



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTOS DEL AUMENTO EN LOS NIVELES DE PKC ζ EN UN MODELO DE
CARCINOGENESIS RENAL INDUCIDO POR FENTA**

TESIS

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

PRESENTA:

Q.F.B. PATRICIA CURIEL MUÑIZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO

FACULTAD DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MARINA MACÍAS SILVA

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI

FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F., ABRIL, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 los proyectos IN227010 e IN221313.

Durante los estudios de maestría la sustentante gozó de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT (443136).

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

PRESIDENTE	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
VOCAL	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
VOCAL	Dra. Marcela Lizano Soberón
VOCAL	Dra. Martha Robles Flores
SECRETARIO	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína Activadora 1
BUN	Nitrógeno ureico sanguíneo
CCR	Carcinoma de células renales
CDP	Proteína de desplazamiento de CCAAT
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
DAG	Diacilglicerol
DEN	N-dietilnitrosamina
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EST	Extracto de semillas de tamarindo
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FIH-1	Factor inhibidor de HIF 1
FeNTA	Nitrilotriacetato de hierro
FT	Fenoles totales
JNK	Cinasa del amino terminal de c-Jun
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HIF	Factor inducible por hipoxia
i.p.	Intraperitoneal
MAPKs	Cinasas de proteína activadas por mitógenos

NBT	Nitroazul de tetrazolio
NF-κB	Factor nuclear κB
$O_2^{\cdot-}$	Anión superóxido
PB	Dominio Phox y Bem1p
PDK-1	Cinasa dependiente de fosfoinosítido
PI3-K	Cinasa de fosfatidil inositol trifosfato
PKCz	Proteína cinasa C zeta
PS	Pseudosustrato
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VHL	Von Hippel Lindau
WB	Western blot

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Carcinoma de células renales.....	4
1.2 Nitrlotriacetato de hierro (FeNTA) como modelo de estudio de carcinogénesis renal.....	5
1.3 Antioxidantes.....	6
1.3.1. Extracto de semillas de tamarindo.....	7
1.4 Proteína cinasa C (PKC).....	8
1.5 La PKC en cáncer.....	8
1.6 La PKC y estrés oxidante.....	9
1.7 Estructura y activación PKCz.....	10
1.8 La PKCz en CCR.....	12
1.9 Factor inducible por hipoxia (HIF).....	13
1.10Factor inhibidor de HIF (FIH).....	13
1.11 CDP.....	14
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	17
5. METODOLOGÍA	
5.1 Preparación del extracto de semillas de <i>Tamarindus indica</i>	18
5.2 Caracterización del extracto.....	18
5.3 Desarrollo del modelo subcrónico de tratamiento con el carcinógeno FeNTA en ratas Wistar macho.....	19
5.3.1 Administración del EST.....	20
5.3.2 Preparación y administración de N-dietilnitrosamina (DEN).....	21
5.3.3 Preparación y administración del nitrlotriacetato de hierro (FeNTA).....	21
5.4 Evaluación de la función renal.....	22
5.5 Extracción de proteínas del tejido renal.....	22
5.5.1 Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry.....	22
5.5.2 Determinación de las proteínas de interés por Western blot	23
5.6 Determinación de la localización subcelular de PKCz, HIF-1 α y HIF-2 α	24
5.6.1 Extracción de proteínas nucleares.....	24
5.7 Asociación entre PKCz y CDP.....	25
5.8 Análisis estadístico.....	26
6. RESULTADOS	
6.1 Caracterización del extracto.....	27
6.2 Curva de peso corporal.....	27
6.3 Observación macroscópica de los riñones.....	28
6.4 Evaluación de la función renal	29

6.5 Niveles de PKCz	
6.5.1 PKCz en corteza renal.....	30
6.5.2 PKCz en pulmón.....	32
6.5.3 PKCz en hígado.....	33
6.6 Niveles de HIF en corteza renal	
6.6.1 HIF-1 α	35
6.6.2 HIF-2 α	35
6.7 Localización subcelular de PKCz, HIF-1α y HIF-2α	
6.7.1 PKCz.....	36
6.7.2 HIF-1 α	37
6.7.3 HIF-2 α	38
6.8 Interacción proteínica PKCz/CDP.....	39
7 RESUMEN DE RESULTADOS.....	41
8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	42
9 CONCLUSIONES.....	48
10 PERSPECTIVAS.....	49
11 ANEXOS	
11.1 Cuantificación de fenoles totales.....	50
11.2 Inactivación del radical superóxido.....	51
11.3 Preparación de nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).....	53
11.4 Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry.....	54
11.5 Electroforesis.....	55
11.5.1 Preparación de los geles para electroforesis.....	55
11.5.2 Preparación de las muestras.....	56
11.6 Transferencia a membrana de fluoruro de polivinilo (PVDF).....	56
11.7 Detección de proteínas.....	57
11.8 Revelado de las placas de rayos X.....	57
12 BIBLIOGRAFIA.....	58

RESUMEN

Entre los tipos de cáncer menos comprendidos se encuentra el cáncer renal, del cual, el carcinoma de células renales (CCR) es el más común y presenta muchas complicaciones que llevan a una alta tasa de mortalidad, como es su detección en estadios muy avanzados, por lo que también su estudio en etapas tempranas es prácticamente imposible.

El modelo de carcinogénesis renal inducida en ratas con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) es un modelo ya establecido; sin embargo, aún no está bien caracterizado. Aunque las evidencias señalan al estrés oxidante como uno de los responsables del desarrollo del CCR en este modelo, los mecanismos moleculares directamente involucrados en la malignización celular no están definidos. En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha visto que en esquemas de tratamiento durante 1 y 2 meses con FeNTA se presentan alteraciones moleculares pro-carcinogénicas en riñón como: incremento en los niveles de MAP cinasas y ciclina D1, así como en la actividad de los factores de transcripción AP-1 y NFκB y la presencia de lesiones preneoplásicas.

La familia de proteína cinasa C (PKC) cataliza la fosforilación de diversos sustratos con diferentes efectos biológicos que al desregularse pueden participar en el desarrollo de neoplasias. Específicamente, la importancia de PKC ζ en el CCR está sustentada por hallazgos de diferentes autores en líneas celulares de este tipo de cáncer y que sugieren que la cinasa participa en la regulación de los niveles del factor inducible por hipoxia (HIF), así como de su translocación nuclear mediante la regulación de la actividad del factor transcripcional CDP, el cual reprime la expresión del gen del factor inhibidor de HIF (FIH). Así mismo, en un estudio de nuestro grupo de investigación, la exposición a FeNTA durante un mes indujo un aumento en los niveles de PKC ζ total; sin embargo, no se conocían las consecuencias de este aumento. Por otro lado, también en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se demostró que un extracto etanólico de semillas de tamarindo (EST) presenta una capacidad antioxidante notable y protege de manera significativa contra el daño severo en la función renal inducido por exposiciones agudas al FeNTA y disminuye la incidencia y retarda el desarrollo de los tumores de CCR inducidos por exposiciones crónicas al carcinógeno.

Por todo lo anterior se consideró importante continuar con la caracterización del comportamiento de PKC ζ y analizar su posible participación en la vía CDP-FIH-HIF en tejido renal de ratas expuestas al carcinógeno FeNTA durante 1 y 2 meses, así como determinar el efecto del EST sobre los parámetros a analizar. Para cumplir con estos objetivos se estudiaron los siguientes grupos experimentales: control (C), tratado con EST (E, antioxidante, tratado con dietilnitrosamina (D, iniciador tumoral), tratado con FeNTA (F, promotor tumoral), tratado con DEN y FeNTA (D+F) y tratado con EST+DEN+FeNTA (E+D+F).

Al igual que en estudios previos ejecutados a 1 mes de exposición a FeNTA, se encontró que los niveles renales de PKC ζ total se incrementan a los 2 meses, así como los de su forma fosforilada en ambos tiempos. Por otra parte, se encontró que PKC ζ se transloca al núcleo y que sus niveles aumentan tanto en el núcleo como en el citoplasma, siendo más notorio el aumento en el núcleo en los dos tiempos de exposición al carcinógeno.

Con la finalidad de estudiar si las alteraciones observadas eran específicas de riñón o se presentaban en otros órganos, se decidió analizar el estatus de PKC ζ total y fosforilada en hígado y pulmón, tejidos en los que no se desarrollan tumores primarios con el esquema de tratamiento utilizado para inducir CCR. En ambos órganos aumentaron los niveles de PKC ζ total y fosforilada en los grupos tratados durante 1 mes, no obstante, a los 2 meses no se observaron cambios con respecto al grupo control. Lo anterior refuerza la hipótesis de que probablemente PKC ζ esté participando en el proceso de carcinogénesis renal en este modelo.

En cuanto a HIF, se encontró que los niveles de ambas isoformas no cambiaron después de un mes de exposición al carcinógeno; por el contrario, a los dos meses aumentaron significativamente en los grupos tratados con FeNTA con respecto al grupo control, tanto en extractos totales como en las fracciones citoplasmáticas y nucleares. Esto coincide con el aumento de PKC ζ y su translocación al núcleo por lo que se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en fracciones nucleares para estudiar si la enzima se unía con CDP. En las muestras de los grupos tratados con FeNTA en ambos tiempos de estudio efectivamente se formó el complejo, no así en el grupo control, por lo que muy probablemente PKC ζ está participando en el aumento observado en los niveles de HIF.

Por otra parte, el extracto no protegió contra las alteraciones anteriores, ya que al comparar los grupos D+F y E+D+F, no se encontraron diferencias significativas, lo que sugiere que la protección contra el desarrollo de CCR observado previamente por efecto del EST parece no ser a través de la modulación de los niveles de la cinasa.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren fuertemente la relación de PKC ζ con la vía CDP-FIH-HIF y su probable participación en etapas tempranas de la carcinogénesis renal inducida con FeNTA.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Carcinoma de células renales

El carcinoma de células renales (CCR) es el tipo de cáncer urológico más común en adultos, representa el 3% de todos los tipos de cáncer y comprende el 90% de las neoplasias renales (Atkins *et al.*, 2000; Jemal *et al.*, 2013). La clasificación histológica distingue varios subtipos de CCR: de células claras, papilar, cromóforo, oncocitoma y de ducto colector, siendo el primero el más común. En México, aunque la estadística no se encuentra actualizada, de acuerdo con el Compendio de Cáncer de 2001 de la Dirección General de Epidemiología en México, se sabe que en el 2001 se presentaron un total de 1577 casos, de los cuales el 81.7% falleció a causa de este padecimiento.

El CCR, además de ser una enfermedad histológicamente diversa, es de difícil diagnóstico por ser asintomático sobre todo en etapas tempranas (cuando el cáncer, en general, es más controlable o, incluso, curable) por lo que, por lo general, se detecta en etapas avanzadas e incluso cuando ya está presente la metástasis (Stadler, 2005; Nelson *et al.*, 2007). Así mismo, la respuesta de esta neoplasia a las terapias convencionales es limitada, complicándose esto aún más, dado que los subtipos histológicos presentan diferentes alteraciones moleculares, por lo que responden de manera diferente a las terapias (Mancini *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha demostrado la participación del estrés oxidante en muchos tipos de cáncer, en el caso del CCR, se ha visto que muestras de tejido tumoral se presentan niveles elevados de marcadores de ADN oxidado comparándolas con muestras de tejido normal (Okamoto *et al.*, 1996), y que hay una elevada lipoperoxidación en CCR de células claras (Oberley *et al.*, 1999). Más aún, existen evidencias de que el aumento en la lipoperoxidación observada en las personas obesas e hipertensas es el mecanismo responsable, al menos en parte, del aumento en el riesgo que corren estos pacientes a desarrollar CCR (Gago-Domínguez y Castelao, 2006).

1.2 Nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) como modelo de estudio de CCR

El carcinoma de túbulo proximal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) es un modelo experimental de carcinogénesis renal (Bahneman *et al.*, 1998). El FeNTA es un complejo pequeño formado por la unión de ácido nitrilotriacético con Fe^{3+} (Figura 1), el cual es una molécula de fácil absorción (Preece *et al.*, 1989) y su órgano blanco de carcinogénesis es el riñón (Toyokuni *et al.*, 1998)

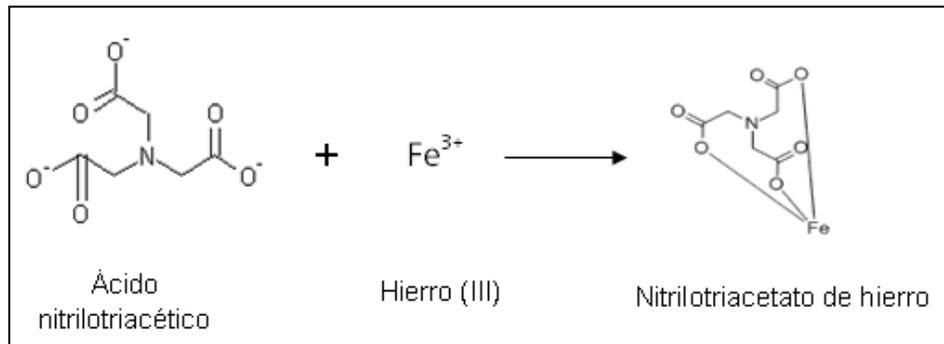


Figura 1. Formación del nitrilotriacetato de hierro (FeNTA).

Una vez en la sangre, el FeNTA es capaz de pasar a través del glomérulo por ser una molécula de bajo peso molecular, y en el lumen de los túbulos proximales el Fe^{3+} -NTA es reducido a Fe^{2+} -NTA por los productos de degradación del glutatión: cisteína y cisteína-glicina (Toyokuni *et al.*, 1994). Ya reducido, el hierro genera radicales OH^{\bullet} mediante la reacción de Fenton Haber-Weiss (Figura 2), los cuales oxidan las biomoléculas (Mizote *et al.*, 2002). Existen diversas evidencias de la inducción de estrés oxidante por FeNTA, por ejemplo, se ha demostrado la formación de lesiones oxidativas al ADN en sistemas tanto *in vitro* (Kawanishi *et al.*, 2002) como *in vivo* (Toyokuni *et al.*, 1994).



Figura 2. Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) mediante la reacción de Fenton-Haber-Weiss.

En roedores, administraciones agudas intraperitoneales de FeNTA producen necrosis tubular e insuficiencia renal severa (Preece *et al.*, 1989, Cruz-White, 2007; López-Ramos, 2007; Torres-Martínez, 2007) y en esquemas de exposición crónica se desarrolla CCR (Okada, 1982). Además, la administración única de N-dietilnitrosamina (DEN) como iniciador 10 días antes del tratamiento crónico con FeNTA aumenta sensiblemente la proporción de animales que desarrollan el carcinoma de células renales y reduce el tiempo necesario de exposición al carcinógeno (Athar e Iqbal, 1998; Ansar *et al.*, 1999; Vargas-Olvera, 2009). En nuestro laboratorio, con un esquema de tratamiento crónico de cuatro meses de exposición a FeNTA y dos meses de descanso después de la última administración, se desarrollaron tumores renales en ratas macho Wistar sin que se alterara la función de este órgano (Vargas-Olvera, 2009). Los datos histopatológicos de ese estudio indican que los tumores corresponden al subtipo histológico de células claras, que es el subtipo más común en el CCR humano y que presentan un aumento en los marcadores de estrés oxidante como 4-hidroxinonanal y nitrotirosina. Por otra parte, también en nuestro laboratorio se ha encontrado que con un esquema de tratamiento durante 1 mes, los riñones de las ratas del grupo D+F presentan displasia, además de alteraciones moleculares procarcinogénicas tales como: incremento en los niveles de expresión de la ciclina D1, PKC ϵ fosforilada, ERK1/2, EGFR y PKCz total, así como un aumento en la activación de los factores de transcripción NF κ B y AP-1 (Aguilar-Alonso, 2010; Rangel-Gómez, 2011; Curiel-Muñiz, 2012).

Sin embargo, aún falta mucho para establecer los mecanismos moleculares o bioquímicos responsables de la carcinogenicidad renal del FeNTA.

1.3 Antioxidantes

Dada la vinculación del estrés oxidante con el desarrollo del cáncer, en los últimos años se ha ampliado la búsqueda de compuestos antioxidantes presentes en alimentos que puedan disminuir el riesgo de desarrollar cáncer (Matés *et al.*, 2011).

Entre los compuestos con mayor capacidad antioxidante están los polifenoles, los cuales se encuentran en una gran cantidad de alimentos como frutas, vegetales y semillas (Bravo, 1998; Rice-Evans, 2001).

Se han probado algunos fitoquímicos fenólicos y extractos ricos en estos compuestos en diferentes tipos de cáncer, tanto *in vivo* como *in vitro*, y se han encontrado resultados muy positivos, como con el té verde y negro (Halder *et al.*, 2006) y la curcumina (Okazaki *et al.*, 2005). Entre los mecanismos celulares involucrados en el efecto benéfico de los fitoquímicos fenólicos, se han descrito los siguientes: inhibición de la lipoperoxidación, inducción de enzimas antioxidantes, efectos antiinflamatorios, inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular e inhibición de metástasis y angiogénesis (Matos *et al.*, 2000). En los últimos años, se ha demostrado que algunos de estos efectos se dan por la inhibición de vías de señalización como PI3K/Akt, ERK y Ras/Raf/MAPK y/o la activación de vías como JNK, p53 y caspasas y la supresión de la activación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 (Lee *et al.*, 2006; Nichenametla *et al.*, 2006).

Entre las especies vegetales que presentan gran contenido de compuestos polifenólicos se encuentra *Tamarindus indica* conocida popularmente como tamarindo. De hecho, los productos derivados de diferentes partes de esta planta (fruto, hoja, corteza y raíces) se usan en la medicina tradicional como antiinflamatorios, laxantes, expectorantes, cicatrizantes y digestivos, entre otras aplicaciones (Parrota, 2001; Komutarin *et al.*, 2004; Maiti *et al.*, 2004).

1.3.1 Extracto de semillas de tamarindo

Se ha comprobado que extractos de tamarindo pueden atenuar las alteraciones causadas por un estrés oxidante exacerbado en diferentes modelos animales (Pumthong, 1999; Ramos *et al.*, 2003). El perfil de los compuestos polifenólicos de la semilla de tamarindo reveló la presencia de seis compuestos principales: procianidinas B₂, epicatequina, tetrámero, pentámero y hexámero de procianidina y taninos poliméricos (Tsuda *et al.*, 1994; Sudjaroen *et al.*, 2005).

Debido al alto contenido de polifenoles en la semilla de esta leguminosa, se esperaría un resultado exitoso de su uso en el tratamiento y/o prevención de neoplasias. Por ejemplo, la procianidina B₂ inhibe el daño oxidante al ADN inducido por Fe²⁺ y H₂O₂ (Sakano *et al.*, 2005) y promueve la apoptosis en células de carcinoma de seno y próstata (Agarwal *et al.*, 2007). También se ha encontrado que esta procianidina puede inhibir cinasas (ERK, JNK y p38-MAPK), evitando la activación de algunos oncogenes relacionados (Zhang *et al.*, 2006).

En estudios realizados en nuestro laboratorio con un extracto etanólico de semilla de tamarindo (EST) se demostró que presenta un alto contenido de compuestos fenólicos y una notable capacidad de inactivación del radical O_2^{\cdot} , además de que tiene una buena estabilidad a largo plazo. Así mismo, se observó que la dosis de $100\text{mg}_{\text{FT}}/\text{kg}/\text{día}$ no tiene efectos pro-oxidantes o antinutricionales ni a corto ni a largo plazo, y en estudios agudos con FeNTA disminuye la producción renal de H_2O_2 y protege de manera significativa contra el daño severo en la función renal inducido por el FeNTA. Por otra parte, la administración del EST disminuyó la incidencia de CCR en un 21.05 % en estudios crónicos con FeNTA (Vargas-Olvera, 2009).

1.4 Proteína cinasa C (PKC)

La superfamilia de las proteínas cinasas C (PKC) cataliza la fosforilación de diversos sustratos en Ser ó Thr con diferentes efectos biológicos indispensables para el buen funcionamiento celular. Esta familia está constituida por 11 isoformas, las cuales están clasificadas en 3 grandes grupos con base en su modo de activación: a) El grupo de las PKC clásicas o convencionales (cPKC) que consiste en las isoformas α (alfa), β_1 , β_{II} (beta) y γ (gama), y que dependen de Ca^{2+} y diacilglicerol (DAG) como cofactores; b) las isoformas independientes de Ca^{2+} pero dependientes de DAG pertenecen a las PKC nuevas (nPKC) que incluyen a las isoformas δ (delta), ϵ (épsilon), η (eta) y θ (teta); y c) el grupo conocido como PKC atípicas (aPKC) ya que no dependen de Ca^{2+} ni de DAG para su activación, y dentro de este grupo se encuentran las isoformas i/λ (iota/lambda) y ζ (zeta). Todas las PKC son reguladas por fosforilaciones sucesivas en sitios específicos, lo que desencadena la unión a su cofactor y por lo tanto su activación (Webb *et al.*, 2000; Dutil *et al.*, 2001; Li y Gobe, 2006; Newton, 2010; Rosse *et al.*, 2010).

1.5 Las PKC en cáncer

La familia de PKC participa en procesos celulares tales como proliferación, ciclo celular, diferenciación y apoptosis (Blobe *et al.*, 1994; Stabnel, 1994; Liu, 1996). Las aberraciones en la expresión y localización de las isoformas de PKC se han implicado en el desarrollo de múltiples enfermedades, siendo la relación más prominente con la promoción y progresión

del cáncer (Fields y Gustafson, 2003). Aunque se sabe que las isoformas de PKC tienen una participación evidente en la carcinogénesis, éstas han representado un desafío para establecer la contribución individual de cada isoforma en el proceso de la carcinogénesis debido a las vastas diferencias en las funciones de cada isoforma y al hecho de que las funciones varían de acuerdo al tipo celular. Por ejemplo, la PKC α funciona como supresor de tumores en el intestino y se ha encontrado que en este tipo de tumores se encuentra disminuida su expresión en comparación con el tejido normal. Por otra parte, los niveles de expresión de PKC ϵ se correlacionan con una alta actividad proliferativa, y su localización membranal se asocia con un potencial altamente invasivo (Brenner *et al.*, 2004; Marengo *et al.*, 2011). En células cancerosas de riñón, se expresan todas las isoformas de PKC a excepción de la PKC γ y la PKC θ (Engers *et al.*, 2000).

1.6 PKC y estrés oxidante

Niveles bajos de estrés oxidante inducen modificaciones en las proteínas señaladoras que repercuten en su funcionalidad. Las isoformas de los grupos convencionales y nuevas de la familia PKC presentan características que las hacen susceptibles a modificaciones oxidantes (Gopalakrishna y Jaken, 2000; Genestra, 2007). Por un lado, el dominio regulatorio N-terminal contiene dedos de zinc que son motivos ricos en cisteína que pueden ser oxidados, lo que desencadena que la función autoinhibitoria del dominio regulatorio quede comprometida y como consecuencia la actividad enzimática sea estimulada (Gopalakrishna y Gundimeda, 2002). Esta susceptibilidad a modificaciones redox se desconoce en las isoformas atípicas, aunque en su dominio C1 se ha descrito solamente un dedo de zinc que podría ser blanco de óxido-reducción (Hirai y Chida, 2002). Giorgi y cols. (2010) realizaron trabajos con fibroblastos embrionarios de ratón en donde el estrés oxidante desencadena la translocación de las isoformas convencionales y nuevas del citosol a la membrana celular y de PKCz al núcleo lo que correlaciona con su activación, sin embargo no se conoce el mecanismo. Esto correlaciona con lo observado en líneas celulares de CCR, en donde PKCz interacciona con el factor transcripcional CDP, el cual se ha visto involucrado en el aumento de los niveles de HIF (Mukhopadhyay y Datta, 2004; Basu *et al.*, 2008).

1.7 Estructura y activación de PKCz

La PKCz posee un dominio regulatorio y un dominio catalítico unidos por una región bisagra al igual que el resto de las PKC (Figura 3). Esta isoforma presenta 3 regiones conservadas (C1, C3 y C4, de acuerdo a la estructura de las PKC convencionales) y 5 regiones variables (V1-V5). La región C1 está dentro del dominio regulatorio, mientras que las regiones C3 y C4 se encuentran dentro del dominio catalítico de la enzima (Li y Gobe, 2006). A diferencia de las isoformas de los grupos convencional y nuevas, PKCz posee un dominio adicional denominado PB1 rico en cisteínas que le permite a la enzima interactuar con otras proteínas que también poseen este dominio, entre ellas se encuentran MEK5, p62 y Par-6. A través de este tipo de interacciones, la PKCz puede ser regulada y además participar en procesos como la polarización celular y en las interacciones célula-célula (Hirai *et al.*, 2003; Gálvez *et al.*, 2009; Rosse *et al.*, 2010).

Dentro del dominio regulatorio se encuentra una secuencia autoinhibitoria denominada pseudosustrato (PS), que se une a la región que acepta al sustrato dentro del dominio catalítico y mantiene a la enzima en una conformación “cerrada” o inactiva igual que ocurre en las otras isoformas de PKC (House y Kemp, 1987; Hurley *et al.*, 1997).

Uno de los dos mecanismos críticos que regulan la actividad de la enzima es la conversión de la enzima a su forma “abierta” y ocurre cuando la afinidad del PS por la región catalítica decrece en respuesta a la unión de fosfatidilserina o ceramida que se encuentran en la membrana plasmática (Johnson *et al.*, 2000; Newton, 2001; Sonnenburg *et al.*, 2001; Gallegos y Newton, 2008)

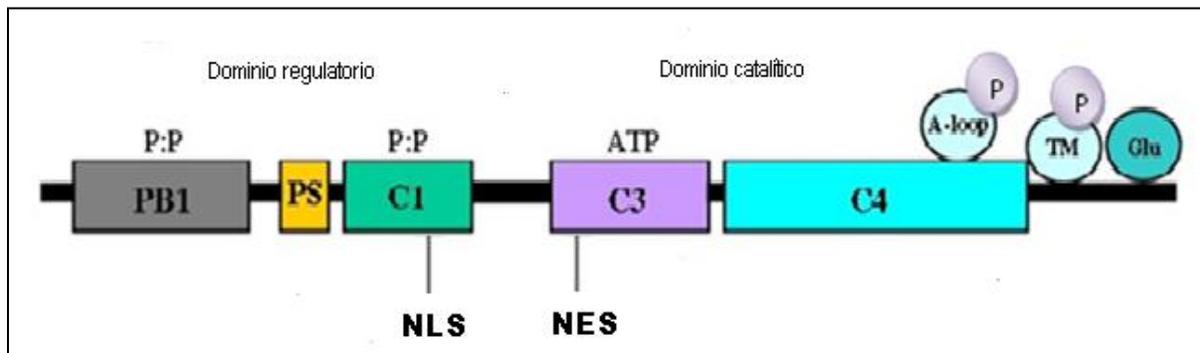


Figura 3. Representación de la estructura de PKCz. PS: pseudosustrato, A-loop: bucle de activación, TM: motivo de giro, Glu: glutamato, P: P: unión de proteínas, NLS: señal de localización nuclear, NES: señal de exportación nuclear. Modificado de Freeley *et al.*, 2011.

Una vez que la enzima está en la membrana plasmática es necesario que sea fosforilada en dos residuos de aminoácido que se encuentran dentro de la región catalítica siendo esto el segundo mecanismo crítico para la regulación de la enzima. La primera fosforilación es realizada por la cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PKC-1) y ocurre en el residuo Thr⁴¹⁰ dentro del bucle de activación (A-loop); esto desencadena la autofosforilación del residuo Ser⁵⁶⁰ dentro del motivo de giro (TM). Además, la enzima posee un tercer motivo llamado motivo hidrofóbico que contiene un residuo de glutamato, que mimetiza la carga negativa que podría aportar un grupo fosfato (Keranen *et al.*, 1995; Hirai *et al.*, 2003). Cualquier alteración en alguno de esos eventos regulatorios afecta la correcta activación de la enzima (Li y Gobe, 2006). Se ha reportado que la unión de fosfatidilserina o ceramida y la fosforilación ordenada de los residuos Thr⁴¹⁰ y Ser⁵⁶⁰ le proporcionan a la enzima una actividad catalítica (Keranen *et al.*, 1995; Le Good *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 1998; Le Good y Brindley, 2004). Se ha descrito que PKCz es capaz de translocarse al núcleo; por ejemplo, se ha observado en células HeLa la participación de PKCz en un proceso antiapoptótico a través de la modulación de los niveles de Bcl-2 lo que provoca resistencia a la quimioterapia (Filomenko *et al.*, 2002; Rimessi *et al.*, 2012), además en células de cáncer de colon (SW480) se ha demostrado mediante ensayos de inmunofluorescencia la colocalización de PKCz con β catenina en el núcleo y que la inhibición de PKCz tiene como resultado la exportación de la β catenina al citoplasma, lo que sugiere que la enzima es la encargada de la regulación de la localización de la β catenina; lo anterior junto con otros ensayos sugieren que la cinasa a través de la β catenina regula de manera positiva la vía Wnt en este tipo de cáncer (Luna-Ulloa *et al.*, 2011).

El mecanismo de activación y translocación de PKCz al núcleo no se ha descrito a detalle, sin embargo, estudios en células PC12 mostraron que PKCz debe de sufrir una fosforilación en el residuo de Tyr²⁵⁶, la cual provoca un cambio conformacional en la enzima lo que tiene como consecuencia la exposición de la NLS (señal de localización nuclear dentro del dominio C1) (Perander *et al.*, 2001) y dicha secuencia se pueda unir a las importinas β las cuales facilitan su entrada al núcleo (White *et al.*, 2002).

1.8 PKCz en CCR

Frecuentemente se ha encontrado un incremento en los niveles del factor inducible por hipoxia (HIF) en los tumores de CCR humano, y esto se ha atribuido generalmente a alteraciones funcionales de VHL, proteína encargada de ubiquitinar y mandar a degradación a HIF; sin embargo, más recientemente se ha descrito que en líneas celulares de CCR, el aumento en los niveles de PKCz parece ser responsable de la activación del factor transcripcional CDP mediante la fosforilación en el residuo Ser⁹⁸⁷, desencadenando su unión al promotor del gen del factor inhibidor de HIF (FIH) lo que evita su transcripción, y por lo tanto los niveles de HIF en el núcleo se incrementan. Esto sugiere una nueva vía de señalización para el estudio del aumento de los niveles de HIF en este cáncer (Pal *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2007) (Figura 4). Como consecuencia de esto, se expresan los genes blanco de HIF, entre los que se encuentra VEGF lo que podría estar relacionado con la alta vascularización observada en los tumores de CCR (Datta *et al.*, 2004; Mukhopadhyay y Datta, 2004; Basu *et al.*, 2008).

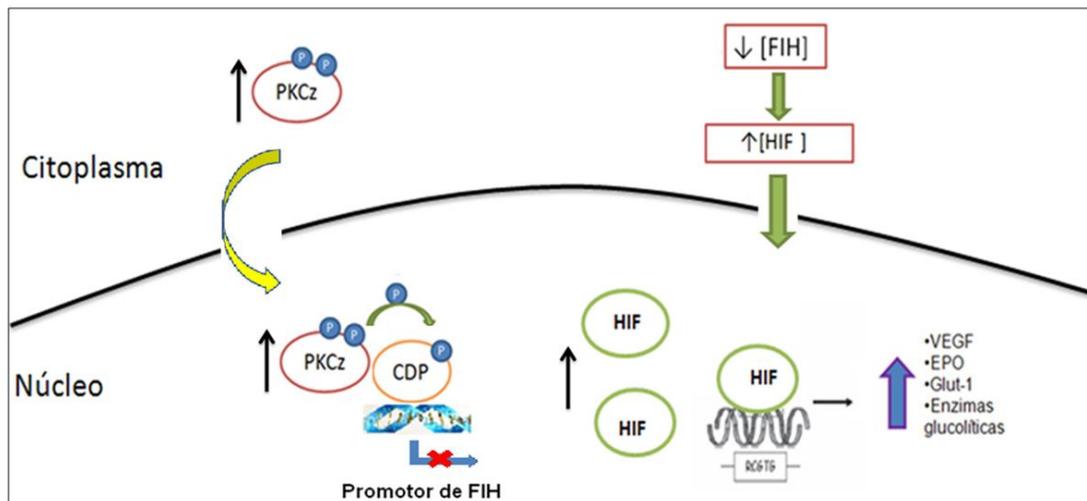


Figura 4. Esquema de regulación de HIF por PKCz. El aumento en los niveles de PKCz así como su translocación al núcleo tiene como resultado la activación del represor transcripcional CDP, el cual se une al promotor de FIH, y como consecuencia HIF se transloca al núcleo en donde activa diversos genes blanco que están relacionados con la supervivencia celular y la angiogénesis

1.9 Factor inducible por hipoxia (HIF)

El factor transcripcional HIF está compuesto por 2 subunidades, HIF-1 β , que se expresa constitutivamente, y se une a HIF-1 α ó HIF-2 α , las cuales son sensibles a las concentraciones de oxígeno. Bajo condiciones de normoxia, tanto HIF-1 α como HIF-2 α son hidroxiladas en residuos de prolina y asparagina por las prolin hidroxilasas o por FIH, respectivamente, y posteriormente son ubiquitinadas por VHL, lo que las marca para ser degradadas via proteasoma. En cambio, en condiciones de hipoxia la hidroxilación de HIF-1 α y 2 α disminuye o desaparece, lo que permite que dichas subunidades se transloquen al núcleo y se puedan unir a p300, la cual es un cofactor necesario para que HIF ejerza su función; una vez formado complejo HIF-1 α /2 α -HIF-1 β -p300 se lleva a cabo su unión a los elementos de respuesta a hipoxia en el DNA (Fukuda *et al.*, 2002; Carroll y Ashcroft, 2005). Se conocen más de 110 genes blanco de este factor, muchos de los cuales están involucrados en el desarrollo y progresión del cáncer. Se sabe que algunos factores de crecimiento son capaces de inducir la síntesis de HIF1 α /2 α independientemente de la disponibilidad de oxígeno (Fukuda *et al.*, 2002; Akeno *et al.*, 2002) mediante mecanismos que involucran a las vías de las MAPK's y de PI3K/Akt (Fukuda *et al.*, 2002; Bardos y Ashcroft, 2004). En nuestro laboratorio hemos encontrado aumentados los niveles de Akt total y fosforilada así como los de ERK1/2 después de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA (Aguilar-Alonso, 2010), además de un incremento en los niveles de proteínas cuyos genes son blanco de HIF: eritropoyetina (EPO) y anhidrasa carbónica IX (CAIX) (datos no publicados)

1.10 Factor inhibidor de HIF (FIH)

Esta proteína contiene un dominio JmjC que se ha involucrado con la dinámica de la cromatina así como en la transducción de señales (Elkins *et al.*, 2003), Metzen y cols. (2003) demostraron que FIH se localiza principalmente en el citoplasma y está expresada en diferentes tejidos, es sensible a la tensión de oxígeno, es decir, al encontrarse en condiciones de normoxia está potencialmente disponible para regular la actividad de HIF, ya que, en el citoplasma lo hidroxila en el residuo Asn⁸⁰³ dentro de su dominio de transactivación en el extremo carboxilo (CAD) lo que tiene como consecuencia la inhibición de su unión con p300 (histona desacetilasa) (Hewitson *et al.*, 2002; Lando *et al.*, 2002; McNeill *et al.*, 2002;

Koivunen *et al.*, 2004) lo que bloquea su actividad transcripcional sobre sus genes blanco. En cambio, en condiciones severas de hipoxia FIH no tiene actividad y por lo tanto, la unión de HIF y p300 se lleva a cabo y como consecuencia la expresión de sus genes blanco (Arany *et al.*, 1996; Kallio *et al.*, 1998; Freedman *et al.*, 2002).

1.11 CDP

CDP (CCAAT-displacement protein) pertenece a la familia de factores de transcripción que están involucrados en el control de la proliferación y diferenciación celular (Nepveu, 2001). En humanos hay dos genes, llamados CDP-1 y CDP-2, mientras que en ratón y rata se llaman Cux-1 y Cux-2 respectivamente (Neufeld *et al.*, 1992; Valarche *et al.*, 1993; Quaggin *et al.*, 1996). Se ha reportado que ratones knock out para Cux-1 muestran fenotipos diversos, los cuales incluyen retardo en el crecimiento, retraso en la diferenciación del epitelio pulmonar, se observa infertilidad en machos y deficiencia de linfocitos B y T, entre otros (Tufarelli *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 2001; Sinclair *et al.*, 2001; Loung *et al.*, 2002). En contraste, la sobreexpresión de Cux-1 en ratones muestra hiperplasia en múltiples órganos así como organomegalia (Ledford *et al.*, 2002). Esto demuestra la importancia del producto del gen CDP/Cux en el desarrollo de varios tejidos.

Se ha demostrado que CDP regula la transcripción a través de dos mecanismos: competencia por los sitios de unión y mediante represión activa (Mailly *et al.*, 1996). Se ha reportado que CDP fosforilado en la Ser⁹⁸⁷ disminuye la expresión del gen de FIH y esto subsecuentemente conduce al aumento de la actividad de HIF (Li *et al.*, 2007), lo que tiene como consecuencia la inducción de la expresión de sus genes blanco, por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), anhidrasa carbónica IX (CAIX) y eritropoyetina (EPO), entre otros (Scortegagna *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2007, Rankin *et al.*, 2007).

2 JUSTIFICACIÓN

El cáncer renal es uno de los tipos de cáncer menos comprendidos, es la neoplasia renal más común en adultos, su diagnóstico es difícil, es asintomático incluso en etapas avanzadas y presenta una alta tasa de mortalidad.

En nuestro laboratorio se está caracterizando un modelo de carcinogénesis renal inducida con nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en el cual está involucrado el estrés oxidante, sin embargo se desconocen los mecanismos moleculares responsables de la malignización celular. Se sabe que con una sola exposición a FeNTA en estudios agudos (1-24 hrs) se desarrolla necrosis e insuficiencia renal, en cambio, con protocolos de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA se obtienen lesiones premalignas así como algunas alteraciones moleculares pro-carcinogénicas; y, por último, el tratamiento crónico con inyecciones repetidas de FeNTA durante 4 meses lleva al desarrollo de CCR.

La importancia de PKC ζ en el CCR está sustentada por hallazgos de diferentes autores en una línea celular de esta neoplasia (786-O) en las que se ha demostrado una correlación entre los niveles de PKC ζ y los niveles de HIF en el núcleo. Así mismo, se ha visto que el aumento de la expresión de PKC ζ disminuye los niveles tanto del ARN mensajero del factor inhibidor de HIF (FIH) como de la proteína, lo que parece deberse a la fosforilación por PKC ζ del factor transcripcional CDP activándolo, el cual reprime la expresión del gen de FIH. Como consecuencia, si PKC ζ aumenta, FIH no va a inhibir la translocación de HIF al núcleo y por lo tanto su unión a p300 y a sus genes blanco. Todo lo anterior sugiere que la cinasa participa en la regulación de los niveles de HIF así como en la regulación transcripcional del gen de FIH y consecuentemente en la regulación de la translocación nuclear de HIF. Interesantemente, en un estudio de nuestro grupo de investigación se encontró un aumento en los niveles de PKC ζ total después de un mes de tratamiento con FeNTA, lo que sugiere su posible participación en la malignización de las células renales; sin embargo, las posibles consecuencias de este aumento en la vía CDP-FIH-HIF son inciertas.

Con base en lo anterior se consideró importante continuar con el estudio del comportamiento de PKC ζ y la vía CDP-FIH-HIF en nuestro modelo. Además, hasta donde sabemos, no existen estudios de la relación entre PKC ζ y la vía CDP-FIH-HIF en modelos *in vivo* ni en etapas tempranas del desarrollo de cáncer. Por otro lado, con el fin de investigar si las

alteraciones inducidas por el FeNTA eran específicas de tejido renal, se analizaron los niveles de la cinasa y su forma fosforilada en muestras de hígado y pulmón, órganos en los que no se desarrollan tumores primarios. Así mismo, debido a que el tratamiento con el EST disminuye la incidencia y retarda el desarrollo del CCR, se decidió estudiar si el extracto protegía contra los efectos del tratamiento con FeNTA sobre la vía de señalización estudiada en el presente trabajo.

3 HIPÓTESIS

En etapas tempranas del modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA los niveles de PKCz total y fosforilada aumentarán, se encontrará en el núcleo e interaccionará con CDP, por consiguiente, los niveles de HIF aumentarán y se promoverá su translocación nuclear. Por otro lado, el EST protegerá contra estas alteraciones.

4 OBJETIVOS

- GENERAL

Estudiar el comportamiento de PKCz y sus probables consecuencias en la vía CDP-FIH-HIF en etapas tempranas del modelo de carcinogénesis renal por exposición a FeNTA y evaluar si el EST modula el proceso.

- PARTICULARES

- Montar protocolos de tratamiento con FeNTA y EST durante 1 y 2 meses en ratas Wistar macho.

Determinar por la técnica de Western blot;

En muestras de corteza renal:

- Los niveles de PKCz total y fosforilada en el residuo Thr⁴¹⁰.
- Los niveles de HIF-1 α y 2 α .
- La localización subcelular de PKCz así como de HIF-1 α y 2 α .

En muestras de hígado y pulmón:

- Los niveles de PKCz total y fosforilada en el residuo Thr⁴¹⁰.

Por la técnica de co-inmunoprecipitación:

- La interacción entre PKCz y CDP en fracciones nucleares renales.

5 METODOLOGÍA

5.1 Preparación del extracto de semillas de *Tamarindus indica*

Se obtuvo la cáscara de la semilla mediante fragmentación mecánica, posteriormente se colocaron 25 g de ésta en 500 ml de etanol anhidro. Se maceraron durante 24 h a temperatura ambiente (extracción etanólica). Después, se separó por decantación el extracto resultante de las cáscatas y se secó al vacío en un rotaevaporador hasta la obtención de un polvo seco. A este polvo se le asignó el nombre de extracto de semillas de tamarindo (EST) (Vargas-Olvera, 2009).

5.2 Caracterización del extracto

- Cuantificación de fenoles totales

Se determinó el contenido de fenoles totales del EST mediante la técnica de Folin-Ciocalteu. En esa técnica, los fenoles se oxidan por el reactivo de Folin (ver anexo 11.1), el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, los cuales se reducen por acción de los fenoles, formando una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno. Para la cuantificación se realiza una curva patrón de ácido gálico en la que se interpolan las soluciones con diferentes concentraciones del EST. Los resultados se expresan en μg eq. de ácido gálico/mL de extracto.

- Evaluación de la capacidad de inactivación del radical superóxido

El radical superóxido que se genera enzimáticamente, por acción de la xantina oxidasa sobre la xantina, y reacciona con el nitroazul de tetrazolio (NBT) para formar formazán (Figura 5), un compuesto colorido que absorbe a 560 nm (Parejo *et al.*, 2002). La inactivación del radical superóxido por acción de los polifenoles se detectó por la disminución de formazán debido a la disminución de radical superóxido disponible.

El protocolo para determinar la capacidad de inactivación del radical superóxido se realizó de la siguiente manera: se determinó la cantidad de formazán formado en la mezcla de reacción sin polifenoles (control positivo, C-100%). Posteriormente se realizó una curva con diferentes concentraciones de EST (Ver anexo 11.2) a las que se les determinó el % de inactivación del

radical respecto a C-100%. A la curva obtenida se le realizó una regresión no lineal para calcular la dosis media inhibitoria (CI_{50}) que se refiere a la cantidad de EST necesario para atrapar el 50% de anión superóxido formado en el sistema xantina-xantina oxidasa.

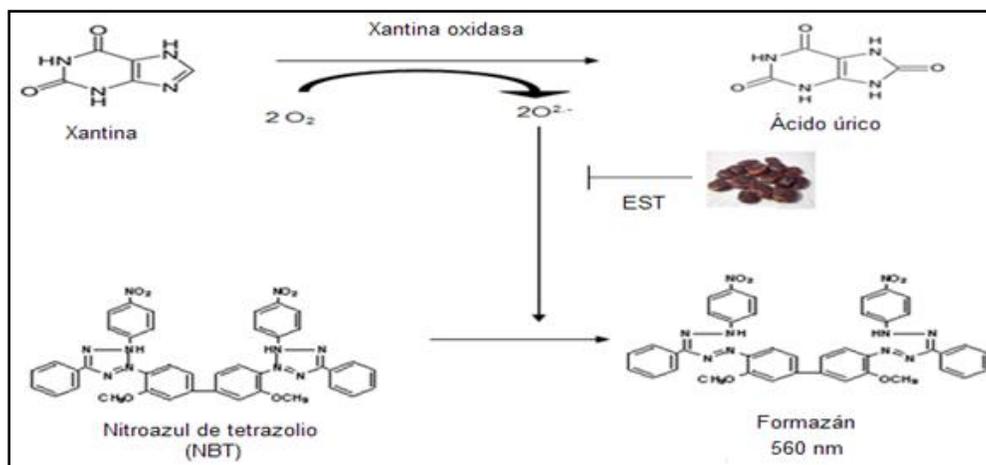


Figura 5. Fundamento para la determinación de la capacidad de inactivación del radical superóxido por el EST.

5.3 Desarrollo de los protocolos de exposición a FeNTA durante uno y dos meses en ratas Wistar macho.

Para el desarrollo de los protocolos de tratamiento con FeNTA se utilizaron un total de 49 ratas Wistar macho (Harlan México-UNAM) que se dividieron en 6 grupos: Control (C), EST (E), DEN (D) (iniciador tumoral), FeNTA (F) (promotor tumoral), DEN+FeNTA (D+F) y EST+DEN+FeNTA (E+D+F). La distribución y tratamiento de las ratas en los diferentes grupos se detalla en la tabla 1, y en la figura 6 se resume el esquema de tratamiento seguido en el presente estudio. Cabe mencionar que el tratamiento seguido es aquél que, extendido a 4 meses de exposición al carcinógeno, lleva al desarrollo de cáncer. Los animales se sacrificaron 48 horas después de la última administración de FeNTA por decapitación. Se extrajeron los riñones y se obtuvieron las cortezas renales, así como muestras de hígado y pulmón, las cuales se congelaron en nitrógeno líquido ($-192 \text{ }^\circ\text{C}$) y se almacenaron a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización. También se extrajeron muestras de sangre para la evaluación de la función renal.

Tabla 1. Distribución y tratamiento de las ratas Wistar macho en los 6 grupos de estudio en cada uno de los protocolos.

Grupo	No. de animales	Esquema de tratamiento
Control (C)	6	Vehículos
EST (E)	7	Administración del extracto de semilla de <i>Tamarindus indica</i> (EST) (100 mg FT/Kg/día) en el agua de beber.
DEN (D)	6	Administración i.p. única de N-dietilnitrosamina (DEN) (200mg/kg)
FeNTA (F)	7	Administración i.p. de nitrilotiacetato de hierro (FeNTA) dos veces por semana con aumentos semanales de la dosis (3, 5, 7, 9 mgFe/kg).
D+F	10	Administración del DEN+FeNTA como se describió en los grupos anteriores.
E+D+F	10	Administración del EST+DEN+FeNTA como se describió en los grupos anteriores.

FT: fenoles totales, ip: intraperitoneal

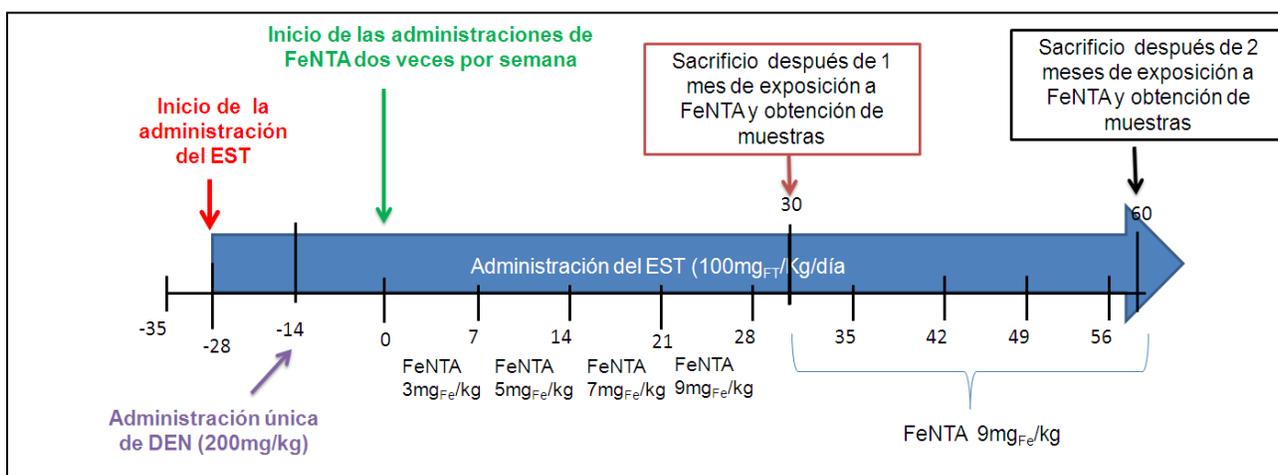


Figura 6. Esquema de desarrollo de los protocolos experimentales.

5.3.1 Administración del EST

El extracto de semilla de tamarindo se administró a lo largo del protocolo a los grupos correspondientes en el agua de beber en una dosis de 100 mg_{FT}/Kg/día, dosis que se ha demostrado en estudios previos que presenta el mayor efecto antioxidante sin producir efectos adversos (Vargas-Olvera, 2009).

Para calcular la cantidad de EST que debe añadirse al agua de beber para que cada rata recibiera la dosis antes mencionada de fenoles totales, se determinó el volumen promedio de agua bebida por los animales, así como el peso de los mismos. Dichas mediciones se

realizaron a lo largo de todo el protocolo a fin de ir ajustando la cantidad de EST añadido al agua de beber de los grupos correspondientes. El EST se administró desde 14 días antes de la aplicación del DEN y durante todo el protocolo.

5.3.2 Preparación y administración de N-dietilnitrosamina (DEN)

La DEN se obtuvo de Sigma Aldrich (EUA). La preparación se llevó a cabo diluyendo el contenido del frasco (1 mL de 990-999 mg/mL) en 11 mL de solución salina y ajustando el volumen a administrar dependiendo del peso de cada rata. Su administración fue vía intraperitoneal 15 días antes de la primera administración de FeNTA en una dosis única de 200 mg/Kg. La dosis se eligió de acuerdo a la literatura (Khan y Sultana, 2005) y observaciones previas en nuestro laboratorio (Vargas-Olvera, 2009).

5.3.3 Preparación y administración del nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)

Primero se preparó una solución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 160 mM (Sigma Aldrich, EUA) y otra de nitrilotriacetato de sodio 320 mM, utilizando en ambos casos una solución de Na_2HCO_3 120 mM como disolvente. Se mezclaron ambas soluciones en una proporción 1:2 v/v y se ajustó el pH a 7.4 con la solución de Na_2HCO_3 . La concentración final de hierro es de 2.98 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}$ (Ver anexo 11.3). El FeNTA se administró recién preparado vía intraperitoneal dos veces por semana durante 4 semanas con aumentos semanales de la dosis, partiendo de 3 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{kg}$ y hasta 9 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{kg}$, siguiendo el método de Awai (1979), con ligeras modificaciones. La cantidad de solución de FeNTA administrada se basó en la concentración de hierro y en el peso del animal. Para conocer la cantidad de la solución de FeNTA a administrar se efectuó un cálculo como se muestra en el siguiente ejemplo:

Para administrar una dosis de 3 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{kg}$ a una rata cuyo peso es de 0.260 Kg

$$0.260 \text{ Kg} \left[\frac{1 \text{ mL solución de FeNTA}}{2.98 \text{ mg}_{\text{Fe}}} \right] \left[\frac{3 \text{ mg}_{\text{Fe}}}{\text{Kg}} \right] = 0.261 \text{ mL de solución de FeNTA}$$

5.4 Evaluación de la función renal

Los riñones están involucrados en diversas funciones críticas del organismo como son la regulación del volumen de fluidos, electrolitos y estado ácido-base, así como la eliminación de productos de desecho. Una de las consecuencias más comunes en la alteración en la función renal es la excreción inadecuada de diversos metabolitos, así como la pérdida de proteínas. La urea es un producto de desecho que se sintetiza a partir de amonio, el cual se produce por la desaminación oxidante de los aminoácidos. Como marcador de función renal se utilizó la determinación del nitrógeno ureico sanguíneo (BUN por sus siglas en inglés) ya que, cuando existe insuficiencia renal la urea no se elimina por la orina, por lo que se observa un aumento en sus niveles sanguíneos.

La determinación de urea se realizó mediante el estuche comercial Urea-37 de la marca SPINREACT (Girona, España), el cual se basa en la reacción de la urea con el o-ftaldehído en medio ácido para formar un compuesto colorido que absorbe a 510 nm (Kaplan, 1984). Los resultados se expresan como mg de BUN/dL de suero.

5.5 Extracción de proteínas de tejido

Para estudiar las proteínas de interés en las muestras, se homogenizaron 100 mg de tejido en 650µL de amortiguador de lisis pH 7.4 en baño de hielo, cuya composición es: 1,4-ditiotreitol (DTT) 1 mM, TRIS HCl 10 mM, glicerol 30%, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%, ortovanadato 1 mM, fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 1 mM y azida de sodio 15 mM con inhibidores de proteasas y de fosfatasa. Los homogenados obtenidos se centrifugaron a 19,764 g (centrífuga Thermo Scientific Legend RT+, Alemania) a 4°C durante 30 min, y posteriormente el sobrenadante se recuperó y 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 Lowry que se describe a continuación.

5.5.1 Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry

El método de Lowry se basa en la formación de un complejo entre iones Cu^{2+} con el nitrógeno de los aminoácidos en condiciones alcalinas. Este complejo reacciona con el reactivo Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotungsteno) para formar un compuesto colorido que puede medirse espectrofotométricamente a 660 nm. La concentración de las

proteínas se calcula interpolando la absorbancia obtenida en la curva patrón de la ASB y los resultados se expresan en mg de proteína/mL (Anexo 11.4).

5.5.2 Determinación de los niveles de las proteínas de interés por Western blot

La evaluación de los niveles de PKCz total, PKCz fosforilada, HIF-1 α , HIF-2 α y CDP se realizó mediante la técnica de Western blot. El Western blot, o inmunoblot, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, como lo es un extracto tisular. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad; en nuestro caso se realizó una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) que emplea el criterio de la separación de acuerdo a su peso molecular. Posteriormente son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilo (PVDF)) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella (Towbin *et al.*, 1979).

Con base en la determinación de proteínas totales por el método de Lowry, se calculó el volumen de homogenado de corteza renal, hígado o pulmón necesario para cargar 50 μ g de proteína en cada pozo de los geles de la electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). La electroforesis se corrió con un tiempo y voltaje dependiente de la proteína a determinar (Anexo 11.5). En la tabla 2 se muestran las condiciones ideales para la detección de las proteínas mencionadas anteriormente. Posteriormente se realizó la transferencia semiseca (Transblot SD semidry Transfer Cell, BioRad) de las proteínas a una membrana de PVDF o de nitrocelulosa (Immobilion-P, Millipore Corporation, MA, USA) (Anexo 11.6). Una vez terminada la transferencia, se bloqueó la membrana. Después se hibridó durante 16 o 36 hrs según el caso con el anticuerpo primario monoclonal específico para cada proteína (Santa Cruz Biotechnology, EUA). Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.1%, durante 15 min cada vez. Posteriormente, se incubaron una hora con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, EUA). Transcurrido ese tiempo se eliminó el anticuerpo secundario y se realizaron tres lavados con PBS de 15 min cada uno. Por último, se adicionaron los sustratos de la peroxidasa (luminol y H₂O₂) a las membranas (Millipore Immobion™ Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore Corporation, MA, USA) (anexo 11.7) y se expusieron a una placa de rayos X (anexo 11.8). Las placas

obtenidas se analizaron por densitometría utilizando el programa Image J (Broken Symmetry Soft). Se realizó esta determinación con cada una de las proteínas de estudio y tubulina como control de carga. Posteriormente los valores densitométricos de la banda fueron corregidos con los valores de tubulina. Los valores de los grupos tratados se compararon contra el grupo control.

Tabla 2. Condiciones específicas para el Western blot de las proteínas estudiadas

Proteína	Cantidad de proteína (µg)	Geles SDS-PAGE (%)	Transferencia	Bloqueo	Anticuerpo Primario (dilución/tiempo de incubación)	Anticuerpo Primario (dilución/tiempo de incubación)
PKCz total	50	10	Semiseca 2.5h, 300mV	Leche 1%	1:1250/ 12 hrs	1:60000/ 1h
PKCz fosforilada (Thr ⁴¹⁰)		8		Albúmina sérica bovina	1:1000/ 36 hrs	1:40000/ 1h
HIF-1α		Leche 1%		1:200/ 36 hrs	1:50000/ 1h	
HIF-2α				1:200/ 36 hrs	1:60000/ 1h	
CDP				1:500/ 12 hrs	1:40000/ 1h	
Tubulina				1:1000/12 hrs	1:30000/ 1h	
Nucleoporina				1:1000/12 hrs	1:30000/ 1h	

5.6 Determinación de la localización subcelular de PKCz, HIF-1α y HIF-2α.

Con el fin de determinar la localización subcelular de PKCz, HIF-1α y HIF-2α se analizaron por Western blot las fracciones citoplasmática y nuclear de los homogenados de corteza renal que se prepararon como se describe a continuación:

5.6.1 Extracción de proteínas nucleares

Para realizar el ensayo de localización subcelular de las proteínas específicas, se llevó a cabo una revisión bibliográfica y se probaron diversas técnicas hasta encontrar aquella que nos brindara un fraccionamiento limpio (fracción citoplasmática limpia de componentes nucleares y viceversa) para la obtención de resultados confiables.

Se realizó la extracción de los núcleos como se describe a continuación:

Se colocaron 100 mg de corteza renal en 450 µL de buffer de extracción (10 mM Hepes, 10 mM de MgCl₂, 5 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM Tritón X-100, 0.5 mM PMSF, 1 µg/mL pepstatina, 10 µg/mL leupeptina, 10 µg/mL aprotinina) y se homogenizaron con un Polytron. Los extractos se incubaron 5 min en baño de hielo y se centrifugaron (2,711 g, 4 °C, 5 min).

Se separó el sobrenadante (fracción citosólica) y el botón se resuspendió en 450 μ L de buffer de extracción nuclear (20 mM Hepes, 0.5 mM KCl, 0.4 mM EDTA, 1.5 mM NaCl, 10% glicerol, 1.0 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 μ g/mL pepstatina, 10 μ g/mL leupeptina, 10 μ g/mL aprotinina, 0.25 mM NaF, 100 μ M ortovanadato de sodio, pH=7.4). El resuspendido se colocó en baño de hielo con agitación durante 15 min. Posteriormente se centrifugó a 10,845 g y 4°C durante 30 min y se separó el sobrenadante que es donde se encuentran las proteínas nucleares, denominada fracción nuclear.

En la tabla 3 se muestran las condiciones para la detección de PKCz total, HIF-1 α y HIF-2 α en fracciones citosólicas y nucleares.

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

Proteína	Proteínas totales cargadas en el gel (μ g)	Anticuerpo Primario	Anticuerpo secundario	
PKCz total	40	1:1250	1:60 000	Gel de poliacrilamida al 10% Tiempo de electroforesis: 3.5 h Bloqueo: Leche descremada 1% 12 hrs de hibridación
HIF-1 α	40	1:200	1:50 000	Gel de poliacrilamida:10% Electroforesis: 4.5 hrs Membrana de nitrocelulosa Bloqueo: Leche descremada 1% 36 hrs de hibridación
HIF-2 α	40	1:200	1:50 000	Gel de poliacrilamida:10% Electroforesis: 4.5 hrs Membrana de nitrocelulosa Bloqueo: Leche descremada 1% 36 hrs de hibridación

5.7 Asociación entre PKCz y CDP

Para determinar la interacción física entre PKCz y CDP se realizaron ensayos de inmunoprecipitación en las fracciones nucleares.

La inmunoprecipitación es un método que se utiliza para separar una proteína, permitiendo la unión de esta a un anticuerpo específico. El complejo anticuerpo-proteína, puede incluir a otras proteínas que estén interaccionando, a su vez, con la proteína de interés, esto se debe a que se separan físicamente del resto de la muestra usando perlas de proteína A/agarosa que interactúan con el anticuerpo utilizado. Posteriormente el complejo proteínico se separa electroforéticamente para un análisis posterior por Western blot.

Para realizar el análisis se tomaron 30 μ L de proteína A/agarosa (Roche, Alemania) y se colocaron en tubos eppendorf de 0.5 mL; se adicionaron 4 μ L del anticuerpo que reconoce a PKC ζ y se incubó durante 2h a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó el volumen de extracto nuclear equivalente a 100 μ g de proteína y se incubó durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 100 μ L del amortiguador de lavado (Tris-HCl 25mM, pH 7.5; NaCl 125mM, EDTA 2.5mM pH 8.0, NaF 2.5 mM y 0.1% de Tritón X-100) a las muestras de estudio y centrifugándose a 108 g, 4°C durante 3 min después de cada lavado y descartando el sobrenadante. El botón se resuspendió en buffer de carga, las proteínas se desnaturalizaron por 5 min en agua hirviendo y las muestras se cargaron en un gel de acrilamida al 8%. Posteriormente se realizó la electroforesis, la transferencia, el bloqueo y la inmunodetección para PKC ζ de la manera descrita anteriormente (tabla 2).

5.8 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm error estándar. La significancia estadística se estableció por análisis de varianza (ANOVA) y usando el método de comparación múltiple de Newman-Keuls con $p < 0.05$ utilizando el programa GraphPad prisma Ver. 5.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterización del EST

Fenoles totales e inactivación del radical superóxido

Los valores de absorbancia del EST se interpolaron en una curva patrón de ácido gálico. El EST presentó un alto contenido de estos compuestos (1.2 ± 0.027 mg eq ac. gálico /mg_{EST}).

Así mismo, se evaluó la capacidad antioxidante del EST mediante la inactivación del radical superóxido usando el sistema generador xantina-xantina oxidasa y su acoplamiento para generar formazán a partir de nitroazul de tetrazolio (Figura 7). Se obtuvo una CI₅₀ de 30.7 µg/mL, lo que demuestra una buena capacidad antioxidante si lo comparamos con otros antioxidantes comúnmente utilizados como el ácido ascórbico cuya CI₅₀ de 66 µg/mL (Cruz-White, 2007) calculada en nuestro laboratorio con la misma técnica.

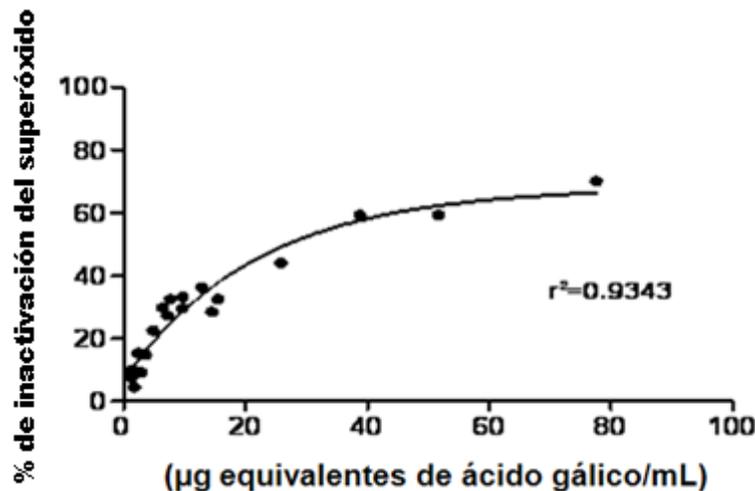


Figura 7. Curva de inactivación del radical superóxido a diferentes concentraciones del EST. La CI₅₀ calculada fue de 30.70 µg de eq. de ácido gálico/ml.

6.2 Curva de peso corporal

A lo largo del protocolo se registró el peso corporal como indicador de la condición física general de los animales que reciben los distintos tratamientos (Figura 8). El grupo control presentó un crecimiento normal característico de una rata sana. En el grupo D se observó una disminución del peso corporal después de la administración del iniciador tumoral; sin embargo, el crecimiento se recupera pocos días después siendo similar al del grupo control, aunque el valor del peso al final del estudio siguió siendo menor. En cambio, la tasa de

crecimiento de los grupos F, D+F y E+D+F prácticamente se detuvo, lo que refleja un detrimento de la salud de las ratas.

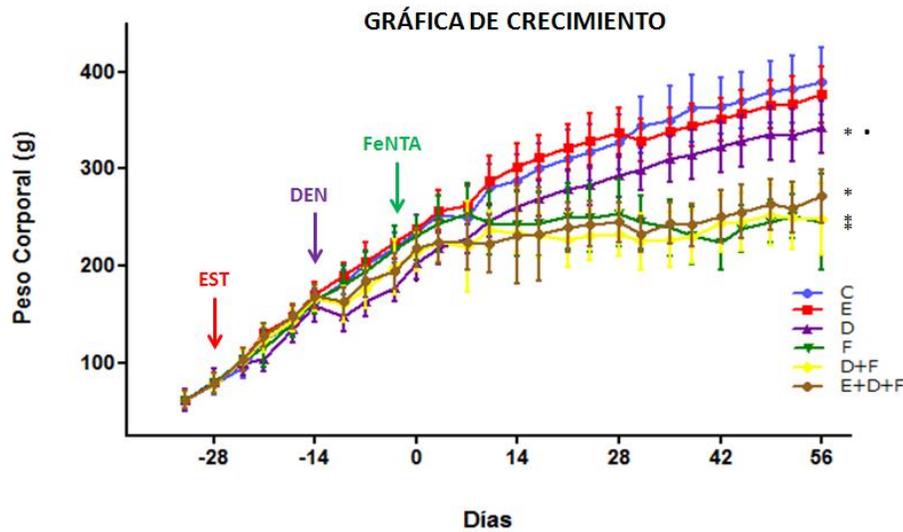


Figura 8. Gráfica de peso corporal a lo largo del protocolo. El tratamiento con el iniciador DEN ocasiona una disminución en el peso de las ratas, sin embargo, el crecimiento se recupera pocos días después aunque el valor del peso al final del estudio siguió siendo menor al del grupo control. En cambio, los animales de los grupos tratados con el carcinógeno FeNTA retardaron su crecimiento y el EST no protegió. * $p \leq 0.05$ vs C, • $p \leq 0.05$ vs los demás grupos. \pm EE

6.3 Observaciones macroscópicas de los riñones

En el panel A de la figura 9 se muestran imágenes representativas de la apariencia macroscópica de los riñones extraídos después de 1 mes de tratamiento con FeNTA y en el panel B después de 2 meses. El riñón representativo de los grupos C, E y D tiene una apariencia sana y tamaño normal. En cambio, los riñones de los grupos F, D+F y E+D+F presentan una coloración pálida en la corteza y una médula enrojecida después de ambos tiempos de estudio.

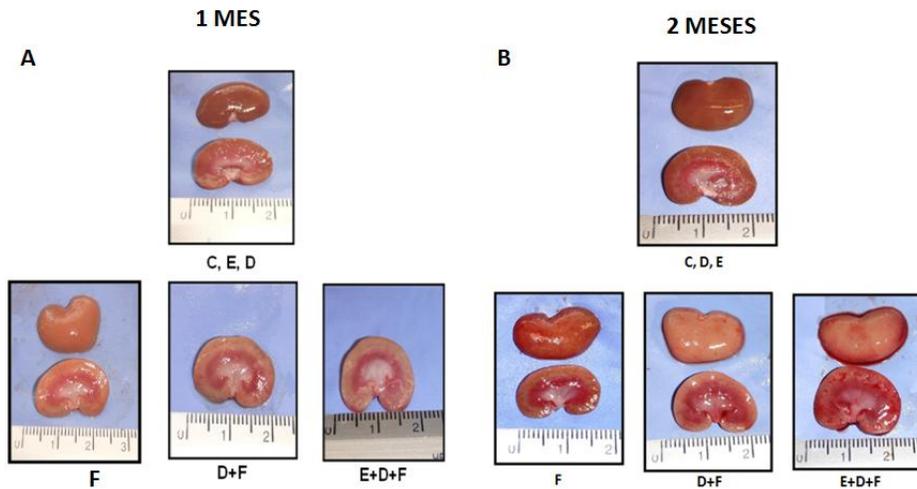


Figura 9. Fotografías representativas de la apariencia macroscópica de los riñones de los grupos de ratas estudiados obtenidos después de uno (A) y dos meses (B) de tratamiento con FeNTA. El riñón de los grupos C, D y E muestra un tamaño y apariencia sana, en cambio, los riñones de los grupos tratados con FeNTA muestran una corteza pálida y la médula enrojecida, así como un proceso inflamatorio.

6.4 Función renal

Con la finalidad de determinar si los tratamientos aplicados inducían alteraciones en la función renal, se analizaron los valores de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN). Como se observa en la figura 10, no se presentó falla en la función renal en ninguno de los grupos en ninguno de los tiempos estudiados.

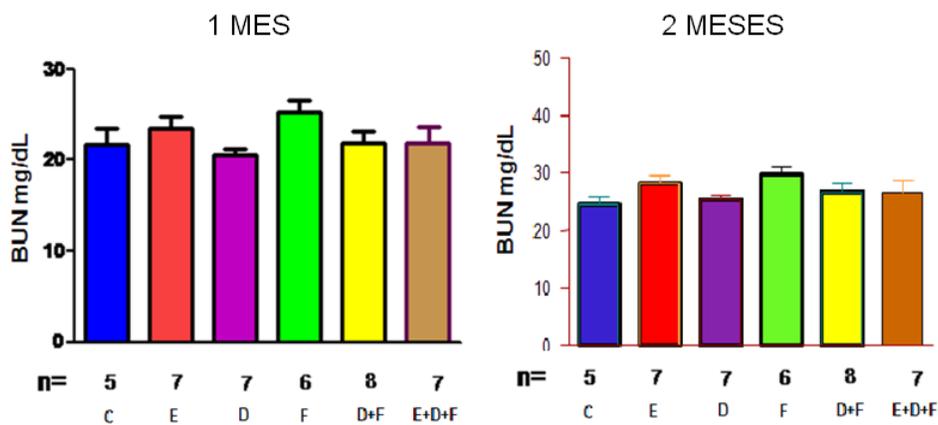


Figura 10. Niveles de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) como marcador de la función renal. Ningún grupo presentó alteraciones a ningún tiempo estudiado. \pm EE.

6.5 Niveles de PKCz

6.5.1 PKCz en corteza renal

Previamente se habían encontrado elevados los niveles de PKCz total en los grupos tratados con el carcinógeno durante un mes (Curiel-Muñiz, 2012). Con base en lo anterior, se decidió estudiar el comportamiento de la forma fosforilada en el residuo Thr⁴¹⁰ de esta enzima mediante la técnica de Western blot. Cabe resaltar que esta fosforilación es indispensable para que la cinasa sea catalíticamente competente. En el panel A de la figura 11 se muestra una autorradiografía representativa del Western blot con muestras de 1 mes de tratamiento con FeNTA donde se observa la banda con un peso molecular de 67 KDa correspondiente a PKCz fosforilada, así como la banda correspondiente a tubulina que se utilizó como control de carga para la corrección de los valores densitométricos de PKCz. En el panel B se presentan los valores del análisis densitométrico de los Western blot realizados. Como se puede observar, hubo un aumento significativo en los niveles de PKCz en los grupos F, D+F y E+D+F con respecto al grupo control, en cambio los niveles no se alteran en los grupos tratados sólo con D y E. Entre los grupos D+F y E+D+F no hubo diferencia significativa, por lo que se concluye que con el esquema de tratamiento utilizado, el extracto no fue capaz de proteger contra este aumento.

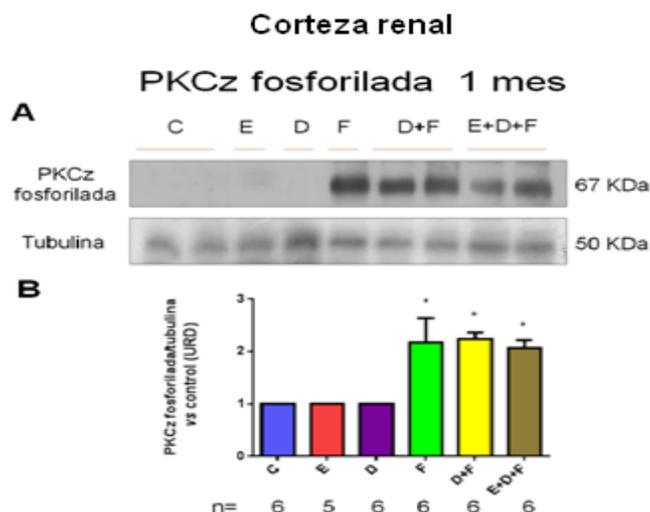


Figura 11. Determinación de los niveles de PKCz fosforilada en Thr⁴¹⁰ en corteza renal después de un mes de exposición a FeNTA. (A) Imagen de un Western blot representativo de la cinasa fosforilada y tubulina como control de carga. (B) Gráfica del análisis densitométrico ajustado contra tubulina y comparado contra el grupo control de todas las muestras estudiadas. \pm EE de n muestras. (*) $p \leq 0.05$ vs C, E y D. Todos los grupos tratados con el carcinógeno mostraron un aumento significativo, y el extracto no fue capaz de proteger contra ese aumento. URD: unidades relativas de densitometría.

Dado que los niveles de PKCz total y fosforilada se encontraron alterados a un mes de tratamiento con FeNTA, se decidió estudiar el comportamiento de esta enzima y su forma fosforilada a los dos meses de exposición al carcinógeno. En los paneles A y C de la figura 12 se observan autorradiografías representativas de Western blots con muestras de 2 meses donde se observa la banda correspondiente a PKCz total y fosforilada respectivamente, así como la banda correspondiente a tubulina que se utilizó como control de carga. En los paneles B y D se presentan los valores del análisis densitométrico de los Western blot realizados. Al igual que en los resultados de 1 mes, se encontró un aumento significativo en los niveles de PKCz tanto total como fosforilada en los grupos F, D+F y E+D+F respecto al grupo control y los grupos E y D no presentan alteraciones. Entre los grupos D+F y E+D+F no hubo diferencia significativa, por lo que tampoco a este tiempo se vio protección por parte del EST.

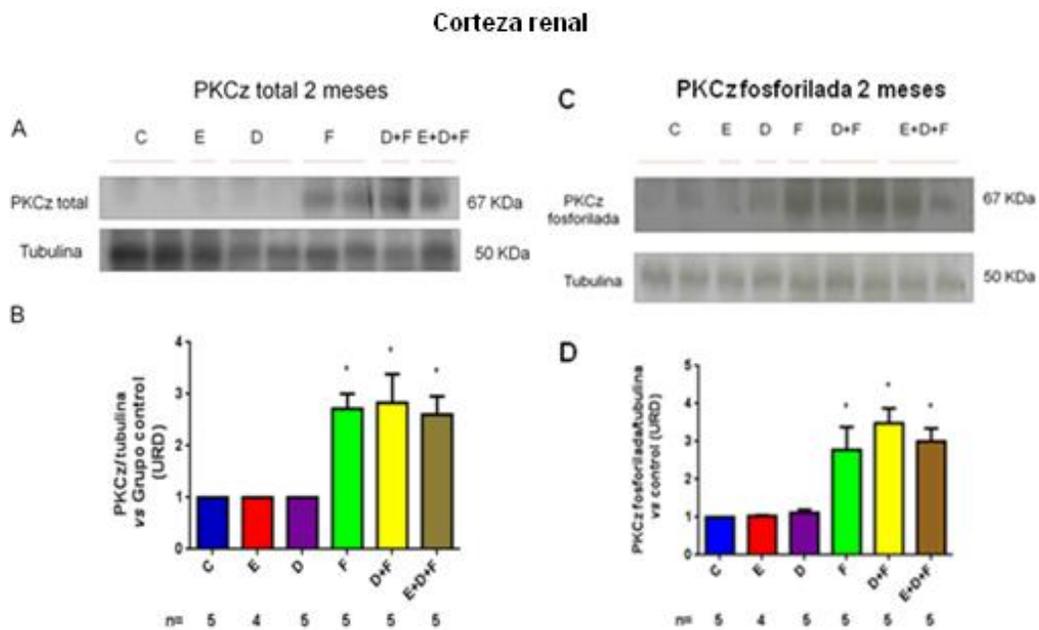


Figura 12. Determinación de los niveles de PKCz total y PKCz fosforilada en Thr⁴¹⁰ en corteza renal después de dos meses de exposición a FeNTA. (A y C) Imágenes de Western blots representativas de PKCz total y fosforilada respectivamente así como de tubulina como control de carga. (B y D) Gráficas del análisis densitométrico ajustado contra tubulina y comparado contra el grupo control de todas las muestras estudiadas. ± EE de n muestras. (*) p ≤ 0.05 vs C, E y D. Todos los grupos tratados con el carcinógeno mostraron un aumento significativo, y el extracto no fue capaz de prevenir ese aumento. URD: unidades relativas de densitometría.

6.5.2 PKCz en pulmón

Con la finalidad de estudiar si se presentaban alteraciones inducidas por FeNTA en tejidos diferentes al riñón, se decidió estudiar el comportamiento de PKCz total y fosforilada en muestras de pulmón con nuestros esquemas de exposición al carcinógeno. Estas determinaciones sólo se realizaron en los grupos C, D+F y E+D+F ya que estos últimos dos grupos presentaron aumento en los niveles de PKCz en corteza renal. En la figura 13 y 14 se muestran los niveles de PKCz total y PKCz fosforilada en pulmón después de 1 y 2 meses de tratamiento con el carcinógeno respectivamente. En la figura 13 se observa claramente que los niveles de PKCz total y su forma fosforilada aumentan significativamente en los grupos D+F y E+D+F en comparación con el grupo control después de 1 mes de tratamiento. No obstante, a los 2 meses de tratamiento los niveles de ambas formas de la cinasa en los grupos tratados con FeNTA son iguales a los del grupo control.

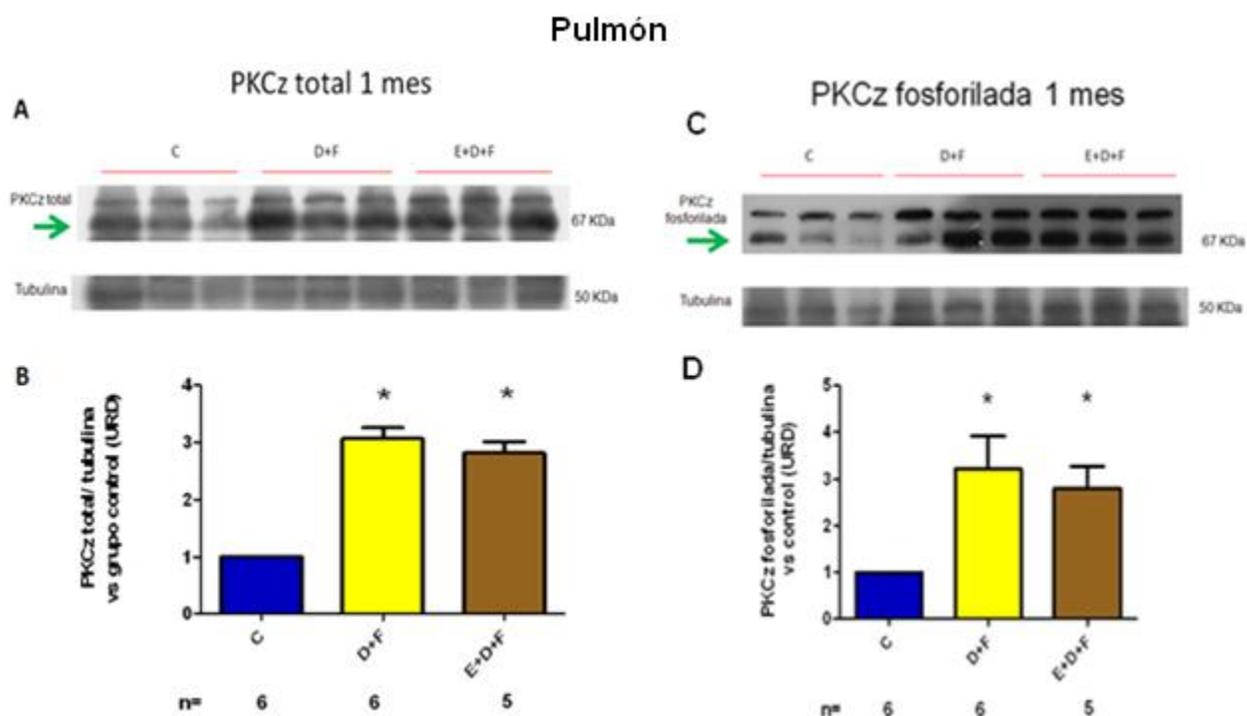


Figura 13. Determinación de los niveles de PKCz total y PKCz fosforilada en Thr⁴¹⁰ en pulmón después de un mes de exposición a FeNTA. (A y C) Imágenes de Western blots representativos de PKCz total y fosforilada respectivamente así como de tubulina como control de carga. (B y D) Gráficas del análisis densitométrico ajustado contra tubulina y comparado contra el grupo control de todas las muestras estudiadas. \pm EE de n muestras. (*) $p \leq 0.05$ vs C, E y D. Todos los grupos tratados con el carcinógeno mostraron un aumento significativo, y el extracto no fue capaz de proteger contra ese aumento. URD: unidades relativas de densitometría.

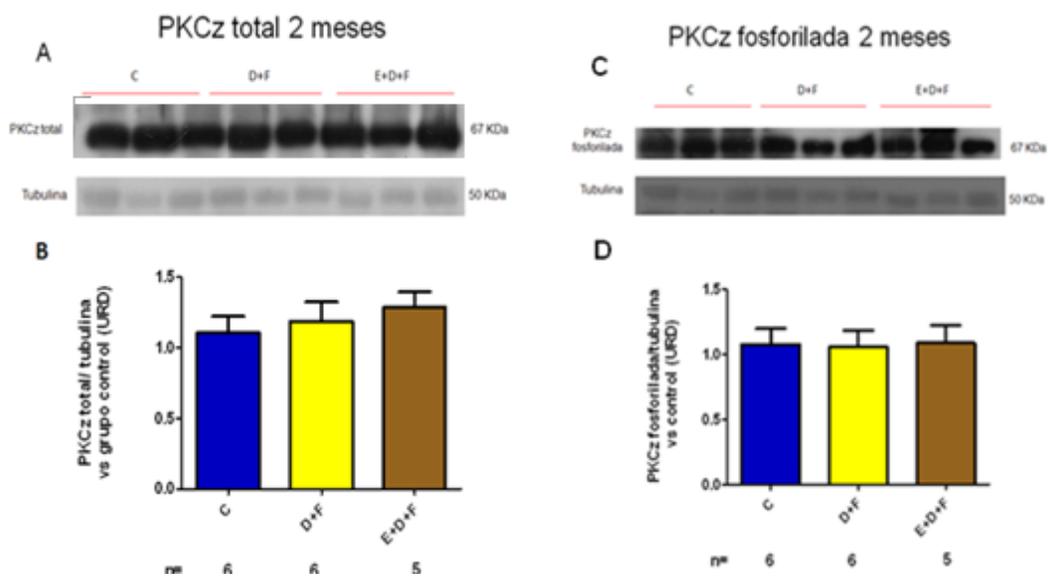


Figura 14. Determinación de los niveles de PKCz total y PKCz fosforilada en Thr⁴¹⁰ en pulmón después de dos meses de exposición a FeNTA. (A y C) Imágenes de Western blots representativos de PKCz total y fosforilada respectivamente así como de tubulina como control de carga. (B y D) Gráficas del análisis densitométrico ajustado contra tubulina y comparado contra el grupo control de todas las muestras estudiadas. ± EE de n muestras. URD: unidades relativas de densitometría.

6.5.3 PKCz en hígado

Para tener un panorama un poco más amplio de la respuesta de la cinasa en diferentes tejidos al tratamiento con FeNTA se decidió analizar el comportamiento en hígado. Al igual que en pulmón, sólo se estudiaron los grupos C, D+F y E+D+F. En la figura 15 se muestran los resultados de los Western blots para PKCz total y fosforilada en hígado a un mes de tratamiento con FeNTA y en la figura 16 a los 2 meses. Los niveles de ambas formas de PKCz se incrementan en los grupos tratados con el carcinógeno después de un mes de tratamiento con el FeNTA, en contraste, no se observaron cambios después de 2 meses de tratamiento en ninguno de los grupos estudiados.

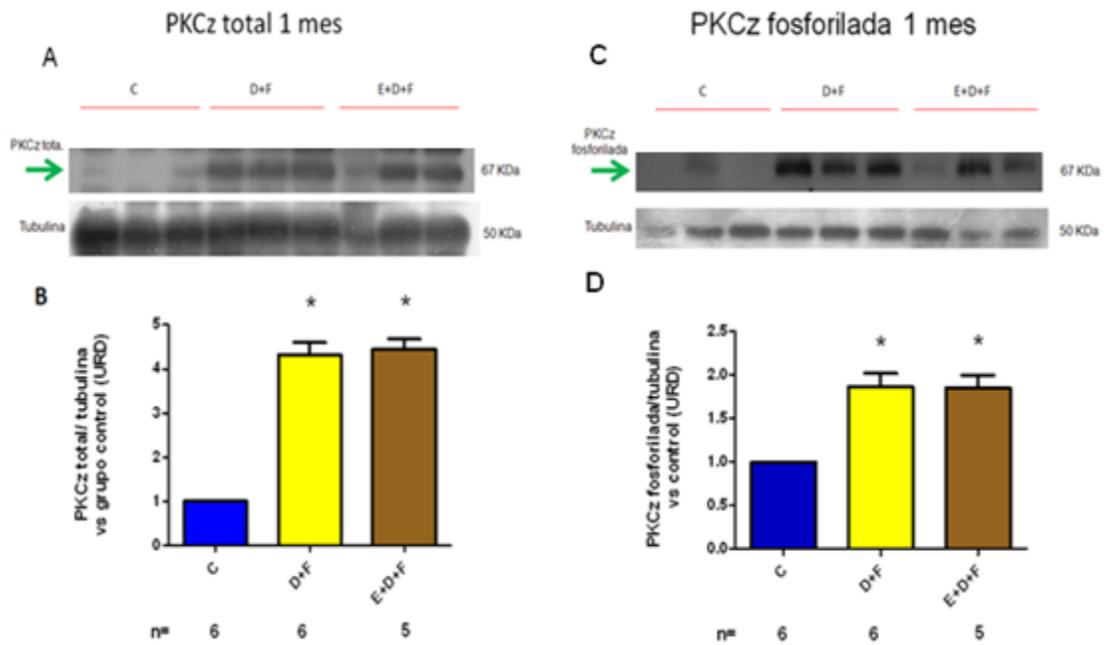


Figura 15. Determinación de los niveles de PKCz total y PKCz fosforilada en Thr⁴¹⁰ en hígado después de un mes de exposición a FeNTA. (A y C) Imágenes de Western blots representativos de la PKCz total y fosforilada respectivamente así como de tubulina como control de carga. (B y D) Gráficas del análisis densitométrico ajustado contra tubulina y comparado contra el grupo control de todas las muestras estudiadas. ± EE de n muestras. (*) p ≤ 0.05 vs C. Todos los grupos tratados con el carcinógeno mostraron un aumento significativo, y el extracto no fue capaz de proteger contra ese aumento. URD: unidades relativas de densitometría.

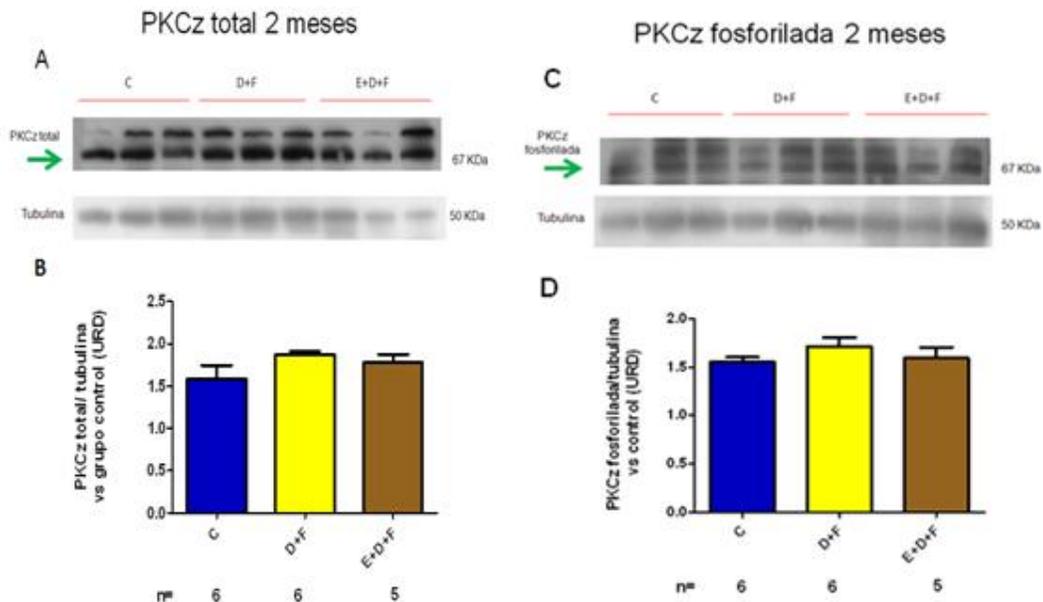


Figura 16. Determinación de los niveles de PKCz total y fosforilada en Thr⁴¹⁰ en hígado después de dos meses de exposición a FeNTA. (A y C) Imágenes de Western blots representativos de PKCz total y fosforilada respectivamente así como de la tubulina como control de carga. (B y D) Gráficas del análisis densitométrico ajustado contra tubulina y comparado contra el grupo control de todas las muestras estudiadas. ± EE de n muestras. URD: unidades relativas de densitometría.

6.6 Niveles de HIF en corteza renal

6.6.1 HIF-1 α

En el panel A y C de la figura 17 se observan imágenes representativas de Western blots con muestras de 1 y 2 meses de tratamiento respectivamente donde se observa una banda de 97 KDa correspondiente a HIF-1 α así como la banda correspondiente a tubulina que se utilizó como control de carga. En el panel B y D se presentan las gráficas del análisis densitométrico. Como se puede observar, no hubo cambios en los niveles de HIF-1 α en ninguno de los grupos de estudio a 1 mes de tratamiento con FeNTA, en cambio, a los 2 meses se observó un aumento significativo en los grupos tratados con el carcinógeno.

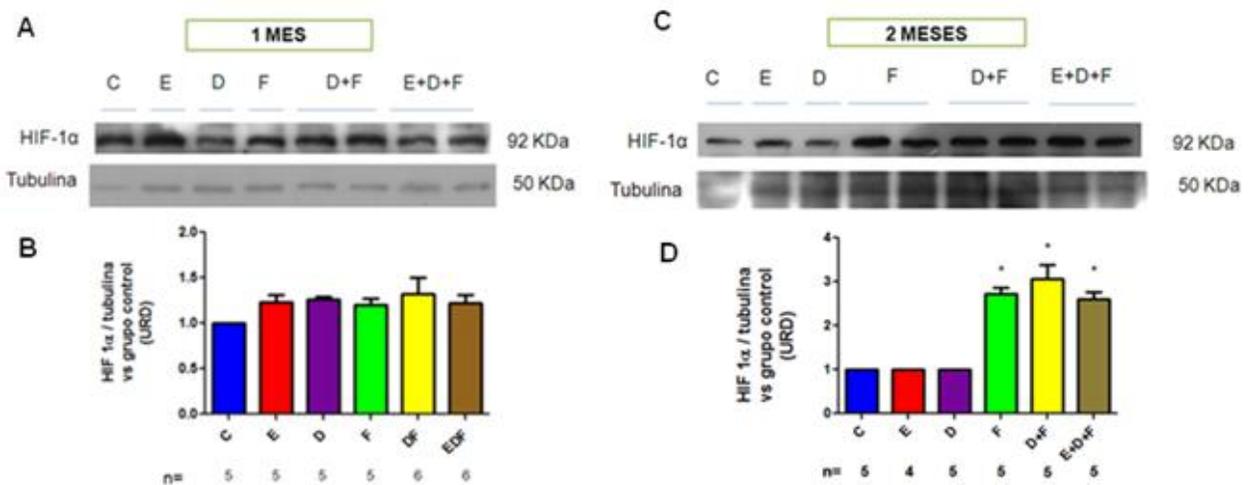


Figura 17. Determinación de los niveles de HIF-1 α en corteza renal después de 1 y 2 meses de exposición a FeNTA. (A y C) Imágenes de Western blots representativas de HIF-1 α así como de tubulina como control de carga. (B y C) Gráficas del análisis densitométrico ajustado contra tubulina y comparado contra el grupo control de todas las muestras estudiadas. \pm EE de n muestras. (*) $p \leq 0.05$ vs C, E y D. URD: unidades relativas de densitometría.

6.6.2 HIF-2 α

En los paneles A y C de la figura 18 se observa la banda correspondiente HIF-2 α en muestras de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA respectivamente así como la banda correspondiente a tubulina que se utilizó como control de carga. En los paneles B y D se presentan los valores del análisis densitométrico. Como se puede observar, no hubo cambios en los niveles de HIF-2 α en ninguno de los grupos de estudio después de un mes de

tratamiento con FeNTA; interesantemente, después de 2 meses se encontró un aumento significativo en los grupos F, D+F y E+D+F con respecto a los grupos C, E y D. Tampoco a en esta determinación se vio protección por parte de EST ya que entre los grupos D+F y E+D+F no hay diferencia significativa.

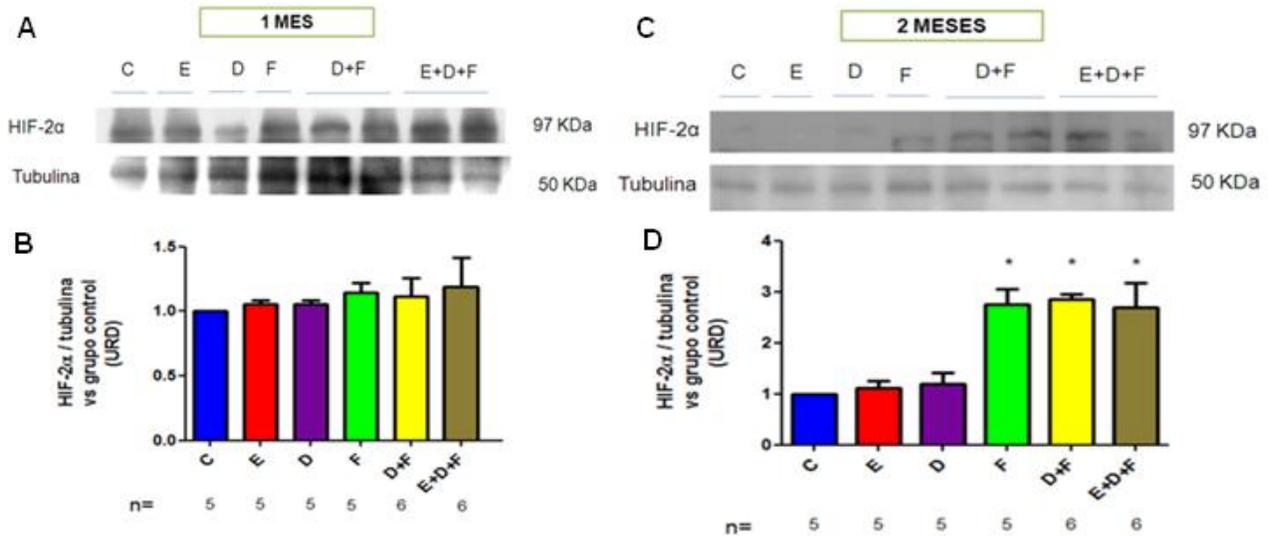


Figura 18. Determinación de los niveles de HIF-1α en corteza renal después de 1 y 2 meses de exposición a FeNTA. (Ay C) Imágenes de Western blots representativos de HIF-2α así como de tubulina como control de carga. (B y C) Gráficas del análisis densitométrico ajustado contra tubulina y comparado contra el grupo control de todas las muestras estudiadas. ± EE de n muestras. (*) p<0.05 vs C, E y D. URD: unidades relativas de densitometría.

6.7 Localización subcelular de PKCz, HIF-1α y HIF-2α en corteza renal

6.7.1 PKCz

PKCz es una enzima que se encuentra ligada a diferentes vías de señalización en el citoplasma, y recientemente se ha demostrado en líneas celulares de CCR su translocación al núcleo para unirse y fosforilar al factor transcripcional CDP. Por lo anterior se decidió analizar la localización subcelular de PKCz en las fracciones citoplasmática y nuclear de corteza renal.

En la figura 19 se presentan imágenes representativas de los Western blots de PKCz, nucleoporina y tubulina en ambas fracciones subcelulares después de los dos tiempos de exposición al FeNTA (paneles A y C), así como los valores de los análisis densitométricos

(paneles B y D). La nucleoporina forma parte de los complejos de poro nuclear por lo que se utilizó como marcador nuclear y la tubulina, que forma parte del citoesqueleto se utilizó como marcador citoplasmático; teniendo como resultado la banda de tubulina solo en la fracción citoplasmática y el nucleoporina en la fracción nuclear, lo que nos indica que ambas fracciones están limpias. En ambas fracciones se observa la presencia de PKCz lo que indica su translocación al núcleo. Asimismo se puede observar un aumento significativo de los niveles de PKCz en los grupos tratados con FeNTA en comparación con los del grupo control en ambas fracciones y en ambos tiempos de estudio.

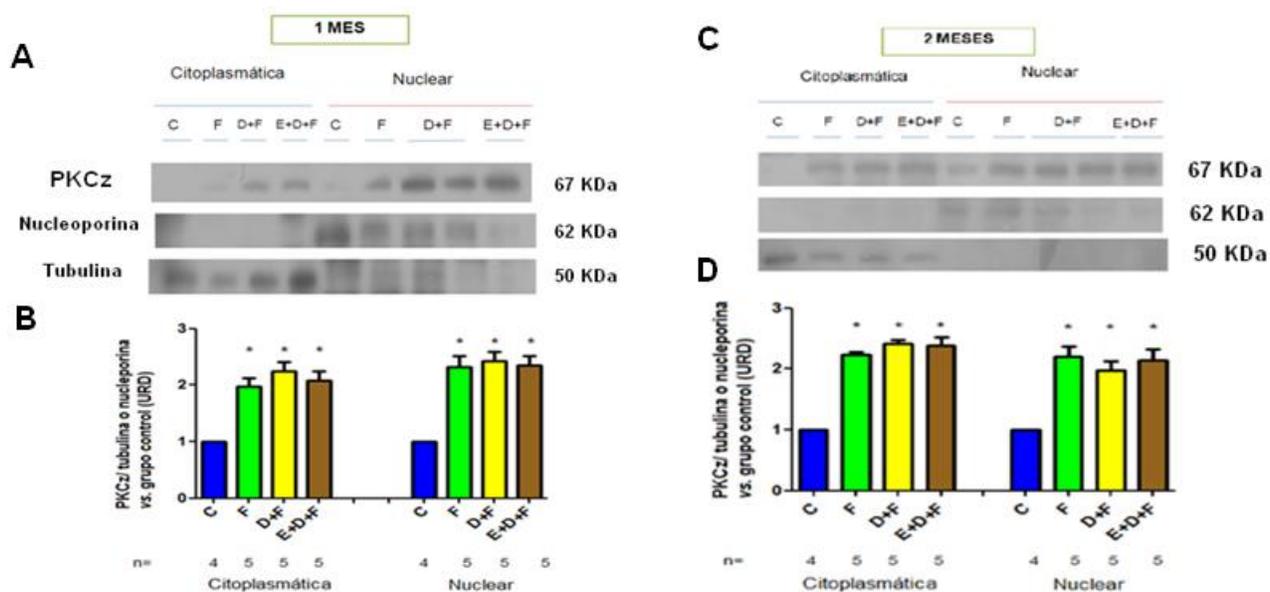


Figura 19. Determinación de los niveles de PKCz en fracciones subcelulares de corteza renal después 1 y 2 meses de exposición a FeNTA. La nucleoporina, marcador nuclear y tubulina en la fracción citoplasmática. (A y C) Imagen de un Western blot representativo de PKCz en fracción citoplasmática y nuclear. (B y D) Gráfica del análisis densitométrico ajustado contra tubulina o nucleoporina y comparado contra el grupo control de todas las muestras estudiadas. \pm EE de n muestras. (*) $p \leq 0.05$ vs C. Todos los grupos tratados con el carcinógeno mostraron un aumento significativo en ambas fracciones a los 2 tiempos estudiados, y el extracto no fue capaz de disminuir ese aumento en ambas fracciones. URD: unidades relativas de densitometría.

6.7.2 HIF-1 α

HIF es un factor transcripcional que está relacionado con la expresión de varios genes que se han vinculado con el desarrollo de CCR y, sabiendo que debe de translocarse al núcleo para llevar a cabo dicha función, se decidió analizar la localización subcelular en fracciones citoplasmáticas y nucleares de homogenados de corteza renal.

En la figura 20 se presentan imágenes representativas de los Western blots de HIF-1 α , nucleoporina y tubulina en ambas fracciones después de los dos tiempos de exposición al FeNTA (paneles A y C), así como los valores de los análisis densitométricos (paneles B y D). Después de 1 mes de exposición al carcinógeno HIF-1 α está presente en ambas fracciones pero sin cambio en sus niveles en ninguno de los grupos estudiados. En cambio, a los 2 meses de exposición se observó un aumento significativo en los grupos tratados con FeNTA en ambas fracciones. Estos resultados nos demuestran que HIF-1 α se está translocando al núcleo en donde podría estar llevando a cabo su función de factor transcripcional.

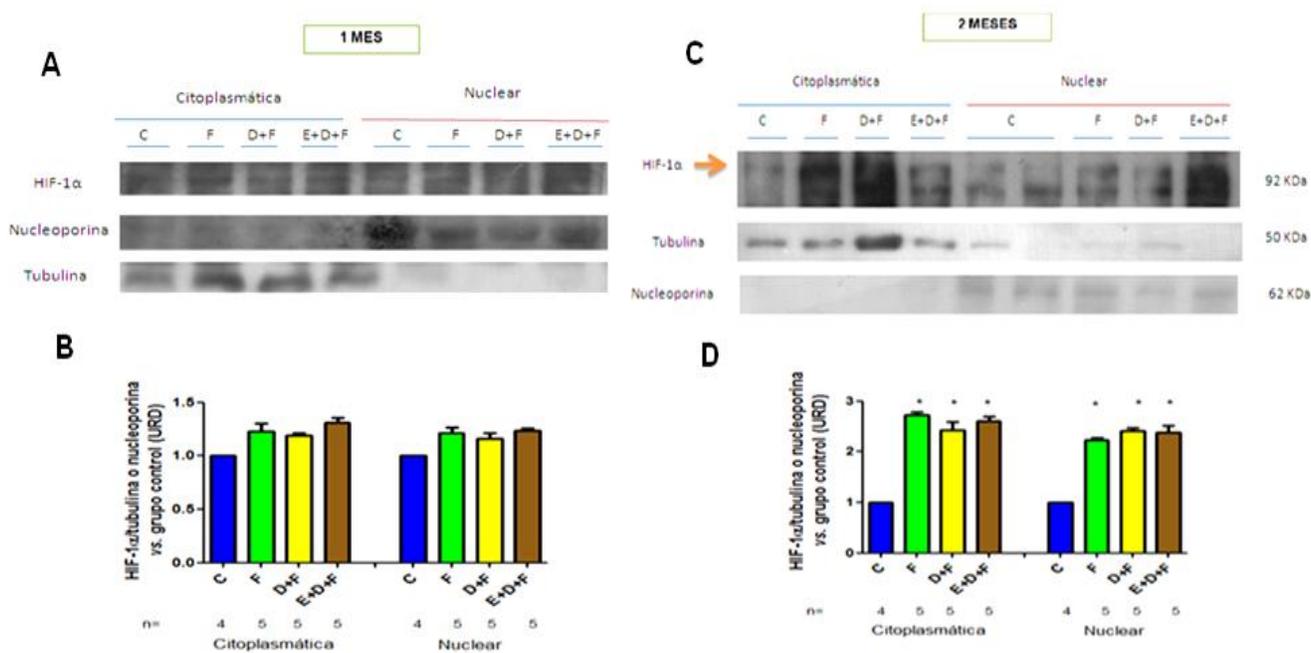


Figura 20. Determinación de los niveles de HIF-1 α en fracciones subcelulares de corteza renal después de 1 y 2 meses de exposición a FeNTA. (A y C) Imágenes de Western blots representativos de HIF-1 α en fracción citoplasmática y nuclear. (B y D) Gráficas del análisis densitométrico ajustado contra tubulina y comparado contra el grupo control de todas las muestras estudiadas. \pm EE de n muestras. (*) $p \leq 0.05$ vs C. A un mes de tratamiento no hay alteraciones en los niveles de HIF-2 α , en cambio, a los 2 meses todos los grupos tratados con el carcinógeno mostraron un aumento significativo en ambas fracciones, y el extracto no fue capaz de proteger contra ese aumento. URD: unidades relativas de densitometría.

6.7.3 HIF-2 α

En los paneles A y C de la figura 21 se presentan imágenes representativas de los Western blots de HIF-2 α , nucleoporina y tubulina en ambas fracciones a 1 y 2 meses de exposición al FeNTA, así como los valores de los análisis densitométricos (paneles B y D). Después de

1 mes de exposición al carcinógeno en ambas fracciones subcelulares no se observaron cambios en los niveles de HIF-2 α en ninguno de los grupos estudiados. Interesantemente, al igual que HIF-1 α a los 2 meses aumentan los niveles de HIF-2 α en los grupos tratados con FeNTA en ambas fracciones, lo que nos indica que esta isoforma se transloca al núcleo.

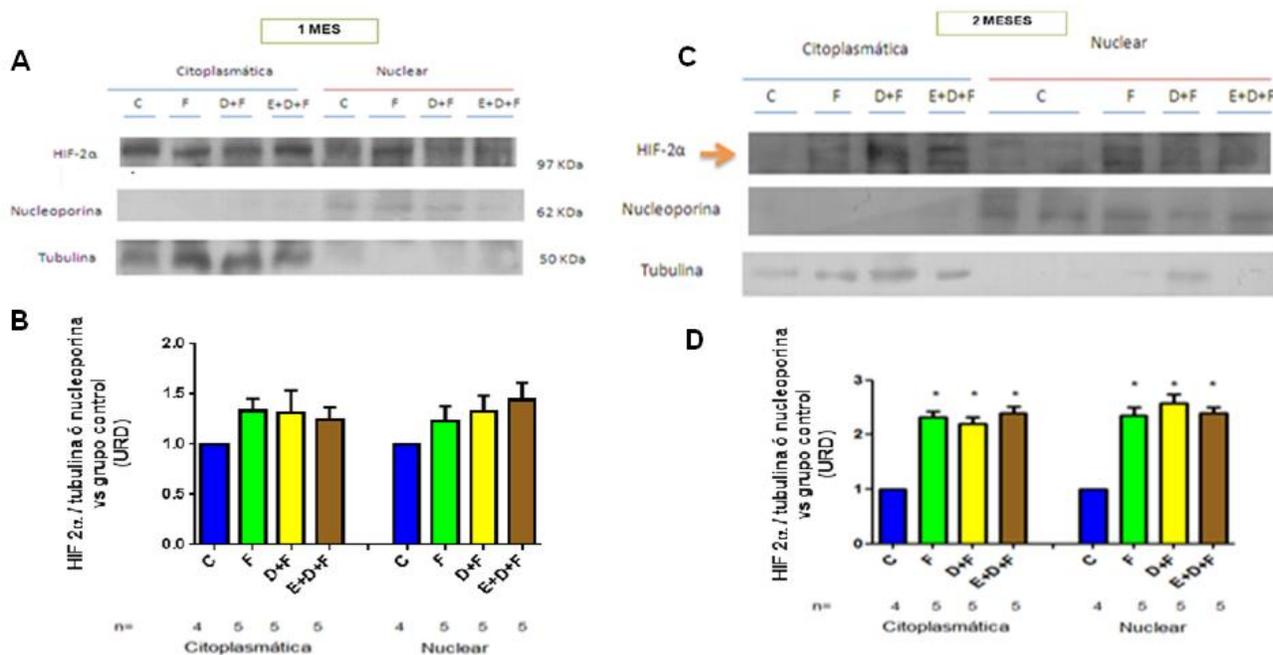
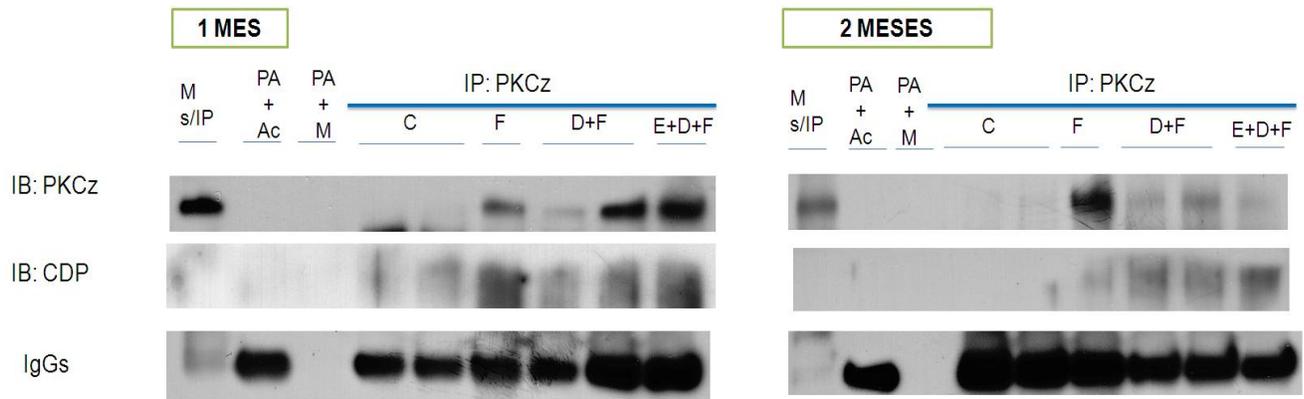


Figura 21. Determinación de los niveles de HIF-2 α en fracciones subcelulares de corteza renal después de 1 y 2 meses de exposición a FeNTA. (A y C) Imágenes de Western blots representativas de HIF-2 α en fracción citoplasmática y nuclear. (B y D) Gráficas del análisis densitométrico ajustado contra tubulina y comparado contra el grupo control de todas las muestras estudiadas. \pm EE de n muestras. (*) $p \leq 0.05$ vs C. A un mes de tratamiento no hay alteraciones en los niveles de HIF-2 α , en cambio, a los 2 meses todos los grupos tratados con el carcinógeno mostraron un aumento significativo en ambas fracciones, y el extracto no fue capaz de disminuir ese aumento. URD: unidades relativas de densitometría.

6.8 Interacción proteínica PKCz/CDP

Para demostrar si ocurría la asociación física entre PKCz y CDP, sugerida por la localización nuclear de PKCz, y su posible participación en la vía CDP-FIH-HIF, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación contra PKCz detectando posteriormente la presencia de CDP por Western blot tanto a 1 como a 2 meses de exposición a FeNTA. En la figura 22 se muestran las imágenes representativas de las autorradiografías obtenidas en dichos ensayos en ambos tiempos estudiados. En todas las muestras se observó la banda correspondiente a PKCz lo que indica que la inmunoprecipitación se llevó a cabo y con la inmunodetección de CDP en los inmunoprecipitados se observa la banda en todos los grupos, lo que demuestra

que interaccionan ambas proteínas, además de que se observa una mayor cantidad de CDP en los grupos tratados con FeNTA a ambos tiempos de estudio.



M s/IP: muestra D+F sin inmunoprecipitar; PA+Ac: proteína A+ anticuerpo; PA+M: proteína A + Muestra

Figura 22. Determinación de la interacción PKCz/CDP por co-inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación se llevó a cabo con un anticuerpo anti-PKCz y posteriormente se detectó la presencia de CDP en el inmunoprecipitado. En ambas imágenes 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 detección de las bandas correspondientes a PKCz y CDP en los inmunoprecipitados de los grupos estudiados sugieren su interacción.

7 RESUMEN DE RESULTADOS

- ❖ Se llevaron a cabo protocolos de tratamiento con FeNTA durante 1 y 2 meses en ratas macho Wistar. El crecimiento de los animales, la función renal y el daño tisular son similares a lo que se había obtenido en protocolos anteriores lo que sugiere la reproducibilidad del esquema de tratamiento.
- ❖ Los niveles renales de PKCz total y su forma fosforilada en el residuo Thr⁴¹⁰ aumentan después de 1 y 2 meses de tratamiento con FeNTA, siendo mayor el incremento a los 2 meses.
- ❖ En muestras de hígado y pulmón se observó un incremento de ambas formas de PKCz después de 1 mes de tratamiento con FeNTA, mientras que no se observaron cambios con respecto al grupo control en ninguno de estos tejidos en las muestras de 2 meses.
- ❖ No se presentaron alteraciones en los niveles de HIF-1 α y HIF-2 α en extractos totales ni en las fracciones citoplasmática y nuclear de riñón después de 1 mes de exposición al carcinógeno, en cambio, a los 2 meses los niveles de ambas proteínas se incrementan en los grupos tratados con el carcinógeno respecto al grupo control.
- ❖ El aumento de PKCz debido al tratamiento con el carcinógeno se presenta tanto en citoplasma como en núcleo en ambos tiempos estudiados.
- ❖ Se observó interacción entre las proteínas CDP y PKCz en la fracción nuclear de los grupos tratados con el carcinógeno a ambos tiempos de estudio, no así en el grupo control.
- ❖ Con respecto al efecto del EST, no se encontraron diferencias entre las alteraciones del grupo D+F y aquellas del grupo E+D+F.
- ❖ Se presentan diferentes alteraciones moleculares en los dos tiempos estudiados de exposición al FeNTA.

8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se obtuvo un EST con un alto contenido de polifenoles y una buena capacidad de inactivación del radical superóxido *in vitro* (CI₅₀ de 30.70 µg/mL). Esta capacidad antioxidante es incluso mayor que, por ejemplo, aquella de la vitamina C que presenta una CI₅₀ de 120 µg/mL determinada en las mismas condiciones de trabajo de nuestro laboratorio (Cruz-White, 2006). Estos resultados son similares a aquellos obtenidos con extractos preparados anteriormente (Aguilar-Alonso 2010; Vargas-Olvera *et al.*, 2012), lo que indica una buena reproducibilidad en la preparación del extracto. Asimismo, y al igual que en protocolos anteriores, el EST no afectó el crecimiento normal de las ratas, ni se observaron alteraciones en su apariencia general de salud con la dosis usada (100mg_{FT}/kg/día), lo que sugiere que el extracto no tiene efectos antinutricionales. Esto es importante ya que existen reportes de que la administración de dosis altas de algunos extractos polifenólicos puede tener efectos pro-oxidantes y antinutricionales (Zhang *et al.*, 1997, Galati *et al.*, 2004; Cruz-White, 2006). Por su parte, el DEN sí ejerce un efecto negativo agudo sobre el crecimiento de los animales, pero a los 7 días de su administración los animales ya muestran un crecimiento normal, y, aunque no alcanzan el peso del grupo control al final del presente estudio, en protocolos crónicos anteriores hemos visto que recuperan el peso normal finalmente. En cambio, el FeNTA provocó un retraso en el crecimiento de los animales que se mantuvo a lo largo del protocolo, lo que indica que el carcinógeno repercute en su salud.

En cuanto a la apariencia macroscópica de los riñones, se observó que tanto el grupo control como los grupos E y D presentan una apariencia general normal y sin diferencia entre ellos. En contraste, los riñones de todos los grupos tratados con FeNTA muestran la corteza pálida y la médula enrojecida considerablemente, indicando daño. A pesar de este daño macroscópico evidente, no se observaron alteraciones a ningún tiempo en la función renal evaluada mediante los niveles de BUN. Esto difiere a lo observado en estudios de tratamiento agudo con FeNTA, donde se induce necrosis y un daño notorio en la función renal en las 48 horas posteriores a la administración del carcinógeno (Cruz-White, 2006; Dávalos-Salas, 2006; Torres-Martínez, 2007; Tanaka *et al.*, 2008), e, interesantemente, coincide con lo que se ha observado en el CCR humano y en el modelo de carcinogénesis renal inducida con FeNTA, donde, incluso con los tumores ya presentes, no se desarrolla

insuficiencia renal, siendo esto uno de los factores que dificultan el diagnóstico oportuno de esta neoplasia (Nelson *et al.*, 2007; Vargas-Olvera *et al.*, 2012). Es importante resaltar que en protocolos realizados previamente en nuestro laboratorio con el mismo esquema de tratamiento utilizado en el presente trabajo, se observó el mismo comportamiento de los niveles de BUN, de la apariencia de los riñones y de la curva de crecimiento, así como la presencia de alteraciones moleculares procarcinogénicas y displasia (Vargas-Olvera *et al.*, 2012). Lo anterior sugiere que los tiempos estudiados representan etapas tempranas del desarrollo de CCR e indica una buena reproducibilidad del esquema de tratamiento con FeNTA.

Con respecto al estudio del comportamiento de PKCz en las cortezas renales, se observó un aumento de los niveles de la cinasa tanto total como fosforilada en los grupos tratados con FeNTA a los dos tiempos estudiados, mientras que en los grupos tratados sólo con EST ó DEN no se alteraron. Por otra parte, en pulmón e hígado, órganos donde no se desarrollan tumores primarios con el esquema de exposición al carcinógeno utilizado, también se encontraron incrementados los niveles de PKCz tanto total como fosforilada en los grupos D+F y E+D+F después de un mes de tratamiento, pero en el segundo mes los niveles de esta cinasa ya están normales, es decir, semejantes a los del grupo control. El hecho de que tanto hígado como pulmón presenten ya un comportamiento normal de PKCz a los dos meses, pero no el riñón, podría deberse a la posible presencia de mecanismos de protección más eficientes en esos dos órganos, especialmente contra el estrés oxidante (Leeuwenburgh y Ji, 1995), haciendo más transitoria la toxicidad del FeNTA; además, el hígado es un órgano que se repara en tiempos cortos (Higgins y Anderson, 1931; Grisham, 1962). Por otra parte, el hecho de que PKCz esté involucrada en procesos que se han visto alterados en cáncer, tales como mitogénesis, polaridad celular, supervivencia celular y angiogénesis (Berra *et al.*, 1993; Pal *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 1998; Rimessi *et al.*, 2012) y de que el aumento en sus niveles persista en riñón pero no en hígado y pulmón, apoya la hipótesis de que probablemente la cinasa esté participando en el proceso de carcinogénesis renal en este modelo. Mas aún, cabe resaltar la importancia de haber estudiado los niveles de la PKCz fosforilada en el residuo Thr⁴¹⁰, ya que esto es indicativo de que PKCz es catalíticamente competente (Le Good y Brindley, 2004) y conformacionalmente apta para ser translocada al núcleo, pues queda expuesto el residuo Tyr²⁵⁶ pudiendo ser fosforilado, lo que tendrá como

consecuencia la exposición, a su vez, de la señal de localización nuclear (NLS) de la enzima (White *et al.*, 2002).

La importancia de PKC ζ en el CCR está sustentada en hallazgos de diferentes autores en una línea celular de esta neoplasia (786-O). Por ejemplo, Pal *et al.* (2001) reportaron que la inhibición de la expresión de PKC ζ disminuye notoriamente la transcripción del gen de VEGF, factor que podría estar relacionado con la alta vascularización de estos tumores (Hemmelein *et al.*, 2001; Paradis *et al.*, 2000; Tomic *et al.*, 2006). Asimismo, este grupo de investigadores (Li *et al.*, 2007) demostraron en la misma línea celular, que si se disminuye la expresión de PKC ζ también disminuye la activación del factor transcripcional CDP, lo que conlleva a una expresión normal del gen de FIH, cumpliendo este último su función fisiológica de inhibir la asociación de p300 y HIF y por ende su unión a los promotores de sus genes blanco (Arany *et al.*, 1996; Kallio *et al.*, 1998; Hewitson *et al.*, 2002; Freedman *et al.*, 2002; Lando *et al.*, 2002; McNeill *et al.*, 2002; Koivunen *et al.*, 2004). Por su parte, Datta *et al.* (2004) encontraron niveles disminuídos de ambas isoformas de HIF en líneas de CCR dominantes negativas para PKC ζ o utilizando RNA de interferencia para esta cinasa, en cambio, cuando sobreexpresaban a la enzima, los niveles de HIF aumentaban. Estas evidencias ponen de manifiesto la relación PKC ζ -HIF.

Por lo tanto, con base en las observaciones anteriores se decidió estudiar el efecto del FeNTA en el comportamiento y localización de HIF. Nuestros resultados indican que no hubo cambios en los niveles de HIF-1 α y HIF-2 α a un mes de tratamiento con FeNTA sin embargo, a los dos meses se encontró un aumento significativo en los niveles de ambas isoformas, tanto en extractos totales como en fracciones citoplasmáticas y nucleares. El aumento de HIF sólo a los dos meses de estudio puede deberse a que a un mes de tratamiento existan mecanismos que contengan este incremento, sin embargo, a los dos meses, estos mecanismos pueden resultar insuficientes o ya no estar presentes; además, pueden activarse otros mecanismos que contribuyan al aumento de HIF o bien que sean más las células de la corteza renal que presenten esta alteración. Entonces, la respuesta de HIF a la exposición de FeNTA durante 2 meses coincide con el aumento observado en los niveles PKC ζ , lo que concuerda con los hallazgos de otros autores en líneas de CCR (Datta *et al.*, 2004).

Cabe señalar que se decidió analizar ambas isoformas de HIF debido a que se han realizado diversos estudios sobre el comportamiento diferencial de éstas en donde observan que tanto su regulación como su participación en la expresión de algunos genes es diferente (Hu *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003). En el caso de HIF-1 α se ha demostrado que en líneas de CCR induce la sobreexpresión de genes de enzimas que participan en el metabolismo energético, entre los que están los genes de la hexocinasa, de la lactato deshidrogenasa y de la aldolasa, entre otros (Hu *et al.*, 2003), lo que les confiere a las células la ventaja de tener un metabolismo típico de “glucólisis aeróbica” (efecto Warburg) y obtener la energía necesaria para realizar diferentes procesos celulares. En el caso de HIF-2 α , Carroll y Ashcroft (2006) encontraron que si las células de la línea CCR4 se tratan con el siRNA de HIF-2 α los niveles del RNAm de VEGF disminuyen, pero no hay repercusión cuando se utiliza un siRNA contra HIF-1 α . También otros autores han demostrado que HIF-2 α regula otros genes que no regula HIF-1 α , entre los que están el de TGF- α , de ciclina D1 y de eritropoyetina (EPO) (Gunaratnam *et al.*, 2003; Raval *et al.*, 2005; Scortegagna *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2007; Rankin *et al.*, 2007). Interesantemente, en nuestro laboratorio se encontró que los niveles de la EPO no se alteran después de 1 mes de tratamiento con el FeNTA, sin embargo, a los 2 meses sus niveles aumentan significativamente (datos aún no publicados), lo que correlaciona con el comportamiento de HIF-2 α a los dos tiempos estudiados. Esto sugiere que muy probablemente el aumento observado de la EPO sea regulado, al menos en parte, por HIF-2 α . Sin embargo, cabe resaltar que en el presente trabajo no se encontraron diferencias en el comportamiento de ambas isoformas, por lo que parece ser que participan en conjunto en la tumorigénesis renal inducida por este carcinógeno.

Una de las alteraciones moleculares que se presenta con frecuencia en tumores de CCR de células claras, al cual parece ser equivalente el CCR desarrollado por nuestro esquema de tratamiento con FeNTA (Vargas-Olvera *et al.*, 2012), es la pérdida de la función de la proteína VHL (70-80%) (Patrick *et al.*, 2007), que es una ubiquitin ligasa y es la principal reguladora de la degradación de HIF en condiciones de normoxia (Iwai *et al.*, 1999). Esta pérdida de la función de VHL está asociada a mutaciones o silenciamiento epigenético (Kim *et al.*, 2004); sin embargo, en un 20% de los casos de CCR de células claras no se encuentran alteraciones en esta proteína. Interesantemente, en los tumores inducidos por exposición a FeNTA, Toyokuni *et al.* (1998) reportaron que el gen de VHL no está mutado, y en nuestro laboratorio observamos que tampoco se alteran los niveles de la proteína en

etapas tempranas ni en los tumores (datos no publicados), lo que parece sugerir que existen otros mecanismos que regulan los niveles de HIF, siendo uno de ellos la vía PKCz-CDP-FIH-HIF.

Dado que el aumento de los niveles de ambas isoformas de HIF en fracciones celulares coincide con el aumento de los niveles de PKCz, se decidió estudiar si la cinasa se localizaba en el núcleo, ya que, como se mencionó anteriormente, es donde puede fosforilar a CDP, activándolo, e inhibir la transcripción de *FIH*, lo que, a su vez, traerá como consecuencia que HIF pueda translocarse al núcleo y activar la transcripción de sus genes blanco. Se observó que, efectivamente, PKCz se encuentra en el núcleo a los dos tiempos estudiados y, además, sus niveles se incrementan en los grupos tratados con FeNTA tanto en la fracción citoplasmática como en la nuclear.

Posteriormente, se decidió analizar la posible interacción PKCz/CDP en la fracción nuclear. Se observó que la cinasa co-inmunoprecipita con CDP en los grupos tratados con el carcinógeno a ambos tiempos de estudio mientras que en los grupos control no se forma el complejo. Esta interacción sugiere que PKCz puede fosforilar a CDP, activándolo, y esto sea la razón, al menos en parte, del aumento de HIF en el núcleo. Lo anterior coincide con los hallazgos de Li *et al.* (2007) quienes realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en líneas de CCR observando la formación del complejo CDP-PKCz, y la disminución en los niveles del RNAm y proteína de FIH, asimismo, con aquéllos de Datta *et al.* (2004) quienes reportaron que en líneas de CCR los niveles de las isoformas de HIF en el núcleo aumentan como consecuencia de la sobreexpresión de PKCz.

Los hallazgos del presente trabajo resultan particularmente importantes ya que, hasta donde sabemos, nunca se había encontrado la posible participación de PKCz en la vía CDP-FIH-HIF en estudios *in vivo*. Además, a diferencia de los reportes de otros autores quienes utilizan células malignizadas, nosotros estamos encontrando alteraciones desde etapas preneoplásicas, lo que sugiere la probable participación de la vía en la malignización de las células renales. Más aún, los dos tiempos estudiados parecen representar diferentes etapas de la carcinogénesis, ya que, la respuesta de las moléculas estudiadas no es exactamente igual. La trascendencia de esto es que en estas etapas el cáncer puede ser contenido e incluso curable, por lo que en un futuro esta vía podría ser candidata como blanco de diagnóstico y/o terapéutico.

Por último, con respecto al efecto del EST, no se encontraron diferencias entre las alteraciones del grupo D+F y aquéllas del grupo E+D+F, lo que indica que con el esquema de tratamiento utilizado el EST no tuvo efecto protector sobre las determinaciones realizadas. Sin embargo, como ya se mencionó, en un protocolo de carcinogénesis por FeNTA realizado en nuestro laboratorio, el EST, con el mismo esquema de tratamiento utilizado en el presente trabajo, disminuyó la incidencia y retardó el grado de avance de los tumores (Vargas-Olvera *et al.*, 2012). Esto sugiere que la protección observada por el tratamiento con el extracto contra el desarrollo de la neoplasia parece no darse a través de la modulación de la vía PKCz-CDP-FIH-HIF; sin embargo, no podemos descartar que el EST pueda tener efecto sobre la cinasa y sus posibles consecuencias a otros tiempos.

9 CONCLUSIONES

El aumento inducido por el carcinógeno FeNTA de los niveles renales de PKC ζ , su translocación al núcleo y su unión al represor transcripcional de *FIH* (CDP) correlaciona con el aumento de los niveles de las isoformas HIF-1 α y HIF-2 α tanto en el citoplasma como en el núcleo, lo que sugiere la posible participación de la cinasa en la vía CDP-FIH-HIF en etapas tempranas de la carcinogénesis renal inducida por exposición a FeNTA.

Los resultados obtenidos son una evidencia más de que los tiempos de exposición al FeNTA estudiados parecen representar diferentes etapas tempranas de la carcinogénesis renal.

Por su parte, el EST no protegió contra las alteraciones observadas en el presente trabajo.

10 PERSPECTIVAS

El presente trabajo abre la puerta a toda un área en nuestra línea de investigación, y algunos pasos a seguir serían:

- Realizar el experimento recíproco de co-inmunoprecipitación entre CDP y PKCz, es decir, inmunoprecipitar a CDP y detectar a PKCz.
- Medir los niveles de CDP fosforilado en el residuo Ser⁹⁸⁷ para comprobar la actividad de cinasa de PKCz sobre este factor transcripcional, ya que se ha reportado que esa fosforilación es específica de esta cinasa.
- Medir los niveles del RNAm de *FIH* así como de su proteína, pues al activarse CDP por la fosforilación en Ser⁹⁸⁷ inhibe la transcripción del gen de *FIH* y como consecuencia los niveles tanto del RNAm como de la proteína deben disminuir.
- Determinar la actividad de HIF mediante el ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).
- Demostrar la asociación de CDP al gen de *FIH* mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).
- Demostrar la asociación de HIF a los promotores de algunos de sus genes blanco mediante ChIP, así como los niveles de RNAm y de sus proteínas correspondientes
- Analizar el comportamiento de la vía en los tumores inducidos con FeNTA y en tumores humanos.
- Investigar alteraciones moleculares río arriba de PKCz.

11 ANEXOS

11.1 Cuantificación de fenoles totales

- Soluciones

Carbonato de sodio 1 M (Na₂CO₃). Se pesaron 26.5 g de Na₂CO₃, disolver en agua destilada y aforar a 250 ml.

Estándar de ácido gálico para la curva patrón [10 mg/ml]. Se pesaron 50 mg de ácido gálico y disolver en metanol al 50% en agua destilada.

Folin 2N. Hacer una dilución 1:10 v/v de Folin 2N en agua destilada.

- Preparación de las muestras

Para la determinación de fenoles totales del EST, las diluciones se realizan a partir de una solución stock de concentración baja (3 mg/mL) (solución stock 1) y otra con concentración alta (13mg /mL) (solución stock 2). La preparación de estas dos soluciones abarca un rango más amplio de concentraciones, lo que permite cuantificar de manera confiable la concentración de los fenoles en el EST.

- Solución stock 1 de EST

0.015 g de polvo de extracto se disuelven en 5 ml de agua y se realizan las diluciones de la tabla 4.

Tabla 4. Diluciones de la solución stock 1 de EST.

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

- Solución stock 2 de EST

0.8g de polvo de extracto se disuelven en 5 ml de agua y se realizan las diluciones de la tabla 5.

Tabla 5. Diluciones de la solución stock 2 de EST.

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

- Procedimiento

A 50 µL de estándar de ácido gálico (10 mg/mL), agua (blanco), o diluciones de EST preparadas de acuerdo a las tablas 4 ó 5 se les agregan 400µL de carbonato de sodio 1M y 500 µL de reactivo de Folin-Ciocalteau 2N (1:10). Las lecturas se realizan en un espectrofotómetro a 765 nm 15 minutos después de adicionar el Folin. La concentración de los fenoles totales del extracto se calcula interpolando la absorbancia obtenida de cada dilución en la curva patrón de ácido gálico que se describe en la tabla 6 y los resultados se expresan en µg eq. de ácido gálico/mL de extracto.

Tabla 6. Concentraciones de ácido gálico en la curva patrón para la cuantificación de fenoles totales.

Ácido gálico [µg/mL]	µL de estándar	mL de agua destilada
50	5	995
100	10	990
150	15	985
200	20	980
250	25	975

11.2 Inactivación del radical superóxido

- Soluciones

Xantina 0.3 mM. Se pesaron 0.0228g de xantina, se agregaron 5 ml de bicarbonato de sodio 400 mM y se aforaron a 500ml con agua destilada.

EDTA 0.4 mM. Se pesaron 0.1117 g de EDTA y se disolvieron en 500 ml de agua destilada.

Nitro azul de tetrazolio (NBT) 150 µM. Se pesaron 0.0368 de NBT y se disolvieron en 300 mL de agua destilada.

Na₂CO₃ 400 mM. Se pesaron 21.2 g de Na₂CO₃ y se disolvieron en 500 mL de agua destilada.

Albúmina sérica bovina 0.1% (ASB). Se pesaron 0.25 g de albúmina y se disolvieron en 500 mL de agua destilada.

Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4. Se pesaron 1.0524g de KH_2PO_4 y 0.6745g de Na_2HPO_4 y se disolvieron en 250 mL de agua destilada.

Sulfato de amonio 2M. Se pesaron 66 g de sulfato de amonio y se aforaron a 250 mL con agua destilada.

Xantina oxidasa 168 U/l. Se parte de un lote de 0.09 U/mg de sólido. Se pesaron 1.75 mg de xantina oxidasa y se disolvieron en 1 mL de sulfato de amonio 2 M.

Cloruro de cobre 0.8mM. Se pesaron 0.07g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se disolvieron en 500 mL de agua destilada.

- Preparación de muestras

Las diluciones del extracto polifenólico se realizan como se indica en la tabla 7 a partir de las soluciones stock mencionadas en la sección 10.1. La preparación de estas dos soluciones stock permite cubrir todo el rango para expresar el porcentaje de inactivación del radical superóxido en función de concentración de fenoles totales presentes en el extracto.

Tabla 7. Diluciones del extracto polifenólico a partir de las soluciones stock 1 y 2 para la determinación de la inactivación del radical superóxido.

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

- Procedimiento

Para cada determinación se agregan 815 μL de la mezcla de reacción descrita en la tabla 8 y se añaden los reactivos como se indica en la tabla 9, preparando un C-100%, un blanco problema y un problema por cada dilución de extracto polifenólico. Los tubos se incuban 15 minutos en un baño a 37°C (el tiempo de incubación se contabiliza desde que se agregan los reactivos de manera simultánea en el primer tubo). Se detiene la reacción con 330 μL de cloruro de cobre, y finalmente se realiza la cuantificación a 560 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de inactivación del radical superóxido en función de la cantidad de fenoles totales presentes en 165 μL de muestra para cada una de las diluciones utilizadas.

Tabla 8. Mezcla de reacción.

Reactivo	Volumen
Xantina 0.3 mM	30 mL
EDTA 0.4 mM	15mL
NBT	15 mL
Na_2CO_3 400 mM	9 mL
Albúmina sérica bovina 0.1%	4.5 mL
Total	73 mL

Tabla 9. Reactivos adicionados para cada dilución de extracto polifenólico en la determinación de la capacidad de inactivación del radical superóxido.

C-100%*	165 μL de amortiguador de fosfatos	20 μL de Xantina Oxidasa
Blanco problema	165 μL de dilución de EST	20 μL de amortiguador de fosfatos
Problema	165 μL de dilución de EST	20 μL de Xantina Oxidasa

*C-100%= cantidad máxima de radical superóxido generada por el sistema xantina-xantina oxidasa.

11.3 Preparación de nitrilotriacetato de hierro (FeNTA)

NaHCO_3 120 mM. Se disolvieron 0.504 g de NaHCO_3 en 40 mL de agua desionizada y se aforaron a 50 mL.

Nitrato de hierro $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 160 mM. Se disolvieron 0.646 g de nitrato de hierro y se aforaron a 10mL con NaHCO_3 120 mM.

Nitrilotriacetato de sodio Na_2NTA 320 mM. Se disolvieron 1.88 g de Na_2NTA en 25 mL de solución de NaHCO_3 120 mM.

Para preparar 30 mL de solución de FeNTA se mezclan 10 ml de nitrato de hierro 160 mM con 20 mL de nitrilotriacetato de sodio 320 mM, con agitación constante y suave. Con la finalidad de ajustar el pH a 7.4 se agregan 0.2 g de bicarbonato de sodio. Durante el desarrollo del ensayo se debe de ajustar el pH de la solución. Esta solución debe protegerse de la luz.

11.4 Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry

a) Preparación de soluciones para el método de Lowry

- **Ácido tricloroacético 10% (TCA).** Se pesaron 10g de TCA y se disolvieron en 100 ml de agua destilada.
- **NaOH 0.1M.** Se pesaron 0.4 g de NaOH y se aforaron a 100 ml con agua destilada.
- **Albúmina sérica bovina 0.05% (ASB).** Se disolvieron 50 mg en 100 mL de agua desionizada

b) Solución A

- **Na₂CO₃ al 2%.** Se disolvieron 20 g en 1000 mL de agua destilada.
- **NaOH al 0.4%.** Se disolvieron 4g en 1000 mL de agua destilada.
- **Tartrato de sodio al 0.02%.** Se disolvieron 0.2 g en 1000 mL de agua destilada.

c) Solución B

- **CuSO₄ al 0.5%.** Se disolvieron 0.5g en 100 mL de agua.

d) Solución C

Se prepara al momento del ensayo y se obtiene mezclando la solución A y solución B en una proporción 50:1

e) Solución D

Se prepara al momento del ensayo y se obtiene diluyendo el reactivo de Folin – Ciocalteu (Sigma F-9252) en agua destilada en una proporción 1:2.

- Procedimiento

Antes de llevar a cabo la cuantificación de proteínas se realizaron diluciones de los sobrenadantes obtenidos de los homogenizados de los tejidos. La dilución utilizada fue 1:150, usando agua destilada como diluyente.

Para el ensayo se colocan 200 µL del homogenizado diluido o estándar de ASB al 0.05% en tubos de ensayo 12 x 75 mm; posteriormente se les añade 1 mL de la solución C y se agitan e incuban durante 10 min. Transcurrido ese tiempo se agregan 100 µL de solución D con

agitación simultánea y se incuban durante 30 min. Se determinan las absorbancias en el espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda Bio 10) a 660nm. La concentración de las proteínas se calcula interpolando la absorbancia obtenida en la curva patrón de la ASB (Tabla 10) y los resultados se expresan en mg de proteína/mL.

Tabla 10. Curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) al 0.05%

Tubo	ASB al 0.05% (µL)	H ₂ O (µL)	[ASB] final (µg/0.2 mL)
1	0	200	Blanco
2	10	190	5
3	20	180	10
4	30	170	15
5	50	150	25
6	70	130	35
7	100	100	50

11.5 Electroforesis

11.5.1 Preparación de los geles para electroforesis

1. Se preparan geles SDS-poliacrilamida a partir de una solución de acrilamida al 30% con agitación suave.
2. Se vacían 5 mL de la mezcla en los moldes, llenando hasta 1.5 cm del tope, éste gel será llamado gel de resolución.
3. Se añaden 150 µL de isopropanol para eliminar las burbujas de la superficie del gel de resolución y se deja polimerizar durante 20 min.
4. Se elimina el isopropanol por decantación y se realizan 3 lavados con agua desionizada para eliminar la acrilamida no polimerizada.
5. Se elimina el exceso de humedad con papel filtro Whatman.
6. Se prepara una segunda mezcla de acrilamida al 5% y colocarla sobre el gel de resolución.
7. Se coloca el peine evitando hacer burbujas.
8. Se dejan polimerizar 15 minutos (éste gel será llamado gel concentrador).
9. Se quitan con cuidado los peines y lavar con agua para eliminar la acrilamida no polimerizada.

10. Se colocan cuidadosamente los geles en una cámara de electroforesis con amortiguador de electroforesis (Tris 25mM, glicina 250 mM, SDS 0.1%, pH=8.3).

11.5.2 Preparación de las muestras

1. Se coloca un volumen de muestra correspondiente a 50 µg de proteína en un tubo eppendorff.
2. Se coloca el mismo volumen de buffer desnaturalizante (Tris HCl 50 mM pH=6.8, β-mercaptoetanol 1%, SDS 1%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%)
3. Se mezcla suavemente.
4. Se colocan los tubos en agua hirviendo durante 4 min.
5. Se colocan las muestras de hielo durante 2 min y después cargar las muestras en el gel concentrador.
6. Se corren los geles en una cámara de electroforesis (BIO-RAD)
7. Se desmontan los moldes y retirar los geles con mucho cuidado.
8. Se elimina el gel concentrador y colocar el gel de resolución en amortiguador de transferencia durante 10 min para su preparación para la transferencia a membranas de PVDF.

11.6 Transferencia a membrana de fluoruro de polivinilo (PVDF)

1. Se recortan las membranas (IMMOBILON, Millipore) con dimensiones de 9x8 cm.
2. Minutos antes de terminada la electroforesis se acondicionan las membranas para la transferencia como se indica en seguida:
 - Se sumergen 5 min en metanol.
 - Posteriormente y evitando que las membranas se sequen, se elimina el metanol sumergiendo las membranas en agua durante 2 min.
 - Se retiran las membranas del agua y se colocan en amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, metanol 10%, pH=8.3) durante 10min.
2. La transferencia semi seca se realiza en el equipo (Transblot SD Semidry transfer cell, BioRad) y se monta de la siguiente manera:
 - Se coloca un papel filtro Whatman (previamente humedecido en amortiguador de transferencia) sobre el ánodo del equipo.

- Se coloca la membrana sobre el papel filtro cuidando que la membrana no se seque y evitando la formación de burbujas.
- Se coloca el gel sobre la membrana.
- Se coloca un segundo papel filtro y se eliminan las burbujas.
- Se coloca el cátodo del equipo cuidando que el sistema haya cerrado bien.

11.7 Detección de proteínas

1. Se preparan 400 μL del sustrato de detección para cada membrana (IMMOBILON, Millipore) evitando su exposición a la luz y se deja a temperatura ambiente durante 30 min.
2. En la oscuridad se recortan las placas de rayos X del mismo tamaño que las membranas.
3. En la oscuridad se colocan las membranas en el cassette de detección.
4. Se colocan 400 μL del sustrato de detección (luminol y H_2O_2) (Millipore ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore Corporation, MA, USA) sobre la membrana (lado que contiene las proteínas), posteriormente se coloca un acetato para distribuir uniformemente el sustrato de detección (eliminando las burbujas que se formen).
5. Posteriormente, se expone una placa de rayos X encima de la membrana durante 30 segundos (este tiempo depende de la proteína a detectar).

11.8 Revelado de las placas de rayos X

1. Transcurrido el tiempo de exposición se retira la placa de rayos X (Kodak Biomax Light film) y se coloca en la solución reveladora con agitación constante hasta la aparición de la banda.
2. Se retira la placa de la solución reveladora (Kodak GBX). Se enjuaga suavemente con agua corriente y se coloca en solución fijadora (Kodak GBX).
3. Se agita suavemente durante 3 minutos y se pasa a un recipiente con agua corriente.
4. Se dejan secar las placas a temperatura ambiente. Posteriormente se digitalizan y se analizan con el programa de Image J (Broken Symmetry Soft).

12 BIBLIOGRAFIA

- Agarwal MK, Iqbal M, Athar M. Vitamin E inhibits hepatic oxidative stress, toxicity and hyperproliferation in rats treated with the renal carcinogen ferric nitrilotriacetate. *Redox Rep* 2005;10(2):62-70.
- Aguilar-Alonso F. 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 para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Bioquímicas), México, Facultad de Química, UNAM, 2010.
- Akeno N, Robins J, Zhang M . Induction of vascular endothelial growth factor by IGF-I in osteoblast-like cells is mediated by the PI3K signaling pathway through the hypoxia-inducible factor-2a. *Endocrinology* 2002;143:420–425.
- Ansar S, Iqbal M, Athar M. Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitrilotriacetate mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. *Carcinogenesis* 1999;20(4):599-606.
- Arany Z, Huang LE, Eckner, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93(23):12969–12973.
- Athar M, Iqbal M. Ferric nitrilotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis* 1998;19(6):1133-1139.
- Atkins M B, George D J, Jonasch E. Renal neoplasia. En Brenner & Rector's the kidney. Vol 2, 6th edition, WB Saunder's Company 2000; 1844-1862.
- Bahnemann, R, Leibold E, Kittel B, Mellert W, Jackh R. Different Patterns of kidney Toxicity after subacute administration of Na- nitriloacetic acid and Fe-nitrilotriacetic acid to wistar rats, *Toxicol Sci* 1998;46(1):166-175.
- Bardos JI, Ashcroft M. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays* 2004;26:262–269.
- Basu A, Contreras A, Datta D, Flynn E, Zeng L, Cohen H, Briscoe D, Pal S. Overexpression of vascular endothelial growth factor and the development of post-transplantation cancer. *Cancer Res* 2008;68(14):5689–5698.

- Globe GC, Obeid LM, Hannun YA. Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13(3-4):411–431.
- Brenner W, Benzing F, Gudejko-Thiel J, Fischer R, Farber G, Hengstler JG, Seliger B, Thuroff JW. Regulation of β 1 integrin expression by PKC ϵ in renal cancer cells. *Int J Oncol* 2004;25(4):1157-1163.
- Carroll VA, Ashcroft M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev Mol Med* 2005;7:1–16.
- Carroll V y Ashcroft M. Role of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1A versus HIF-2A in the Regulation of HIF target genes in response to hypoxia, Insulin-Like Growth Factor-I, or loss of Von Hippel-Lindau function: Implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res* 2006;66:6264-6270.
- Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* 1998;8(19):1069-1077.
- Cruz-White. Efecto del pretratamiento con un extracto de semillas de uva sobre el daño oxidante y otras alteraciones inducidas por el carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) en un estudio *in vivo*. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Bioquímicas), México, Facultad de Química, UNAM, 2007.
- Curiel-Muñiz P. Comportamiento de la proteína cinasa Cz en etapas tempranas de un modelo de carcinogénesis renal inducida por FeNTA. Tesis de licenciatura para obtener el título de Química Farmacéutica-Bióloga, México, Facultad de Química, UNAM, 2012.
- Datta K, Li J, Bhattacharya R, Gasparian L, Wang E, Mukhopadhyay D. Protein kinase C zeta transactivates hypoxia-inducible factor alfa by promoting its association with p300 in renal cancer. *Cancer Res* 2004; 64(2):456-462.
- Ebina Y, Okada S, Hamazaki S, Ogino F, Li JL, Midorikawa O. Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of iron- and aluminium-nitrilotriacetate complexes in rats. *J Natl cancer Inst* 1986; 76 (1):107-113.
- Elkins JM, Hewitson KS, McNeill LA, Seibel JF, Schlemminger I, C.Pugh CW, Ratcliffe PJ, Schofield CJ. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1 alpha. *J Biol Chem* 2003;278(3):1802-1806.
- Ellis T, Gambardella L, Horcher M, Tschanz S, Capol J, Bertram P, Jochum W, Barrandon Y, Busslinger M. The transcriptional repressor CDP (Cutl1) is essential for

epithelial cell differentiation of the lung and the hair follicle. *Genes Dev* 2001;15(17):2307–2319.

- Engers R, Mrzyk S, Springer E, Fabbro D, Weissgerber G, Gerharz CD, Gabbert HE. Protein kinase C in human renal cell carcinomas: role in invasion and differential isoenzyme expression. *Br J Cancer* 2000;82(5):1063–1069.
- Fields AP, Gustafson WC. Protein kinase C in disease: cancer. *Methods Mol Biol* 2003;233:519–537.
- Filomenko R, Poirson-Bichat F, Billerey C, Belon JP, Garrido C, Solary E. Atypical protein kinase C ζ as a target for chemosensitization of tumor cells. *Cancer Res* 2002; 62:1815-1821.
- Freedman SJ, Sun ZY, Poy F, Kung AL, Livingston DM, Wagner G, Eck MJ. Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99(8):5367–5372.
- Freeley M, Kelleher D, Long A. Regulation of protein kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cell Signal* 2011;23(5):753–762.
- Fukuda R, Hirota K, Fan F, et al. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277:38205–38211.
- Gago-Domínguez M, Castelao J. Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: Further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(4):721-733.
- Gallegos LL, Newton AC. Spatiotemporal dynamics of lipid signaling: protein kinase C as paradigm. *IUBMB Life* 2008;60(12):782–789.
- Galvez A, Duran A, Linares J, Pathrose p; Castilla E, Abu-Baker S, Leitges M, Díaz-Meco M, Moscat J. Protein Kinase C ζ represses the interleukin-6 promoter and impairs tumorigenesis in vivo, *Mol Cell Biol* 2009;29(1):104-115.
- Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants. *Cell Signal* 2007;19(9):1807-1819.
- Giorgi C, Agnoletto C, Baldini C, Bononi C, Bonora M, BMarchi S, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Zavan, Pinton P. Redox control of Protein Kinase C: Cell and Disease-Specific aspects. *Antioxid Redox Signal* 2010;13(7):1051-1083.

- Gong K, Zhang N, Na X, Wu G, Yang XY, Xin DQ, Na YQ. The expression of Hypoxia Inducible Factor-1,2 alpha in sporadic clear cell renal cell carcinoma and their relationships to the mutations of Von Hippel-Lindau gene. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2005; 43(6):390-393.
- Gopalakrishna R, Gundimeda U. Antioxidant regulation of protein kinase C in cancer prevention. *J Nutr* 2002;132(12):3819S-3823S.
- Gopalakrishna R, Jaken S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(9):1349–1361.
- Grisham, J. W. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: autoradiography with thymidine-H. *Cancer Res* 1962; 22:842–849.
- Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC. Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104:2301–2306.
- Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, de Paulsen N, Mekhail K, Parolin DA, Nakamura E, Lorimer IA, Lee S. Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/ epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL(-/-) renal cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003; 278:44966–44974.
- Hewitson KS, L. A. McNeill LA, M. V. Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW, Schofield CJ. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* 2002;277(29):26351–26355.
- Higgins, G. M. & Anderson, R. M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol* 1931 12:186–202.
- Hirai T, Chida K. Protein kinase C zeta (PKCzeta): activation Mechanisms and Cellular Functions. *J. Biochem* 2003;133(1):1-7.
- House C, Kemp BE. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* 1987;238(4834):1726-1728.
- Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, et al. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) and HIF-2a in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23:9361–9374.
- Hurley JH, Newton AC, Parker PJ, Blumberg PM, Nishizuka Y. Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci* 1997;6(2):477-480.

- Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, Minato N, Conaway R, Conaway J, Klausner R, Pause A. Identification of the von Hippel–Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96 (22):12436–12441.
- Jemal A, Siegel R, Naishadham MA. Cancer statistics, *CA Cancer J Clin* 2013;63(1):11-30.
- Johnson J, Giorgione J, Newton AC. The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry* 2000;39(37):11360-11369.
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J* 1998;17(22):6573–6586.
- Kaplan A. urea. *Clinical Chemistry*, The C.V.Mosby Co. St. Louis, Toronto, Princeton, 1984, 1257-1260.
- Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 2002;32(9):822-832.
- Keranen LM, Dutil EM, Newton AC. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* 1995;5(12):1394–1403.
- Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22(24):4991-5004.
- Kimoto T, Koya-Miyata S, Hino K, Micallef MJ, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by *Brazilia propolis* and artemisinin. *Virchows Arch* 2001;438:259-270.
- Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* 2004;279(11):9899–9904.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002;16(12):1466–1471.
- Ledford AW, Brantley JG, Kemeny G, Foreman TL, Quaggin SE, Igarashi P, Oberhaus SM, Rodova M, Calvet JP, Vanden Heuvel GB. Deregulated expression of the homeobox gene *Cux-1* in transgenic mice results in downregulation of p27(kip1) expression during

nephrogenesis, glomerular abnormalities, and multiorgan hyperplasia. *Dev Biol* 2002;245(1):157–171.

- Lee C, Kim SJ, Jeong DG, Lee SM, Ryu SE. Structure of human FIH-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. *J Biol Chem* 2003;278(9):7558–7563.
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 1998;281: 2042–2045.
- Le Good JA, Brindley DN. Molecular mechanisms regulating protein kinase C α turnover and cellular transformation. *Biochem J*. 2004;378(1): 83-92.
- Leeuwenburgh C, Ji LL. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys* 1995;1(316):941-949.
- Li J, Gobe G. Protein kinase C activation and its role in kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2006;11(5):428-434.
- Li J, Wang E, Dutta S, Lau J, Jiang S, Datta K, Mukhopadhyay D. Protein kinase C mediated modulation of FIH-1 expression by the homeodomain protein CDP/Cut/Cux. *Mol Cell Biol* 2007;27(20):7345–7353.
- Liu JP. Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 116:1–29.
- López-Ramos D. Efecto del carcinógeno renal nitrilotriacetato de hierro y de un antioxidante polifenólico sobre la expresión del gen de ciclina D1. Tesis para obtener el título de Química-Farmacéutica Bióloga, México, Facultad de Química, UNAM. 2007.
- Luna-Ulloa L, Hernández-Maqueda J, Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlán C, Robles-Flores M. Protein kinase C α is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines. *Carcinogenesis* 2011;32(11): 1615–1624.
- Luong MX, van der Meijden CM, Xing D, Hesselton R, Monuki ES, S.Jones SN, Lian JB, Stein JL, Stein GS, Neufeld EJ, van Wijnen AJ. Genetic ablation of the CDP/Cux protein C terminus results in hair cycle defects and reduced male fertility. *Mol Cell Biol* 2002;22(5):1424–1437.
- Mancini, V, Battaglia M, Ditinno P, Palazzo S, Lastilla G, Montironi R, Bettocchi C, Cavalcanti E, Ranieri E, Selvaggi FP. Current insights in renal cell cancer pathology, *Urol Oncol* 2008;26(3):225-238.

- McNeil LA, Hewitson KS, Claridge TD, Seibel JF, Horsfall LE, Schofield CJ. Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803. *Biochem J*.2002;367(Pt 3):571–575.
- Metzen E, U. Berchner-Pfannschmidt U, P. Stengel P, J. H. Marxsen JH, I. Stolze I, M. Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J. Intracellular localization of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 2003;116(Pt7):1319–1326.
- Mizote A, Hida AI, Hosako M, Fujisawa M, Kamekawa M, Okada S. Effects of phlebotomy on the growth of ferric nitrilotriacetate-induced renal cell carcinoma. *Acta Med Okayama* 2002;56(4):199-204.
- Mukhopadhyay D, Datta K. Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. *Semin Cancer Biol* 2004;14(2):123–130.
- Nelson, EC, Evans CP, Lara PN. Renal cell carcinoma: current status and merging therapies. *Cancer Treat Rev* 2007;33(3):299-313.
- Nepveu, A. Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development. *Gene* 2001;270(1-2):1–15.
- Neufeld EJ, Scheuermann RH. Lymphoid apoptosis and myeloid hyperplasia in CCAAT displacement protein mutant mice. *Blood* 2001;98(13):3658–3667.
- Neufeld EJ, Skalnik DG, Lievens PM, Orkin SH. Human CCAAT displacement protein is homologous to the Drosophila homeoprotein, Cut. *Nat Genet* 1992;1(1):50–55.
- Newton AC. Protein kinase C: poised to signal, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298(3):E395–E402.
- Newton AC. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev* 2001; 101(8):2353-2364.
- Oberley TD, Toyokuni S, Szweda LI. Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free Radic Biol Med* 1999;27(5-6):695-703.
- Okada S., Induction of rat renal adenocarcinoma by ferric-nitriloacetate (FeNTA). *Jpn Arch Intern Med* 1982;29:485-491.
- Okamoto K, Toyokuni S, Kim WJ, Ogawa O, Kakehi Y, Arao S, Hiai H, Yoshida O. Overexpression of human mut T homologue gene messenger RNA in renal cell

carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. *Int J Cancer* 1996; 65(4):437-441.

- Pal S, Claffey K, Cohen H, Khosravi-Far R, Mukhopadhyay D. Role of protein Kinase C ζ in Ras-mediated transcriptional activation of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor expression. *J Biol Chem* 2001;276(4):2395-2403.
- Pal S, Claffey K, Dvorak H. The von Hippel-Lindau gene product inhibits vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathways. *J Biol Chem* 1997; 272(44):27509–27512.
- Park SK, Dadak AM, Haase VH. Hypoxia induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α): role of cytoplasmic trapping of HIF-2 α . *Mol Cell Biol* 2003;23:4959–4971.
- Perander M, Bjorkoy G, Johansen, T. Nuclear import and export signals enable rapid nucleocytoplasmic shuttling of the atypical protein kinase C lambda. *J Biol Chem* 2001;276:13015-13024.
- Preece NE, Hall DE., Howarth JA., King LJ., Parke DV., Effects of acute and subchronic administration of iron nitrilotriacetate in the rat. *Toxicology* 1989;59(1):37-58.
- Quaggin SE, G. B. Vandenheuvel GB, Golden K, Bodmer R, Igarashi P. Primary structure, neural-specific expression, and chromosomal localization of Cux-2, a second murine homeobox gene related to Drosophila Cut. *J Biol Chem* 1996;271(37):22624–22634.
- Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, Simon MC, Keith B, Haase VH. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest* 2007; 117:1068–1077.
- Raval RR, Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ.. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 2005; 25:5675–5686.
- Rangel-Gómez A. Comportamiento de la proteína cinasa C ϵ (PKC ϵ) en una etapa temprana del modelo de carcinogénesis renal por FeNTA, Tesis de licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico-Biólogo, México, Facultad de Química, UNAM, 2011.

- Rimessi A, Zecchini E, Siviero R, Giorgi C, Leo S, Rizzuto R, Pinton P. The selective inhibition of nuclear PKC ζ restores the effectiveness of chemotherapeutic agents in chemoresistant cells. *Cell Cycle* 2012; 11(5):1040-1048
- Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron A, Boeckeler K, Parker P. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(2):103-112.
- Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, Bennett MJ, Garcia JA.. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1-1-mice. *Nat Genet* 2003; 35:331–340.
- Sonnenburg ED, Gao T, Newton AC. The phosphoinositide dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide-3-kinase. *J Biol Chem* 2001;276(48):45289–45297.
- Stabel S. Protein kinase C—an enzyme and its relatives. *Semin Cancer Bio* 1994;15(4):227–284.
- Stadler, W. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2005;104(11):2323-2333.
- Stolze IP, Tian YM, Appelhoff RJ, Turley H, Wykoff CC, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) in regulating HIF transcriptional target genes. *J Biol Chem* 2004;279(41):42719–42725.
- Torres-Martínez M. 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 Biólogo, México, Facultad de Química, UNAM. 2007.
- Toyokuni S, Mori T, Dizdaroglu M. DNA base modifications in renal chromatin of Wistar rats treated with renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Int J Cancer* 1994;57(1):123-128.
- Toyokuni S, Okada K, Kondo S, Nishioka H, Tanaka T, Nishiyama Y, Hino O, Hiai H. Development of high-grade renal cell carcinomas in rats independently of somatic mutations in the Tsc2 and VHL tumor suppressor genes. *Jpn J Cancer Res.*1998;89(8):814-820.

- Tufarelli C, Fujiwara Y, DZappulla DC, Neufeld EJ. Hair defects and pup loss in mice with targeted deletion of the first Cut repeat domain of the Cux/CDP homeoprotein gene. *Dev Biol* 1998;200(1):69–81.
- Valarche I, Tissier-Seta JP, Hirsch MR, Martinez S, Goridis C, Brunet JF. The mouse homeodomain protein Phox2 regulates Ncam promoter activity in concert with Cux/CDP and is a putative determinant of neurotransmitter phenotype. *Development* 1993; 119(3):881–896.
- Vargas-Olvera CY, Sánchez-González DJ, Solano JD, Aguilar-Alonso FA, Montalvo-Muñoz F, Martínez-Martínez CM, Medina-Campos ON, Ibarra-Rubio ME. Characterization of N-diethylnitrosamine-initiated and ferric nitrilotriacetate-promoted renal cell carcinoma experimental model and effect of a tamarind seed extract against acute nephrotoxicity and carcinogénesis. *Mol Cell Biochem.* 2012;369(1-2):105-117.
- Vargas-Olvera CY. Efecto de un extracto de semillas de tamarindo (EST) sobre el desarrollo de cáncer renal inducido por nitrilotriacetato de hierro (FeNTA). Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Bioquímicas), México, Facultad de Química, UNAM. 2009.
- Webb B, Hirst S, Giembyez M. Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol* 2000;130:1433-1452.
- White W, Seibenhener L, Wooten M. Phosphorylation of tyrosine 256 facilitates nuclear import of atypical PKC. *J Cell Biochem* 2002;(85):42-53.