En el estudio agudo (una hora después de la administración de FeNTA) se demuestra la inducción de estrés oxidante.
- El EST a una dosis de 100 mg FT/Kg/día disminuye la producción renal de peróxido de hidrógeno inducida una hora después de tratamiento con FeNTA.
- Una dosis de 150 mg FT/Kg/día del EST tiene un efecto pro-oxidante.

### **Protocolo I**

- El índice de mortalidad es muy alto después de dos administraciones consecutivas de FeNTA a dosis de 9 mg Fe/Kg.
- El EST (100 mg FT/Kg/día) protege de manera significativa contra el daño severo en la función renal inducido por las dos administraciones de dosis altas de FeNTA.

### **Protocolo II**

- Una dosis única de DEN disminuye el peso corporal de las ratas, pero no altera los parámetros estudiados en riñón (función renal y estrés oxidante).
- El EST administrado a una dosis de 100 mg/FT/Kg de manera crónica no tiene efectos pro-oxidantes, antinutricionales o sobre la función renal.

#### *Esquema de administración con FeNTA fijo*

- El índice de mortalidad es alto después de la administración de dosis iniciales de FeNTA de 7mg Fe/Kg.
- El FeNTA con este esquema de tratamiento induce insuficiencia renal aguda y probablemente crónica.
- El extracto protege de manera significativa contra el daño en la función renal inducido por FeNTA.

#### *Esquema de administración con FeNTA gradual*

- El esquema de tratamiento con aumento gradual de la dosis de FeNTA permitió llegar a dosis altas del mismo disminuyendo sensiblemente el índice de mortalidad.
- Se comprobó la producción de estrés oxidante durante el desarrollo de este protocolo y su protección parcial gracias al EST.
- Con este esquema de tratamiento se logró inducir el CCR y no se observó insuficiencia renal.
- El subtipo histológico en todos los tumores analizados fue de células claras.
- Aunque la diferencia entre el tratamiento con o sin EST no fue estadísticamente significativa, el EST disminuyó la incidencia de CCR en un 21.05%.
- Con base en el tamaño de los tumores y el grado Fuhrman se puede decir que el EST a una dosis de 100 mg fenoles totales/Kg/día retardó el avance del CCR.

## VI. CONCLUSIONES

- ✓ Se consiguió obtener un extracto rico en polifenoles a partir de semillas de tamarindo (EST) con una gran capacidad de inactivación de radical superóxido.
- ✓ Se logró implementar un esquema de tratamiento de exposiciones repetidas a FeNTA con el que se desarrolló el carcinoma de células renales sin alterar la función renal, comportamiento similar al curso de la enfermedad en el humano.
- ✓ Se estableció que el subtipo histológico de los tumores inducidos por FeNTA corresponde al de células claras.
- ✓ El EST a una dosis de 100 mg fenoles totales/Kg/día retardó el avance del CCR y disminuyó su incidencia en un 21.05%.
- ✓ La protección obtenida por el EST contra el cáncer puede explicarse por la protección parcial contra el estrés oxidante.

## VII. APÉNDICE

### A. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

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

### B. INACTIVACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

#### Soluciones para la preparación de la mezcla de reacción

- **Xantina 0.3 mM**  
Pesar 0.022833g de xantina, agregar 4-5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  400 mM y aforar con 500 mL de agua destilada.
- **EDTA 0.6 mM**  
Pesar 0.1117 g de EDTA y disolverlos en 500 mL de agua destilada con agitación.
- **Azul de nitrotetrazolio (NBT) 150  $\mu\text{M}$**   
Pesar 0.0368g de NBT y disolverlos en 300 mL de agua destilada con agitación.
- **$\text{Na}_2\text{CO}_3$  400 mM**  
Pesar 21.2 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y disolver en 500 mL de agua destilada con agitación.
- **Albúmina sérica bovina 0.1 %**  
Pesar 0.25 g de albúmina y disolver en 250 mL de agua destilada.

#### Mezcla de reacción

Mezclar las soluciones en el volumen indicado a continuación:

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

- **Amortiguador de fosfatos 50mM pH: 7.4**  
Pesar 1.0524g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.6745g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  para preparar 250 mL de solución.
- **Sulfato de amonio 2M**  
Pesar 66g de sulfato de amonio y aforar en 250 mL de agua destilada.
- **Xantina oxidasa 168 U/L**  
Para preparar 1mL de xantina oxidasa 168U/L a partir de un lote de 0.09U/mg de sólido:  
 $0.096 \text{ U} \text{-----} 1\text{mg} \quad 1750 \text{ mg} \text{-----} 1000\text{mL}$   
 $168\text{U} \quad x = 1750\text{mg} \quad x = 1.75 \text{ mg} \quad 1 \text{ mL}$   
Disolver la cantidad calculada (1.75 mg) de xantina oxidasa en 1 mL de sulfato de amonio 2M.
- **Cloruro de cobre  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.8 mM**  
Pesar 0.07 g de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y disolver en 500 mL de agua destilada.

### C. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

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

Pesar 0.0267g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.0431 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  para preparar 25 mL de solución.

➤ **Tris HCl 20 mM pH:7.4**

Pesar 0.1576 g de Tris-HCl disolver en agua desionizada, ajustar el pH y aforar a 50mL.

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

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

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

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

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

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

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

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

### D. CUANTIFICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

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

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

➤ **Peróxido de hidrógeno 25 mM**

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

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

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

➤ **Reactivo de Fox**

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

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

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

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

Pesar 1.52 mg de naranja de xilenol y 2 mg de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$  y disolverlos en 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  250 mM Mezclar las soluciones 1 y 2 (proporción 9:1 (v/v) respectivamente)

➤ **Ácido sulfúrico 250 mM**

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

### E. PROTEÍNAS OXIDADAS

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

Pesar la cantidad de cada reactivo descrita a continuación:

Para 100mL	Peso
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.278 g
• NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0.4194 g
• EDTA	0.372 g
• Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.0005 g
• Leupeptina*	0.0005 g
• Aprotinina*	0.0005g
• Pepstatina*	0.0007 g
• Tritón	0.1 mL

Ajustar a pH:7.4 y aforar a 100mL con agua destilada

\* o disolver una tableta (Protease inhibitor cocktail tablets, Complete mini Roche) por cada 10 mL de solución.

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

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

➤ **Ácido tricloroacético al 20%**

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

➤ **Ácido tricloroacético al 10%**

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

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

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

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

Pesar 0.7584 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> •3H<sub>2</sub>O y 0.092 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Ajustar al pH indicado y aforar con 200 mL de agua destilada.

➤ **Dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM**

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

➤ **HCl 2.5M**

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

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

Mezclar proporciones iguales de etanol y acetato de etilo.

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

Pesar 4 mg de ABS y disolver en guanidina 6M

## F. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

➤ **Ácido tricloroacético al 10%**

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

➤ **NaOH 0.1 M**

Pesar 0.4 g de hidróxido de sodio y aforar con 100 mL de agua destilada.

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

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



➤ **Solución A:**

Preparar una solución con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%, NaOH al 0.4% y tartrato de sodio al 0.02% en agua destilada.

➤ **Solución B**

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

➤ **Solución C**

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

➤ **Solución D**

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

## G. CUANTIFICACIÓN DE CREATININA

➤ **Reactivo de trabajo**

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

## H. CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO UREICO SANGUÍNEO

➤ **Reactivo de trabajo**

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

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

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

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

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

### Reactivos

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

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

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

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

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

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

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

Para preparar 30 mL de solución de FeNTA se mezclan 10 mL de nitrato de hierro 160 mM con 20 mL de nitrilotriacetato de sodio 300 mM, y se agregan 0.2 g de bicarbonato de sodio 120 mM lentamente y con agitación para ajustar a pH 7.4. Una vez obtenido el pH deseado, se interrumpe la agitación con la finalidad de mantener constante este pH por mayor tiempo.

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

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

Precauciones

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

## K. PERFUSIÓN

### ➤ Solución Krebs-Ringer

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

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

### ➤ EDTA 250 mM

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

## VIII. REFERENCIAS

1. Adjei, A., Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral, small-molecule mitogen-activated protein kinase kinase ½ inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in patients with advanced cancers, *Journal of Clinical Oncology*, 2008; **26**, 2139-2146.
2. Ansar, S., Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitrosotriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumor promotion, in mice, *Carcinogenesis*, 1999; **20**, 599-606.
3. Athar, M., Ferric nitrosotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress, *Carcinogenesis*, 1998; **19**, 1133-1139.
4. Atzpodien, J., Interleukin-2 and interferon alfa-2<sup>a</sup>-based immunochemotherapy in advanced renal cell carcinoma: a prospectively randomized trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN), *Journal of Clinical Oncology*, 2004; **22**, 1188-1194.
5. Awai, M., Induction of Diabetes in Animals by Parenteral Administration of Ferric Nitrosotriacetate, *American Journal of Pathology*, 1979, **95**; 663-674.
6. Bahnemann, R., Different Patterns of Kidney Toxicity after Subacute Administration of Na-Nitrosotriacetic Acid and Fe-Nitrosotriacetic Acid to Wistar Rats, *Toxicological sciences*, 1998; **46**, 166-175.
7. Bansal, A., Protective role of vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver, *Chemico-Biological Interactions*, 2005; **156**, 101-111.
8. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary sources, Metabolism, and Nutritional significance, *Nutrition reviews*, 1998; **56**, 317-333.
9. Bhattacharya, S., Functional and nutritional properties of tamarind (*Tamarindus indica*) kernel protein, *Food Chemistry*, 1994; **49**, 1-9.
10. Burcham, P., Genotoxic lipid peroxidation products: DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts, *Mutagenesis*, 1998; **13**, 287-293.
11. Cadenas, S., Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO<sub>3</sub>, *Free Radical Biology and Medicine*. 1999; **26**, 1531-1537.
12. Campbell, S., Nephrectomy in metastatic renal cell carcinoma, *Current Treatment Options of Oncology*, 2003; **4**, 363-372.
13. Cavazzana, A., Bellini duct carcinoma. A clinical and *in vitro* study, *European Urology*, 1996; **30**, 340-344.
14. Chanwitheesuk, A., Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand, *Food Chemistry*, 2005; **92**, 491-497.
15. Chipman, J., DNA oxidation by potassium bromated; a direct mechanism or linked to lipid peroxidation?, *Toxicology*, 1998; **126**, 93-102.
16. Cho, D., The role of mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of advanced renal cell carcinoma, *Clinical Cancer Research*, 2007; **13**, 758s-763s.
17. Chow, W., Epidemiology of renal cell carcinoma. In Vogelzang N., Sacardino P., Shipley W., Coffey D.: *Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology*, 2<sup>nd</sup> edition, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000.
18. Cohen, D., Molecular genetics of familial renal cell carcinoma syndromes, *Clin. Lab. Med*, 2005; **25**, 259-277.

19. Conroy, T., Simplified chronomodulated continuous infusion of floxuridine in patients with metastatic renal cell carcinoma, *Cancer*, 1993; **72**, 2190-2197.
20. Coppin, C., Immunotherapy for advanced renal cell cancer, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2005; **1**, CD001425.
21. Cruz, A. Efecto del pre-tratamiento con un extracto de semillas de uva sobre el daño oxidativo y otras alteraciones inducidas por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en un estudio in vivo. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Bioquímicas), México, Facultad de Química, U.N.A.M. 2007.
22. Dalgin, G., Identification and characterization of renal cell carcinoma gene markers, *Cancer Informatics*, 2007, **3**, 65-92.
23. Dall'Oglio, F., Microvascular tumor invasión, tumor size and Fuhrman grade: a pathologic triad for prognostic evaluation of renal cell carcinoma, *The Journal of Urology*, 2007; **178**, 425-428.
24. Dávalos, M., Efecto del tratamiento con un concentrado de arándano sobre alteraciones inducidas por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) tanto *in vivo* como *in vitro*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Bioquímicas), México, Facultad de Química, U.N.A.M. 2006.
25. D'Autréaux, B., ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, *Molecular Cell Biology*, 2007; **8**, 813-824.
26. De, M., Antimicrobial Screening of Some Indian Species, *Phytotherapy Research*, 1999; **13**, 616-618.
27. Deguchi, J., Sex Hormone –dependent Renal Cell Carcinogenesis Induced by Ferric Nitrilotriacetate in Wistar Rats, *Japanese Journal of Cancer Research*, 1995; **86**, 1068-1071.
28. Deiana, M., Lipid peroxidation in plasma of rats treated with ferric-nitrilotriacetate, in relation to kidney and liver modifications, *Biofactors*, 2005; **23**, 35-44.
29. Ebina, Y., Nephrotoxicity and Renal Cell Carcinoma after Use of Iron and Aluminium-nitrilotriacetate complexes in rats, *Journal of The National cancer institute*, 1986; **76**, 107-113.
30. Esaki, S., The effect of methanolic extract of *Tamarindus indica* Linn. on the growth of clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei*, *Indian Journal of Medical Research*, 2005; **122**, 525-528.
31. Farnsworth, N., Thai medicinal plants recommended for primary health care system. Prachachon, Thailand, 1992.
32. Ficarra, V., Prognostic value of renal cell carcinoma nuclear grading: multivariate analysis of 333 cases, *Urology Int*, 2001; **67**, 130-134.
33. Fleming, S., Collecting duct carcinoma of the kidney, *Histopathology*, 1986; **10**, 1131-1141.
34. Frei, B., Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: evidence from animal studies, *The Journal of Nutrition*, 2003; **133**, 3275-3284S.
35. Fuhrman, S., Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 1982; **6**, 655-663.
36. Fukuda, A., Oxidative stress response in iron-induced renal carcinogenesis: acute nephrotoxicity mediates the enhanced expression of glutathione S-transferase Yp isozyme, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996; **329**, 39-46.
37. Fuzesi, L., Collecting duct carcinoma: Cytogenetic characterization. *Histopathology*, 1992; **21**, 155-160.

38. Gago-Dominguez, M., Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights, *Free Radical Biology and Medicine*, 2006; **40**, 721-733.
39. Gérard-Monnier, D., Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation, *Chemical Res. Toxicology*, 1998; **11**, 1176-1183.
40. Gerhäuser, C., Mechanism-based *in vitro* screening of potential cancer chemopreventive agents, *Mutation Research*, 2003; 523-524, 163-172.
41. Georg, S., Rapid determination of polyphenols and Vitamin C in plant-derived products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005; **53**, 1370-1373.
42. Goldstein, N., The current state of renal cell carcinoma grading, Union Internationale Contre le cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; **80**, 977-980.
43. Gunawan, B., Prognostic impacts of cytogenetic findings in clear cell renal cell carcinoma: Gain of 5q31-qter predicts a distinct clinical phenotype with favorable prognosis, *Cancer Research*, 2001; **61**, 7731-7738.
44. Halliwell, B., Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies?, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008; **476**, 107-112.
45. Hamasaki, S., Nephrotoxicity of ferric nitrilotriacetate, An electron-microscopic and metabolic study, *The American Journal of Pathology*, 1986; **123**, 343-350.
46. Heim, K., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Chemistry*, 2002; **13**, 572-584.
47. Hermanns, R., Urinary excretion of biomarkers of oxidative kidney damage induced by Ferric nitrilotriacetate, *Toxicological Sciences*, 1998; **43**, 241-249.
48. Hilger, R., The Ras-Raf-MEK pathway in the treatment of cancer, *Onkologie*, 2002; **25**, 511-518.
49. Iqbal, M., Attenuation of Iron-Nitrilotriacetate (FeNTA)-mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil, *Food and Chemical Toxicology*, 1998; **36**, 485-495.
50. Jahangir, T., Modulatory effects of *Pluchea lanceolata* against chemically induced oxidative damage, hyperproliferation and two-stage renal carcinogenesis in Wistar rats, *Molecular and cellular Biochemistry*, 2006; **291**, 175-185.
51. Jemal, A., Cancer statistics, *CA. A Cancer Journal of Clinicians*. 2007; **57**, 43-66.
52. Jones, J. Genomics of renal cell cancer: The biology behind and the therapy ahead., *Clinical Cancer Research*, 2007; **13**, 685s-692s.
53. Kaplan, A., Urea. *Clinical Chemistry*. The C.V. Mosby Co. St. Louis. Toronto. Princeton 1984; 1257-1260 y 437 y 418.
54. Kawabata, T., Iron-induced apoptosis in mouse renal proximal tubules after an injection of a renal carcinogen, iron-nitrilotriacetate, *Carcinogenesis*, 1997; **18**, 1389-1394.
55. Khan, N., Anticarcinogenic effect of *Nymphaea alba* against oxidative damage, hyperproliferative response and renal carcinogenesis in Wistar rats, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2005; **271**, 1-11.
56. Khan, N., Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats, *Life Sciences*, 2005; **77**, 1194-1210.

57. Kish, J., Evaluation of low dose continuous infusion 5-fluorouracil in patients with advanced and recurrent renal cell carcinoma. A Southwest Oncology Group Study, *Cancer*, 1994; **74**, 916-919.
58. Komutarin, T., Extract of seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages *in vitro* and *in vivo*, *Food and Chemical Toxicology*, 2004; **42**, 649-658.
59. Kovacs, G., Differentiation between papillary and non papillary renal cell carcinomas by DNA analysis, *Journal of National Cancer Institute.*, 1989; **81**, 527-530.
60. Kovacs, G., The Heidelberg classification of renal cell tumors. *Journal of Pathology*, 1997; **183**, 131-133.
61. Krinke, G., The laboratory rat, Academic Press, 2000.
62. Lane, B., Targeted Molecular Therapy for Renal Cell Carcinoma, *Urology*, 2007; **69**, 3-10.
63. Lee, K. The role of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors*, 2006; **26**, 105-121.
64. Li, J. Subacute Nephrotoxicity and Induction of Renal Cell Carcinoma in Mice Treated with Ferric Nitrotracetate, *Cancer Research*, 1987; **47**, 1867-1869.
65. Libermann, T., Genomics of renal cell cancer: The biology behind and the therapy ahead, *Clinical Cancer Research*, 2007; **13**, 685-692.
66. Lindsey, H., Bevacizumab and erlotinib show promise for kidney cancer, *Lancet Oncology*, 2006; **7**, 15.
67. Levi, F., Declining mortality from kidney cancer in Europe, *Annals of Oncology*, 2004; **15**, 1130.
68. Long, L., Hydrogen peroxide in human urine: Implications for antioxidant defense and redox regulation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999; **262**, 605-609.
69. Loo, G., Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (Review), *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2003; **14**, 64-73.
70. López-Lázaro, M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer letters*, 2007; **252**, 1-8.
71. LoRusso, P., Phase I and pharmacodynamic study of the oral MEK inhibitor CI-1040 in patients with advanced malignancies, *Journal of Clinical Oncology*, 2005; **23**, 5281-5293.
72. Lowry, O., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biology and Chemistry*, 1951; **193**, 265-275.
73. Luengthanaphol, S., Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat-preliminary experiments. *Journal of Food Engineering*. 2004; **63**, 247-252.
74. Maiti, R., Antidiabetic effect of aqueous extract of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; **92**, 85-91.
75. Maiti, R., Attenuation of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin induced diabetic rats by aqueous extract of seed of *Tamarindus indica*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005; **28**, 1172-1176.
76. Mancini, V., Current insights in renal cell cancer pathology, *Urologic Oncology*, 2008; **26**, 225-238.
77. Martinello, F., Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters, *Food and Chemical Toxicology*, 2006; **44**, 810-818.
78. Mates, J., Antioxidant enzymes and human diseases, *Clinic. Biochem.*, 1999; **32**, 595-603.

79. Mathew, A., Global increases in kidney cancer incidence, 1973-1992; *European Journal of Cancer Prevention*, 2002; **11**, 171.
80. Mc Dougal., Epidemiology of renal cell carcinoma. In Vogelzang N., Sacardino P., Shipley W., Coffey D.: *Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology*, 2<sup>nd</sup> edition, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000.
81. Medeiros, J., Grading of renal cell carcinoma: Workgroup No. 2 Union Internationale Contre le cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; 80(5), 990-991.
82. Medicinal Plants of the World, Vol. 1. Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses, 2a. edición, Humana Press. Totowa, New Jersey, 2003.
83. Moon, Y., Dietary flavonoids: effect on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*, 2006; **20**, 187- 210.
84. Moure, A., Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 2001; **72**, 145-171.
85. Murray, R., Urea. *Clinical Chemistry*. The C.V. Mosby Co. St. Louis. Toronto. Princeton 1984; 1261-1266 y 418.
86. Negrier, S., Better survival with interleukin-2-based regimens? Possibly only highly selected patients, *Journal Clinical of Oncology*, 2004; **22**, 1174-1176.
87. Neill, S., Hydrogen peroxide signaling, *Current Opinion in Plant Biology*, 2002; **5**, 388-395.
88. Nelson, E., Renal cell carcinoma: Current status and emerging therapies, *Cancer Treatment Reviews*, 2007; **33**, 299-313.
89. Nickerson, M, Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome, *Cancer Cell*, 2002; **2**, 157-164.
90. Nishida, Y., Origin of renal proximal tubular injuries by Fe(III)-nta chelate, *Z. Naturforschung*, 2007; **62c**, 608-612.
91. Nishiyama, Y., Low incidence of point mutations in H-, K- and N-ras oncogenes and p53 tumor suppressor gene in renal cell carcinoma and peritoneal mesothelioma of Wistar rats induced by ferric nitrilotriacetate, *Japanese Journal of Cancer Research*, 1995; **86**, 1150-1158.
92. Novick, A., Renal tumors. In Walsh P., Retik A., Vaughan E., Wein A.: *Campbell's Urology*, 8<sup>nd</sup> edition, 2672-2731p. Philadelphia, Saunders, 2002.
93. Nyström, T., Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence, *The EMBO Journal*, 2005; **24**, 457-464.
94. Oberley, T., Oxidative damage and cancer, *American Journal of Pathology*, 2002; **160**, 403-408.
95. Okada, S., Induction of the rat renal adenocarcinoma by ferric-nitrilotriacetate (Fe-NTA), *Japan Arch. Intern. Med.*, 1982; **29**, 485-491.
96. Packer, L., Antioxidant activity and biological properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol, *Free Radical Biology and Medicine*, 1999; **27**, 704-724.
97. Phakruschaphan, T., Comparison of peeling and extraction methods in the production of Tamarind seed gum. *The Kasetsart Journal of Natural Sciences*, 1982; **16**, 74-81.
98. Poli, G., Oxidative stress and cell signaling, *Current Medicinal Chemistry*, 2004; **11**, 1163-1182.

99. Prasain K., Serial review: Flavonoids and Isoflavones (Photoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity, *Free radical Biology and Medicine*, 2004; **37**, 1324-1350.
100. Pumthong, G., 1999, Antioxidative activity of polyphenolic compounds extracted from seed coat of *Tamarindus indica* Linn. PhD Thesis, Chiangmai University, Thailand.
101. Ramos, A., Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 2003; **87**, 241-246.
102. Ravaud, A., Update on the medical treatment of metastatic renal cell carcinoma, *European Urology*, 2008; **54**, 315-325.
103. Rice-Evans, C., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 1996; **20**, 933-956.
104. Richie, J., *Urologic Oncology*, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005, 812p.
105. Rietjens, I. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Toxicology and Pharmacology*, 2002; **11**, 321-333.
106. Rini, B., Phase II trial of weekly intravenous gemcitabine with continuous infusion fluorouracil in patients with metastatic renal cell cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 2000; **18**, 2419-2426.
107. Rohdewald, P., A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with diverse clinical pharmacology, *International Journal of Clinical Pharmacology and therapeutics*, 2002; **40**, 158-168.
108. Ross, I., *Medicinal Plants of the World, Vol. 1 Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses*, 2a. edición, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2003.
109. Russell, R., The role of VHL in the regulation of E-cadherin, *Cell Cycle*, 2007; **6**, 56-59.
110. Sakihama, Y., Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology*, 2002; **177**, 67-80.
111. Samuels, B., Modulation of vinblastine resistance in metastatic renal cell carcinoma with cyclosporine A or tamoxifen: a Cancer and Leukemia Group B study, *Clinical Cancer Research*, 1997; **3**, 1977-1984.
112. Schmidt, L., Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas, *Nature Genetics*, 1997; **16**, 68-73.
113. Schoenberg, M., Frequent loss of chromosome arms 8p and 13q in collecting duct carcinoma (CDC) of the kidney, *Genes Chromosomes Cancer*, 1995; **12**, 76-80.
114. Serrano, F., Percentage of high-grade carcinoma as a prognostic indicator in patients with renal cell carcinoma, *American Cancer Society*, 2008; **113**, 477-483.
115. Siddhuraju, P., Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat, *LWT*, 2007; **40**, 982-990.
116. Skinner, D., Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer*, 1971; **28**, 1165-1177.
117. Skubitz, K., Differential gene expression identifies subgroups of renal cell carcinoma, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2006; **147**, 5, 250-267.
118. Sobin, L. TNM Classification of malignant tumors. Union Internationale Contre le cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; 80(9), 1803-1804.



119. Soobratte, M., Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and action, *Mutation research*, 2005; **579**, 200-213.
120. Soong, Y., Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 2004; **88**, 411-417.
121. Srigley, J. Current prognostic factors of renal cell carcinoma: Workgroup No. 4 Union Internationale Contre le cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; 80(5), 994-996.
122. Srinivasan, D., Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine, *Journal of Ethnopharmacology*, 2001, **74**, 217-220.
123. Stadler, W., Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma, *Cancer*, 2005; **104**, 2323-2333.
124. Storkel, S., Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1 Union Internationale Contre le cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; 80(5), 987-989.
125. Sudjaroen, Y., Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp, *Food and chemical Toxicology*, 2005; **43**, 1673-1682.
126. Takizawa, T., Enhancement of hepatocarcinogenesis by Kojic acid rat two stage models after initiation with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine or N-diethylnitrosamine, *Toxicological sciences*, 2004; **81**, 43-49.
127. Tanaka, T., Over-expression of glutathione S transferase Yp isozyme and concomitant down regulation of Ya isozyme in renal cell carcinoma of rats induced by ferric nitrilotriacetate, *Carcinogenesis*, 1998; **19**, 897-903.
128. Tanaka, Y., Coordinated induction of Nrf2 target genes protects against iron nitrilotriacetate (FeNTA)-induced nephrotoxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008; **231**, 364-373.
129. Thomas, J. Recent advances in the diagnosis of renal cell carcinoma, *Diagnostic Histopathology*, 2008; **14**:4, 157-163.
130. Tickoo, S., Ultrastructural observations on mitochondria and microvesicles in renal oncocytoma, chromophobe renal cell carcinoma, and eosinophilic variant of conventional (clear cell) renal cell carcinoma, *American Journal of Surgical Pathology*, 2000; **24**, 1247-1256.
131. Tomlinson, I., Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer, *Nature Genetics*, 2002; **30**, 406-410.
132. Torres, M., Efecto del tratamiento con un extracto de *Tamarindus indica* sobre el daño inducido por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). Tesis para obtener el Título de Química Farmacéutica Biólogo, México, Facultad de Química, U.N.A.M. 2007.
133. Toyokuni, S., Development of high-grade renal cell carcinomas in rats independently of somatic mutations in the Tsc2 and VHL tumor suppressor genes, *Japanese Journal of Cancer Research*, 1998; **89**, 814-820.
134. Toyokuni, S., Formation of 4-hydroxy-2-nonenal modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1994, **91**; 2616-2620.
135. Toyokuni, S., Induction of Renal Cell Carcinoma in Male Wistar Rats Treated with Cupric Nitrilotriacetate, *Laboratory Investigation*, 1996; **75**, 239-248.
136. Toyokuni, S., Iron-Induced Carcinogenesis: The Role of Redox Regulation, *Free Radical Biology and Medicine*, 1996; **20**, 553-566.

137. Tsuchiya, K., Oxygen radicals photo-induced by ferric nitrilotriacetate complex, *Biochimica and Biophysica Acta*, 2005; **1725**, 111-119.
138. Tsuda, T., Screening for Antioxidative Activity of Edible Pulses, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1993; **57**, 1606-1608.
139. Tsuda, T., Antioxidative Components Isolated from the Seed of Tamarind (*Tamarindus indica* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994; **42**, 2671-2674.
140. Umemura, T., Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitrilotriacetate (FeNTA), *Carcinogenesis*, 1990; **11**, 345-347.
141. Umemura, T., Prevention by 2-mercaptoethane sulfonate and N-acetylcysteine of renal oxidative damage in rats treated with ferric nitrilotriacetate, *Japanese Journal of Cancer Research*, 1996; **87**, 882-886.
142. Valko, M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemical Biological Interactions*, 2006; **160**, 1-40.
143. van den Berg, E., Classification of renal cell cancer based on (cyto) genetic analysis, *Contributions to Nephrology*, 1999; **128**, 51-61.
144. Veal, E., Hydrogen peroxide sensing and signaling, *Molecular Cell*, 2007; **26**, 1-14.
145. Velioğlu, Y., Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998; **46**, 4113-4117.
146. Vogelzang, N., Future directions for gemcitabine in the treatment of genitourinary cancer, *Seminars in Oncology*, 2002; **29**, S40-45.
147. Vogelzang, N., Kidney cancer, *Lancet*, 1998; **352**, 1691-1696.
148. Vogelzang, N., Signal-transduction inhibitors in renal cell carcinoma, *British Journal of Urology International*, 2007; **99**, 1289-1295.
149. Walsh, P., Campbell's Urology, Octava edición, Filadelfia, Pensilvania: Saunders, 2002.
150. Wang, R., Mathematical modeling of the stability of green tea catechin epigallocatechin gallate (EGCG) during bread baking, *Journal of Food Engineering*, 2008; **87**, 505-513.
151. Weber, H., Hydrogen peroxide-induced activation of defense mechanisms against oxidative stress in rat pancreatic acinar AR42J cells, *Free Radical Biology and Medicine*, 2007; **42**, 830-841.
152. Williams, R. Serial review: Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004; **36**; 838-849.
153. Wilkinson, M., A phase II study of constant-infusion floxuridine for the treatment metastatic renal cell carcinoma, *Cancer*, 1993; **71**, 3601-3604.
154. World Health Organization (WHO), 2004.
155. Won, K., The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *BioFactors*, 2006; **26**, 105-121.
156. Yoo, C., Prognostic significance of perinephric fat infiltration and tumor size in renal cell carcinoma, *The Journal of Urology*, 2008; **180**, 486-491.
157. Zbar, B., Hereditary papillary renal cell carcinoma, *Journal of Urology*, 1994; **151**, 561-566.