



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**FUNCIONALIDAD DE LA CICLINA D1 EN ETAPAS TEMPRANAS DE UN
MODELO DE CARCINOGENÉISIS RENAL Y EFECTO DE UN COMPUESTO
ANTIOXIDANTE**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
Q. F. B. ROCÍO NAVARRO GARCÍA**

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO FACULTAD DE QUÍMICA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES FACULTAD DE QUÍMICA
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**

MÉXICO, D. F. ENERO, 2013



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

Esta investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. María Elena Ibarra Rubio en el laboratorio 120 del edificio F de la Facultad de Química de la UNAM, gracias al financiamiento por parte del programa UNAM-DGAPA-PAPIIT con el proyecto IN227010 y por parte de la Facultad de Química bajo el Programa de Apoyo a la investigación y el Posgrado (PAIP) No. 4194-10.

Durante los estudios de maestría el sustentante gozó de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, (310136).

El jurado asignado para la revisión de la tesis estuvo conformado por:

Dr. Jorge Vázquez Ramos

Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz

Dr. José Pedraza Chaverrí

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

*A María Alma, Ximena y Rodrigo,
quienes son el tesoro más bello
de mi vida y mi gran inspiración
para dar siempre lo mejor.*

*A Jehová, “pues Dios es quien
produce en mí tanto
el querer como el hacer
para que se cumpla
su buena voluntad”.*

Fil 2:13

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Ma. Elena Ibarra por abrirme las puertas de su laboratorio y por todas sus enseñanzas.

Al Maestro José Solano, por su amabilidad, apoyo y todos sus consejos.

A la M.V.Z. Lucía Macías Rosales de la Unidad de Experimentación Animal, por su importante colaboración en el cuidado y manejo de los animales.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones en la revisión de este trabajo.

A Lety García Gutiérrez por toda la paciencia, disposición y ayuda que ofrece a todos y cada uno de los estudiantes de este programa de posgrado.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Alfredo, Nacho, Karla y Chabetty, quienes fueron parte importante de mi crecimiento. A Paty "Potato", por todas las risas que compartimos. A Telma, que ha sido tan generosa conmigo, por toda su ayuda y sincera amistad. A Francisco, el estupendo guía que en poco tiempo se convirtió en mi buen amigo, por transformar un arduo camino en una divertida aventura.

A Gaby, Lalo y Lila, colegas e inigualables camaradas, porque siguen compartiendo sus sueños conmigo y han sido fundamentales en este viaje.

A mis hermanos y amigos de Tierra Firme por todo el ánimo que me han dado. A Lalo y Jamie Rocha, por todo el cariño y la confianza que me han brindado. A Nelly, la gran amiga que Dios me ha concedido y a su familia, que me ha traído tanta alegría.

A mi tía Claudia y mi tío Víctor, quienes siempre demuestran interés en mi camino y en el de mis hermanos.

A ti, papá, porque sé que estás a mi lado y que cuento contigo; por todo lo que me has dado.

A mi tía Toña, Fer y Dani porque son parte de mi motivación y me llenan de ilusión y dulzura.

A mi tío Beto, Osvaldo y Norma, quienes son esenciales en mi vida y la colman de amor y entusiasmo cada día.

LISTA DE ABREVIATURAS

CCR	Carcinoma de células renales
FeNTA	Nitrilotriacetato de hierro
EST	Extracto de semillas de tamarindo
DEN	N-dietilnitrosamina
Cdk	Cinasas dependientes de ciclinas
Rb	Familia de proteínas de retinoblastoma
CAK	Cinasa activadora de Cdk
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ON	Óxido nítrico
MDA	Dialdehído malónico
WB	Western blot
IP	Inmunoprecipitación
BUN	Nitrógeno uréico sanguíneo
ip	Intraperitoneal
FT	Fenoles totales
ABS	Albúmina sérica bovina
PVDF	Fluoruro de polivinilo
SFB	Suero fetal bovino
PA	Proteína A/agarosa
AC	Anticuerpo primario
URD	Unidades relativas de densitometría
EE	Error estándar

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Antecedentes	3
2.1 Generalidades del ciclo celular	3
2.2 Fase G1 del ciclo celular	4
2.3 Proteínas de la fase G1 del ciclo celular y cáncer	7
2.4 Carcinoma de células renales (CCR)	10
2.5 Modelo de carcinogénesis renal inducida con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)	11
2.6 Extracto de semillas de tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)	13
3. Hipótesis	15
4. Objetivos	16
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos particulares	16
5. Material y métodos	17
5.1 Diseño experimental	17
5.2 Protocolo de tratamiento subcrónico con FeNTA	17
5.3 Obtención del EST	21
5.4 Evaluación de la función renal	21
5.5 Niveles de las proteínas de interés por Western blot	22
5.5.1 Extracción de proteínas del tejido renal	22
5.5.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	22
5.5.3 Electroforesis y transferencia	23
5.5.4 Detección de las proteínas de interés	25
5.6 Determinación de la localización subcelular de la ciclina D1 por Western blot	27
5.6.1 Extracción de proteínas nucleares	27

5.6.2	Electroforesis, transferencia y detección de la ciclina D1	28
5.7	Ensayos de inmunoprecipitación	28
5.8	Análisis estadístico	29
6.	Resultados	30
6.1	Protocolo de tratamiento subcrónico con FeNTA	30
6.2	Localización subcelular de la ciclina D1	32
6.3	Niveles de Cdk4	35
6.4	Niveles de p21 ^{Cip1/Waf1}	36
6.5	Interacción proteínica ciclina D1/Cdk4/p21 ^{Cip1/Waf1}	37
6.6	Niveles de pRb	37
6.7	Niveles de p-pRb	38
6.8	Niveles de p16 ^{INK4a}	40
6.9	Interacción proteínica Cdk4/p16 ^{INK4a}	41
7.	Resumen de resultados	42
8.	Discusión	43
9.	Conclusiones	50
10.	Perspectivas	50
11.	Referencias	51

1. Resumen

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por una proliferación celular descontrolada. Para su estudio se ha dividido en tres etapas: iniciación, promoción y progresión, siendo las dos primeras claves para su control. En un gran número de casos se han encontrado alteraciones en moléculas involucradas en el control de la fase G1 del ciclo celular, como son ciclina D1, Cdk4, proteínas de la familia de retinoblastoma (Rb) y de la familia INK4, entre otras. El carcinoma de células renales (CCR) es el más letal de los tipos de cáncer urológicos y su diagnóstico en etapas tempranas es difícil debido a que los pacientes no presentan síntomas, lo que hace casi imposible el estudio de los eventos en estas etapas. En nuestro laboratorio se ha montado un modelo experimental de CCR inducido en ratas por exposición al nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) durante cuatro meses, en el cual está involucrado el estrés oxidante; en este modelo se utiliza la N-dietilnitrosamina (DEN) como iniciador tumoral. Uno de los objetivos de nuestro grupo de trabajo es caracterizar las etapas tempranas de la carcinogénesis por FeNTA, así como evaluar los efectos de un agente antioxidante: un extracto de semillas de tamarindo (EST), el cual disminuye la incidencia y retarda el desarrollo de CCR en este modelo. Con respecto a alteraciones en proteínas involucradas en el control de la fase G1 del ciclo celular, se ha encontrado un aumento en los niveles de ciclina D1 en etapas tempranas del modelo; con base en estos hallazgos, el objetivo del presente trabajo fue determinar la funcionalidad de la ciclina D1, por lo que se determinaron la localización subcelular de la ciclina D1, los niveles de Cdk4, p21^{Cip1/Waf1}, pRb (p130 y p105), p-pRb (p-p130 y p-p105) y p16^{INK4a}, así como las interacciones ciclina D1/Cdk4/p21^{Cip1/Waf1} y Cdk4/p16^{INK4a}. Para esto, se desarrolló un protocolo subcrónico de un mes de exposición a FeNTA, tiempo en el que se desarrollan alteraciones moleculares y lesiones pre-neoplásicas, en ratas macho Wistar divididas en los siguientes grupos de estudio: control (C), EST (E), DEN (D), FeNTA (F), DEN+FeNTA (DF) y EST+DEN+FeNTA (EDF). En muestras de corteza renal obtenidas al final del protocolo, se evaluó el estatus de cada una de las proteínas antes mencionadas, obteniendo los siguientes resultados: la ciclina D1 se encuentra principalmente en el núcleo en todos los grupos y el carcinógeno induce un aumento en sus niveles. La función de la ciclina D1 es regular la actividad de la Cdk4, cuyos niveles también presentaron un aumento debido al tratamiento con FeNTA. Por otra parte, p21^{Cip1/Waf1}, proteína que se une al complejo ciclina D1/Cdk4, puede promover la función de este complejo mediante su estabilización e internalización nuclear cuando una sola de sus moléculas se le une, o inhibirla si dos o más moléculas se le asocian; los niveles de esta proteína en las muestras de los grupos tratados con FeNTA se elevaron en proporciones similares a las de la ciclina D1 y Cdk4, sin embargo, era necesario investigar sobre

la interacción física entre todas ellas. Esto se realizó mediante ensayos de inmunoprecipitación (IP), en los que se encontró que, probablemente, el complejo ciclinaD1/Cdk4/p21^{Cip1/Waf1} se forma. La función de este complejo es fosforilar a Rb, por lo que se determinó su comportamiento. Se encontró que los niveles totales de ambas proteínas de dicha familia estudiadas (p105 y p130) se elevan en el grupo tratado con EST, pero sólo los niveles de p130 se incrementan por el tratamiento carcinogénico. En cambio, los niveles de las formas fosforiladas (p-p105 y p-p130) se elevan en todos los grupos expuestos a FeNTA, lo que promovería un avance en la fase G1 del ciclo celular. Cabe mencionar que se observó un efecto de protección parcial por parte del EST en la fosforilación de p130, siendo éste uno de los posibles mecanismos por medio de los cuales el extracto protege contra el desarrollo del CCR en nuestro modelo experimental. En conjunto, la localización nuclear de la ciclina D1, el aumento tanto en sus niveles como en los de Cdk4 y p21^{Cip1/Waf1}, la posible formación del complejo ciclina D1/Cdk4/p21^{Cip1/Waf1} y los niveles elevados de p-p105 y p-p130 indican que la ciclina D1 es funcional. Por otro lado, los niveles de p16^{INK4a}, proteína que influye en la funcionalidad de la ciclina D1 al evitar que ésta se una a Cdk4, también incrementaron en todos los grupos tratados con FeNTA, pero en una proporción menor al aumento de la ciclina D1; se sabe que una vez que los niveles de ciclina D1 han rebasado los de los inhibidores de la familia INK4, se puede dar la activación de la Cdk4, por lo que probablemente el aumento observado en los niveles de p16^{INK4a} no represente un obstáculo en la funcionalidad de la ciclina D1; además, al realizar ensayos de IP para determinar su interacción con Cdk4, se encontró su ausencia en la mayoría de las muestras de los grupos expuestos al carcinógeno. Esto sugiere que la sobreexpresión del inhibidor podría ser una respuesta de protección celular en la etapa del modelo estudiada, pero no es efectiva ya que no se está dando la interacción con Cdk4. En conclusión, se sugiere que la ciclina D1 es biológicamente funcional en etapas tempranas del modelo de carcinogénesis renal, ya que también se observaron alteraciones moleculares relacionadas con su función, lo que podría estar participando en la transformación de las células renales debida a la exposición al FeNTA.

2. Antecedentes

2.1 Generalidades del ciclo celular

El desarrollo de un organismo pluricelular a partir de una sola célula hasta formar un individuo adulto requiere de numerosas divisiones celulares. Para que se dé una división, las células completan una serie de eventos ordenados que colectivamente forman el “ciclo celular”. Este ciclo incluye la fase G1, la duplicación del genoma mediante la síntesis de ADN, comprendida en la fase S, la fase G2 y la segregación de los juegos completos de cromosomas a cada una de las células hijas en la fase M. Dependiendo de señales ambientales y del desarrollo, las células en la fase G1 pueden abandonar el ciclo celular, temporal o permanentemente, y entrar a una fase quiescente o de arresto conocida como G0 (van den Heuvel, 2005).

La división celular es un proceso regulado de manera muy precisa. La habilidad de las células para dividirse se atribuye generalmente a la presencia de dos clases de moléculas: la primera comprende a las cinasas dependientes de ciclinas (Cdk, por sus siglas en inglés), que son una familia de cinasas de serina/treonina, y la segunda incluye a las ciclinas, que regulan la actividad de cinasa de las Cdk. De acuerdo a lo anterior y en base a diversos experimentos en células eucariontes, se ha establecido un modelo clásico (ver sección 2.2) de la regulación del ciclo celular (Satyanarayana y Kaldis, 2009).

El grupo de complejos ciclina-Cdk que está directamente involucrado en la conducción del ciclo celular incluye tres Cdk de interfase (Cdk2, Cdk4 y Cdk6), una Cdk mitótica (Cdk1) y diez ciclinas que pertenecen a cuatro diferentes clases (los tipos A, B, D y E). Los complejos ciclina-Cdk específicos son los responsables del manejo de diversos eventos que se sabe ocurren durante la interfase de una manera secuencial y ordenada (Malumbres y Barbacid, 2009). En la figura 1 se representa el ciclo celular y se muestran los complejos ciclina-Cdk específicos que participan en cada fase del mismo.

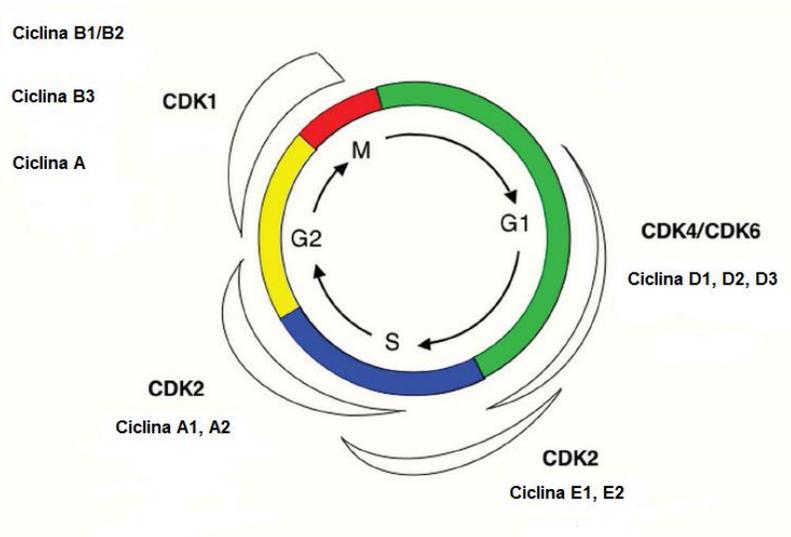


Figura 1. Ciclo celular y complejos ciclina-Cdk correspondientes a cada fase (van den Heuvel, 2005).

2.2 Fase G1 del ciclo celular

La fase G1 del ciclo celular es el intervalo en el que las células responden a señales extracelulares que determinan si éstas deben llevar a cabo la replicación de su ADN y dividirse o si salen del ciclo para entrar a un estado quiescente. Una vez que las células deciden iniciar la replicación del ADN, están comprometidas a completar el ciclo. El momento de G1 en el que se toma esta decisión es conocido como punto de restricción. Cuando las células son inducidas por factores de crecimiento a entrar al ciclo celular, generalmente requieren de estimulación mitogénica continua para poder llegar al punto de restricción, después del cual los mitógenos son prescindibles y las células entran a la fase S, completando el ciclo en su ausencia (Sherr, 2000).

De acuerdo al modelo clásico del ciclo celular, las Cdk4 y/o Cdk6 son activadas en etapas tempranas de la fase G1 por ciclinas tipo D, e inician la fosforilación de la familia de proteínas de retinoblastoma (Rb), la cual incluye a p105 (pRb), p107 (RBL1) y p130 (RB2). Esto lleva a la liberación de Rb de su unión a factores de transcripción de la familia E2F, lo que resulta en la activación y transcripción de los genes de respuesta a E2F requeridos para la progresión del

ciclo celular. Los genes de respuesta temprana a E2F incluyen a las ciclinas tipo E y A. Después, en la fase G1 tardía, la Cdk2 es activada por su unión con la ciclina E y completa la fosforilación de Rb; esto lleva a una mayor activación de la transcripción mediada por E2F (Sherr y Roberts, 2004). Así, la célula pasa a través del punto de restricción en los límites de la fase G1 e inicia la fase S del ciclo.

La pérdida del control del punto de restricción puede resultar en la desregulación de las vías de señalización de factores de crecimiento o en aberraciones de la maquinaria del control del ciclo celular (Ewen y Lamb, 2004). Se ha demostrado que la sobreexpresión de las ciclinas tipo D altera directamente el control del punto de restricción, sugiriendo que la desregulación de este tipo de ciclinas contribuye a la formación de tumores por anulación del punto de restricción y el subsecuente descontrol de la proliferación (Ewen y Lamb, 2004).

Además de la regulación que ejerce la formación de los complejos ciclina-Cdk en el ciclo celular, existe un segundo mecanismo regulatorio que involucra a proteínas inhibidoras de la actividad de Cdk. Éstas pueden modular el ciclo celular previniendo o limitando que los complejos ciclina-Cdk lleven a cabo la fosforilación de sus sustratos (Abukhdeir y Park, 2009). Existen dos familias de inhibidores: la familia Cip/Kip y las proteínas INK4 (Malumbres y Barbacid, 2005).

La familia de proteínas inhibidoras de cinasa Cip/Kip incluye a p21^{Cip1/Waf1} (CDKN1A), p27^{Kip1} (CDKN1B) y p57^{Kip2} (CDKN1C). Esta familia se caracteriza, de manera general, por inhibir a los complejos ciclina E-Cdk, ciclina A-Cdk y ciclina D-Cdk (Abukhdeir y Park, 2009; Sherr y Roberts, 1999). A pesar de que esta familia de proteínas debe su nomenclatura a la primera función que se describió para ellas, actualmente se sabe que también pueden promover la progresión del ciclo celular mediante la estabilización e internalización nuclear de complejos ciclina-Cdk (Abukhdeir y Park, 2009).

Las proteínas de la familia INK4 tienen como blanco específico a las Cdk que se asocian a ciclinas tipo D. La familia incluye a p15^{INK4b} (CDKN2B), p16^{INK4a}

(CDKN2A), p18^{INK4c} (CDKN2C) y p19^{INK4d} (CDKN2D) (Abukhdeir y Park, 2009); éstas se unen específicamente a Cdk4 y Cdk6, formando complejos binarios Cdk-INK4 e impidiendo su asociación con ciclinas tipo D. Además, las proteínas INK4 pueden secuestrar a Cdk4/6 previamente unidas a ciclinas tipo D y a proteínas Cip/Kip, liberando a estas últimas para unirse e inhibir al complejo ciclina E-Cdk2, asegurando así el arresto del ciclo celular (Sherr, 2000).

Específicamente, en la transición G0/G1 del ciclo celular se observan las asociaciones entre las ciclinas tipo D, Cdk 4/6 y los inhibidores p15^{INK4b}, p16^{INK4a} y p21^{Cip1/Waf1} como se indica en la figura 2, en donde se observa también el efecto de dichas relaciones en la progresión del ciclo celular.

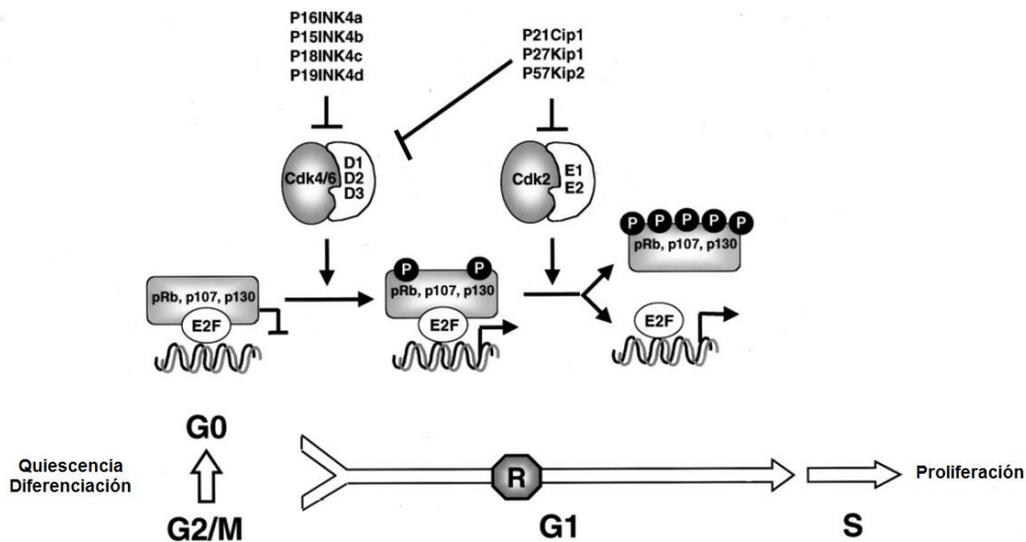


Figura 2. Asociaciones proteínicas de la transición G1/S del ciclo celular (Modificado de Ortega, 2002). Las ciclinas tipo D se asocian a Cdk4/6 para fosforilar e inactivar parcialmente a las proteínas de la familia Rb, las cuales no presentan fosforilación en G0 y reprimen la transcripción de genes blanco de los factores de transcripción E2F. El complejo ciclina E/Cdk2 lleva a cabo la hiperfosforilación de las proteínas de la familia Rb dando lugar a la transición G1/S, promoviendo la proliferación celular. Las proteínas de la familia INK4 pueden impedir la fosforilación de Rb mediante el secuestro de CDK4/6. Así mismo, las proteínas de la familia Cip/Kip, dependiendo de su concentración celular, pueden actuar como reguladores negativos de la transición G1/S al inhibir la actividad de los complejos ciclina D/Cdk4/6 y ciclina E/Cdk2, o bien, participar en su internalización nuclear (ver figura 3).

La localización subcelular de las proteínas involucradas en la transición G1/S del ciclo celular es de gran relevancia, puesto que la formación de los complejos ya revisados es esencial para la progresión del ciclo celular. En la figura 3 se ilustra la compartimentalización del ensamblaje, la actividad y la degradación de las proteínas que participan en la transición G1/S. Para que se lleve a cabo la activación de las Cdk de esta fase se requiere de varios eventos, siendo el primero de ellos un aumento en la expresión de ciclinas tipo D hasta alcanzar el nivel necesario para rebasar los niveles de los inhibidores de la familia INK4 presentes y que se forme entonces el complejo ciclina D-Cdk, el cual une a una proteína de la familia Cip/Kip para que sea internalizado al núcleo (Alt *et al.*, 2002), en donde será activado por la cinasa activadora de Cdk (CAK) (Fisher, 2005); esto conllevará a la fosforilación del sustrato correspondiente, Rb (Paternot *et al.*, 2010), promoviendo la progresión del ciclo celular.

2.3 Proteínas de la fase G1 del ciclo celular y cáncer

Actualmente existe abundante evidencia de que alteraciones en ciclinas específicas, Cdk o en proteínas inhibitorias, juegan un papel importante en diversos tipos de cáncer humano; las modificaciones más frecuentes se relacionan con la ciclina D1 (Tashiro, 2007). En efecto, el rearrreglo, la amplificación y/o el incremento de la expresión del gen de la ciclina D1 y el aumento en los niveles de la proteína se han reportado en varios tipos de cáncer humano, incluyendo adenomas paratiroideos, linfomas de células B, cáncer de mama, colon, pulmón, vejiga e hígado, entre otros (Tashiro, 2007). Se sabe también que la sobreexpresión de la ciclina D1 participa en la potenciación de angiogénesis tumoral, además de que contribuye a la resistencia de diferentes células tumorales ante agentes quimioterapéuticos (Kornmann, 1998).

Así mismo, la actividad de la Cdk4 está desregulada en diversos tumores de humano y se ha demostrado que es crucial para diferentes procesos de transformación oncogénica (Miliani de Marval *et al.*, 2004); la amplificación del gen

de la Cdk4 y su resultante sobreexpresión, o mutaciones que le confieran insensibilidad $p16^{INK4}$ pueden contribuir a dichos procesos (Paternot *et al.*, 2010).

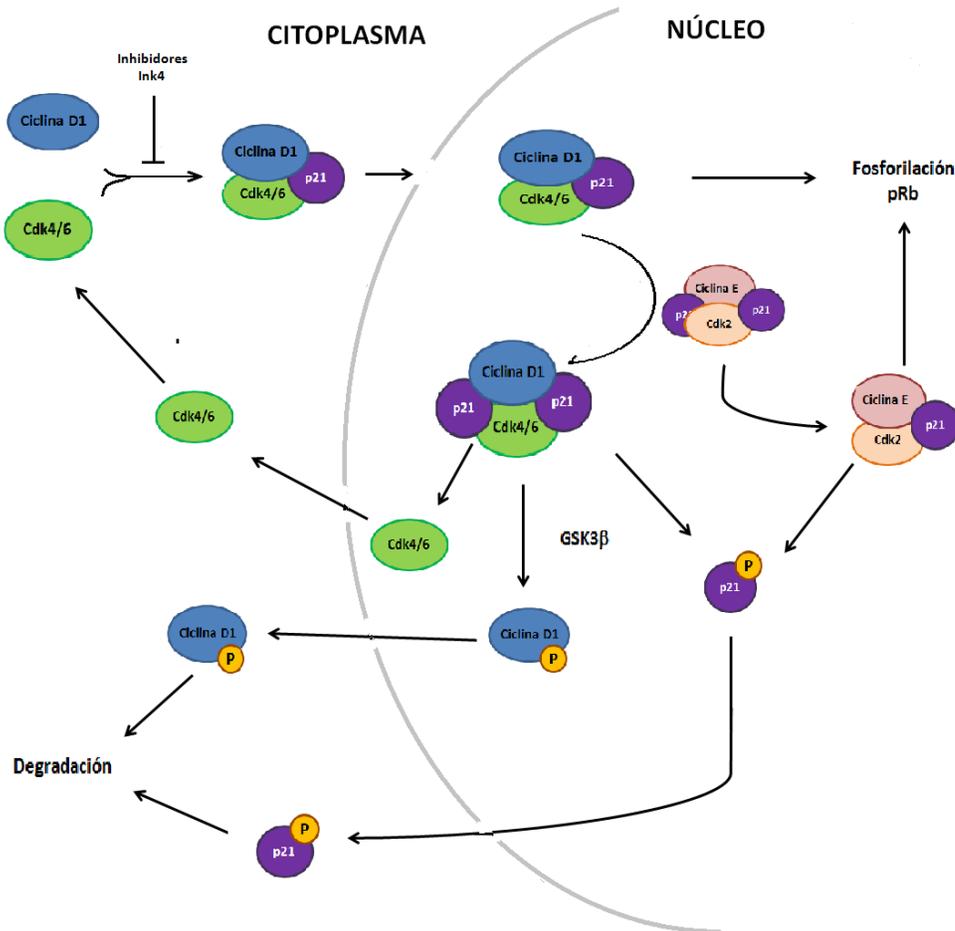


Figura 3. Localización subcelular del ensamblaje y degradación de los complejos Ciclina-Cdk de la fase G1 (modificado de Obaya y Sedivy, 2002). La expresión de la ciclina D1 alcanza los niveles citoplasmáticos necesarios para formar el complejo de fosforilación con Cdk4, el cual es estabilizado e internalizado al núcleo por una proteína de la familia Cip/Kip para poder llevar a cabo la fosforilación de pRb. Una vez realizada la fosforilación, el complejo es inhibido por las proteínas de la familia Cip/Kip que estaban unidas e inhibiendo al complejo ciclina E/Cdk2 para que este último lleve a cabo la hiperfosforilación de pRb. Una vez inhibido el complejo ciclina D1/Cdk4, las cinasas GSK3β y Cdk2 fosforilan a la ciclina D1 y a $p21^{Cip1/Waf1}$, respectivamente, como señal de exportación nuclear y subsecuente degradación en el proteosoma. Por su parte, la Cdk4 es exportada del núcleo y puede ser reutilizada.

En cuanto a alteraciones de las proteínas inhibitorias, el gen de p16^{INK4a} es considerado como supresor de tumores, cuya disminución contribuye al desarrollo de tumores (Ortega, 2002); esto resulta coherente tomando en cuenta su actividad como regulador negativo de la progresión de la fase G1 del ciclo celular. Además, también se ha sugerido que p16^{INK4a} tiene una función en la infiltración celular cuando esta proteína se encuentra en el citoplasma (Nilson y Landberg, 2006).

Por su parte, la pérdida de la expresión o función de p21^{Cip1/Waf1}, ha sido implicada en la génesis y progresión de neoplasias humanas, además de su posible participación en la resistencia a fármacos (Abukhdeir y Park, 2009). Por otro lado, la sobreexpresión de p21^{Cip1/Waf1} puede resultar en un arresto del ciclo celular (Harper et al., 1995). p21^{Cip1/Waf1} juega un papel importante tanto en el control de la proliferación celular como en la diferenciación, senescencia y apoptosis. Es importante mencionar que p21^{Cip1/Waf1} es un factor esencial de estabilización y se asocia al complejo ciclina D-Cdk4/6, formado en el citoplasma, para que éste último pueda ser activado por una fosforilación e internalizado al núcleo, debido a que ninguna de estas proteínas (ciclina D1 y Cdk4/6) cuenta con las señales de localización nuclear necesarias para el traslado del complejo (Alt, 2002). El papel que p21^{Cip1/Waf1} desempeñe, ya sea como factor de estabilización o como inhibidor, depende de sus niveles de expresión: dependiendo del contexto celular, a concentraciones de bajas a medias suele llevar a cabo la función de estabilizar y permitir el traslado nuclear de los complejos ya mencionados, mientras que a concentraciones altas funciona como inhibidor (Morisaki *et al.*, 1999).

pRb está identificado como un gen supresor de tumores que está ausente o mutado en retinoblastomas infantiles (de donde recibe su nombre) y en una amplia variedad de tumores (Canhoto *et al.*, 2000). Esta proteína tiene un papel central en el ciclo celular debido a que actúa como represor de los factores de transcripción E2F, cuyos genes blanco promueven la progresión del ciclo; su inactivación tiene gran influencia en la proliferación de células cancerosas. Se han descrito diferentes mecanismos por medio de los cuales puede darse dicha inactivación,

aunque el más común en cánceres humanos esporádicos es a través de su fosforilación por complejos ciclina/Cdk (Rizzolio *et al.*, 2012).

2.4 Carcinoma de células renales (CCR)

El carcinoma de células renales (CCR) es el tipo más común de cáncer de riñón (>80%) (Gowrishankar y Cairns, 2010), representa alrededor del 3% de todas las neoplasias en adultos y es la más letal de las neoplasias urológicas (Lam *et al.*, 2005). El CCR, que es uno de los tipos de cáncer menos comprendidos, presenta un alto índice de mortalidad (81.7% en México al 2001, Compendio de Cáncer, Dirección General de Epidemiología en México 2001). Por otra parte, es asintomático en etapas tempranas e intermedias por lo que su detección oportuna es casual y poco frecuente; al momento de su diagnóstico, el 30% de los pacientes presentan metástasis (Santana-Ríos *et al.*, 2011). Además, este tipo de cáncer es resistente a las quimioterapias y radioterapias convencionales (Libermann, 2007). Los tratamientos actuales para la enfermedad metastásica incluyen inhibidores de cinasas de tirosina, como el sunitinib o el pazopanib, inhibidores de mTOR, como el temsirolimus o el everolimus, o terapia inmunológica contra el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF) con bevacizumab e IFN (Fisher *et al.*, 2012), pero sus efectos son limitados.

El CCR se origina en las estructuras tubulares del riñón y está clasificado en cuatro tipos histológicos principales. El más común, que representa alrededor del 75-80% de todos los casos de CCR, es el de células claras; los otros tipos son el CCR papilar (10-15%), el cromóforo (5%) y el de ducto colector (1%). Cerca del 4% del total de casos de CCR es hereditario y el 96% es esporádico (Gowrishankar y Cairns, 2010).

La ocurrencia del CCR en hombres y mujeres se da en una proporción 2:1, respectivamente (Lipworth *et al.*, 2006). Algunos de los factores de riesgo son el tabaquismo, la obesidad, la hipertensión, la falla renal crónica y algunos factores hereditarios (Gowrishankar y Cairns, 2010). Así mismo, se ha demostrado la

presencia de estrés oxidante en este tipo de cáncer, pues se han encontrado niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de óxido nítrico (ON) en la sangre de los pacientes, así como un incremento de peroxidación lipídica (Ganesamoni *et al.*, 2012) y concentraciones elevadas de formas oxidadas de glutatión (Drewniak *et al.*, 2012) en el tejido tumoral. Por otro lado, el riesgo de desarrollar dicha enfermedad se ha relacionado inversamente a la ingesta de frutas y verduras (Bravi *et al.*, 2006), alimentos que contienen compuestos con efectos antioxidantes; de hecho, se ha descrito un posible beneficio por el consumo de vitaminas E, C (Bosetti *et al.*, 2006) y algunas clases de flavonoides (Bosetti *et al.*, 2007).

En relación a las proteínas de la fase G1 del ciclo celular, en el CCR humano se ha reportado que la sobreexpresión de la ciclina D1 correlaciona con el tamaño del tumor (Ge *et al.*, 2007), y, como ya se mencionó, el aumento en los niveles de ciclina D1 es una de las alteraciones frecuentes de la fase G1 asociadas al cáncer en general (Hedberg *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha encontrado que p16^{INK4a} está ausente o tiene una expresión muy baja en una gran proporción de muestras de este tipo de tumores (82%) (Ikuerowo *et al.*, 2007). Además, Kashyap y colaboradores (2005) propusieron a p21^{Cip1/Waf1} como marcador tumoral potencial de esta enfermedad, pues observaron una sobreexpresión de esta proteína en una línea celular de CRR.

2.5 Modelo de carcinogénesis renal inducida con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)

El contar con un modelo experimental de CCR bien caracterizado nos permitiría definir sus alcances como equivalente experimental del padecimiento en el humano, representando así una herramienta para la búsqueda de alteraciones específicas, la identificación de nuevos marcadores en etapas tempranas del CCR para su detección oportuna y el desarrollo de agentes terapéuticos más eficaces para su tratamiento.

Uno de los pocos modelos experimentales de carcinogénesis renal es aquél de carcinoma de túbulo proximal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) (Bahnmann *et al.*, 1998). El FeNTA es un complejo de fácil absorción que induce daño por oxidación en los túbulos proximales renales, lo que lleva a una alta incidencia de CCR en ratas (Tanaka *et al.*, 2000). El mecanismo por el cual el FeNTA produce daño en los túbulos proximales renales no se ha elucidado, sin embargo, se ha sugerido que la nefrotoxicidad de dicho compuesto es consecuencia de la generación de especies reactivas de oxígeno producidas mediante la reacción de Fenton-Haber Weiss (Tsuchiya *et al.*, 2005).

En roedores, la administración aguda de FeNTA vía intraperitoneal genera necrosis tubular, y con esquemas de exposición crónica se desarrolla CCR; además, la administración única de N-dietilnitrosamina (DEN) como iniciador tumoral, catorce días antes del comienzo del tratamiento crónico con FeNTA, aumenta la proporción de animales con CCR y reduce el tiempo necesario de exposición al carcinógeno para el desarrollo de tumores (Athar e Iqbal, 1998; Vargas-Olvera *et al.*, 2012).

En nuestro laboratorio, después del tratamiento crónico con FeNTA con una duración de cuatro meses, se lograron obtener tumores de CCR de células claras en ratas macho Wistar sin presentarse alteraciones en la función renal, lo que también ocurre en el padecimiento en el humano (Vargas-Olvera *et al.*, 2012).

También en nuestro laboratorio hemos encontrado que la exposición subcrónica a FeNTA durante un mes genera displasia en los riñones de los roedores (Vargas-Olvera *et al.*, 2012) y alteraciones en la expresión y fosforilación de c-Jun, ERK-1, JNK y p38 (α y β), así como en la actividad de AP-1 (Aguilar-Alonso, 2010) y NF-kB (Pariente-Pérez, 2012). Relevantemente para este trabajo, se encontró un aumento en los niveles renales de la ciclina D1, sin embargo, se desconocen los efectos del aumento de esta proteína, la cual, como ya se mencionó, juega un papel importante en la regulación de la fase G1 del ciclo celular. Todo esto nos ha llevado a sugerir que un mes de tratamiento con FeNTA podría representar una etapa temprana de carcinogénesis en este modelo

experimental de CCR. Así mismo, otros autores han descrito la pérdida monoalélica específica del gen supresor de tumores p16^{INK4a} con tratamientos cortos con FeNTA (Hiroyasu *et al.*, 2002). En tumores de esta enfermedad se ha encontrado que en un 53.8% de los casos existen alteraciones genéticas como deleción homo y hemicigótica o metilación aberrante del promotor de dicho gen, lo cual está asociado con el grado nuclear histológico y la actividad metastásica (Tanaka *et al.*, 1999). A pesar de ello, no se han estudiado los niveles proteínicos o del ARNm de p16^{INK4a}, ni se ha determinado el comportamiento de ninguna de las otras proteínas de esta vía.

2.6 Extracto de semillas de tamarindo (*Tamarindus indica* L.)

Muchas verduras y frutas, así como otros tipos de alimentos como son el vino, granos, etc., son ricos en compuestos fenólicos, moléculas antioxidantes que protegen a las células contra los efectos dañinos de EROs (Prior, 2003; Wu *et al.*, 2004). La capacidad antioxidante de un compuesto fenólico se relaciona con el número de grupos hidroxilo presentes en su estructura química, de esto dependerá la eficacia con que estos compuestos neutralizan a los radicales libres (Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2009). El consumo de frutas, vegetales y granos está asociado, entonces, con la reducción del riesgo de presentar enfermedades causadas por radicales libres (Wargovich, 2000), como lo es el cáncer. En la actualidad, los compuestos fenólicos están considerados entre las moléculas con mayor capacidad antioxidante (Heo *et al.*, 2007).

Los efectos benéficos de los compuestos fenólicos están relacionados, por ejemplo, con la inhibición de la lipoperoxidación, inducción de enzimas antioxidantes, efectos antiinflamatorios, inducción de apoptosis y del arresto del ciclo celular e inhibición de la metástasis y de la angiogénesis (Nichenametla *et al.*, 2006). Además, en los últimos años, se ha señalado que algunos de estos resultados se dan por la inhibición de vías de señalización como PI3K/Akt, ERK, Ras/Raf/MAPK y/o la activación de vías como JNK, p53 y caspasas; esto lleva a la regulación de la expresión de genes como Waf-1, BAX, Bcl-2 y la supresión de la

activación de factores de transcripción como AP-1 y NF-kB (Lee y Lee, 2006; Nichenametla *et al.*, 2006).

El tamarindo, *Tamarindus indica* L., presenta un alto contenido de compuestos fenólicos (Lamien-Meda *et al.*, 2008) tanto en las semillas como en el pericarpio (Sudjaroen *et al.*, 2005), por lo que se dice que posee una actividad antioxidante (Povichit *et al.*, 2010). Se ha descrito que la composición de compuestos fenólicos en las semillas de tamarindo es la siguiente: tetrámero de procianidina (30.2%), hexámero de procianidina (23.8%), trímero de procianidina (18.1%), pentámero de procianidina (17.6%), procianidina B2 (5.5%) y (-)-epicatequina (4.8%) (Sudjaroen *et al.*, 2005). Como ejemplo de los efectos benéficos de los componentes fenólicos del tamarindo, se ha demostrado que la procianidina B2 inhibe el daño oxidante al ADN inducido por Fe^{2+} y H_2O_2 (Sakano *et al.*, 2005) y también es capaz de inhibir algunas cinasas, como ERK, JNK y p38-MAPK, previniendo la activación de algunos oncogenes relacionados (Zhang *et al.*, 2006).

En nuestro laboratorio se preparó un extracto de semillas de tamarindo (EST) que presenta un alto contenido de compuestos fenólicos y una notable capacidad de inactivación del radical superóxido *in vitro*, además de tener buena estabilidad a largo plazo (Vargas-Olvera, 2009, 2012). Al probar sus efectos biológicos, se observó que el EST administrado a ratas Wistar a una dosis de 100mg/kg/día, disminuye la producción renal de peróxido de hidrógeno y protege notoriamente contra el daño severo en la función renal inducidos por el tratamiento agudo con FeNTA; más aún, el EST fue capaz de disminuir la incidencia de CCR en un 21.05 % en un estudio de exposición crónica a FeNTA (Vargas-Olvera, 2009, 2012).

Con base en todos estos antecedentes y particularmente en el hallazgo del aumento en los niveles renales de la ciclina D1 debido al tratamiento con FeNTA, en el presente trabajo se planteó la siguiente:

3. Hipótesis

- a) Los niveles de la ciclina D1 se encontrarán aumentados en el núcleo y la proteína será biológicamente funcional en una etapa temprana de un modelo experimental de CCR inducido con FeNTA.
- b) Específicamente, el tratamiento con el carcinógeno inducirá un incremento en los niveles de Cdk4 y de p21^{Cip1/Waf1}, proteínas que presentarán una asociación con ciclina D1. Los niveles de p16^{INK4a} disminuirán y la proteína no interactuará con Cdk4. Los niveles de pRb podrán no verse afectados, a diferencia de su forma fosforilada, p-pRb, que aumentará en los grupos tratados con FeNTA.
- c) El extracto de semillas de tamarindo protegerá contra las alteraciones en el comportamiento de la ciclina D1 y de moléculas relacionadas con su función.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Investigar si la ciclina D1 es funcional en etapas tempranas de un modelo de carcinogénesis renal mediante la determinación de su localización subcelular, de los niveles de Cdk4 y p21^{Cip1/Waf1}, de la interacción entre todas estas proteínas, así como de los niveles de p16^{INK4a}, su interacción con Cdk4 y los niveles de pRb y p-pRb; además, evaluar el efecto de un extracto de semillas de tamarindo sobre las posibles alteraciones que se den por el tratamiento con el carcinógeno.

4.2 Objetivos particulares

- Desarrollar un protocolo de tratamiento subcrónico con FeNTA en ratas macho Wistar.
- Determinar en corteza renal:
 - La localización subcelular de la ciclina D1 por Western blot (WB).
 - Los niveles de Cdk4, p21^{Cip1/Waf1}, p16^{INK4a}, pRb y p-pRB por WB.
 - La asociación de la ciclina D1 con Cdk4 por inmunoprecipitación (IP).
 - La presencia del inhibidor p21^{Cip1/Waf1} en estos inmunoprecipitados.
 - La asociación de Cdk4 con el inhibidor p16^{INK4a} por IP.
- Evaluar el efecto de un extracto de semillas de tamarindo en las posibles alteraciones debidas al tratamiento con FeNTA que presenten las moléculas ya mencionadas.

5. Material y métodos

5.1 Diseño experimental

En la figura 4, se muestra el diseño experimental desarrollado con base en la literatura (Toyokuni *et al.*, 1994; Eybl *et al.* 2008) y en trabajos de nuestro laboratorio (Aguilar-Alonso, 2010; Torres-Martínez, 2007; Vargas-Olvera, 2009).

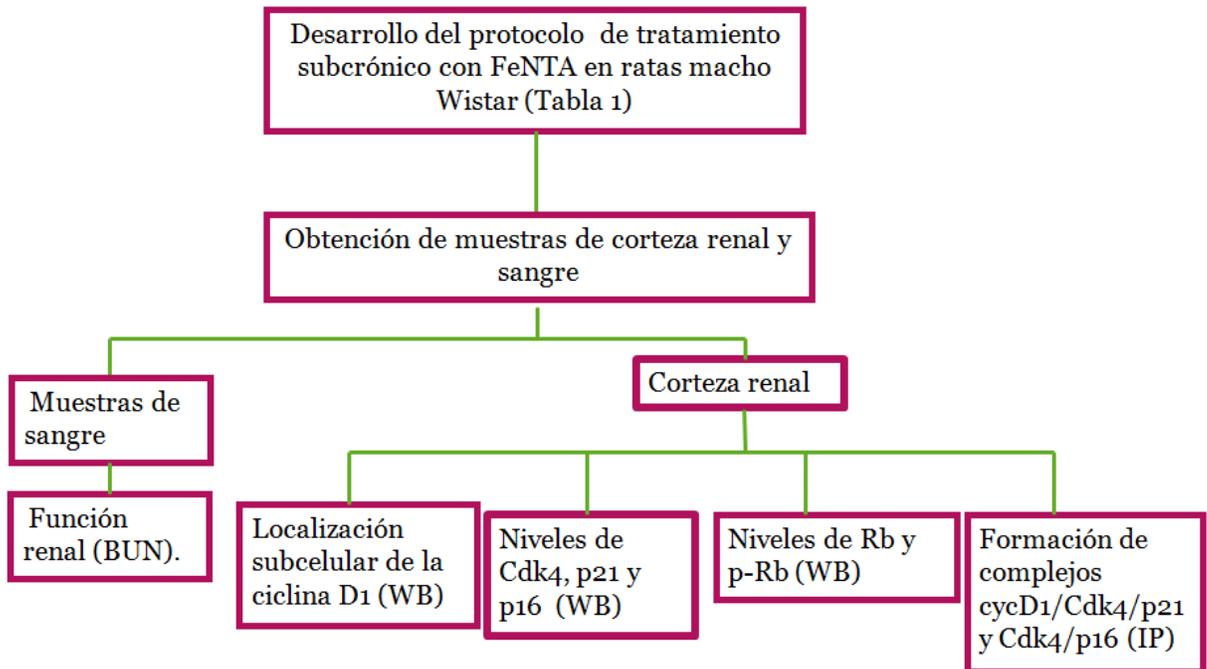


Figura 4. Diseño experimental del proyecto.

5.2 Protocolo de tratamiento subcrónico con FeNTA

Para el desarrollo del protocolo de tratamiento subcrónico con FeNTA se estudiaron un total de 48 ratas Wistar macho (Harlan México-UNAM), cuyo peso inicial oscilaba entre los 50 y 70 g. El total de las ratas se dividió en seis grupos como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Grupos de estudio y esquemas de tratamiento para el desarrollo del protocolo de exposición subcrónica a FeNTA.

Grupo	No. de animales	Esquema de tratamiento
C	7	Vehículos.
E	7	Administración del EST (100 mg/kg/día) en el agua de beber durante todo el estudio.
D	7	Administración ip única de DEN (200mg/kg) quince después de iniciado el tratamiento con el EST.
F	7	Administración ip de FeNTA dos veces por semana con aumentos graduales de la dosis (3,5,7,9 mg _{Fe} /kg) iniciando quince días después de la administración de DEN.
DF	10	Administración única de DEN y FeNTA como se describió en los grupos anteriores.
EDF	10	Administración de EST (100 mg _{FT} /kg/día), DEN y FeNTA como se describió en los grupos anteriores.

FT: fenoles totales; ip: intraperitoneal

En la figura 5 se presenta el esquema de tratamiento para el desarrollo del protocolo de exposición subcrónica a FeNTA. Antes de iniciar el estudio, se consideró un periodo de adaptación de las ratas, después del cual comenzó la administración del extracto a los grupos E y EDF, que se continuó hasta finalizar el estudio. El EST se administró en el agua de beber en una dosis de 100 mg/kg/día, la cual, según estudios previos, presenta el mayor efecto antioxidante y disminuye la incidencia y el grado de avance de los tumores (Vargas Olvera, 2009, 2012). La cantidad de EST que debía ser añadida al agua para alcanzar la dosis mencionada se calculó de acuerdo al promedio del líquido consumido al día por las ratas; esto se determinó a lo largo del protocolo para realizar ajustes en caso de ser necesario.

Dos semanas después de haber iniciado la administración del EST, se suministró DEN (Sigma Aldrich Inc., St. Louis MO, EUA) a los grupos D, DF y EDF

como iniciador tumoral (Khan, 2005) vía intraperitoneal (ip) a una dosis de 200 mg/kg. La preparación del reactivo se realizó diluyendo el contenido del vial (990-999 mg) en 11 mL de solución salina y se ajustó el volumen a administrar en función del peso de cada animal.

La administración del carcinógeno renal FeNTA a los grupos F, DF y EDF, comenzó quince días después del suministro de la DEN con un esquema de dos inyecciones (ip) por semana y con aumento gradual de la dosis, iniciando con 3 mg_{Fe}/kg, 5 mg_{Fe}/kg, 7 mg_{Fe}/kg hasta 9 mg_{Fe}/kg.

El FeNTA se preparó al momento de su administración siguiendo el método de Awai *et al.* (1979) con ligeras modificaciones. Se preparó una solución de nitrato de hierro (Sigma Aldrich Inc., St Louis MO, EUA) 160 mM y otra de nitrilotriacetato de sodio 320 mM, utilizando en ambos casos una solución de bicarbonato de sodio 120 mM como disolvente. Se mezclaron ambas soluciones en una proporción 1:2. La solución resultante, con una concentración final de hierro de 2.98 mg/mL, se ajustó a pH 7.4 con bicarbonato de sodio. Es importante señalar que la cantidad administrada de FeNTA se basó en la cantidad de hierro contenido en la solución y no en la del complejo FeNTA. Este esquema está basado en un protocolo de tratamiento crónico con FeNTA con una duración de cuatro meses, en el que se obtuvieron los tumores de CCR dos meses después de la última administración del carcinógeno (Vargas-Olvera, 2009, 2012).

Un mes después de la primera inyección de FeNTA, se sacrificaron las ratas por decapitación a las 48 h de la última administración del carcinógeno. Acto seguido, se recolectaron muestras sanguíneas, se extrajeron los dos riñones de cada rata y se separó la corteza renal almacenándola a -70°C hasta el día de los análisis correspondientes.

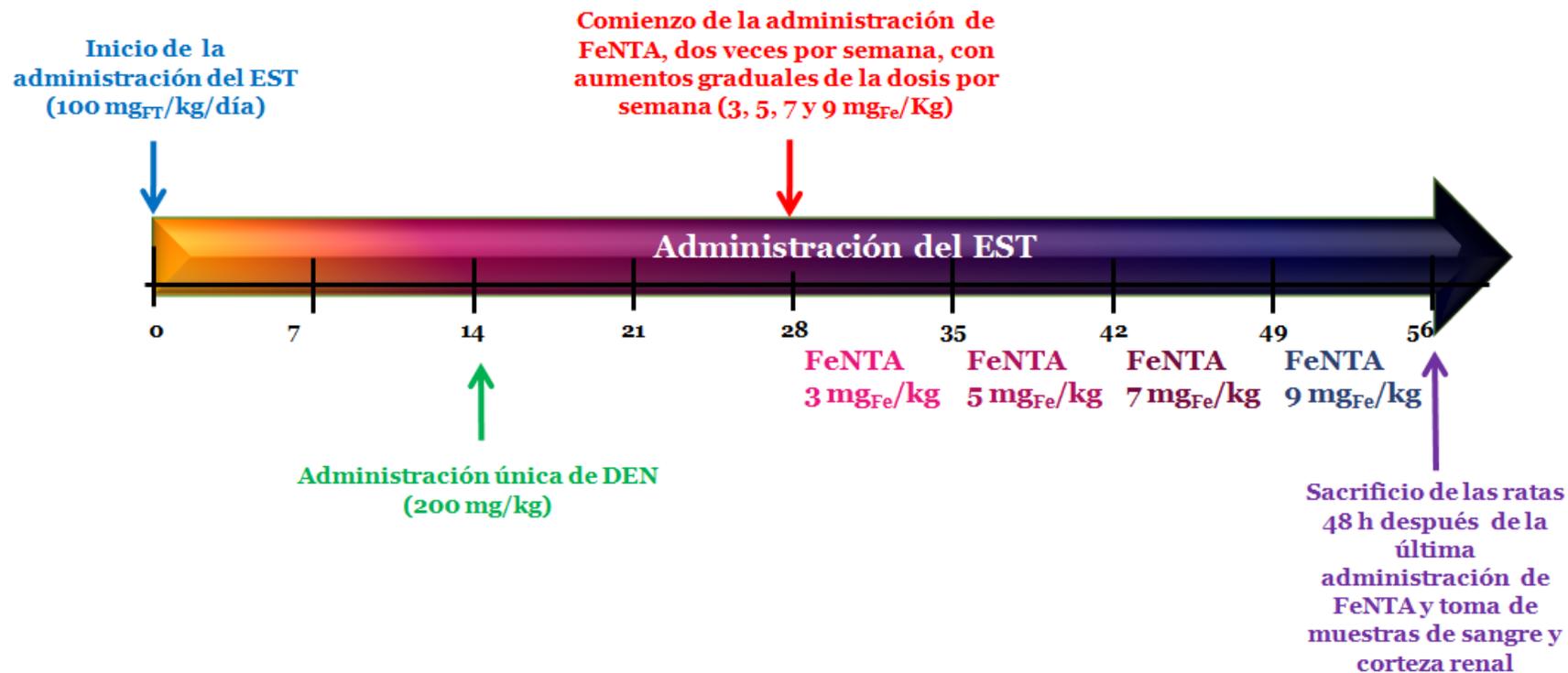


Figura 5. Esquema de tratamiento para el desarrollo del protocolo de exposición subcrónica a FeNTA.

5.3 Obtención del EST

Se obtuvieron las semillas de tamarindo y se separó la cáscara de la semilla mecánicamente. Se colocaron 25 g de cáscara de semillas de tamarindo en 500 mL de etanol anhidro macerándolos durante 24 h a temperatura ambiente; esto se repitió tres veces. Posteriormente, se separó la cáscara del extracto por decantación y filtración, y se concentró el extracto al vacío en rotaevaporador hasta obtener un polvo seco de color café claro. En estudios previos se realizó la caracterización del EST mediante la determinación de su contenido de fenoles totales (FT) ($1.07 \pm 0.027 \text{ mg}_{\text{FT}}/\text{mg}_{\text{EST}}$) y de su capacidad de inactivación del anión superóxido in vitro ($\text{IC}_{50} = 2.7 \pm 0.03 \text{ } \mu\text{g}_{\text{EST}}/\text{mL}$); además se demostró que el extracto presenta una buena estabilidad a largo plazo y que el método de extracción es reproducible (Vargas-Olvera, 2009).

5.4 Evaluación de la función renal

La función renal se evaluó mediante la determinación de nitrógeno uréico sanguíneo (BUN, por sus siglas en inglés). La urea es el producto final de la degradación de aminoácidos; una vez sintetizada se transporta por circulación sanguínea hasta los riñones en donde se filtra para su excreción. La medición de los niveles de BUN es una herramienta clínica para la evaluación de la función renal, pues su filtración y excreción están afectadas en casos de disfunción renal.

Para esta determinación se utilizó el estuche comercial Urea-37 (SPINREACT, Girona, España), el cual se basa en la reacción de la urea con o-ftaldehído en medio ácido, en donde se forma un compuesto colorido que absorbe a 510 nm. Los resultados se expresan como mg de BUN/dL de suero.

5.5 Niveles de las proteínas de interés por Western blot

Por medio de la técnica conocida como Western blot se pueden detectar, con ayuda de anticuerpos específicos, proteínas que han sido separadas una de otra de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en condiciones desnaturizantes y que después han sido transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilo (PVDF), obteniendo una réplica del patrón de corrimiento proteínico en el gel. Para determinar los niveles de p16^{INK4a}, p21^{Cip1/Waf1}, Cdk4, pRb y p-pRb se utilizaron los homogenados de corteza renal que se describen a continuación.

5.5.1 Extracción de proteínas del tejido renal

Para el análisis de los niveles de las proteínas en las muestras de corteza renal, se homogenizaron 100 mg de tejido con un Politron PT-1035 GT (Kinematica, Bohemia, NY) en 650 µL de amortiguador de lisis (ditiotreitól (DTT) 1 mM, TRIS HCl 10 mM, glicerol 30%, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, Triton X-100 al 1%, ortovanadato 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, azida de sodio 15 mM) enriquecido con inhibidores de proteasas (COMPLETE®, Roche, Mannheim, Germany) y de fosfatasas (PhosSTOP®, Roche, Mannheim, Germany). Los homogenados se centrifugaron a 1300 x g (Centrífuga Thermo Scientific Legend RT+, Alemania) a 4°C durante 30 min, después de lo cual se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta el día de su análisis. A cada homogenado se le determinó el contenido de proteínas totales mediante el método de Bradford, que se describe a continuación.

5.5.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

El método Bradford de cuantificación de proteínas se basa en un ensayo colorimétrico que involucra la unión del azul brillante de Coomassie G-250 a proteínas, lo que causa un cambio en la absorción máxima del colorante de 465 a 595 nm. La absorbancia a esta longitud de onda es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra (Bradford, 1976).

Se realizaron diluciones 1:10, con agua desionizada, de los homogenados de corteza renal y de éstas se colocaron 0.5 ó 1.0 μL en una placa de 96 pozos (Corning incorporated, Corning, NY, USA), añadiendo el volumen de agua necesario para alcanzar 100 μL . Se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (ABS) a partir de una solución stock de 10 mg/mL como se describe en la tabla 2. Se agregaron 150 μL del reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein assay, Bio-Rad Laboratories inc., CA, USA) previamente diluido 1:4 con agua desionizada y se prosiguió con la lectura de las absorbancias a 595 nm. La concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de proteínas en las muestras se calculó por interpolación de la absorbancia obtenida en la ecuación de la línea recta descrita por la curva patrón de ABS.

Tabla 2. Curva patrón de ABS para la determinación de proteínas por el método de Bradford

Vol. del stock (μL)	Agua (μL)	Concentración final de ABS ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
0	100	0
10	90	1.2
20	80	2.4
30	70	3.6
40	60	4.8
50	50	6.0
60	40	7.2
70	30	8.4
80	20	9.6
90	10	10.8
100	0	12.0

5.5.3 Electroforesis y transferencia

Los geles SDS-poliacrilamida se prepararon con una solución de acrilamida al 10% (gel de resolución), la mezcla se agitó suavemente y se vació en los moldes, llenando hasta 1.5 cm del tope (gel de resolución). Se añadieron 150 μL

de isopropanol a la superficie del gel de resolución y se dejó polimerizar durante 30 min. Se eliminó el isopropanol por decantación y se lavó con agua para eliminar la acrilamida no polimerizada; el exceso de humedad se elimina con papel Whatman.

Se preparó una segunda mezcla de acrilamida al 5% (gel concentrador) y se vertió sobre el gel de resolución. Se colocó el peine evitando hacer burbujas, esperando hasta la polimerización total del gel. Una vez polimerizado, se retiró el peine cuidadosamente y se lavó con agua para eliminar la acrilamida no polimerizada. Los moldes con los geles se montaron en una cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell, Bio-Rad, USA), la cual se llenó con amortiguador de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1%, pH=8.3).

Se colocó un volumen de muestra que contenía 40-120 µg de proteína en tubos eppendorf; se agregó el mismo volumen de amortiguador desnaturante (Tris-HCl 50 mM pH=6.8, β-mercaptoetanol 1%, SDS 1%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%) y se mezcló. Los tubos se incubaron en un baño de agua hirviendo durante 5 min, después de lo cual se colocaron en hielo y se esperó a que éstos se enfriaran. Posteriormente se procedió a cargar las muestras en los pozos del gel concentrador.

Los geles se corrieron a 85 mV por 3 h en promedio. Los moldes se desmontaron, se eliminó el gel concentrador y los geles de resolución se prepararon para la transferencia a membranas de PVDF (Immobilion-P, Millipore Corporation, MA, USA) introduciéndolos en amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, metanol 10%, pH=8.3) durante 10 min.

Las membranas de PVDF se recortaron con dimensiones de 9X6 cm y se acondicionaron sumergiéndolas en metanol durante 5 min, después en agua por 2 min y finalmente en amortiguador de transferencia.

Para el proceso de transferencia se utilizó un equipo de transferencia semiseca (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, USA), excepto para el caso de pRb y p-pRb, donde se llevó a cabo una transferencia húmeda (Mini-

PROTEAN[®] Tetra Cell, Bio-Rad, USA). Es importante evitar que la membrana se seque o que se formen burbujas, de ser así, deben ser eliminadas. La transferencia se lleva a cabo a 70 mA/gel durante 1.5 h, en ambos casos.

Una vez terminada la transferencia, se desmontaron los geles y las membranas se colocaron en 5 mL de solución de bloqueo preparada previamente con leche descremada (1%) o suero fetal bovino (1%), según la proteína a determinar, en PBS-Tween (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HCO₃ 100 mM; KH₂CO₃ 2.0 mM; Tween 0.1%, pH 7.4) y se sometieron a agitación suave durante 1 h.

Después del bloqueo, las membranas se colocaron en 5 mL de una dilución del anticuerpo primario (p16 F-12, p21 C-19, Rb C-50 y p-Rb (Thr821/826) Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) previamente preparado en PBS-Tween dependiendo de la proteína a detectar; las membranas se dejaron incubando a 4°C durante una noche (dos, en el caso de p16^{INK4a}) en agitación suave constante.

Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el anticuerpo primario y las membranas se lavaron con PBS-Tween tres veces en intervalos de 15 min. Después de esto se añadieron 5 mL de una dilución del anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa previamente preparada (el anticuerpo y la dilución dependen de la proteína a detectar) y se incubó durante 1 h (2, en el caso de pRb y p-pRb) a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente se eliminó el anticuerpo secundario y se procedió a realizar lavados con PBS-Tween como se describió anteriormente.

5.5.4 Detección de las proteínas de interés

Se preparó el sustrato de detección (luminol y H₂O₂, Millipore Immobilon[™] Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore Corporation, MA, USA) y se dejó atemperar durante 30 min. Una vez en el cuarto oscuro, se colocaron las membranas sobre un acetato en el estuche de exposición; se vertieron 400 µL del

sustrato de detección sobre cada membrana, y se incubó el tiempo suficiente hasta que la señal fuera evidente y se colocó un segundo acetato sobre la membrana para después exponer la placa de autorradiografía. El tiempo de exposición depende de la proteína a detectar. Transcurrido el tiempo de exposición se retiró la placa de autorradiografía y se colocó en la solución reveladora con agitación constante hasta la aparición de la banda. Se removió la placa de la solución reveladora, se enjuagó con agua y se colocó en solución fijadora, en donde se agitó por 3 min y se enjuagó con agua. Las placas se dejaron secar para digitalizarlas y realizar su análisis densitométrico (GraphPad Prism 5) ajustando las unidades de densitometría de las bandas de las proteínas de interés con las del control de carga correspondiente y dividiendo este valor con aquél del grupo control. En la tabla 3 se muestran las condiciones específicas para el Western blot de cada una de las proteínas de interés.

Tabla 3. Condiciones específicas para el Western blot de las proteínas de interés

Proteína	Cantidad Proteína (µg)	Geles SDS-PAGE (%)	Transferencia	Bloqueo	Tiempo hibridación anticuerpo primario (noches)	Tiempo hibridación anticuerpo secundario (h)
p16	100	15	Semihúmeda, 2 h, 250 mA	Leche 1%	2	1
p21	70	12			1	
Cdk4	40	10			1	
pRb	120	8	Húmeda,	SFB 10%	2	
p-pRb	120	8	15 h, 400 mA			

*SFB, suero fetal bovino

5.6 Determinación de la localización subcelular de la ciclina D1 por Western blot

Con el fin de determinar la localización subcelular de la ciclina D1 se analizaron por WB las fracciones citoplasmática y nuclear de los homogenados de corteza renal.

5.6.1 Extracción de proteínas nucleares

Para realizar el ensayo de localización subcelular de la ciclina D1, se llevó a cabo una revisión bibliográfica y se probaron diversas técnicas hasta encontrar aquella que nos brindara un fraccionamiento limpio (fracción citoplasmática libre de componentes nucleares y viceversa) para la obtención de resultados confiables. A continuación se describe la técnica utilizada:

Se colocaron 100 mg de tejido renal en 200 μ L de amortiguador 1 (sacarosa 0.25 M, KCl 25 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Tris.Cl 10 mM, pH: 7.4, enriquecido con una tableta de COMPLETE®) y se homogenizaron con un Politrón PT-1035 GT (Kinematica, Bohemia, NY) a velocidad mínima. Se añadieron 200 μ L de amortiguador 1 y se centrifugó a 800 xg, a 4°C, por 10 min (centrífuga Thermo Scientific LEGET RT+, Alemania); el sobrenadante, que corresponde a la fracción citoplasmática, se recuperó para luego determinar su concentración de proteínas por el método de Bradford. El botón obtenido se resuspendió en 400 μ L de amortiguador 1 y se repitió la operación de centrifugación como se indicó anteriormente; el sobrenadante fue descartado. El botón se resuspendió en 300 μ L de amortiguador 2 (HEPES 20 mM, pH: 7.9, NaCl 420 mM, glicerol 25%, $MgCl_2$ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 0.5 mM) enriquecido con COMPLETE® y se agitó vigorosamente con vórtex cada 3 min por cinco veces, después de lo cual se centrifugó durante 10 min a 800 xg, a 4°C; se recuperó el sobrenadante, que corresponde a la fracción nuclear, para luego determinar su concentración de proteínas por el método de Bradford.

5.6.2 Electroforesis, transferencia y detección de la ciclina D1

Se calculó el volumen necesario de cada muestra para cargar 70 µg de proteína en el pozo correspondiente de los geles de SDS-PAGE. La electroforesis y la transferencia se llevaron a cabo como se describió anteriormente. El bloqueo de las membranas se realizó con suero fetal bovino (SFB) al 10% por 1 h. Después se realizó el reconocimiento con el anticuerpo primario (Cyclin D1 H-295, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron los lavados, la incubación con el anticuerpo secundario y la detección correspondiente como se describió anteriormente.

5.7 Ensayos de inmunoprecipitación

Para determinar la interacción física entre ciclina D1, Cdk4 y p21^{cip1/Waf1}, así como entre Cdk4 y p16^{INK4a}, se realizaron ensayos de IP.

La inmunoprecipitación es un método que se utiliza para aislar una proteína mediante la incubación de un extracto proteínico con un anticuerpo específico, permitiendo la unión de la proteína al anticuerpo en solución. El complejo anticuerpo-proteína, que incluye a otras proteínas que estén interaccionando con ella, se separa físicamente del resto de la muestra usando perlas de proteína A/agarosa que interactúan con el anticuerpo utilizado. Este complejo proteínico se separa electroforéticamente para un análisis posterior por Western blot.

Para realizar el análisis, se tomaron 10 µL de proteína A/agarosa (sc-2001, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) y se colocaron en tubos eppendorf de 0.5 ml; se adicionaron 0.6 µg del anticuerpo que reconoce a Cdk4 (F-12, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) y se dejó incubar durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó el volumen de muestra equivalente a 100 µg de proteína y se dejó incubar durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados con 200 µL del amortiguador de lavado (Tris-HCL 25 mM, pH 7.5, NaCl 125 mM, EDTA 2.5 mM, pH 8.0, NaF 2.5

mM y 0.1% de Triton X-100) y se centrifugó después de cada uno a 650 x g durante 5 min, descartando el sobrenadante. El botón se resuspendió con solución amortiguadora de carga, las proteínas se desnaturalizaron por 5 min en agua hirviendo y las muestras se cargaron en un gel de acrilamida al 10%. Posteriormente se realizaron la electroforesis, transferencia semihúmeda a membranas de PVDF y la inmunodetección de la manera descrita para la técnica de Western blot.

5.8 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm error estándar (EE). La significancia estadística se estableció por medio del análisis de varianza, ANOVA, y utilizando el método de comparación múltiple de Newman Keuls con $p < 0.05$; todo esto con ayuda del programa Graph Pad Prisma Versión 4.02.

6. Resultados

6.1 Protocolo de tratamiento subcrónico con FeNTA

El peso corporal de los animales se registró a lo largo del protocolo como un indicador del estado general de salud de los mismos. Como se advierte en la figura 6, el grupo EST presentó un aumento de peso igual al del grupo control, lo que refleja un crecimiento sin alteraciones y, por lo tanto, se puede decir que no se presentaron efectos adversos por el extracto en este sentido. Después de la administración del DEN, los animales correspondientes presentaron una disminución de peso, sin embargo, posteriormente mostraron un crecimiento similar al del control aunque no alcanzaron el mismo peso al final del protocolo. En cambio, después de la administración de FeNTA, el crecimiento de los animales tratados con este carcinógeno se detuvo sin mostrar una recuperación a lo largo del protocolo.

En las muestras sanguíneas obtenidas el día del sacrificio de los animales, se realizó la determinación de BUN como marcador de función renal para verificar que no se estuviera provocando insuficiencia renal por el tratamiento, ya que en estudios de tratamiento agudo (1-24 h) se induce daño renal severo, como necrosis e insuficiencia renal. En la figura 7 se aprecia que no existe diferencia significativa en los niveles de BUN en ninguno de los grupos estudiados con respecto al control, esto es, no se observó insuficiencia renal.

Al momento de la extirpación de los riñones, se realizó un análisis macroscópico para determinar si se presentaba algún cambio en la morfología renal por el tratamiento con FeNTA. En la figura 8 se observa una imagen representativa de cada grupo, donde se puede ver que los riñones de los grupos E y D presentaron características morfológicas macroscópicas similares a las del control, no así los de los grupos F, DF y EDF, en los que se observó palidez en la zona correspondiente a la corteza renal, además de irritación medular.

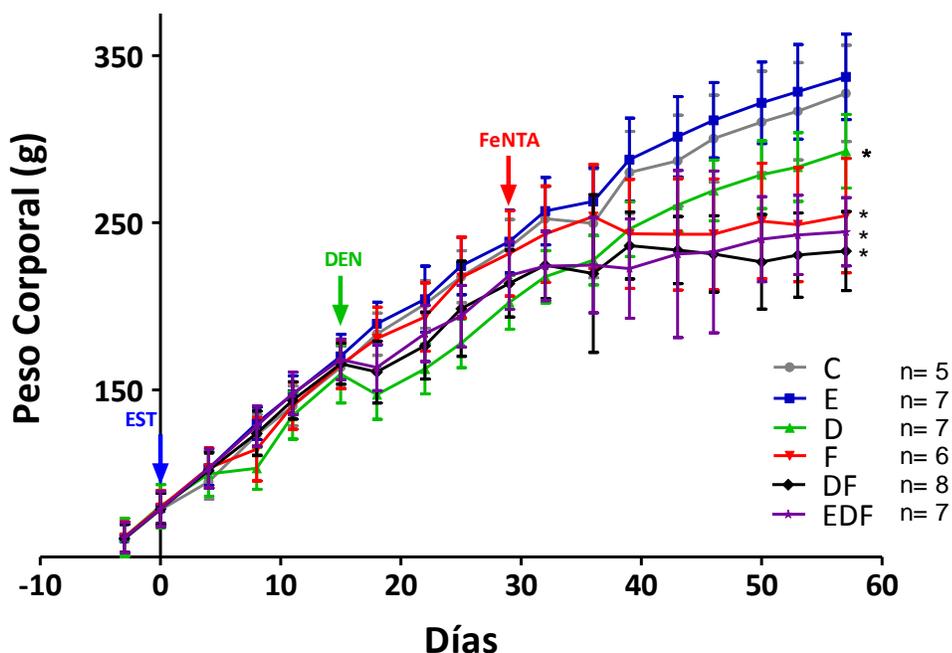


Figura 6. Peso corporal de las ratas en función del tiempo. La administración del EST no alteró el crecimiento de las ratas. El iniciador tumoral DEN indujo una disminución del peso corporal después su administración, pero los grupos tratados con este compuesto presentaron un restablecimiento de su crecimiento posteriormente. En cambio, la administración de FeNTA detuvo el crecimiento de los animales hasta el final del estudio; incluso, la administración del EST no contrarrestó este efecto. Cada punto representa la media \pm EE de n determinaciones. $*P \leq 0.05$ vs. Control

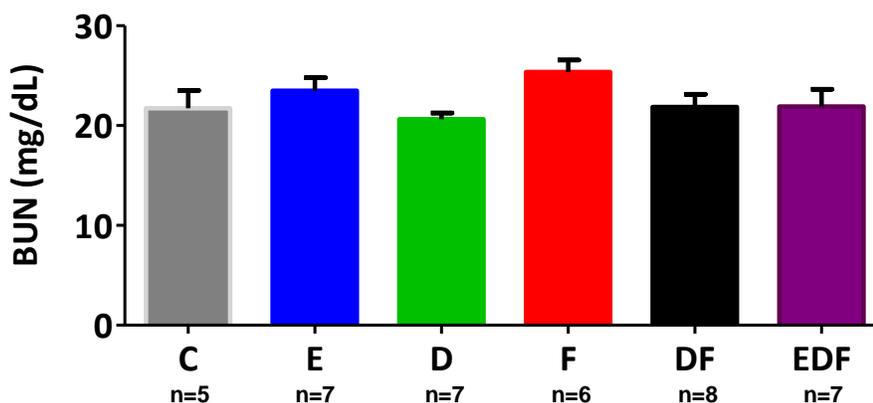


Figura 7. Determinación de BUN (mg/dL). Los niveles de BUN de los grupos de estudio no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. Media \pm EE de n determinaciones.

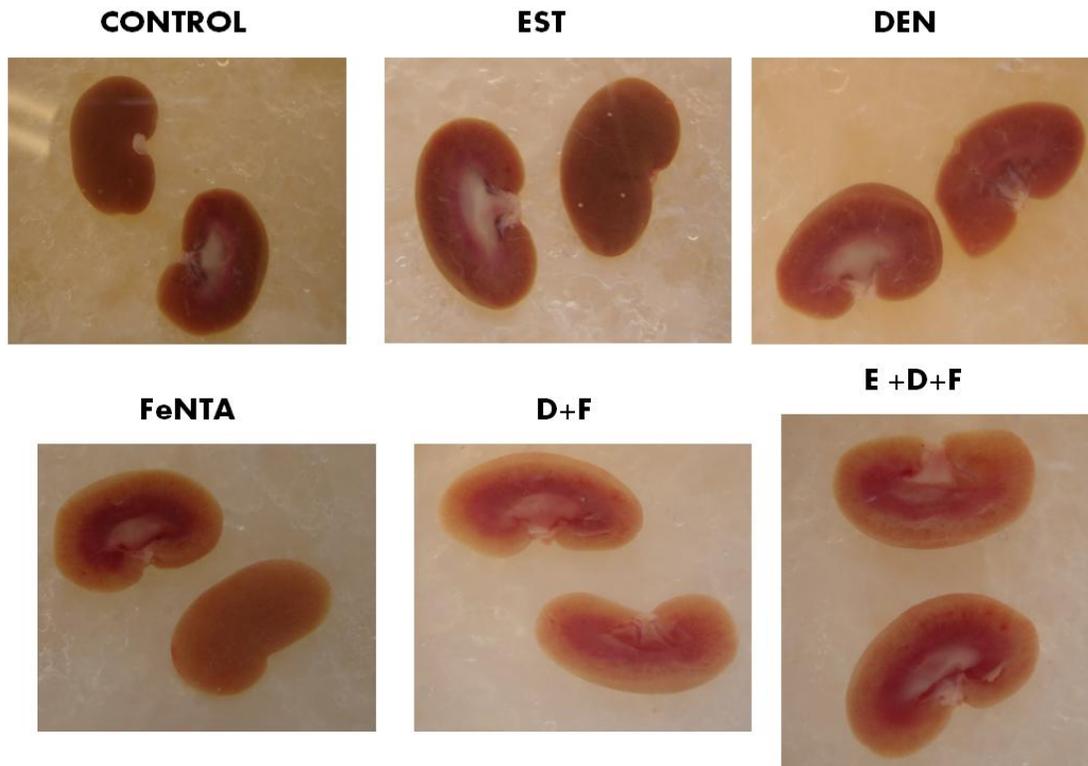


Figura 8. Imágenes representativas de los riñones extirpados de los animales de los diferentes grupos estudiados. Los riñones correspondientes a las ratas de los grupos E y D presentaron una apariencia macroscópica similar a los del grupo control, no así los del los grupos tratados con el carcinógeno, en los que se aprecian palidez en la corteza e irritación en la médula.

6.2 Localización subcelular de la ciclina D1

En estudios previos de nuestro laboratorio, después de una exposición subcrónica a FeNTA durante una mes, en extractos totales de corteza renal se observó un aumento en los niveles de la ciclina D1 (Aguilar-Alonso, 2010), sin embargo, desconocíamos las consecuencias de esta alteración. Para que esta proteína lleve a cabo su función se debe encontrar en el núcleo, por lo que en el presente trabajo se consideró importante determinar su localización subcelular. Se realizaron diferentes pruebas para encontrar la técnica de fraccionamiento celular más eficiente, es decir, que no se presentara contaminación nuclear en la fracción correspondiente al citoplasma y viceversa, para poder determinar la localización

subcelular de la ciclina D1. En la figura 9 se presenta una imagen representativa del Western blot de ciclina D1, de nucleoporina (p62) y GAPDH en ambas fracciones. La nucleoporina es una proteína que forma parte de los complejos de poro nuclear por lo que se utilizó como marcador nuclear; GAPDH se utilizó como marcador citoplasmático debido a que forma parte de la maquinaria necesaria para llevar a cabo la glucólisis en el citoplasma. No se detectó ciclina D1 en las fracciones citoplasmáticas, a diferencia de las fracciones nucleares en las que se detectó claramente en todos los grupos de estudio, lo que indica que la localización subcelular de la proteína es básicamente nuclear. El comportamiento de la ciclina D1 en el núcleo de los diferentes grupos estudiados se presenta en la figura 10, donde se puede apreciar que su nivel aumentó por la exposición al FeNTA y que no se obtuvo ningún efecto ante el EST en el grupo EDF, lo cual coincide con los resultados en extractos totales previamente reportados (Aguilar-Alonso, 2010).

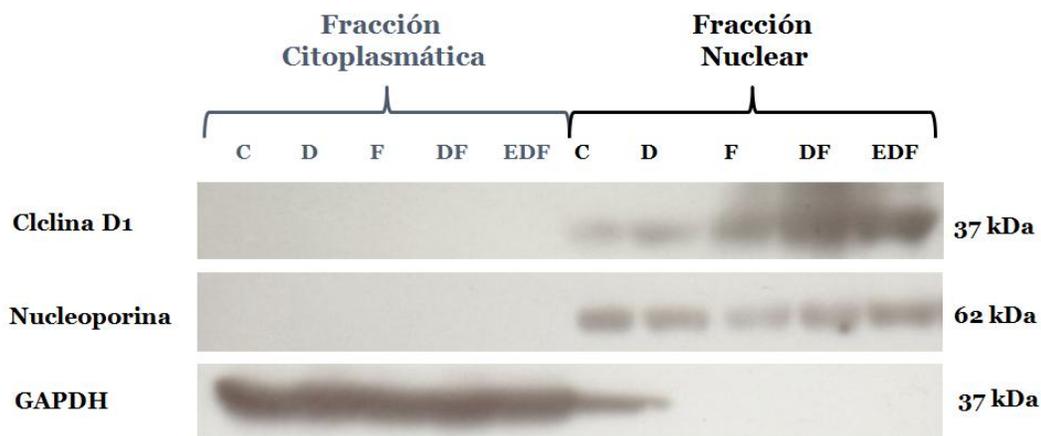


Figura 9. Eficiencia del fraccionamiento subcelular. La nucleoporina, marcador nuclear, se encuentra sólo en la fracción nuclear de las muestras y GAPDH se encuentra en la fracción citoplasmática, por lo que este método se considera eficiente para la separación de fracciones celulares. La ciclina D1 se encuentra principalmente en las fracciones nucleares de las muestras.

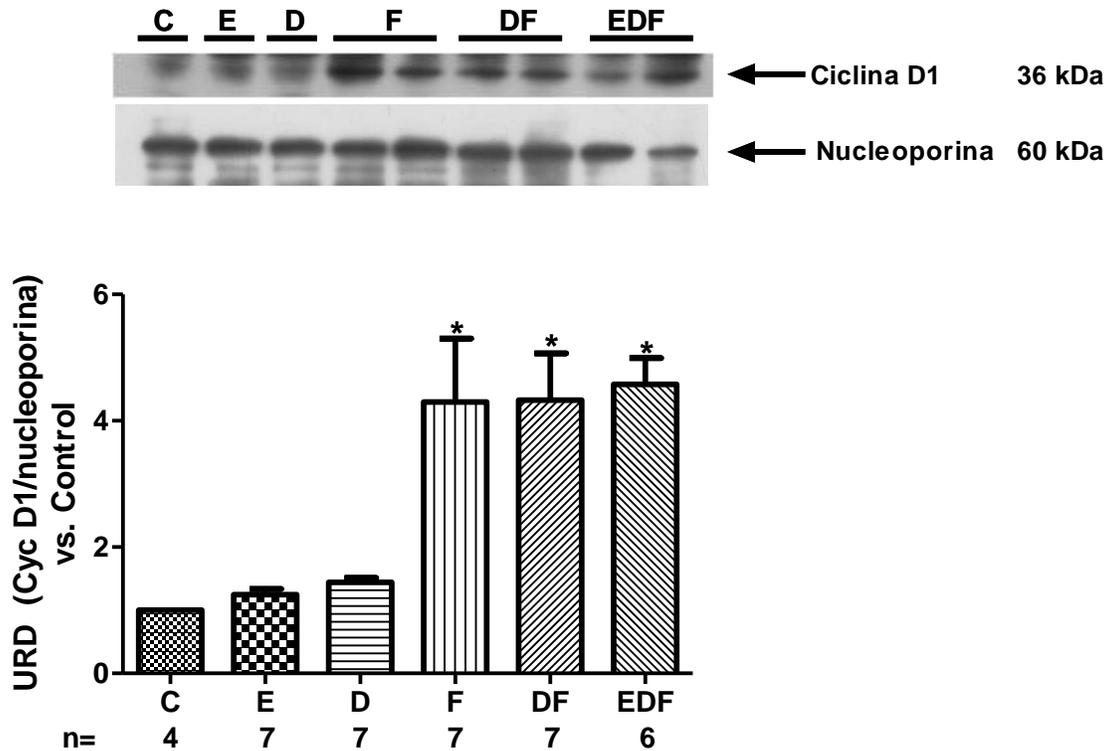


Figura 10. Determinación por Western blot de los niveles nucleares de la ciclina D1 en corteza renal de los diferentes grupos estudiados. En la parte superior se presenta una imagen representativa de las autorradiografías donde se colocó una muestra de los grupos C, D y E y dos muestras de diferentes ratas de los grupos F, DF y EDF, y los resultados del análisis densitométrico de todas las muestras. En el histograma se observa un incremento estadísticamente significativo de los niveles de la ciclina D1 nuclear en los grupos tratados con FeNTA, a diferencia de los grupos E y D, en los que no hubo cambio. En las autorradiografías, cada carril representa una muestra diferente de los grupos de estudio señalados en la parte superior. Cada columna representa la media \pm EE de n determinaciones, $*P \leq 0.05$ vs. *Control*. URD, unidades relativas de densitometría.

6.3 Niveles de Cdk4

La función que la ciclina D1 lleva a cabo en el núcleo es regular la actividad de Cdk4, por lo que se decidió determinar los niveles de esta proteína. En la figura 11 se muestra una imagen representativa de esta determinación en corteza renal por Western blot, así como los resultados de los análisis densitométricos de las autorradiografías. Al igual que en el caso de la ciclina D1, se observó un aumento significativo de esta cinasa en los tres grupos tratados con el carcinógeno, pero no hubo diferencia entre los grupos DF y EDF, por lo que se puede decir que el EST no previene el aumento de los niveles de la Cdk4.

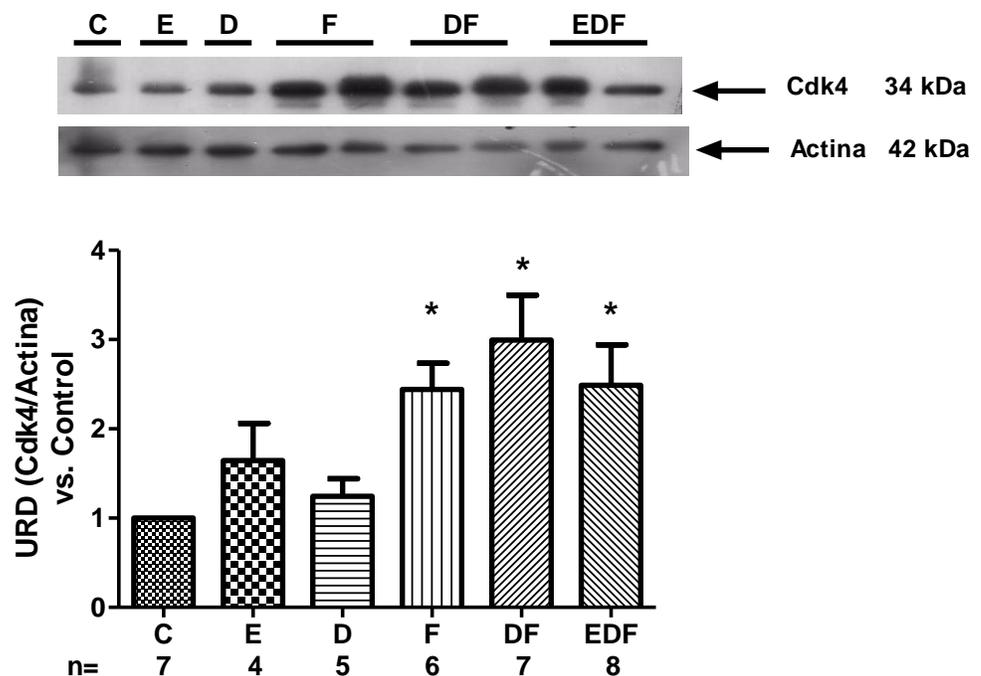


Figura 11. Determinación de los niveles en corteza renal de Cdk4 por Western blot. Se muestra una imagen representativa (superior) y los resultados del análisis densitométrico (inferior) de todas las muestras. En el histograma se observa un aumento, con respecto al grupo control, en los niveles de la proteína en todos los grupos tratados con FeNTA sin diferencias entre ellos. La actina se utilizó control de carga. Cada columna representa la media \pm EE de n determinaciones, * $P \leq 0.05$ vs. *Control*. URD, unidades relativas de densitometría.

6.4 Niveles de p21^{Cip1/Waf1}

Para que la ciclina D1 y la Cdk4 puedan entrar al núcleo necesitan asociarse con una proteína de la familia Cip/Kip, por lo que se determinaron los niveles en corteza renal de p21^{Cip1/Waf1} por Western blot. En la figura 12 se muestra una imagen representativa de dicha determinación y los resultados de los análisis densitométricos de las autorradiografías obtenidas. Los resultados indican que los niveles de esta proteína aumentaron debido al tratamiento con FeNTA con diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, lo que coincide con la localización nuclear de ciclina D1 y con el aumento en los niveles de la ciclina D1 y de Cdk4.

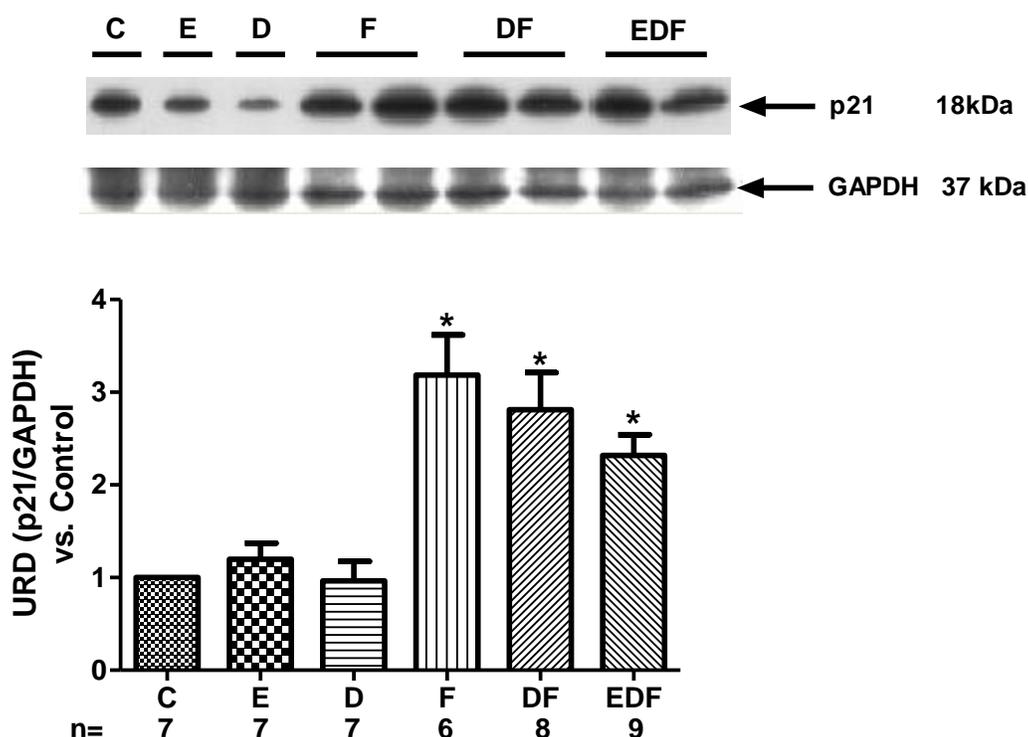


Figura 12. Determinación de los niveles en corteza renal de p21^{Cip1/Waf1} por Western blot. Se muestra una imagen representativa (superior) y los resultados del análisis densitométrico (inferior) de todas las muestras. Los niveles de la proteína en los grupos E y D fueron similares a los del grupo control, a diferencia de los correspondientes a todos los grupos tratados con el carcinógeno, que mostraron un incremento estadísticamente significativo sin presentar diferencias entre sí. GAPDH se utilizó como control de carga. Cada columna representa la media±EE de *n* determinaciones, * $P \leq 0.05$ vs. Control. URD, unidades relativas de densitometría.

6.5 Interacción proteínica ciclina D1/Cdk4/p21^{Cip1/Waf1}

Para demostrar si ocurría la asociación física entre ciclina D1, Cdk4 y p21^{Cip1/Waf1} sugerida por el aumento en los niveles de estas tres proteínas, así como la localización nuclear de la ciclina D1, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación contra Cdk4 detectando posteriormente la presencia de las tres proteínas por Western blot. En la figura 13 se muestra una imagen representativa de las autorradiografías obtenidas de dichos ensayos. En todas las muestras de los grupos estudiados se observaron las bandas correspondientes a las proteínas que constituyen el complejo, lo que indica que tanto la ciclina D1 como p21^{Cip1/Waf1} interaccionan con Cdk4.

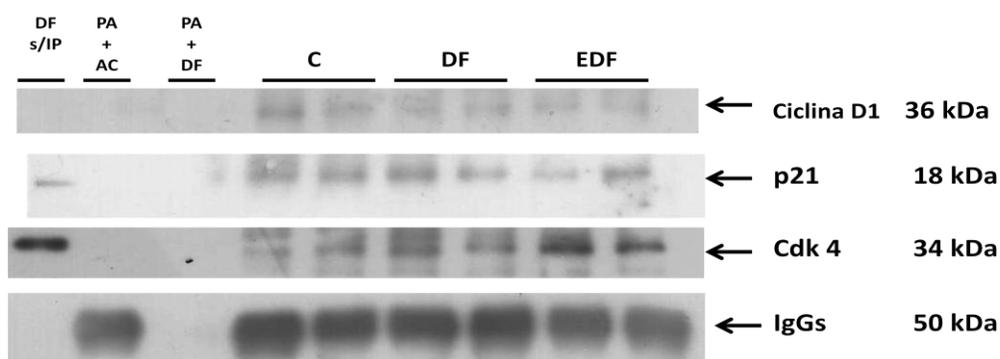


Figura 13. Determinación de la interacción ciclina D1/Cdk4/p21^{Cip1/Waf1} por inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación se llevó a cabo con un anticuerpo anti-Cdk4. El primer carril corresponde a un control positivo (muestra sin inmunoprecipitar, s/IP) y los dos siguientes son controles negativos: proteína A (PA) + anticuerpo primario (AC) sin muestra, y PA + muestra sin AC, respectivamente. Las bandas correspondientes a cada una de las proteínas que integran el complejo de fosforilación de pRb (ciclina D1, Cdk4 y p21^{Cip1/Waf1}) se detectaron en los inmunoprecipitados de los grupos estudiados sugiriendo su interacción.

6.6 Niveles de pRb

Siendo pRb sustrato del complejo de fosforilación ciclina D1/Cdk4 para el control de la progresión del ciclo celular, se consideró importante determinar si existía alguna alteración en los niveles de esta proteína debida al tratamiento con FeNTA. En la figura 14 se muestra una imagen representativa de la determinación de pRb (p130 y p105) por Western blot, así como el resultado del análisis densitométrico

de las autorradiografías obtenidas donde se observa un aumento significativo, con respecto al grupo control, de los niveles de p130 en los grupos E, D y DF, y de p105 sólo en el grupo E. De acuerdo con nuestro conocimiento, éste es el primer reporte de un efecto sobre los niveles de pRb por parte de compuestos polifenólicos.

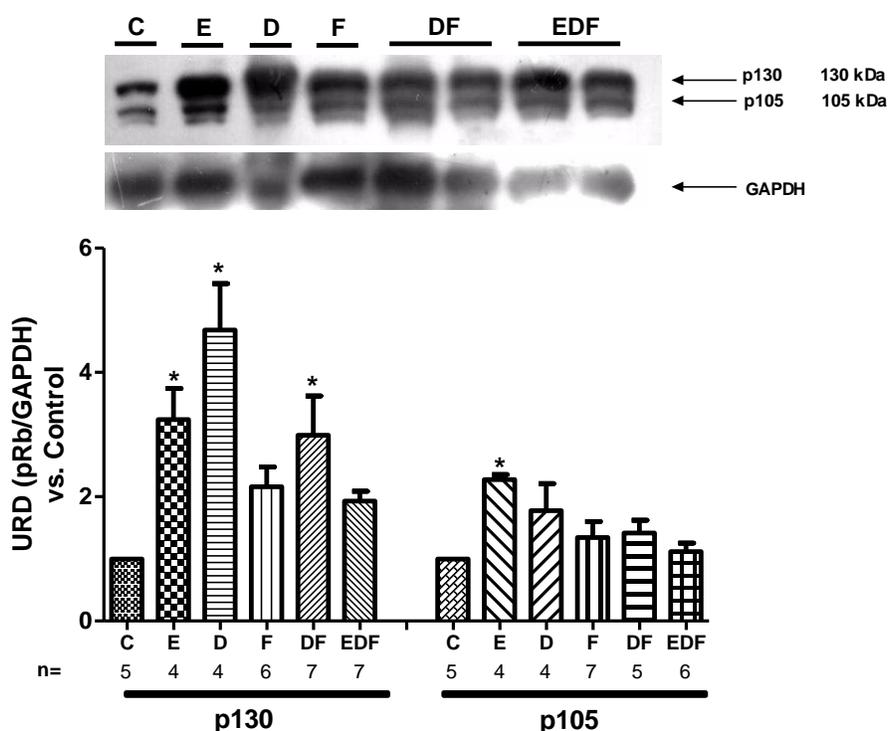


Figura 14. Determinación de los niveles de pRb (p130 y p105) en corteza renal por Western blot. Se muestra una imagen representativa y los resultados del análisis densitométrico de todas las muestras. Se observa un aumento de p130 estadísticamente significativo en los grupos E, D y DF con respecto al control; en cambio, p105 aumenta sólo en el grupo E. GAPDH se utilizó como control de carga. Cada columna representa la media \pm EE de n determinaciones, * $P \leq 0.05$ vs. *Control*. URD, unidades relativas de densitometría.

6.7 Niveles de p-pRb

Debido a que se observó un aumento en los niveles de ciclina D1, que la proteína se encontró principalmente en fracciones nucleares, que los niveles de Cdk4 y p21^{Cip1/waf1} incrementan y que se advirtieron interacciones entre las proteínas que

forman el complejo ciclina D1/Cdk4/p21^{cip1/Waf1}, el cual es uno de los responsables de la fosforilación de pRb, se procedió a la determinación de los niveles de dos de las proteínas de dicha familia (p-p130 y p-p105) en su forma fosforilada en Thr821/826, que son los sitios blanco de fosforilación del complejo mencionado. En la figura 15 se muestra una imagen representativa de la determinación por WB y el resultado de los análisis densitométricos de las autorradiografías obtenidas. Se encontró que los niveles de p-p130 presentan un aumento significativo únicamente en los grupos DF y EDF, con respecto al control y, a diferencia de las demás determinaciones, en el grupo EDF los niveles de p-p130 son estadísticamente menores que aquellos del grupo DF, destacándose una protección parcial por parte del EST contra este aumento. Por su parte, los niveles de p-p105 se elevan significativamente en todos los grupos tratados con FeNTA.

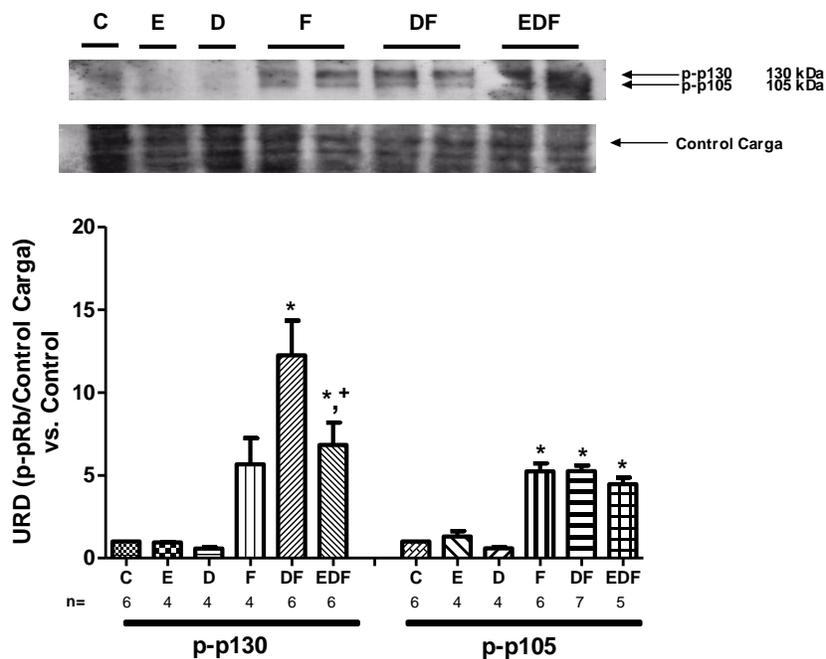


Figura 15. Determinación de los niveles de p-pRb (Thr821/826) por Western blot. Se muestra una imagen representativa (superior) y los resultados del análisis densitométrico (inferior) de todas las muestras. Los niveles de p-p130 incrementan en el grupo DF y EDF, presentando diferencia entre sí. Los niveles de p-p105 se encuentran elevados en todos los grupos tratados con el carcinógeno FeNTA. Cada columna representa la media \pm EE de n determinaciones, * $P \leq 0.05$ vs. Control; + $P \leq 0.05$ vs. DF. URD, unidades relativas de densitometría.

6.8 Niveles de p16^{INK4a}

Debido a que la funcionalidad del complejo ciclina D1/Cdk4 también puede afectarse por la presencia de inhibidores de la familia INK4, se determinaron los niveles de p16^{INK4a} en corteza renal. En la figura 16 se muestran tanto una imagen representativa del Western blot como los resultados de los análisis densitométricos de las autorradiografías obtenidas. Contrario a lo que se esperaba, se observó un incremento de los niveles de esta proteína en los tres grupos tratados con el carcinógeno, entre los cuales no hubo diferencias.

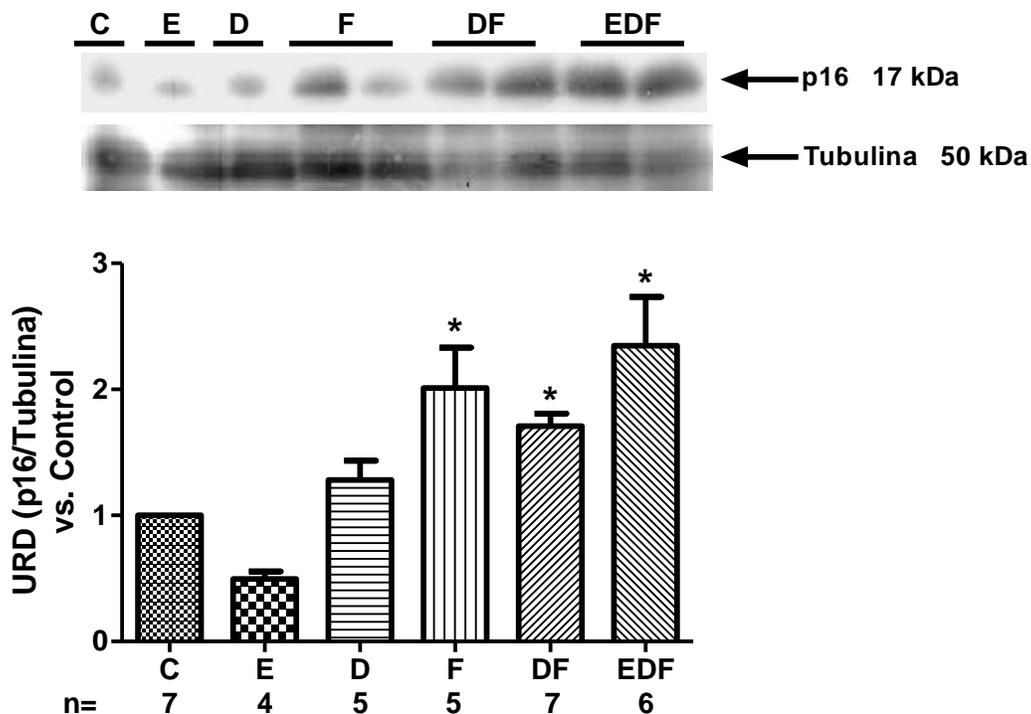


Figura 16. Determinación de los niveles de p16^{INK4a} por Western blot. Se presenta una imagen representativa (superior) y los resultados del análisis densitométrico (inferior) de todas las muestras. Los grupos tratados con el carcinógeno presentaron un aumento en los niveles de esta proteína con respecto al grupo control y no presentaron diferencias entre sí. La tubulina se utilizó como control de carga. Cada columna representa la media \pm EE de n determinaciones, * $P \leq 0.05$ vs. *Control*. URD, unidades relativas de densitometría.

6.9 Interacción proteínica Cdk4/p16^{INK4a}

Se consideró importante determinar si existía una interacción entre Cdk4 y p16^{INK4a} debido a que, contrario a lo que se esperaba, los niveles de p16^{INK4a} presentaron un aumento por la exposición a FeNTA y su función inhibitoria se da al interactuar directamente con la cinasa; para esto se realizaron ensayos de inmunoprecipitación contra Cdk4. En la figura 17 se muestran dos imágenes representativas de las autorradiografías obtenidas. En todos los casos del grupo control se observó la banda correspondiente a p16^{INK4a}; sin embargo, en las muestras de los grupos tratados con el carcinógeno en algunas se detectó pero en la mayoría no, por lo que podemos decir que la interacción entre Cdk4 y p16^{INK4a} no se presenta en una proporción considerable de muestras de ratas expuestas al FeNTA.

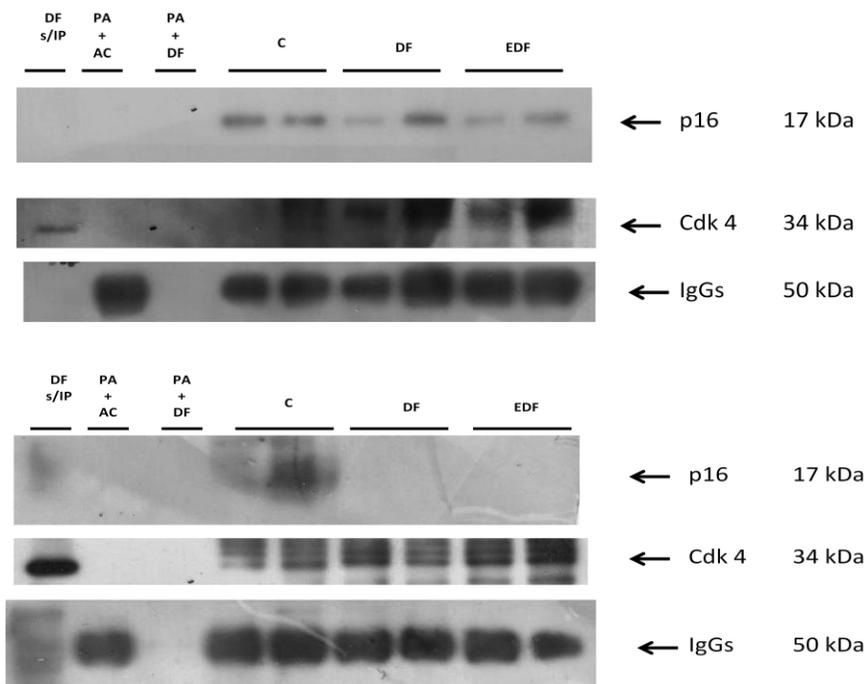


Figura 17. Determinación de la interacción Cdk4/p16^{INK4} por inmunoprecipitación contra Cdk4. El primer carril corresponde a un control positivo (muestra sin inmunoprecipitar, s/IP) y los dos siguientes son controles negativos: proteína A (PA) + anticuerpo primario (AC) sin muestra, y PA + muestra sin AC, respectivamente. La banda correspondiente a p16^{INK4a} tiende a disminuir de intensidad en los grupos tratados con FeNTA. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes.

7. Resumen de resultados

- Se desarrolló un protocolo de tratamiento subcrónico con FeNTA en ratas macho Wistar, que podría representar una etapa temprana del modelo experimental de CCR.
- La localización subcelular de la ciclina D1 es principalmente nuclear y sus niveles aumentan debido al tratamiento carcinogénico.
- El tratamiento con FeNTA promueve el aumento en los niveles de Cdk4, p21^{Cip1/Waf1}.
- Se observaron interacciones entre las proteínas del complejo ciclina D1/Cdk4/p21^{Cip1/Waf1} (ciclina D1/Cdk4 y p21^{Cip1/Waf1}/Cdk4) en muestras de grupos tratados con el carcinógeno.
- La exposición a FeNTA promueve el aumento en los niveles de p16^{INK4a}.
- En la mayoría de las muestras de los grupos tratados con el carcinógeno no se presenta la asociación de Cdk4 con p16^{INK4a}.
- Los niveles de p105 y p130 aumentan por el tratamiento con el EST, y sólo los de p130 se incrementan en el grupo DF.
- Los niveles de p-p105 y p-p130 se elevan en los grupos tratados con FeNTA.
- El EST previene parcialmente el incremento de la fosforilación de p130. No se observaron otros efectos del extracto sobre las alteraciones encontradas en este estudio.

8. Discusión

Uno de los tipos de cáncer menos comprendidos es el CCR, el cual es el cáncer renal más común en adultos y el más letal de los tipos de cáncer urológicos. Esta neoplasia suele ser diagnosticada incidentalmente y, por lo tanto, en etapas muy avanzadas, lo que dificulta su estudio en estadios tempranos; además, presenta resistencia a terapias convencionales. Todo esto lleva a una elevada tasa de mortalidad (Lam *et al.*, 2005; Santana-Ríos *et al.*, 2011; Libermann, 2007). Lo anterior justifica fuertemente el desarrollar modelos experimentales bien caracterizados que permitan el estudio de este cáncer. Uno de los escasos modelos experimentales de carcinogénesis renal es aquél inducido con FeNTA en roedores, en donde se utiliza DEN como iniciador tumoral. Al igual que en el CCR humano, en este modelo está demostrada la participación del estrés oxidante, sin embargo, las alteraciones moleculares involucradas en el desarrollo del cáncer no han sido dilucidadas. Por otro lado, se han descrito diversas alteraciones moleculares involucradas en el control de la progresión del ciclo celular asociadas al desarrollo de cáncer; en particular, se ha encontrado que algunas moléculas que participan en la cascada ciclina D-Cdk/INK4/pRb/E2F presentan comportamientos anormales en más del 80% de neoplasias humanas (Ortega *et al.*, 2002), incluyendo el CCR (Ge *et al.*, 2007; Ikurowo *et al.*, 2007). Con base en todo esto, en el presente trabajo se determinó el estatus de proteínas involucradas en el control de la fase G1 del ciclo celular después de un mes de exposición al FeNTA. Este esquema de tratamiento parece representar etapas tempranas de la carcinogénesis renal, pues en nuestro laboratorio se han encontrado tanto lesiones pre-neoplásicas (displasia) como alteraciones moleculares pro-carcinogénicas, como un incremento en la actividad de NF- κ B (Pariante-Pérez, 2012) y de AP-1 (Aguilar-Alonso, 2010).

Para alcanzar los objetivos del presente trabajo se realizó un protocolo de exposición subcrónica a FeNTA durante un mes en ratas macho Wistar siguiendo el esquema de tratamiento previamente establecido. A lo largo del protocolo se registró la ganancia de peso de los animales en función del tiempo (crecimiento)

como un indicador de su estado general de salud. Dado que el grupo E presentó un aumento de peso normal, reflejando un crecimiento sin alteraciones, se puede decir que no se presentaron efectos adversos por parte del extracto a la dosis administrada; esto es de importancia porque se ha reportado que la administración de extractos polifenólicos, a ciertas dosis y tiempos de tratamiento, pueden producir efectos antinutrimientales e incluso pro-oxidantes (Cruz-White, 2007; Bryans *et al.*, 2007; Vargas-Olvera, 2009). Por otro lado, a pesar de que la administración del DEN causó una disminución inmediata en el peso, los grupos tratados con dicho compuesto presentaron un crecimiento posterior normal, esto es, similar al del grupo control, aunque no alcanzaron el mismo peso al final del protocolo. En cambio, cuando se inició la administración del FeNTA, el crecimiento de los grupos correspondientes (F, DF y EDF) se detuvo y se mantuvo así a lo largo del protocolo. Por lo anterior, se sugiere que estos últimos grupos sufrieron deterioro en su salud.

En cuanto a la evaluación de la función renal, al no existir diferencia significativa en los niveles de BUN en ninguno de los grupos estudiados con respecto al control, se concluye que no se presenta insuficiencia renal. Esto es importante ya que en estudios de exposición aguda (1-24 h) el carcinógeno induce necrosis e insuficiencia renal severas (Cruz-White, 2007; Dávalos-Salas, 2006; Torres Martínez, 2007; Tanaka *et al.*, 2008), por lo que nuestros resultados indican que las muestras obtenidas 48 h después de la última administración de FeNTA corresponden a una etapa diferente a aquélla en la que se presentan daños severos en la función renal representando un modelo de insuficiencia renal aguda. Además, este resultado coincide con la ausencia de insuficiencia renal tanto en el modelo de inducción de CCR con FeNTA (tratamiento crónico) (Vargas-Olvera, 2009) como en el desarrollo de CCR en humano (Nelson *et al.*, 2007).

Con respecto a alteraciones moleculares en corteza renal, en estudios subcrónicos previos de nuestro laboratorio se encontró un aumento en los niveles de la ciclina D1 (Aguilar Alonso, 2010), pero desconocíamos si era biológicamente funcional; esta proteína cumple su función en el núcleo, por lo que en el presente

trabajo se decidió analizar primero su localización subcelular. La ciclina D1 se encontró principalmente en el núcleo, ya que los niveles de esta proteína no fueron detectables en la fracción citoplasmática de las cortezas renales de ninguno de los grupos de estudio. Además, el comportamiento de los niveles nucleares de la ciclina D1 fue igual al observado en los extractos totales previamente analizados, es decir, el tratamiento con FeNTA indujo un aumento notable en sus niveles con respecto al grupo control. Este incremento podría deberse a un aumento en la síntesis de la ciclina D1, o a que los mecanismos de degradación se encuentren afectados por el tratamiento con FeNTA. En este último caso se sabe que para que la ciclina D1 sea exportada de este compartimento debe sufrir una fosforilación en el residuo Thr286 por la GSK-3 β (Diehl, 1998), y una vez en el citoplasma, la fosforilación actúa como señal para la ubiquitinación y subsecuente degradación de la proteína (Lin *et al.*, 2006), y resultados recientes de nuestro grupo de trabajo indican que la interacción proteínica ciclina D1/GSK-3 β disminuye en los grupos tratados con el carcinógeno, por lo que parece ser que su degradación podría estar disminuída.

La localización nuclear de la ciclina D1 nos sugería fuertemente que esta proteína podría estar llevando a cabo su función como subunidad reguladora de la Cdk4, por ello se determinaron los niveles renales de esta cinasa en extractos totales, los cuales también aumentaron en todos los grupos tratados con el carcinógeno con respecto al grupo control. Para que la ciclina D1 y la Cdk4 cumplan su función deben ser internalizadas conjuntamente al núcleo, y para esto, formar previamente un complejo con una proteína de la familia Cip/Kip, como p21^{Cip1/Waf1} (Jodi *et al.*, 2002), por lo que se consideró importante determinar los niveles de esta última proteína. Se encontró que sus niveles se elevan en todos los grupos tratados con FeNTA en comparación con los del grupo control. Como se mencionó en la introducción, p21^{Cip1/Waf1} puede tener dos funciones: estabilización e internalización nuclear de los complejos ciclina D-Cdk o inhibición de los mismos. La función que lleva a cabo p21^{Cip1/Waf1} depende de la estequiometría molecular, es decir, la unión de una sola molécula al complejo ciclina D1/Cdk4 promueve la introducción de éste al núcleo, pero si dos o más

moléculas de p21^{Cip1/Waf1} se unen al complejo, entonces lleva a cabo su función como inhibidor dando como resultado un arresto en la fase G1 del ciclo celular. Entonces, tomando en cuenta que la ciclina D1 se encuentra principalmente en el núcleo, que los niveles de ésta, de la Cdk4 y de p21^{Cip1/Waf1} aumentan entre tres y cuarto veces por el tratamiento con FeNTA, y que en los grupos F, DF y EDF se logra el desarrollo de CCR con un esquema de tratamiento crónico (Vargas-Olvera, 2009), es muy probable que a las concentraciones en las que p21^{Cip1/Waf1} está presente en nuestras muestras, esta proteína esté cumpliendo su función de internalización nuclear.

Con base en las observaciones anteriores consideramos necesario determinar la interacción entre las proteínas que forman el complejo ciclina D1/Cdk4/p21^{Cip1/Waf1} por medio de ensayos de inmunoprecipitación contra Cdk4. En el inmunoprecipitado se detectó la presencia de las tres proteínas sugiriendo la asociación física entre ellas. Sin embargo, esto no demuestra por completo la formación del complejo ternario, ya que podría darse la interacción únicamente entre ciclina D1/Cdk4 y p21^{Cip1/Waf1}/Cdk4; no obstante, el orden en que se ha reportado que dicho proceso ocurre, es decir, que una vez que la ciclina D1 y Cdk4 se asocian, p21^{Cip1/Waf1} se une a ellas para estabilizar el complejo (Obaya y Sedivy, 2002), se sugiere que efectivamente podría existir una interacción entre estas tres proteínas en las muestras estudiadas. También se ha observado que p21^{Cip1/Waf1} no es capaz de asociarse al complejo ciclina D/Cdk4 si presenta mutaciones en la región de unión a las ciclinas tipo D (Lin *et al.*, 1996) y que no existen asociaciones detectables entre p21^{Cip1/Waf1} y subunidades de cinasa a menos de que la ciclina tipo D esté presente (Hall *et al.*, 1995), por lo que si nosotros observamos una interacción entre Cdk4 y p21^{Cip1/Waf1}, es probable que ésta última también esté asociada a la ciclina D1. Si esto es cierto, el hecho de que la localización de la ciclina D1 sea principalmente nuclear y que Cdk4 y p21^{Cip1/Waf1} probablemente estén asociadas a ella, se podría sugerir que el complejo se encuentra en el núcleo. Sin embargo, se requiere de otro tipo de evidencia experimental para corroborar la integración del complejo ternario ciclina D1/Cdk4/p21^{Cip1/Waf1}.

La trascendencia de la localización nuclear de este complejo es la fosforilación e inactivación parcial de Rb, y nuestros resultados sugerían que este complejo podría ser funcional. Entonces, se decidió evaluar el comportamiento de los niveles de dos de las proteínas de la familia Rb (p105 y p130), así como de su forma fosforilada en Thr821/826, fosforilación de la cual es responsable Cdk4 (Zarkowska y Mitnacht, 1997). Al ser considerado un gen supresor de tumores, en procesos de carcinogénesis podría esperarse una disminución de los niveles de Rb. Contario a lo esperado, en nuestro estudio se observó un aumento de p130 en el grupo DF pero ningún cambio en la expresión de p105. Sin embargo, para que Rb pueda liberar a los factores de transcripción E2F induciendo la expresión de genes que promueven la progresión de la fase G1 debe ser fosforilada, por lo que se decidió evaluar el comportamiento de las proteínas fosforiladas en Thr821/826, encontrándose que los niveles tanto de p-p105 como de p-p130 se elevan en los grupos DF y EDF. Este aumento en su fosforilación puede llevar a que E2F induzca la expresión del gen de la ciclina E y permita que el complejo ciclina E/Cdk2 hiperfosforile a Rb, lo que daría paso a la transición G1/S (Malumbres y Barbacid, 2009).

En conjunto, la localización nuclear de la ciclina D1, el aumento tanto en sus niveles como en los de Cdk4 y p21^{Cip1/Waf1}, la posible formación del complejo ciclina D1/Cdk4/p21^{Cip1/Waf1} y los niveles elevados de p-p105 y p-p130 sugieren que la ciclina D1 es funcional, y que todo esto podría dar como resultado un desbalance en el control de la progresión de la fase G1, promoviendo la proliferación de las células epiteliales del túbulo proximal, por lo que todo esto podría ser parte del mecanismo por medio del cual el FeNTA induce la malignización celular.

Por otro lado, debido a que se ha reportado la pérdida de la expresión de p16^{INK4a} en tejido tumoral de CCR humano (Vidaurreta *et al.*, 2008) y a que en etapas tempranas del modelo se ha encontrado la pérdida monoalélica del gen *INK4a* (Tomoyuki *et al.*, 1999), mas se desconocía la expresión de la proteína, se determinaron sus niveles esperándose una disminución en los grupos tratados con

el carcinógeno, pero, por el contrario, presentaron un aumento de un poco más de dos veces con respecto al grupo control. En esta etapa del modelo, este aumento podría ser resultado de una activación de mecanismos de defensa celular, ya que su función biológica es inhibir la formación del complejo ciclina D1/Cdk4 para impedir la fosforilación de Rb (Sherr y Roberts, 1999). Sin embargo, cabe mencionar que, relativamente, el aumento de p16^{INK4a} con respecto al grupo control fue menor que el de la ciclina D1, y se ha demostrado que para que se active la Cdk4 los niveles de las ciclinas tipo D deben rebasar los niveles de las proteínas de la familia INK4a (Alt *et al.*, 2002), por lo que nuestros resultados podrían sugerir que p16^{INK4a} está siendo rebasada por la ciclina D1, lo que concuerda con las condiciones necesarias para promover la progresión de la fase G1. Además, aunque p16^{INK4a} aumente la interacción con Cdk4 podría no darse. De hecho, se ha demostrado la presencia de una mutación que impide la unión de la cinasa al inhibidor en diferentes tipos de neoplasias (Ortega *et al.*, 2002). Por lo anterior, se consideró importante evaluar la interacción de p16^{INK4a} con Cdk4 por medio de ensayos de inmunoprecipitación. El comportamiento de la interacción Cdk4/p16^{INK4a} fue variable en los grupos tratados con FeNTA, esto es, en algunas muestras se dio la interacción pero en la mayoría no; en cambio, en el grupo control la unión de Cdk4 con p16^{INK4a} se presentó en todas las muestras, sin excepción. La variabilidad observada puede explicarse por la respuesta de cada organismo ante el tratamiento con FeNTA, pues se debe recordar que la incidencia de la enfermedad en los estudios de exposición crónica no es del cien por ciento (Vargas-Olvera *et al.*, 2012). Por otro lado, si bien el incremento de los niveles de esta proteína puede deberse a un aumento en su síntesis, el hecho de que se haya reportado que el gen *INK4a* presenta una delección monoalélica desde etapas tempranas de exposición a FeNTA (Tomoyuki *et al.*, 1999), es más probable que p16^{INK4a} se acumule porque los mecanismos para su degradación estén dañados por el tratamiento con el carcinógeno.

En tumores de CCR humano se han reportado alteraciones de algunas proteínas de la fase G1 del ciclo celular, como son la regulación a la alta de la ciclina D1 (Baba *et al.*, 2003; Bindra *et al.*, 2002) y la sobreexpresión de la Cdk4

(Atkins *et al.*, 2005); además, se sabe que la expresión de pRb total en esta neoplasia es normal en el 95% de los tumores estudiados (Hedberg *et al.*, 2004). Estas observaciones son similares a los resultados obtenidos en etapas tempranas de nuestro modelo de carcinogénesis renal sugiriendo una similitud entre las dos versiones de la enfermedad, pero se debe considerar evaluar el comportamiento de estas proteínas en los tumores inducidos por exposición al FeNTA, lo cual hasta ahora no se ha realizado.

Es importante recalcar que en los grupos de estudio E y D no se observaron modificaciones pro-carcinogénicas en el comportamiento de las moléculas que se analizaron en este trabajo, sino que, por el contrario, se tuvo un efecto anticarcinogénico, que fue el aumento en los niveles de p105 y p130. Hasta ahora no había reportes de un incremento de pRb como efecto de un tratamiento con compuestos polifenólicos, sino sólo en su fosforilación (Kennedy *et al.*, 2002; Nie *et al.*, 2006), por lo que este puede ser el primer hallazgo de la inducción de la síntesis de pRb por compuestos polifenólicos; lo anterior puede ser uno de los mecanismos del efecto benéfico de este tipo de compuestos ante el cáncer.

Por otra parte, los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de p-p130 sugieren que el EST puede estar ejerciendo una protección parcial contra la fosforilación de p130 inducida por el tratamiento carcinogénico, puesto que los niveles de la proteína fosforilada son menores en el grupo EDF que en el grupo DF. Así, por medio de una reducción en la fosforilación de esta proteína, los factores de transcripción E2F, reprimidos por su unión a p130, no llevan a cabo la inducción de la transcripción de sus genes blanco involucrados en el progreso de la fase G1 del ciclo celular, retrasando la división celular del tejido renal. Por lo que se puede pensar que la disminución parcial de la fosforilación de p130 podría ser uno de los mecanismos por medio de los cuales el EST protege contra el desarrollo de CCR previamente observada en nuestro laboratorio (Vargas-Olvera *et al.*, 2012). En el presente estudio no se encontraron otros efectos de protección por parte del extracto.

9. Conclusiones

La ciclina D1 parece ser funcional en etapas tempranas del modelo de carcinogénesis renal, pues también se observaron alteraciones moleculares relacionadas con su función biológica, lo que podría estar participando en la transformación de las células renales debido a la exposición al FeNTA. Los resultados apoyan la propuesta de que el tratamiento subcrónico con el carcinógeno puede representar etapas tempranas de carcinogénesis. El extracto de semillas de tamarindo ejerce un efecto de protección parcial ante la fosforilación de p130, lo que podría ser uno de los mecanismos mediante los cuales el EST disminuye la incidencia y el avance de los tumores de CCR previamente observado en este modelo experimental.

10. Perspectivas

Para complementar los resultados obtenidos con el desarrollo del presente proyecto se plantean las siguientes perspectivas:

- Demostrar la localización nuclear del complejo ciclina D1/Cdk4/p21.
- Analizar los niveles de Cdk6 y su interacción con ciclina D1.
- Evaluar la actividad de cinasa de los complejos ciclina D1/Cdk4/6.
- Determinar los niveles de p16^{INK4a} en etapas más avanzadas de este modelo.
- Determinar el estatus de los E2F y de las proteínas codificadas por sus genes blanco.
- Hacer un ensayo de proliferación celular para corroborar la transición G1/S.
- Realizar un silenciamiento de la ciclina D1 y evaluar sus efectos en el origen de lesiones pre-neoplásicas, así como en moléculas blanco del complejo ciclina D1/Cdk4, como pRb.
- Evaluar el comportamiento de la ciclina D1 en tumores de CCR inducidos con FeNTA.

11. Referencias

Abukhdeir AM, Park BH (2009) *p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance*. Expert Rev Mol Med 10: e19.

Aguilar-Alonso FA (2010) *Alteraciones en AP-1, MAPKs y ciclina D1 inducidas por la exposición subcrónica al carcinógeno renal FeNTA y efecto de un extracto de semillas de tamarindo (EST)*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

Alt JR, Gladden AB y Diehl JA (2002) *p21^{Cip1} Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export*. J Biol Chem 277: 8517-8523.

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

Atkins DJ, Gingert C, Störkel S, et al. (2005) *Concomitant deregulation of HIF1 α and cell cycle proteins in VHL-mutated renal cell carcinomas*. Virchows Arch 447: 634-642.

Awai M, Narasaki M, Yamanoi Y y Seno S (1979) *Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis*. Am J Pathol 95: 663-673.

Baba M, Hirai S, Nagashima Y, et al. (2003) *Loss of von Hippel Lindau protein causes cell density dependent deregulation of cyclin D1 expression through hypoxia-inducible factor*. Oncogene 22: 2728-2738.

Bahnemann R, Leibold E, Jäckh R et al. (1998) *Different patterns of kidney toxicity after subacute administration of Na-nitrilotriacetic acid and Fe-nitrilotriacetic acid to Wistar rats*. Tox Sci 46: 166-175.

Bindra RS, Vasselli JR, Klausner RD, et al. (2002) *VHL-mediated hypoxia regulation of cyclin D1 in renal carcinoma cells*. Cancer Res 62: 3014-3019.

Bosetti C, Scotti L, LaVecchia C *et al.* (2006) *Micronutrients and the risk of renal cell cancer: A case-control study from Italy.* Int J Cancer 120: 892-896.

Bosetti C, Rossi M, LaVecchia C *et al.* (2007) *Flavonoids and the Risk of Renal Cell Carcinoma.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16: 98-101.

Bradford MM (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem 72: 248-254.

Bravi F, Bosetti C, LaVecchia C *et al.* (2006) *Food groups and renal cell carcinoma: A case-control study from Italy.* Int J Cancer 120: 681-685.

Bryans JA, Judd PA, Ellis PR (2007) *The effect of consuming instant black tea on postprandial plasma glucose and insulin concentrations in healthy humans.* J AM Coll Nutr 26: 471-477.

Canhoto AJ, Chestukhin A, DeCaprio A *et al.* (2000) *Phosphorylation of the retinoblastoma-related protein p130 in growth-arrested cells.* Oncogene 19: 5116-5122.

Cruz-White A (2007) *Efecto del pretratamiento 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 de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

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

Diehl JA, Cheng MC, Roussel MF, Sherr CJ. (1998) *Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.* Genes & Dev 12: 3499-3511.

Drewniak T, Wajdowicz A, Maciukiewicz P *et al.* (2012) *Selected markers of oxidative stress and carcinogenic trace elements concentrations in the renal cell carcinoma tissue.* Pol Merkur Lekarski 32: 378-381.

Ewen ME y Lamb J. (2004) *The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis.* Trends Mol Med 10:158-162.

Eybl V, Kotyzová D, Cerná P, Koutensky J (2008) *Effect of melatonin, curcumin, quercetin, and resveratrol on acute ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced renal oxidative damage in rats.* Hum Exp Toxicol 27: 347-353.

Fisher RP (2005) *Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription.* J Cell Sci 118: 5171-5180.

Fisher R, Gore M, Larkin J (2012) *Current and future systemic treatments for renal cell carcinoma.* Semin Cacer Biol <http://dx.doi.org/10.1016/y.semcancer.2012.06.004>

Ganesamoni R, Bhattacharyya S, Singh SK *et al.* (2012) *Status of oxidative stress in patients with renal cell carcinoma.* J Urol 187: 1172-1176

Ge JR, Ren GP Yao HP. (2007) *Expression of cyclin D1 and p27kip1 in renal cell carcinoma and its significance.* J Zhejiang Univ Med Sci 36: 483-487.

Gil J, Peters G (2006) *Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all.* Nature Rev Mol Cell Biol 7: 667-677.

Gowrishankar B, Cairns P (2010) *Signaling pathways in renal cell carcinoma.* Cancer Biol Ther 10: 658-664.

Hall M, Bates S, Peters G (1995) *Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins.* Oncogene 11:1581-1588.

Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Swindell E, *et al.* (1995) *Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21.* Mol Bio Cell 6: 387-400.

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

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

Heo HJ, Kim YJ, Chung D, Kim DO (2007) *Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system*. *Food Chem* 104: 87–92.

Hiroyasu M, Ozeki M, Toyokuni S *et al.* (2002) *Specific Allelic Loss of p16^{INK4A} tumor Suppressor Gene after Weeks of Iron-Mediated oxidative Damage during Rat Renal Carcinogenesis*. *Am J Pathol* 160:419-424.

Ikuero SO, Kuczyk MA, von Wasielewski R *et al.* (2007) *p16INK4a expression and clinicopathologic parameters in renal cell carcinoma*. *Eur Urol* 51: 732-737.

Jacobo-Velázquez DA y Cisneros-Zevallos L. (2009) *Correlations of Antioxidant Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data Analysis for Food and Medicinal Plants*. *J Food Sci* 74: R107- R113.

Kashyap MK, Kumar A, Upadhyaya SK *et al.* (2005) *Biochemical and molecular markers in renal cell carcinoma: an update and future prospects*. *Biomarkers* 10: 258-294.

Kennedy DO, Kojima A, Matsui-Yuasa I, *et al.* (2002) *Cellular thiol status-dependent inhibition of tumor cell growth via modulation of retinoblastoma protein phosphorylation by (-)epigallocatechin*. *Cancer Lett* 179: 25-32.

Khan N, Sultana S (2005) *Chemomodulatory effect of Ficus racemosa extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats*. *Life Sci* 77: 1194-1210.

Kornmann M, Arber N y Korc M (1998) *Inhibition of basal and mitogen-stimulated pancreatic cell growth by cyclin D1 antisense is associated with loss of*

tumorigenicity and potentiation of cytotoxicity to cisplatinum. J Clin Invest 101: 344-352.

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF *et al.* (1997) *New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors.* Genes Dev 11:847-862.

Lam JS, Shvarts O, Leppert JT *et al.* (2005) *Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy.* J Urol 173: 1853-1852.

Lamien-Meda A, Lamien CE, Nacoulma OG *et al.* (2008) *Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso.* Molecules 13: 581-594.

Lee KN y Lee HJ (2006) *The roles of polyphenols in cancer chemoprevention.* Biofactors 26(2): 105-121.

Libermann T (2007) *Genomics of renal cell cancer: the biology behind and the therapy ahead.* Clin Cancer Res 13: 685-692.

Lin DI, Barbash O, Diehl JA *et al.* (2006) *Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF (FBX4- α B crystallin) complex.* Mol Cell 24: 355-366.

Lin T, Reichner C, Wu X, Lewin A (1996) *Analysis of wild-type and mutant p21^{Waf1} gene activities.* Mol Cell Biol 16: 1786-1793.

Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin K (2006) *The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma.* J Urol 176: 2353-2358.

Malumbres M y Barbacid M (2005) *Mammalian cyclin-dependent kinases.* Trends Biochem Sci 30: 630-641.

Malumbres M y Barbacid M (2009). *Cell-cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm.* Nature Rev Cancer 9: 153-166.

Miliani de Marval PI, Macias E, Rounbehler R, Rodriguez-Puebla ML, *et al.* (2004) *Lack of cyclin-dependent kinase 4 inhibits c-myc tumorigenic activities in epithelial tissues.* Mol Cell Biol 24: 7538-7547.

Montalvo-Muñoz F (2008) *Estudio del papel de la proteína p53 y el efecto de un extracto de tamarindo en la respuesta a un carcinógeno renal in vivo.* Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica-Biológica, Facultad de Química, UNAM.

Morisaki H, Ando A, Nakanishi M *et al.* (1999) *Complex mechanisms underlying impaired activation of Cdk4 and Cdk2 in replicative senescence: roles of p16, p21 and Cyclin D1.* Exp Cell Res 253: 503-510.

Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL, Exon JH (2006) *A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer.* Crit Rev Food Sci Nutr 46: 161-183.

Nie L, Wise M, Peterson D, Meydani M (2006) *Mechanism by which avenantramide-c, a polyphenol of oats, blocks cell cycle progression in vascular smooth muscle cells.* Free Radic Biol Med 41: 702-708.

Nelson EC, Evans CP, Lara PN Jr. (2007) *Renal cell carcinoma: current status and emerging therapies.* Cancer Treat Rev 33: 299-313.

Nilson K., Landberg G (2006) *Subcellular localization, modification and protein complex formation of the cdk-inhinator p16 in Rb-functional an Rb- inactivated tumor cells.* Int J Cancer 118: 1120-1125.

Nishiyama Y, Suwa H, Toyokuni S *et al.* (1995) *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.* Jpn. J Cancer Res 86: 1150-1158.

Obaya AJ, Sedivy JM (2002) *Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells.* Cell Mol Life Sci 59: 126-142.

Ortega S, Malumbres M, Barbacid M (2002) *Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer.* Biochim Biophys Acta 1602: 73-87.

Pariante-Pérez TO (2012) *Participación de NF- κ B en la carcinogenicidad del nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) y efecto de un extracto de tamarindo (EST)*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

Paternot S, Bockstaele L, Roger PP *et al.* (2010) *Rb Inactivation in cell cycle and cancer: The puzzle of highly regulated activating phosphorylation of CDK4 versus constitutively active CDK-activating kinase*. Cell Cycle 9: 689-699.

Povichit N, Phrutivorapongkul A, Leelapornpisid P *et al.* (2010) *Phenolic content and in vitro inhibitory effects on oxidation and protein glycation of some Thai medical plants*. Pak J Pharm Sci 23: 403-408.

Prior RL (2003) *Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage*. Am J Clin Nutr 78: 570S-578S.

Rizzolio F, Lucchetti C, Giordano A *et al.* (2012) *Retinoblastoma tumor-suppressor protein phosphorylation and inactivation depend on direct interaction with Pin1*. Cell Death Differ 19: 1152-1161.

Sakano K, Mizutani M, Kawanishi S *et al.* (2005) *Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage*. Free Radic Biol Med 39: 1041-1049.

Santana-Ríos Z, Urdiales-Ortíz A, Pacehco-Gahbler C *et al.* (2011) *Cáncer de células renales, factores patológicos pronósticos y nuevas estrategias de estadificación*. Rev Mex Urol 71: 218-224.

Satyanarayana A, Kaldis P (2009) *Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms*. Oncogene 28: 2925-2939.

Sherr CJ (2000) *The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited*. Cancer Res 60: 3689-3695.

Sherr CJ, Roberts JM (1999) *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev 13: 1501-1512.

Sherr CJ, Roberts JM (2004) *Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases*. Genes Dev 18: 2699-2711.

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

Tanaka T, Kondo S, Toyokuni S *et al.* (2000) *Expression of stress-response and cell proliferation genes in renal cell carcinoma induced by oxidative stress*. Am J Pathol 156: 2149-2157.

Tanaka T, Iwasa Y, Toyokuni S *et al.* (1999) *High incidence of allelic loss on chromosome 5 and inactivation of p15^{INK4B} and p16^{INK4A} tumor suppressor genes in oxystress-induced renal cell carcinoma of rats*. Oncogene 18: 3793-3797.

Tanaka Y, Aleksunes LM, Klaassen CD *et al.* (2008) *Coordinated induction of Nrf2 target genes protects against iron nitrilotriacetate (FeNTA)-induced nephrotoxicity*. Toxicol Appl Pharmacol 231: 364-373.

Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M (2007) *Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression*. Cancer Sci 98: 629-635.

Torres-Martínez MM (2007) *Efecto del tratamiento con un extracto de Tamarindus indica sobre el daño inducido por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)*. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga, Facultad de Química, UNAM.

Toyokuni S, Uchida K, Okamoto K, *et al.* (1994) *Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate*. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 2616-2620.

Tsuchiya K (2005) *Oxygen radicals photo-induced by ferric nitrilotriacetate complex*. Biochim Biophys Acta 1725: 111-119.

Van den Heuvel S (2005) Cell-cycle regulatio, *Worm Book*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.28.1, <http://www.wormbook.org>

Vargas-Olvera CY (2009) *Efecto de un extracto de semillas de tamarindo (EST) sobre el desarrollo de cáncer renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

Vargas-Olvera CY, Sánchez-González DJ, Solano JD *et al.* (2012) *Characterization of N-diethylnirosamine-initiated and ferric nitriloacetate-promoted renal cell carcinoma experimental model and effect of a tamarind seed extract against acute nephrotoxicity and carcinogenesis*. *Mol Cell Biochem* 369: 105-117.

Vidaurreta M, Maestro ML, Arroyo M *et al.* (2008) *Inactivation of p16 by CpG hypermethylation in renal cell carcinoma*. *Urol Oncol* 3: 239-245.

Wargovich, MJ (2000) *Anticancer properties of fruits and vegetables*. *Hort Science* 35: 573-575.

Wu X, Beecher GR, Prior RL *et al.* (2004) *Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States*. *J Agric Food Chem* 52: 4026-4037.

Zarkowska T, Mitnacht S (1997) *Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases*. *J Biol Chem* 272: 12738-12746.

Zhang HS, Hannon GJ, Beach D (1994) *p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states*. *Genes Dev* 8: 1750-1758.

Zhang WY, Liu HQ, Zhu XZ *et al.* (2006) *Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in endotoxin-treated monocytic cells*. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 508-515.