

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

Posgrado en Biología Experimental

El papel de Nrf2 (Factor relacionado al factor nuclear eritroide 2)
en la protección de células de cáncer hepático.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

BIOL. EXP. ÁNGEL TONATIUH SALAZAR ANZURES

DIRECTOR

DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ.

ASESORES

Asesor: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.

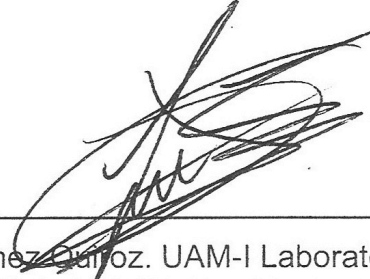
Asesor: Dr. Eduardo Montalvo Jave.

México D.F., Marzo 2014.

EL PROYECTO EL PAPEL DE NRF2 (FACTOR RELACIONADO AL FACTOR NUCLEAR ERITROIDE 2) EN LA PROTECCIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER HEPÁTICO FUE FINANCIADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA "CONACYT" Y REALIZADO POR EL ALUMNO DE MAESTRÍA ÁNGEL TONATIUH SALAZAR ANZURES CON NO. CVU: 421313.

AGRADECIMIENTOS A CONACyT POR PERMITIR EL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO.

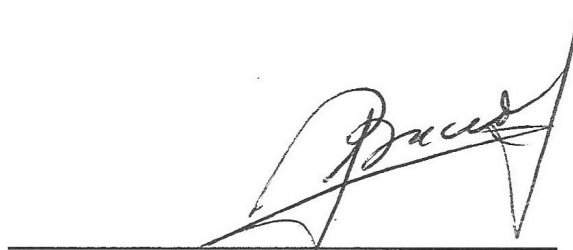
MIEMBROS DEL JURADO



Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz. UAM-I Laboratorio de Fisiología Celular. Dpto. Ciencias de la Salud UAMI. Presidente. legq@xanum.uam.mx 58044730



Dr. Eduardo Montalvo Javé. Hospital General Jefe de la unidad 304. Secretario. montalvoeduardo@hotmail.com 54246892



Dra. Leticia Bucio Ortiz. UAM-I Laboratorio de Fisiología Celular. Dpto. Ciencias de la Salud UAMI. Vocal. lebo@xanum.uam.mx 58044730



Dra. Roxana Uri Miranda Labra. Laboratorio de Fisiología Celular. Dpto. Ciencias de la Salud UAMI. roxml@xanum.uam.mx 58044730



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00130

Matrícula: 2113801471

EL PAPEL DE Nrf2 (FACTOR RELACIONADO AL FACTOR NUCLEAR ERITOIDE 2) EN LA PROTECCION DE CELULAS DE CANCER HEPATICO.

En México, D.F., se presentaron a las 13:00 horas del día 13 del mes de marzo del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ
DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA
DR. EDUARDO MONTALVO JAVE

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

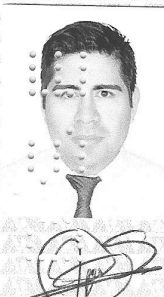
MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ANGEL TONATIUH SALAZAR ANZURES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

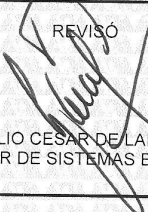
APROBAR.

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.




ÁNGEL TONATIUH SALAZAR ANZURES
ALUMNO

REVISÓ



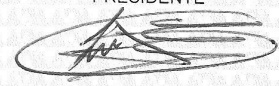
LIC. JULIO CESAR DE LARA SASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



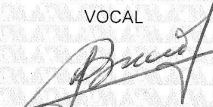
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE




DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL



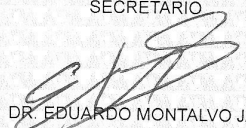
DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

VOCAL



DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

SECRETARIO



DR. EDUARDO MONTALVO JAVE



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

Fecha : 10/03/2014

Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL del alumno ANGEL TONATIUH SALAZAR ANZURES, matrícula 2113801471, quien cumplió con los 176 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha trece de marzo del 2014 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

EL PAPEL DE Nrf2 (FACTOR RELACIONADO AL FACTOR NUCLEAR ERITOIDE 2) EN LA PROTECCION DE CELULAS DE CANCER HEPATICO.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 216 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBAR.

JURADO

Presidente

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

Secretario

DR. EDUARDO MONTALVO JAVE

Vocal

DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

Vocal

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR DE TESIS:

Doctora María Concepción Gutiérrez Ruíz
Profesor Titular C, Tiempo Completo
Laboratorio de Fisiología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mcgr@xanum.uam.mx

ASESOR:

Doctor Luis Enrique Gómez Quiroz
Profesor Titular C, Tiempo Completo
Laboratorio de Fisiología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
legq@xanum.uam.mx

ASESOR:

Doctor Eduardo Montalvo Javé
Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"
Servicio de cirugía general, unidad 304
montalvoeduardo@hotmail.com

ÍNDICE:

ABREVIATURAS	8
ABSTRACT	10
RESUMEN	11
JUSTIFICACIÓN	13
INTRODUCCIÓN	14
NRF2 Y KEAP1	15
NRF2	15
EL PAPEL DE KEAP1	17
REGULACIÓN DE ACCIÓN DE NRF2.....	20
GENES BLANCO DE NRF2.....	22
ANTECEDENTES	24
NRF2 Y CÁNCER.....	24
CICLO CELULAR Y CÁNCER	29
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES	30
HIPÓTESIS	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31
CULTIVO CELULAR:.....	31
ENSAYO DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN:	31
EXTRACCIÓN PROTEÍNAS	32
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	32
WESTERN BLOT	33
MICROSCOPIA CONFOCAL:	34
EXPRESIÓN DE GENES DE DESTOXIFICACIÓN.....	34
EXTRACCIÓN DE ARN.	34
RT-QPCR.....	35
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN:	49
BIBLIOGRAFÍAS	53

ABREVIATURAS

ABC transporter.- Transportadores acoplados a bombas ATP, del inglés ATP binding cassette.

ABCC1.- Del inglés Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)

ABCC2.- Del inglés Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)

ABCC3.- Del inglés Multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3)

ABCG2.- Del inglés ATP-binding cassette sub-family G member 2

ADN.- Acido desoxirribonucleico

AP1.- Proteína Activadora 1

ARE.- Del inglés antioxidant responsive element

ARN.- Acido ribonucleico

B-Raf.- Del inglés v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1.

BTB/POZ.- Del inglés Bric-abrac, tramtrack, broad-complex/poxovirus zinc finger.

bZIP.- Dominio conocido como "zipper" o cierre de leucinas (bZip)

C-Myc.- Myc proto-oncogene protein

CTR.- Región del carboxilo terminal

ERN.- Especies reactivas de nitrógeno

ERO.- Especies reactivas de Oxígeno

GCLC.- Glutamato-cisteina ligasa subunidad catalítica

GCLM.- Glutamato-cisteina ligasa subunidad modificadora

γ-GCS.- Gamma glutamil cistein sintetasa

GSH.- Glutation

GST.- Glutation S transferasa

HO-1.- Hemoxigenasa 1

Keap1.- Del inglés Kelch-like ECH-associating protein 1

K-Ras.- Del inglés V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.

Maf.- Proteínas estabilizadoras de Nrf2 descubiertas en muscle aponeurotic fibrosarcoma.

MAPKs.- Cinasas activadas por mitógenos

MRP.- Del inglés Multidrug resistance-associated protein

NFκB.-	Factor nuclear kappa B
NF-E2.-	Del inglés Nuclear factor, erythroid-derived 2
NQO1.-	NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1
Nrf1.-	Factor nuclear eritroide 1
Nrf2.-	Factor nuclear eritroide 2
Nrf3.-	Factor nuclear eritroide 3
NTR.-	Región del amino terminal.
OMS.-	Organización Mundial de la Salud.
pI3K.-	Fosfatidil-inositol-3-quinasa
p21.-	Proteína de 21 KDa
p45.-	Proteína de 45 KDa
p49.-	Proteína de 49 KDa
p53.-	Proteína de 53 KDa
p62.-	Proteína de 62 KDa
ROS.-	Especies Reactivas de Oxígeno
TBHQ.-	Tert-butilhidroquinona

ABSTRACT

Cancer is a disease that annually reports a high mortality rate. It has been reported that the prevalence of hepatocellular carcinoma has been increasing in recent years due to the ability to develop resistance molecular mechanisms that generate protection and survival in liver cancer cells to treatment with chemotherapeutic agents. It is therefore of great interest to study these mechanisms of resistance in order to analyze and provide information on new therapeutic strategies.

In the hepatoblastoma and liver cancer cell lines, HepG2 and Huh7, the cytotoxic effect of the cisplatin anticancer drug was analyzed. The results showed tolerance to cytotoxic effect in both cell types at concentrations lower than 30 μ M of cisplatin for 24 hours. Therefore we used these concentrations to analyze cytoprotective effect and its relationship with cell cycle. Given that both cell lines showed a similar behavior in cell cycle it was considered to study the molecular mechanism just in HepG2 cell line because Huh7 line has mutations in p53.

After, was analyzed by Western blot the expression of proteins involved in cell cycle regulation in HepG2 line, we observed an expression increase of p21 protein and a decrease of cdk2 protein with concentrations of 2.5 and 5 μ M of cisplatin during 24 hs, suggesting a cytostatic effect.

Subsequently, the behavior of cell cycle was analyzed in the HepG2 line by flow cytometry with 2.5, 5, 10, 15 and 20 μ M of cisplatin at 48 and 72 hours of exposure. The results showed the presence of cell cycle arrest with concentrations of 2.5 and 5 μ M after 48 hours of exposure and it was maintained until 72 h, whereas at concentrations higher than 10 μ M the presence of cell death was observed. These data are consistent with the results obtained in the cell proliferation.

To assess the chemoresistance response to cisplatin chemotherapeutic agent we studied cellular localization of Nrf2 transcription factor so like the Nrf2 protein expression and its target genes, which are involved in the antioxidant and detoxifying processes produced by cytotoxic agents. The results showed nuclear translocation of Nrf2 by confocal microscopy and an increased protein expression of Nrf2, NQO1, HO1 and γ -GCS. Besides an increase in the expression of the *ATP7B*, *MRP2*, *MRP3* and *CTR1* transporter genes with concentrations of 2.5 and 5 μ M of cisplatin during 24 hs. These results showed that treatment with cisplatin induces antioxidant proteins and an increase of transporter molecules that decrease the concentration of the chemotherapeutic agent causing a chemoresistant effect at cell level.

RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades que anualmente reporta una alta tasa de mortalidad. Se ha reportado que la prevalencia del carcinoma hepatocelular ha incrementando en los últimos años debido a la capacidad de desarrollar mecanismos moleculares de resistencia que generan protección y sobrevivencia en las células de cáncer hepáticas al tratamiento con agentes quimioterapéuticos. Por ello resulta de gran interés estudiar estos mecanismo de resistencia con el fin de analizarlos y aportar información sobre nuevas estrategias terapéuticas.

En las líneas celulares hepáticas de hepatoblastoma y cancerosas, HepG2 y Huh7, se analizó el efecto citotóxico del fármaco antineoplásico cisplatino. Los resultados mostraron tolerancia al efecto citotóxico en ambas líneas celulares a concentraciones menores de 30 μ M de cisplatino durante 24 hs de exposición. Por lo que se decidió utilizar estas concentraciones para analizar a nivel molecular el efecto citoprotectory su relación con el ciclo celular. Dado que ambas líneas celulares mostraron un comportamiento similar, se consideró estudiar el mecanismo en la línea celular HepG2 ya que la línea Huh7 presenta mutaciones en p53.

Se analizó por Western blot la expresión de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular de la línea HepG2, se observó un incremento en la expresión de la proteína p21 y una disminución de la proteína cdk2, con las concentraciones de 2.5 y 5 μ M de cisplatino a 24 hs de exposición, sugiriendo este resultado un efecto citoestático.

Posteriormente, se analizó el comportamiento del ciclo celular en la línea HepG2 por medio de citometría de flujo con las concentraciones de 2.5, 5, 10, 15 y 20 μ M de cisplatino a 48 y 72 hs de exposición. Los resultados mostraron la presencia de arresto del ciclo celular con las concentraciones de 2.5 y 5 μ M a partir de 48 hs de exposición que se mantuvo hasta las 72 hs, mientras que a concentraciones mayores de 10 μ M se observó la presencia de muerte celular. Estos datos son acordes con los resultados obtenidos en la proliferación celular.

Con el fin de evaluar la respuesta quimiorresistente al agente quimioterapéutico cisplatino se analizó la localización celular y la expresión del factor de transcripción Nrf2 y de sus genes blancos los cuales participan en los procesos antioxidantes y detoxificantes generados por agentes citotóxicos. Los resultados mostraron translocación al núcleo de Nrf2 por microscopía confocal, así como un incremento en la expresión de la proteína Nrf2 y de las proteínas NQO1, HO1 y γ -GCS., además de un incremento en la expresión de los genes transportadores *ATP7B*, *MRP2*, *MPR3* y *CTR1* con las concentraciones de 2.5 y 5 μ M de cisplatino durante 24 hs de exposición. Estos resultados mostraron que el tratamiento con cisplatino induce proteínas antioxidantes, así como un incremento de moléculas transportadoras que disminuyen la concentración del agente quimioterapéutico ocasionando un efecto quimiorresistente a nivel celular.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema de salud pública debido al alto índice de mortalidad, en la última década se ha registrado un incremento en algunos tipos de cáncer como es el de hígado. Uno de los principales problemas en el tratamiento del cáncer es la quimiorresistencia que presentan las células cancerígenas, debido al desarrollo de mecanismos citoprotectores.

Las células tienen mecanismos citoprotectores que permiten mantener la homeostasis, ante diferentes agresiones como el estrés oxidante y el daño citotóxico generado por xenobióticos. En la última década estos mecanismos han cobrado interés ya que se ha sugerido su participación en los procesos de quimioresistencia en células tumorales. Uno de los factores involucrados en la citoprotección es el factor de transcripción Nrf2, ya que regula genes involucrados en el balance del estado redox intracelular; enzimas de conjugación de fase II; transportadores los cuales participan en la salida de agentes xenobióticos en la fase III (Hayes y McMahon, 2009; Slocum et al., 2011; Shibata T. et al., 2008; Jianget al., 2010). Algunos reportes indican que el incremento del factor de transcripción Nrf2 está relacionado con un mal pronóstico en pacientes con cáncer pulmonar (Solis et al., 2010; Konstantinopoulos et al., 2011), debido al incremento en la vía Nrf2 y a la constante activación de genes de detoxificación de fase I, II y fase III.

Existen reportes que muestran la participación de Nrf2 y algunos de sus genes blanco en la sobrevivencia de células de cáncer (Homma et al., 2009; Li W y Kong AN 2009; Ohta et al., 2008)., sin embargo a la fecha no hay estudios que integre todos estos datos y su relación con el ciclo celular. Por lo que conocer el mecanismo de quimiorresistencia permitirá proponer nuevos blancos terapéuticos que controlen con mayor eficiencia la proliferación de células cancerosas.

INTRODUCCIÓN

La investigación en cáncer es una de las áreas más importantes a nivel mundial debido al alto índice de mortalidad y a las limitadas estrategias terapéuticas existentes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en el 2008 que el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo con 7.6 millones de casos reportados ocupando la prevalencia más alta los de pulmón, estómago, hígado, colon y mama (OMS, 2011).

El cáncer es el resultado de la desregulación permanente del funcionamiento normal de la célula, atribuido a diversos factores internos y externos, tales como mutaciones, alteración en la expresión de oncogenes, genes reguladores del ciclo celular, presencia de estrés oxidante, desregulación en los mecanismos de reparación y protección celular. En ocasiones la célula tiene la capacidad de reparar estas alteraciones o bien morir, sin embargo, es posible que algunas escapen de estas acciones y entren en una fase neoplásica dando como resultado el desarrollo de cáncer (Hanahan et al 2011).

Las principales estrategias terapéuticas usadas contra el cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, generalmente aplicadas en conjunto. Existe una gran cantidad de agentes quimioterapéuticos usados con base en sus mecanismos moleculares de acción farmacológica, cuya clasificación depende de ésta y de su estructura química. La clasificación se basa principalmente en agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la mitosis, corticoesteroides, y antraciclinas. Cabe mencionar que algunos fármacos pueden compartir características en el mecanismo acción, sin embargo la estructura del fármaco denomina su clasificación como es el caso del cisplatino, el cual comparte características de acción farmacológica con los agentes alquilantes.

El cisplatino es un agente quimioterapéutico ampliamente usado en diferentes tipos de cáncer, principalmente en ovario, cabeza, cuello, pulmón. Su mecanismo de acción se basa en su activación intracelular a través de un fenómeno denominado acuciación, el cual consiste en desplazar uno de los dos ligandos de cloruro del cisplatino para unirse covalentemente al ADN, formando aductos, permitiendo la activación de varias vías de transducción de señales que llevan al arresto del ciclo celular o bien a la muerte celular programada entre otras. Sin embargo, algunas células cancerígenas desarrollan mecanismos de protección que confieren resistencia al tratamiento (Kelland, 2007).

Dentro de los mecanismos moleculares propuestos en los procesos de resistencia están las rutas de señalización molecular relacionadas con la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), y la activación de factores de transcripción sensibles al estrés oxidante tales como la proteína activadora 1 (AP-1), el factor nuclear kappa b (NFkB), y el factor relacionado con el factor nuclear eritroide (Nrf2), los cuales se han observado que juegan un papel importante en procesos de sobrevivencia y proliferación celular tras la exposición a algún tipo de estrés (Smith et al., 2007; Nicholson et al., 2002; Shaulian et al., 2002; Gopalakrishnan et al., 2008), además de estar estrechamente relacionados con los procesos de apoptosis y cáncer (Osburn et al., 2008; Lau et al., 2008).

NRF2 Y KEAP1

Nrf2

Nrf2 es un factor de transcripción que en la última década ha cobrado interés debido a la participación en los procesos de resistencia en células de cáncer (Motohashi et al., 2004; Klaassen et al., 2005; Mandlekar et al., 2006). El descubrimiento de Nrf2 se dio al intentar aislar al factor de transcripción de la región de control del locus del gen de β -globina, usando secuencias repetidas de NFE2/ AP1 como sitio de reconocimiento en levaduras; se encontraron 2 proteínas muy similares a NF-E2, las cuales fueron denominadas como Nrf1 (66 kDa) y Nrf2 (68 kDa), posteriormente se encontró un tercer factor, Nrf3 (Moi y Kan, 1990). Las

moléculas Nrf's pertenecen a una familia de proteínas básicas con un característico dominio conocido como "zipper" o cierre de leucinas (bZip) en la región del carboxilo terminal, el cual tiene función de heterodimerización con otras proteínas pequeñas conocidas como Maf (del inglés musculoaponeurotic fibrosarcoma). La región básica corriente arriba de bZip es la responsable de la unión al ADN, mientras que la activación transcripcional es conferida por dos regiones tanto en la en la parte media de la región N-terminal como en la región C terminal (Ma, 2013).

Entre los primeros factores de transcripción identificados fueron p45-NFE2 (Chan et al., 1993), Nrf1 (Chan et al., 1993), Nrf2 (Moi et al., 1994) y Nrf3 (Kobayashi et al., 1999). Al observar que estas proteínas funcionaban como factores de transcripción heterodiméricas con otras proteínas pequeñas llamadas Mafs, se logró establecer la importancia de la formación del complejo formado entre el factor de transcripción y las Mafs, el cual tiene la finalidad de estabilizar la unión con la secuencia específica en el ADN permitiendo la activación de los genes blanco (Igarashi et al., 1994). Se determinó que el factor de transcripción Nrf2 se une y regula al elemento de respuesta antioxidante humano (ARE del inglés antioxidant response element), una secuencia del ADN situado en las regiones promotoras corriente arriba de muchos genes de detoxificación, y por lo tanto intermediario en la expresión de varias enzimas antioxidantes (Itoh et al, 1999).

La primera evidencia del papel de Nrf2 en la protección contra el estrés oxidante proviene del estudio de Venugopal y Jaiswal en 1996, en el que se demostró que la sobreexpresión del cDNA de Nrf1 y Nrf2 aumentaba la expresión de la NADPH quinona deshidrogenasa 1 (NQO1) en respuesta a la presencia de agentes oxidantes y xenobióticos. Además los autores reportaron que Nrf1 y Nrf2 regulaban positivamente a ARE, mientras que c-Fos y Fra1 lo hacían de manera negativa. El papel de Nrf2 se confirmó cuando se obtuvieron los primeros ratones génicamente modificados y carentes de este factor (Nrf2 $-/-$). Los ratones Nrf2 $-/-$ tuvieron un desarrollo aparentemente normal, por lo que se descartó que Nrf2

fuera esencial para la eritropoyesis murina, el crecimiento o el desarrollo. No obstante, estos ratones no pudieron inducir la expresión de los genes responsables de la detoxificación de agentes carcinogénicos y de la protección contra el estrés oxidativo, tales como NQO1, gamma glutamil cisteíniligasa (γ -GCL), glutatión S transferasa (GST) y hemoxigenasa 1 (HO-1) (Iskander y Jaiswal, 2005). Otros estudios han demostrado que Nrf2 también contribuye a la actividad del proteosoma 26S, evidenciando la participación de un proceso de regulación en la expresión de Nrf2 (Hayes y McMahon, 2009).

El papel de Keap1

En contraste con NF-E2, Nrf2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células, de modo que su actividad se mantiene estrictamente regulada. En la célula se debe conservar un determinado estado redox para permanecer en homeostasis, una alteración en dicho estado puede modificar la actividad de diversas enzimas y factores de transcripción. Así, Nrf2 no se encuentra libre y activo todo el tiempo, únicamente cuando se generan condiciones de estrés oxidante. Aun cuando ha sido relativamente sencillo encontrar niveles constitutivos del ARNm para Nrf2, ha resultado difícil detectar a la proteína madura, lo que sugiere que sufre una rápida degradación dentro de la célula. La vida media de Nrf2 es muy corta y se ha estimado que puede ser un tiempo menor de 20 min en macrófagos y en varias líneas celulares (Itoh et al., 2003; McMahon et al., 2003; Nguyen et al., 2003). El uso de inhibidores del proteosoma muestra que la degradación de Nrf2 ocurre mediante la ubiquitinación y reconocimiento del proteosoma (Kobayashi et al., 2006; Rushworth et al., 2011). La célula sintetiza y degrada a Nrf2 de manera sistemática, por lo que el control de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en una síntesis de *novo* (Kensler et al., 2007; Zhang et al., 2006).

Se ha reportado que las proteínas Nrf2 tienen seis dominios conservados asociados a su regulación negativa, los cuales han sido denominados como Neh (Nrf2, ECH [chicken Nrf2] homologous domain) tal como muestra la Figura A. En

La proteína Keap1 murina está formada por 624 aminoácidos con una masa molecular de 69 kDa, y consta de cinco dominios (Fig. A), de los cuales dos se consideran como dominios canónicos. El primero de ellos es el dominio BTB/POZ (Bric-abrac, tramtrack, broad-complex/ poxovirus zinc finger) que es un motivo evolutivamente conservado para interacciones proteína/proteína y se encuentra presente en proteínas que unen actina y en factores de transcripción con dedos de zinc, además se sabe que forma complejos con otros dominios. El otro dominio conservado se conoce como Kelch y su nombre proviene de su semejanza con la proteína reguladora Kelch de *Drosophila* donde fue identificada por primera vez. Este motivo aparece repetido seis veces tanto en Kelch como en Keap1, por lo que es común encontrar a Keap1 dentro de la clasificación de la súperfamilia de proteínas con repeticiones de dominios Kelch. La repetición de estos motivos es la que da la estructura de hélice- β , y es a través de este dominio que se une con el dominio Neh2 de Nrf2 (Kobayashi et al., 2006; Kensler et al., 2007; Itoh et al., 1999).

Los otros tres dominios de Keap1 son: la región N-terminal (NTR), la región C-terminal (CTR) y la región de intervención (IVR), la cual se distingue por su alto número de residuos de cisteína. Se ha reportado que en la proteína Keap1 murina están presentes 25 residuos de cisteína, mientras que la humana 27, de los cuales únicamente nueve de estos residuos pueden reaccionar ya que están ubicados cerca de aminoácidos básicos, lo cual disminuye su pKa y aumenta su reactividad. Estudios posteriores han demostrado que la sola interacción de Keap1 (por medio del dominio Kelch) con Nrf2 (vía Neh2) es insuficiente para mantener a Nrf2 en el citosol y se ha reportado que Keap1 se asocia al mismo tiempo con el citoesqueleto. Se considera que Keap1 forma un multicomplejo estructural el cual comparte sus láminas- β tanto con Nrf2 como con los filamentos de actina. Todas estas observaciones implican que el complejo Keap1-Nrf2 se forma y se retiene en el citosol mediante interacciones con el citoesqueleto (Kang et al., 2004). Estudios *in vitro* usando Keap1 murina recombinante y el dominio Neh2 mostraron que el complejo Keap1-Nrf2 se forma en una proporción de 2:1. Posteriormente, se

observó que Keap1 se encuentra como homodímero y de esta manera es como se une a Nrf2, mediante dos sitios de reconocimiento con diferente afinidad en el dominio Neh2 (los motivos DLG, baja afinidad, y ETGE, alta afinidad, conocidos como enlace tipo pestillo y bisagra respectivamente). El reconocimiento por los dos sitios tiene importancia fisiológica, ya que se ha demostrado que la delección del motivo DLG (con una afinidad de dos órdenes de magnitud menor que ETGE) obstaculiza la ubiquitinación dependiente de Keap1 y la degradación por el proteosoma (Tong et al., 2006; Kensler et al., 2007).

Regulación de acción de Nrf2.

En condiciones basales sin presencia de estrés celular, Nrf2 es degradado constitutivamente en el citosol a través de la formación del complejo Nrf2-Keap1, es decir, la degradación de Nrf2 es un evento constitutivo que no requiere ninguna modificación post-transcripcional del sustrato y se ha observado que esto se debe a que Keap1 funciona como un adaptador de sustratos para el proteosoma. En cuanto al mecanismo de degradación de proteínas por el proteosoma, su selectividad y especificidad están dadas por una proteína modificadora de 76 aminoácidos llamada ubiquitina, la cual se unen a las proteínas que se van a degradar. Las proteínas ubiquitinadas son reconocidas por un complejo de proteasas conocido como proteosoma 26S que desdobla y digiere a las proteínas. El proceso de poli-ubiquitinación y reconocimiento el cual requiere de la participación de varias enzimas: las E1 para la activación de las ubiquitinas, las E2 para la conjugación de la ubiquitinas y las E3 para su unión. Existen una gran cantidad de ligasas E3 en los organismos eucariontes y destaca la familia de ligasas denominadas "Cullin-based" (Cul) que juegan un papel importante como andamios o adaptadores (Kobayashi et al., 2004).

Se ha demostrado que Keap1 es un adaptador que se une a Nrf2 con la ligasa Cul-3 (Cullinan SB. 2004). Así, la activación de Nrf2 y su translocación al núcleo dependen directamente de su disociación de Keap1, la cual esta dada a través de la oxidación de las cisteínas contenidas en Keap1 ocasionando la

desestabilización del complejo Nrf2-Keap1 generando la activación de los genes ARE. De tal manera que la proteína Keap1 tiene una función dual, por un lado ser un adaptador de la ligasa Cul-3 para la degradación de Nrf2 y al mismo tiempo un sensor de estrés oxidante. Se ha encontrado que varios inductores de la vía mediada por ARE tienen la particularidad de interactuar con grupos sulfhidrilos, ya sea por oxidación o por alquilación. Esto sugiere que los grupos tioles reactivos dentro de estas proteínas podrían actuar como sensores para la activación de la vía ARE (Tong et al., 2006).

Aún no se ha determinado con certeza cuales son las cisteínas que se modifican en respuesta a los inductores de estrés y electrófilos, se ha observado que las cisteínas 273, 288 y 297 en la región IVR son críticas para la regulación de Nrf2; en estudios mutacionales confirman que las cisteínas 151, 273, y 288 son críticas para la regulación de Nrf2; En ratón, la cisteína 151 fue requerida para la activación de Nrf2 por electrófilos y la cisteína 272 y 288 para la supresión de Nrf2 bajo condiciones normales (Yamamoto et al., 2008). En general se han propuesto algunos residuos de cisteína de grupos tioles que se oxidan o se modifican covalentemente generando la disociación del complejo Nrf2-Keap1 y ocasionando la translocación de Nrf2 del citoplasma al núcleo, uniéndose con proteínas Maf, para reconocer una secuencia consenso y activar sus genes blanco.

Además de la oxidación directa o la modificación covalente de los grupos tioles en Keap1, la actividad de la proteína Nrf2 puede ser modulada por modificaciones post-traduccionales, como pueden ser fosforilaciones en serinas y treoninas por diversas cinasas como fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), proteína cinasa C (PKC), la cinasa del N-terminal de c-Jun (JNK) y la proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK). La fosforilación por estas enzimas facilita el desacoplamiento de Nrf2 con Keap1 y su posterior translocación al núcleo. También se ha encontrado que la proteína cinasa p38 de la familia de las proteínas activadoras de mitógeno (MAP) puede tanto activar como inhibir la translocación nuclear de Nrf2 dependiendo del tipo celular (Itoh K. 2004).

Como respuesta al estrés oxidante, la cascada de señalizaciones mediada por PI3K produce la despolimerización de los microfilamentos de actina, facilitando la translocación nuclear de Nrf2. Además, PI3K también puede fosforilar a la proteína \square de unión al amplificador CCAAT (C/EBP), que a su vez se transloca al núcleo y se une a la secuencia CCAAT del elemento de respuesta a xenobióticos (XRE) de manera paralela a la unión de Nrf2 al elemento ARE, potenciando la respuesta celular (Lee et al., 2004). Una vez que Nrf2 ha logrado translocarse al núcleo, puede dimerizar con las proteínas Maf pequeñas (MafG, MafK, MafF y MafT), con las Maf grandes (c-Maf) o con otras proteínas bZIP como c-Fos, Fra1, p45-NF-E2, Bach1 y Bach2.

Existe una gran cantidad de estudios que tratan de esclarecer la contribución de las proteínas Maf pequeñas a la regulación de genes ARE, sin embargo, a la fecha no se han encontrado diferencias funcionales entre las proteínas Maf pequeñas. Por lo que se ha llegado a la conclusión de que las proteínas Maf se unen con el factor de transcripción Nrf2 para estabilizar su unión a las secuencias ARE y activar los genes de respuesta antioxidante. También se sabe que las homo y heterodímeros de las Mafs pequeñas pueden formar represores de la transcripción debido a la pérdida de su dominio de transactivación (Dhakshinamoorthy S. 2000).

Genes blanco de Nrf2

En general, los principales genes blanco que regula Nrf2 a través de la unión con su secuencia consenso ARE se pueden clasificar en tres importantes grupos: a) Genes reguladores del estado redox intracelular, tales como hemoxigenasa1, NAD(P)H quinona oxido-reductasa 1 y tioredoxinas (HO-1, NQO1, Trx), entre otros; b) genes de destoxificación fase II, incluyendo glutatión S transferasa y glutamato cisteína ligasa (GST y GCL) entre otros; y c) genes transportadores acoplados a ATP (del inglés cassette binding ATP) ABC y proteínas resistentes a multidrogas (del inglés multidrug resistance protein MRP); Además de algunos genes encargados de la degradación de proteínas (Kwak M-K. 2003), proliferación celular (Malhotra et al. 2010), y reprogramación metabólica (Mitsuishiet al., 2012).

La enzima HO-1 conocida también como proteína de choque térmico 32, es la principal enzima implicada en el paso limitante del catabolismo de grupos hemo pro-oxidantes, para la formación de hierro libre, monóxido de carbono y biliverdina que posteriormente es metabolizada a bilirrubina. Otras enzimas que participan en los procesos antioxidantes son la enzima NQO1 encargada de reducir a las quinonas con dos electrones. En total se han reportado más de 100 genes involucrados en la respuesta antioxidante y muchos de ellos se localizan en compartimentos específicos dentro de la célula para regular las vías de señalización en el medioambiente local. Cabe mencionar que algunos reguladores como p62 y DJ-1, activan Nrf2 y son inducidos por oxidantes a través de Nrf2, creando una retroalimentación positiva (Ma, 2013).

La enzima GST participa en los procesos de conjugación y detoxificación a través de la conjugación de electrófilos hidrofóbicos, ERO, ERN, fármacos y xenobióticos con el glutatión (GSH), el cual es sintetizado por la enzima la gama-glutamil cisteina sintetasa (γ -GCS); la UDP-glucuronosil transferasa encargada de catalizar la conjugación del ácido glucurónico con xenobióticos y drogas promoviendo su detoxificación y su excreción.

En la última década se ha propuesto que Nrf2 participa en la activación de algunos transportadoras ABC y MRPs, capaces de transportar metabolitos y fármacos a la región extracelular con la finalidad de disminuir el efecto citotóxico (Ma, 2013; Adachi et al., 2007; Klaassen y Slitt 2005).

ANTECEDENTES

Nrf2 y cáncer

La evidencia muestra en células normales la importancia del factor de transcripción Nrf2 como un modulador del estrés oxidante a través de la activación de mecanismos de defensa tales como enzimas antioxidantes, enzimas de conjugación y moléculas detoxificantes. Sin embargo es necesario analizar su papel tanto en células normales como en células cancerígenas, ya que existe una indiscutible dicotomía en el papel de Nrf2 y en la batería de genes que regula con respecto a la quimiopreención del cáncer y en la quimiorresistencia de células cancerígenas (Hayes y McMahon, 2009).

Aunque el efecto citoprotector que genera Nrf2 es importante en la quimiopreención en tejido normal y premaligno, se ha reportado en células cancerígenas que la sobre actividad de Nrf2 desarrolla ventajas en la citoprotección y en la quimioresistencia a través de genes reguladores del estrés oxidante y detoxificantes, además de alterar la proliferación celular dirigiendo la glucosa y la glutamina a vías anabólicas, incrementando la síntesis de purinas y promoviendo el ciclo de las pentosas hacia la síntesis de material genético para la proliferación celular (Motohashi H, Yamamoto M. 2004; Zhang, 2006; Osburn WO, et al. 2006). Se han descrito varios patrones de señalización involucrados en la desregulación de la expresión de Nrf2, los cuales están activados constitutivamente, tales como: (1) Mutaciones somáticas en Keap1 o el dominio de unión de Keap1 con Nrf2, relacionados con su regulación negativa (2) Silenciamiento epigenético de la expresión de Keap1 dando como resultado una represión defectuosa de Nrf2; (3) Acumulación de proteínas disruptoras como la proteína p62, permitiendo la disociación del complejo Keap1-Nrf2; (4) Inducción transcripcional de Nrf2 por K-Ras, B-Raf, c-Myc y genes oncogénicos y (5) Modificaciones post-traduccionales de las cisteínas de Keap1 por succinilización que ocurre en carcinoma renal papilar debido a la pérdida de actividad de la enzima fumarato hidratasa (Bataille y Manautou, 2012).

Recientemente se ha reportado que Nrf2 está sobreexpresado en numerosos tipos de cáncer, como el de cuello, cabeza (Stacy et al., 2006), pulmón (Shibata et al. 2008b; Ohta et al., 2008; Singh et al., 2006), piel (Kim et al., 2010), vesícula biliar (Shibata et al., 2008a), mama (Nioi y Nguyen, 2007), próstata (Zhang et al., 2010), y de endometrio (Jiang et al., 2010). Además de varias mutaciones en Nrf2 o Keap1, que generan la desestabilización del complejo Keap1-Nrf2 las cuales se han identificado en diferentes tejidos y líneas celulares cancerígenas (Jiang et al., 2010).

En un estudio extenso de 304 especímenes de cáncer pulmonar, un análisis inmunohistoquímico en células pequeñas de cáncer de pulmón mostro alta expresión de NRf2 en el rango entero de carcinomas en muchos pacientes, mientras un baja expresión relativa de Keap1 fue solamente vista en pacientes con adenocarcinomas. Ambas anomalías podrían estar correlacionadas con un pobre pronostico, ya sea por recurrencia o supervivencia no mayor a 5 años (Solis et al., 2010).

Evidencia similar ha sido reportado en un estudio de 30 pacientes con carcinoma de ovario epitelial, el cual muestra evidencia de Nrf2 nuclear en más de la mitad de las pacientes, en contraste a una nula evidencia en los controles, asociada con una desregulación de los genes dependientes de Nrf2, además de mutaciones en *Keap1* o ausencia en su expresión. Un hallazgo interesante en este estudio es la posible correlación entre los niveles altos de *Nrf2* con una relativa resistencia a los agentes quimioterapéuticos a base de platino y una baja tasa de supervivencia (Konstantinopoulos et al. 2011).

Además de las evidencias presentadas en diversos estudios clínicos, existen estudios en líneas celulares de cáncer y en animales, que muestran la capacidad de Nrf2 para generar resistencia a agentes quimioterapéuticos, estos estudios han incluido una amplia gama de fármacos, tales como cisplatino, carboplatino, 5-fluorouracilo, paclitaxel, bleomicina, doxorubicina y etoposidos (Shibata et al., 2008; Homma et al., 2009; Jiang et al., 2010).

Interesantemente, los fenómenos de resistencia podrían estar explicados por una serie de aspectos regulados por el factor de transcripción Nrf2, los cuales incluyen el metabolismo y la disminución en la acumulación del fármaco dentro de la célula, a través de la participación de enzimas antioxidantes, enzimas de conjugación, enzimas destoxicantes y proteínas de transporte (Baird y Kaye, 2003; Homma S, et al 2009; Li y Kong, 2009; Ohta et al., 2008; Jiang et al., 2010)

Existen estudios sobre la participación de las moléculas destoxicantes reguladas por el factor de transcripción Nrf2 en cáncer y su relación con el proceso de quimiorresistencia. Se ha encontrado en modelos animales que varios de los genes inducidos por agentes quimioprotectores en células normales, tales como la enzima GST, se encuentran también sobreexpresados en los nódulos preneoplásicos hepáticos (Hayes y McMahon, 2009). Algunos estudios han mostrado que la sobre expresión en los niveles de HO-1, NQO1 y GSH inhiben la apoptosis e incrementan en forma sinérgica la sobrevivencia en células cancerígenas. NQO1 actúa a través de destoxicación de drogas, mientras que HO-1 contribuye en la citoprotección por atenuación del estrés oxidante por el fármaco y disminución de la apoptosis (Hayashi et al., 2003). La sobre regulación de moléculas de defensa antioxidantes pueden incrementar la proliferación y la quimioresistencia en células de cáncer a través del metabolismo de agentes anticancerígenos y el aumento en la tolerancia citotóxica generada por fármacos anticancerígenos. (Homma et al., 2009; Li y Kong, 2009; Ohta et al., 2008).

En el caso de la participación de moléculas destoxicantes de fase III se ha propuesto la participación de transportadores acoplados a bombas ATP (transportadores ABC) capaces de transportar a la región extracelular una gran variedad de sustratos, incluyendo azúcares, aminoácidos, iones metálicos, péptidos, proteínas, compuestos hidrófobos, xenobióticos y fármacos con la finalidad de disminuir el efecto citotóxico (Ishikawa, 1992; Dean et al., 2001; Fojo et al., 1987; Baird y Kaye 2003; Szakacs et al., 2006). Recientemente esta capacidad de transportar los fármacos a la región extracelular ha despertado

interés en los procesos de quimiorresistencia, ya que se ha asociado que el incremento en la expresión de estas proteínas podrían jugar un papel importante en la farmacocinética y/o en la farmacodinámica de los medicamentos usados en la quimioterapia (Shibata et al., 2008; Jiang et al., 2010).

Para evidenciar la participación de estos transportadores en los procesos de quimiorresistencia, se ha estudiado la expresión de algunos en diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, en humanos la familia de los transportadores ABCC o MRP, principalmente MRP1-MRP3 juegan un papel importante en los procesos de quimiorresistencia (Borst et al., 2000). En otro estudio se ha demostrado en células de cáncer de próstata que el transportador ATP7B está asociado a la resistencia de cisplatino (Komatsu et al., 2000). En un estudio realizado por Sugeno H. Et al. 2004, evaluó la participación del transportador ATP7B usando anticuerpos monoclonales en 19 muestras de tejido de hepatocarcinoma primario y tejido normal, los resultados mostraron incremento de ATP7B en tejido cancerígeno comparado con el tejido normal. En cáncer pancreático (Hong et al., 2010) los resultados mostraron que la expresión del transportador ABCG2 correlacionó con la resistencia a drogas. En otro estudio observaron que el incremento de los genes *ABCB4* y *ABCB11* por transfección en hepatocitos generan quimiorresistencia., *ABCB4*, es un gen encargado de codificar la proteína MRP3 asociada con colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 3 y en cáncer hepático (Hong et al., 2010).

Adachi Et al. 2007 encontraron incremento en los niveles de ARN mensajero de los transportadores *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3* (MRP1, MRP2, MRP3) y *ABCG2*, al igual que una sobre activación en las cadenas ligeras y pesadas de la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa con el tratamiento de *tert-butylhydroquinona* (TBHQ), un potente inductor de Nrf2, el cual generó sobre activación de este factor de transcripción y su translocación al núcleo.

En un estudio realizado en células de cáncer pulmonar se evaluó el rol de la vía Nrf2 –ARE en la regulación de MRP1, en el que mostraron en las células H69AR incremento en la actividad de la vía Nrf2-ARE y en la expresión de MRP1 al inducir estrés, evidenciando una relación entre Nrf2 y el transportador MRP1 (Ji L, 2013). La familia de genes de MRP han sido identificados como blancos de Nrf2 (Maher et al., 2007; Okada K. 2008).

Homma et al., 2009 mostraron en células A549 de cáncer de pulmón que la expresión de los genes antioxidantes y destoxicantes esta regulada por Nrf2, tales como las subunidades catalítica y moduladora de γ -glutamyl cisteína sintetasa (GCLc y GCLm), HO-1, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, NQO1, Trx, y sus genes relacionados, incluyendo las bombas de eflujo de drogas dependientes de ATP (MRP1 y MRP2) al igual que el transportador ATP7A.

Ji et al., 2013 mostraron en células de cáncer de pulmón H69 incremento en la expresión de NQO1, MRP1, MRP2, Keap1, NRF2, HO-1, GST, TXN, MYC, RAS ante el tratamiento con cisplatino, doxorubicin, etoposido. Mientras que el grupo de Kwak mostró que la inhibición de Nrf2 sensibiliza a las células de carcinoma de ovario ante la exposición de cisplatino y doxorubicin (Shim et al., 2009; Cho et al., 2008).

El grupo de Biswal mostro que el silenciamiento de Nrf2 en células de cáncer pulmonar tienen una respuesta al tratamiento con carboplatin *in vivo* comparado con el control (Singh et al. 2008).

La resistencia a fármacos es el mayor obstáculo en el tratamiento de carcinomas malignos, es un fenómeno en el que las células cancerosas exhiben una sensibilidad reducida a un gran grupo de fármacos con diferentes mecanismos de actividad farmacológica, presente tanto en la terapia primaria (intrínseca) o adquirida durante o después del tratamiento (Fojo et al., 1987).

Algunos de los fármacos actúan en la replicación celular como son agentes alquilantes, los cuales forman aductos en el ADN que impiden la replicación del material genético, incrementando el estrés celular y activando de mecanismos de reparación que pueden dirigir hacia arresto del ciclo celular o a muerte.

Ciclo celular y cáncer

Estudios recientes han demostrado que drogas quimioterapéuticas tales como cisplatino están involucradas en la inhibición del ciclo celular, especialmente en mitosis y en la replicación del ADN a través del eje molecular p53/p21, la proteína p53 encargada de censar el daño ocasionado por el fármaco, es capaz de activar mecanismos de reparación, sin embargo ante el incremento del estrés celular p53 activa a la proteína p21 para arrestar el ciclo celular, generando una respuesta positiva en el tratamiento, estudios realizados en cultivo celular de HepG2 mostraron arresto del ciclo celular a concentraciones moderadas de cisplatino (Qu et al., 2013). De tal manera que las células cancerosas con p53 funcional son más susceptibles al tratamiento que aquellas con p53 mutado, como es el caso entre las células de cáncer hepático HepG2 y Huh7. La línea celular HepG2 sin mutación en p53 proviene de un hepatoblastoma, mientras que la línea celular Huh7 con p53 mutado es capaz de generar metástasis.

Objetivo General

Determinar el papel de Nrf2 y sus genes blanco en la sobrevivencia, proliferación y quimiorresistencia en líneas celulares derivadas de cáncer hepático.

Objetivos Particulares

- Determinar el efecto del tratamiento de cisplatino sobre la viabilidad y proliferación en la líneas celulares de cáncer hepático HepG2 y Huh7.
- Determinar las fases del ciclo celular en la línea HepG2 tratada con cisplatino y la expresión de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular.
- Determinar la participación de las proteínas Nrf2, γ -GCS, NQO1, HO-1 en el proceso de citoprotección en la línea HepG2 en repuesta al tratamiento con cisplatino.
- Determinar la participación de los genes transportadores *ATP7B*, *MRP2*, *MRP3* y *CTR1* en la línea HepG2 en respuesta a la exposición del agente quimioterapéutico cisplatino.

Hipótesis

El cisplatino inducirá incremento en la activación de Nrf2 y de sus genes blanco los cuales participarán como un mecanismo citoprotector en las líneas celulares de tumores hepáticos, capaz de generar quimiorresistencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular:

Se utilizaron dos tipos de línea celular de cáncer hepático, HepG2 de un hepatoblastoma y Huh7 derivada de un hepatocarcinoma. Las células fueron cultivadas por separado en medio Williams's completo (medio W-completo, Gibco BRL), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/mL de ampicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Costar) y el medio de cultivo se cambio cada tres días. Cuando las células llegaban a confluencia, se cosechaban con tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma) y se resembraban a una dilución 1:2. Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad, a una temperatura de 37 °C.

Ensayo de viabilidad y proliferación:

Para determinar la viabilidad y proliferación las células HepG2 y Huh7 se sembraron 15,000 células por cm² a una densidad del 80 % en una placa de 96 pozos, posteriormente fueron expuestas a diferentes concentraciones del agente quimioterapéutico cisplatino. En las células de cáncer HepG2 se utilizaron 2.5, 5, 10 µM de cisplatino y para Huh7 se expusieron a 5, 10 y 30 µM de cisplatino durante 24, 48 y 72h. El efecto citotóxico del cisplatino se determinó mediante el uso del ensayo comercial Cell Counting-8 (CCK-8) (Dojindo Inc.) el cual consiste en la reducción de la sal de tetrazolio, WST-8, por medio de la actividad de la deshidrogenasa en células en una reacción colorimétrica. Siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, tras el período de tratamiento, las células se incubaron con el reactivo CCK-8 a 37°C durante una hora. Al término, las placas se leyeron a una longitud de onda de 490 nm.

Extracción proteínas

Al término de los tratamientos, se extrajeron las proteínas con el fin de analizar el contenido de la expresión de las proteínas Nrf2, NQO1, HO-1, α -GCS por la técnica de Western blot. Al finalizar el tratamiento las células se lavaron con PBS estéril y se agregaron 100 μ L del amortiguador de lisis, formado por 10 mL de reactivo de extracción de proteína M-PER (Pierce Biotechnology, USA), 100 μ L de Dithiothreitol (DTT) 1M, 100 μ L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo PMSF 1M, una pastilla de inhibidor de proteasas (Complete, Roche Applied Science, Indianapolis, USA) y una pastilla de inhibidor de fosfatasa (PhosphoStop, Roche Applied Science, Indianapolis, USA). Se obtuvo el extracto celular y fue centrifugado a 14,000 rpm debes poner la velocidad de la centrifuga en 15,000 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se almacenó a -80 °C hasta el momento de la determinación.

Determinación de la concentración de proteína

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método del ácido bicinónico o BCA (Pierce Biotechnology, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomó una alícuota del 5 μ L de las muestras y se le agregó 200 μ L de reactivo BCA diluido 1:50 y se incubó por 30 min a 25 °C. Se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina de 0.1-0.5 mg/mL. Posteriormente se leyó la absorbancia en un Multimode Detector (DTX880, Beckman Coulter) y se determinó la concentración de la proteína utilizando la curva estándar de albúmina sérica de bovino.

Western Blot

El ensayo de Western blot se realizó de acuerdo con el método descrito por Valdés-Arzate *et al.* (2009). Se tomaron 100 µg de la proteína total y se le agregó amortiguador de muestra 2X formado por Tris-HCl 0.1 M pH 6.8, glicerol, SDS al 20 %, 2-b-mercapto etanol y azul de bromofenol al 0.1 %. Las muestras se dejaron 5 min a 95°C y se corrieron en geles de 10 % en un amortiguador formado por Tris HCl 1.5M pH 8.8, SDS al 10%. Después, las muestras se dejaron correr en una cámara de electroforesis, BioRad, con un amortiguador de corrida formado por Tris-Base 0.125M, glicina 0.96M y SDS al 0.5% a 120 volts por 90 min. La proteína se transfirió a una membrana de difloruro de Polivinilideno (PVDF, G.E. Health care amersham Pharmacia Biotechnology, USA), usando un amortiguador de transferencia preparado por Tris-Base 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, SDS al 0.05% y metanol al 20% por 14 h a 30 Volts a 25 °C. Posteriormente la membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada al 5 % en amortiguador TBS-Tween formado por NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM y Tween 20 al 0.1 % pH 7.5 durante 30 min dos veces. Al finalizar, se lavó con TBS-Tween 20 varias veces y se le agregó un anticuerpo primario específico para cada proteína: Nrf2 (Santa Cruz) 1:500; NQO1 (Santa Cruz) 1:500; (GCS 1:500 (Santa Cruz); HO-1 (Cell Signaling) 1:1000; p21 1:500 (Santa Cruz) cdk2 1:500 (Santa Cruz); Actina 1:8000 (General electric) durante 24h a 4°C. Lavar con TBS-Tween suplementado con leche durante 10 minutos dos veces. Posteriormente agregar el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa a una dilución 1:10000 (Santa Cruz, Biotechnology) por 1h. La membrana se lavó con TBS-Tween durante 10 min por triplicado y por ultimo un lavado con TBS. Finalmente la membrana se trato con el kit SuperSignal West Pico Substrate (Pierce Biotechnology, USA) durante 5 min y se determinó la expresión de la proteína por densitometría en un equipo imaging system gel logic 1500 (Kodak).

Microscopia confocal:

Para la preparación de muestras para microscopía confocal, las células crecieron sobre un cubre estéril en medio de cultivo completo hasta una confluencia del 60-80%. A continuación, se eliminó el medio de cultivo en placa, se levantaron con PBS y se incubaron durante veinte minutos en 1 % de BSA en PBS a temperatura ambiente se fijaron en paraformaldehído al 2 % de durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se eliminó el paraformaldehído de la placa y se hicieron tres lavados de 5 minutos con PBS a temperatura ambiente. Se colocó el anticuerpo primario para Nrf2 y p53 Santa Cruz (1:500) durante 3 horas hecho en conejo, posteriormente fue bloqueado con solución de bloqueo al 5 % y lavado con PBS, después fue colocado el anticuerpo secundario durante una hora, Los núcleos fueron marcados con Dapi en señal azul, Nrf2 marcado con A488 en señal verde, p53 marcado con A495 en señal roja, al término fue lavado con PBS para remover el exceso de el anticuerpo. Por último, se retiró el cubre de la placa y se colocó sobre un portaobjetos en el que previamente se había puesto una gota de medio de montaje (Vectashield). Las imágenes de las células con y sin tratamiento fueron obtenidas con un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 780 NLO. Se usó una longitud de onda de excitación del láser de 488 nm y una ventana de emisión de 500-530 nm.

Expresión de genes de detoxificación

Extracción de ARN.

A partir de las líneas celulares de cáncer hepático tratadas con cisplatino se extrajo el ARN total mediante el método de trizol. Para ello, se agregó 500 µL de trizol a cada muestra, se centrifugó a 12,000g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y fueron incubados durante 5 min entre 15 a 30°C para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se agregaron 0.2 mL de cloroformo por cada mL de trizol. Los tubos se agitaron vigorosamente por 15 seg y se incubaron de 2 a 3 min entre 15 a 30°C. Pasado ese tiempo, se centrifugaron los tubos a 12,000 xg a 4°C y la fase acuosa se transfirió a otro tubo al cual se le

agregó 0.5 mL de alcohol isopropílico (2- propanol). Se incubó por 10 min entre 15 a 30°C y se centrifugó durante otros 10 min a 12,000 xg a 4°C. Al pellet se le agregaron 1.5 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 7.500xg durante 5 min. Finalmente, el pellet se resuspendió en 30 μ L de agua tratada con DEPC y se incubó durante 10 min a 55°C. El ARN extraído se mantuvo a -80°C hasta su utilización.

RT-qPCR

Para realizar la expresión de los ARN de transportadores se realizó el ensayo de RT-qPCR. Partimos de concentraciones determinadas a la integridad del ARN para la síntesis de cDNA, tomando en cuenta el protocolo del kit de Quiagen.

Las amplificación del ARN de cada gen fue realizada a través del Rotor-Gene Q de Qiagen con las siguientes condiciones:

Gen	Condiciones
RP13	50 °C/10 min activar enzima RT 95 °C/5 min inactivar enzima RT 95 °C/10 seg; 60 °C/30seg. Ciclaje; 35 ciclos
MRP3	50 °C/10 min activar enzima RT 95 °C/5 min inactivar enzima RT 95 °C/15 seg; 62 °C/15 seg; 72 °C/30 seg. Ciclaje; 38 ciclos
ATP7B	50 °C/10 min activar enzima RT 95 °C/5 min inactivar enzima RT 95 °C/15 seg; 62 °C/15 seg; 72 °C/30 seg. Ciclaje; 38 ciclos
CTR1	50 °C/10 min activar enzima RT 95 °C/5 min inactivar enzima RT 95 °C/15 seg; 62 °C/15 seg; 72 °C/30 seg. Ciclaje; 38 ciclos

Tabla 1.- Secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el ARNm que codifica para los siguientes genes.

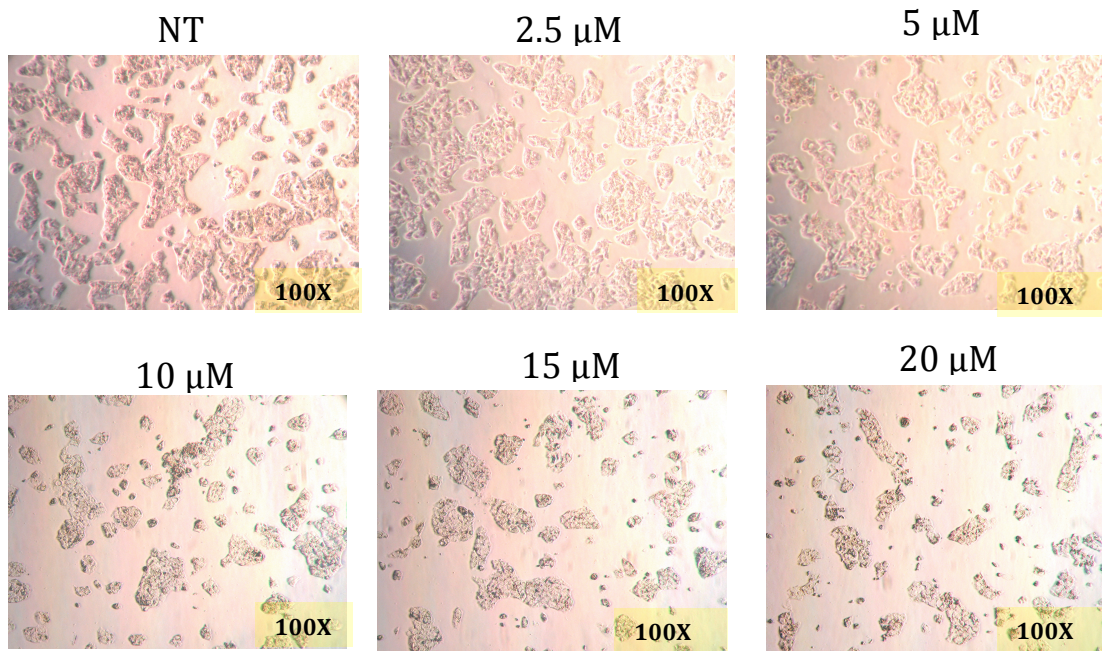
Name	Forward	Reverse	Length	Sequence
<i>ATP7B</i>	Cattccagga ctgtccattct	Ggcctgaacgt agaagtacca	91	cattccaggactgtccattctaatactcatctcttattctgtgtacc ttgtccagctcctcgggtgggtggtacttctacgttcaggcc
<i>MRP2</i>	Ctggatcacct ccaacagggt	agaagacagtc aggtccaac	65	ctggatcacctccaacagggtggcttgcaattcgctggagctgg tgggaacctgactgtcttct
<i>MRP3</i>	Cctggctgtgc tctacacct	Gattccagcgg cttcagtt	72	cctggctgtgcctcaccttagtgcagcggcttctatgcagccac atcacggcaactgaagcggctggaatc
<i>CTR1</i>	Atgccatggg atttgaat	Gatcataaaggt atctggcctca	87	atgccatgggatttgggaatgggcaattgctgtctccagggtgacat tccaagcctgcagtatatctgaggccagatacctttatgatc

Tabla 1. Muestran las secuencias de los oligonucleótidos de cada uno de los genes que fueron analizados.

RESULTADOS

Las líneas células HepG2 y Huh7 fueron tratadas con diferentes concentraciones (2.5, 5, 10, 15 y 20 μ M) de cisplatino durante 24h para analizar la morfología del cultivo celular. Las células fueron observadas en microscopía óptica al término del tratamiento. Ambas líneas celulares mostraron deterioro del cultivo conforme incrementa la dosis del fármaco. En la línea celular HepG2 (Figura 1A) la morfología se mantiene semejante a las células no tratadas a la concentración de 2.5, sin embargo a concentraciones mayores de 10 μ M se observa una menor cantidad de células, células redondeadas y con una morfología que sugiere daño celular. En el cultivo de la línea celular Huh7 (Figura 1B) se observa que con concentraciones de 2.5, 5, 10 y 15 μ M de cisplatino la morfología es muy semejante a las células no tratadas mientras que con 20 μ M se observa una morfología que sugiere daño celular. Estos datos sugieren una mayor susceptibilidad al efecto citotóxico por cisplatino en la línea celular HepG2.

A)



B)

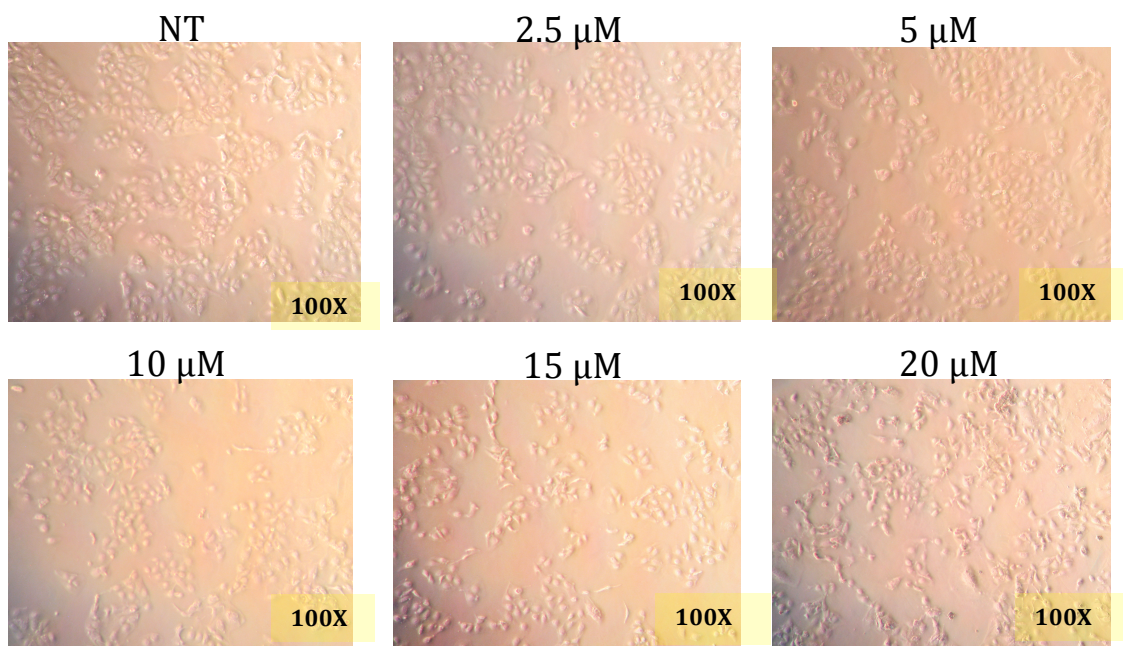
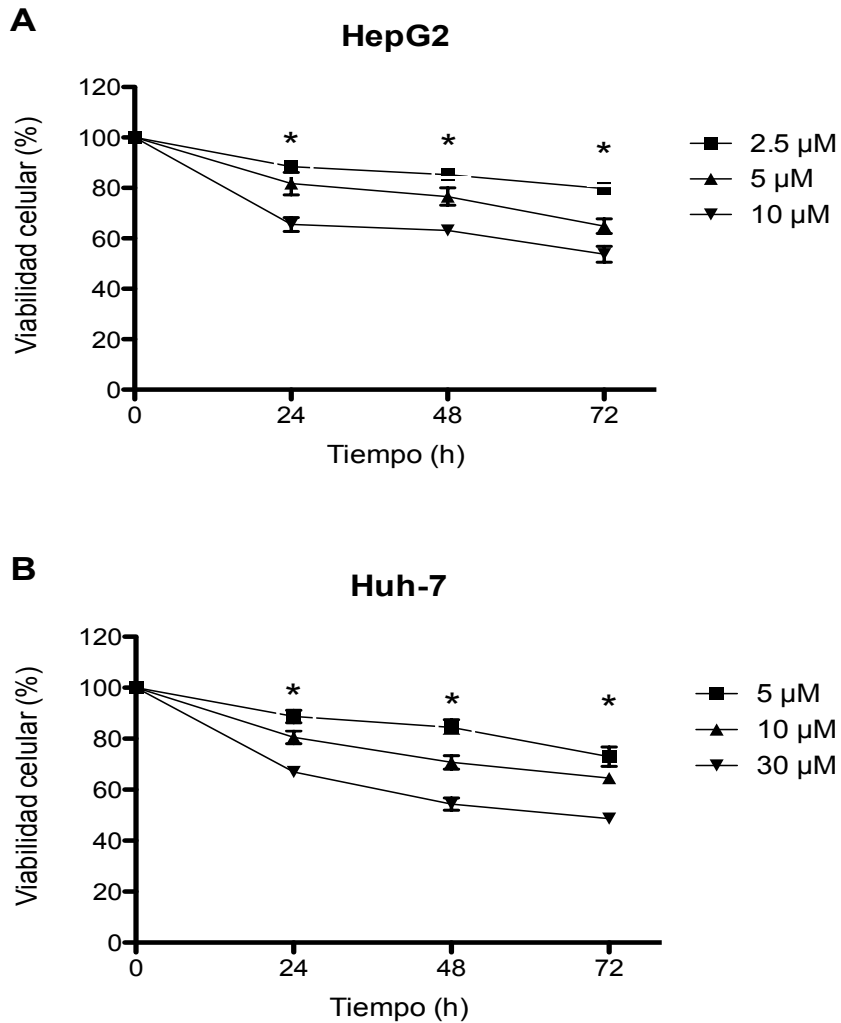


Figura 1.- Microfotografías de microscopía óptica de células HepG2 y Huh7 tratadas por diferente periodo con cisplatino. A) HepG2 y B) Huh7 con exposición de diferentes concentración de cisplatino 2.5, 5, 10, 15 y 20 μM durante 24h. Se observa deterioro en la morfología del cultivo celular a medida que incrementa la dosis del tratamiento y el tiempo de exposición. Sin embargo bajo las concentraciones de 2.5 y 5 μM de cisplatino no se observan cambios drásticos.

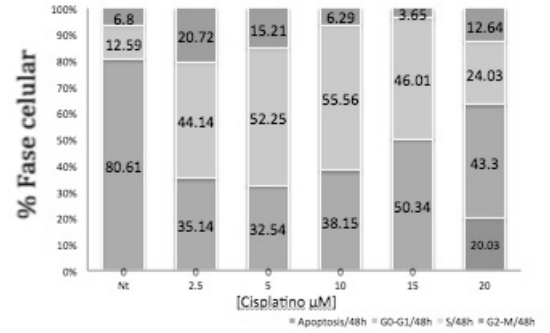
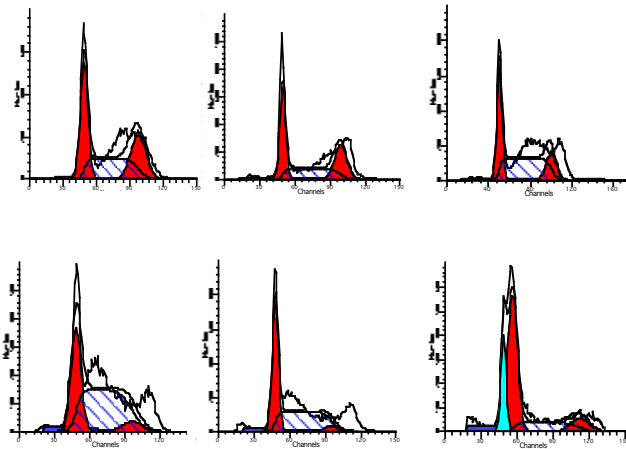
Posteriormente se evaluó el efecto citotóxico del cisplatino sobre la viabilidad y proliferación celular en ambas líneas celulares. En la Gráfica 1A se muestra que la línea HepG2 disminuye su viabilidad de forma más notoria durante las primeras 24 hs de tratamiento con cisplatino en todas las concentraciones utilizadas. Se observa un 10% de disminución en la viabilidad con 2.5 μ M de cisplatino a las 24 hs de exposición, sin cambios aparentes en la proliferación a 48 y 72 hs, lo que sugiere un efecto citoestático. Asimismo se observa que conforme incrementa la concentración del fármaco se observa un incremento del efecto citotóxico. En la línea celular Huh7 (Gráfica 1B) se observa una disminución significativa a partir de 5 μ M de cisplatino, con un comportamiento similar a la línea HepG2. Estos datos sugieren que a concentraciones de 2.5 y 5 μ M en ambas líneas celulares, se podría inducir un sistema citoprotector que mantiene a las células con una alta viabilidad, pero sin capacidad de proliferar, posiblemente un efecto citostático.



Gráfica 1. Proliferación de las líneas celulares de cáncer hepático HepG2 y Huh7 tratadas con diferentes concentraciones de cisplatino por distintos periodos.A) Curva de proliferación de la línea celular HepG2 a concentraciones de 2.5, 5 y 10 μ M de cisplatino. Se observa una disminución en la proliferación a partir de una concentración de 10 μ M de cisplatino. Grafica B) Curva de proliferación de la línea celular Huh7, los datos muestran una disminución a partir de 30 μ M de cisplatino. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una vía con una prueba estadística Tukey y un nivel de significancia de $*p < 0.05$. La viabilidad celular fue calculada relativa a los controles (100 %) y expresada las medias \pm SE de tres experimentos independientes. El ensayo fue realizado por el kit Cell Counting-8 (CCK-8).

Dado que las células Huh7 tienen mutado el gen de p53 y este está relacionado con el control del ciclo celular, el estudio se continuó en las células HepG2 únicamente. Para evaluar si se produce una respuesta citoestática en la línea celular HepG2 se analizaron las fases del ciclo celular por citometría de flujo. Los resultados mostraron un mayor porcentaje de células en fase de síntesis (S) a concentraciones de 2.5, 5 y 10 μ M de cisplatino a 48 y 72 hs (Figura 2A y 2B). Se observa que a 2.5 μ M hay mayor porcentaje celular en fase S tardía la cual va recorriéndose hacia G1 al incrementar la concentración a 5 y 10 μ M. Sin embargo a la concentración de 20 μ M se observa un 20% y un 39% de células en apoptosis a las 48 y 72 hs respectivamente.

2A)



2B)

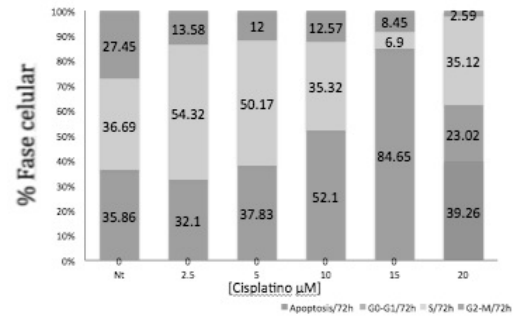
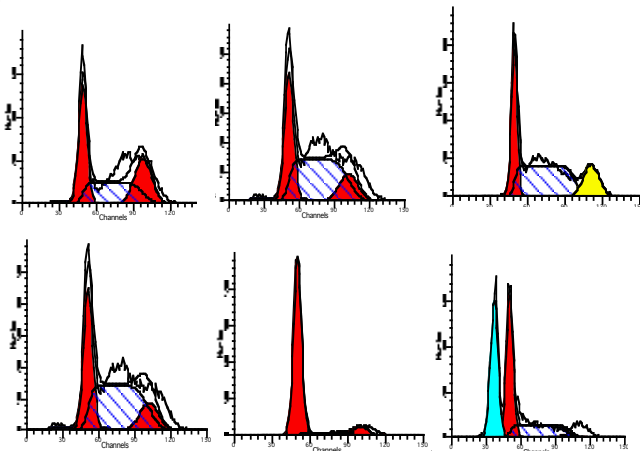


Figura 2.- Análisis del ciclo celular de la línea HepG2 tratada con diferentes concentraciones de cisplatino a 48 y 72 hs por citometría de flujo. A) Análisis del ciclo celular de la línea celular HepG2 a concentraciones de 2.5, 5, 10, 15 y 20 μM de cisplatino durante A) 48h y B) 72h. Se observa incremento en el porcentaje de la fase de síntesis del ciclo celular a concentraciones de 2.5 y 5 μM de cisplatino a 48h. A 72h el comportamiento se mantiene.

Con el fin de corroborar el efecto citoestático se analizó la expresión de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, p21 y cdk2. Los resultados muestran un incremento significativo de p21 y una disminución de cdk2a 2.5 y 5 μ M de cisplatino, lo que sugiere la presencia de un efecto citoestático desde las 24 hs de exposición con el fármaco.

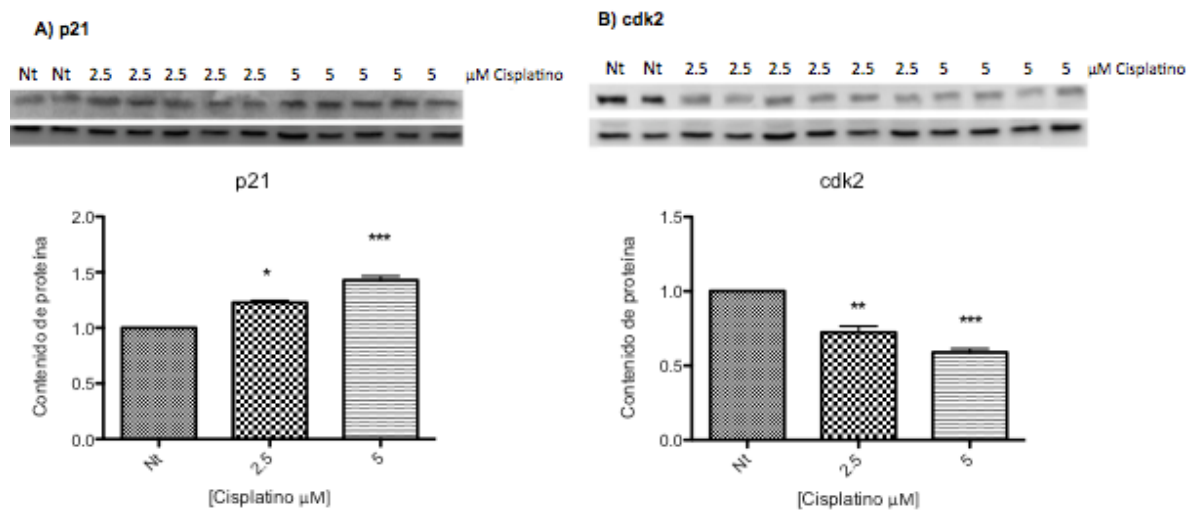


Figura 3.- Expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular en la línea celular HepG2 tratadas con cisplatino A) proteína p21 B) proteína Cdk2. Se observa un incremento en la expresión de la proteína p21 encargada de la inhibición del ciclo celular, y disminución de la proteína Cdk2 la cual participa en la promoción del ciclo celular. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una vía con una prueba estadística Tukey y un nivel de significancia de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Para estudiar la participación de proteínas citoprotectoras dependientes de Nrf2 en las células HepG2 tratadas con 2.5 y 5 μ M de cisplatino durante 24 hs, se determinó la expresión de las proteínas Nrf2 y de sus genes blanco NQO1, HO1 y α -GCS (Figura 4). Los resultados mostraron un incremento significativo en las cuatro proteínas determinadas a concentraciones de 2.5 y 5 μ M del fármaco. La expresión de la proteína Nrf2 se incrementó un 50 y un 100 % en comparación con su control no tratado con 2.5 y 5 μ M de cisplatino respectivamente. En el caso de la proteína NQO1, se observa un incremento del 100% a 2.5 μ M y aproximadamente 200% a la concentración de 5 μ M de cisplatino. Para la proteína HO1 se observa un aumento del 15 y 65% a las concentraciones de 2.5 y 5 μ M del fármaco respectivamente. Mientras que para la proteína α -GCS presenta un incremento del 50 y 270% con 2.5 y 5 μ M comparadas con su control no tratado. Los resultados en conjunto muestran un incremento en la expresión de las proteínas estudiadas, lo que sugiere un efecto citoprotector.

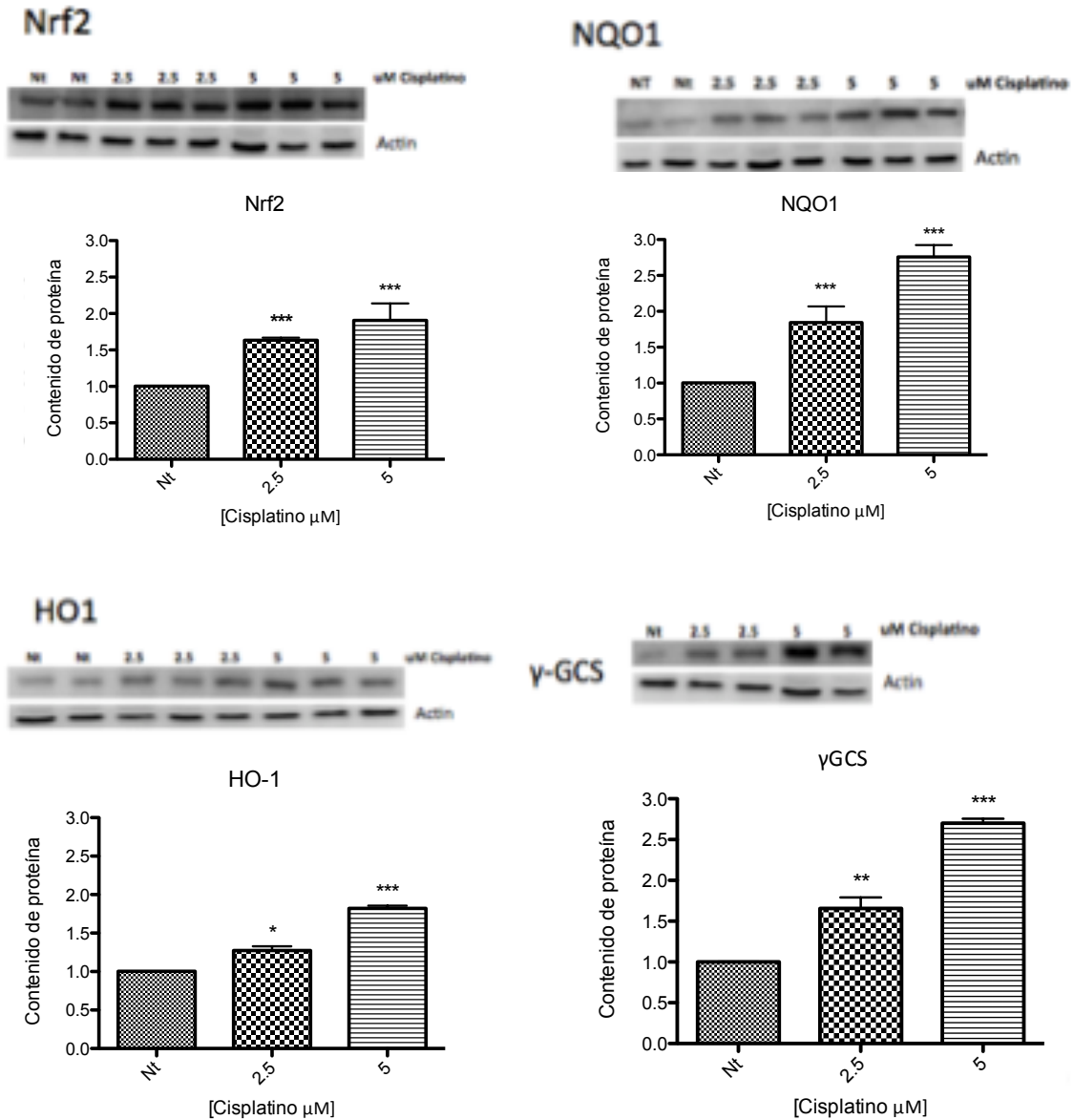


Figura 4.- Expresión de Nrf2 y de las proteínas de detoxificación asociadas a Nrf2 en la línea celular HepG2 tratadas con cisplatino A) Factor de transcripción Nrf2; B) NQO1; C) HO-1 D) γ -GCS. Se observa incremento en la expresión de las proteínas al ser expuestas a concentraciones de 2.5 y 5 μ M de cisplatino. Cada columna representa la media + D.E. de al menos tres experimentos independientes * $p < 0.05$ contra las células sin tratamiento. El análisis por análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una vía con una prueba estadística Tukey y un nivel de significancia de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Dado que Nrf2 también está involucrado en la inducción de transportadores importantes en el hepatocito, se determinó la expresión de los genes de los transportadores *ATP7B*, *MRP2*, *MRP3* y *CTR1* en la línea celular HepG2 tratadas con las diferentes concentraciones (2.5, 5, 10, 15, 20 y 30 μ M) de cisplatino (Figura 5). Los resultados mostraron que el gen del transportador *ATP7B* incrementó 2.5 y 1.6 veces más con 2.5 y 5 μ M de cisplatino, mientras que a concentraciones mayores a 10 μ M la expresión del gen disminuyó. Para los genes transportadores *MRP2* y *CTR1* se mostró un incremento de 0.5 veces con concentraciones menores a 5 μ M de cisplatino. En el caso del gen transportador *MRP3* se mostró un incremento significativo a concentraciones de 10 y 15 μ M de cisplatino, lo que sugiere que *MRP3* podría estar activándose bajo un estímulo agudo de cisplatino. En general los datos muestran un incremento en la expresión de los genes transportadores, lo cual sugiere una posible disminución en las concentraciones intracelulares de cisplatino, lo que se traduciría como un menor daño celular.

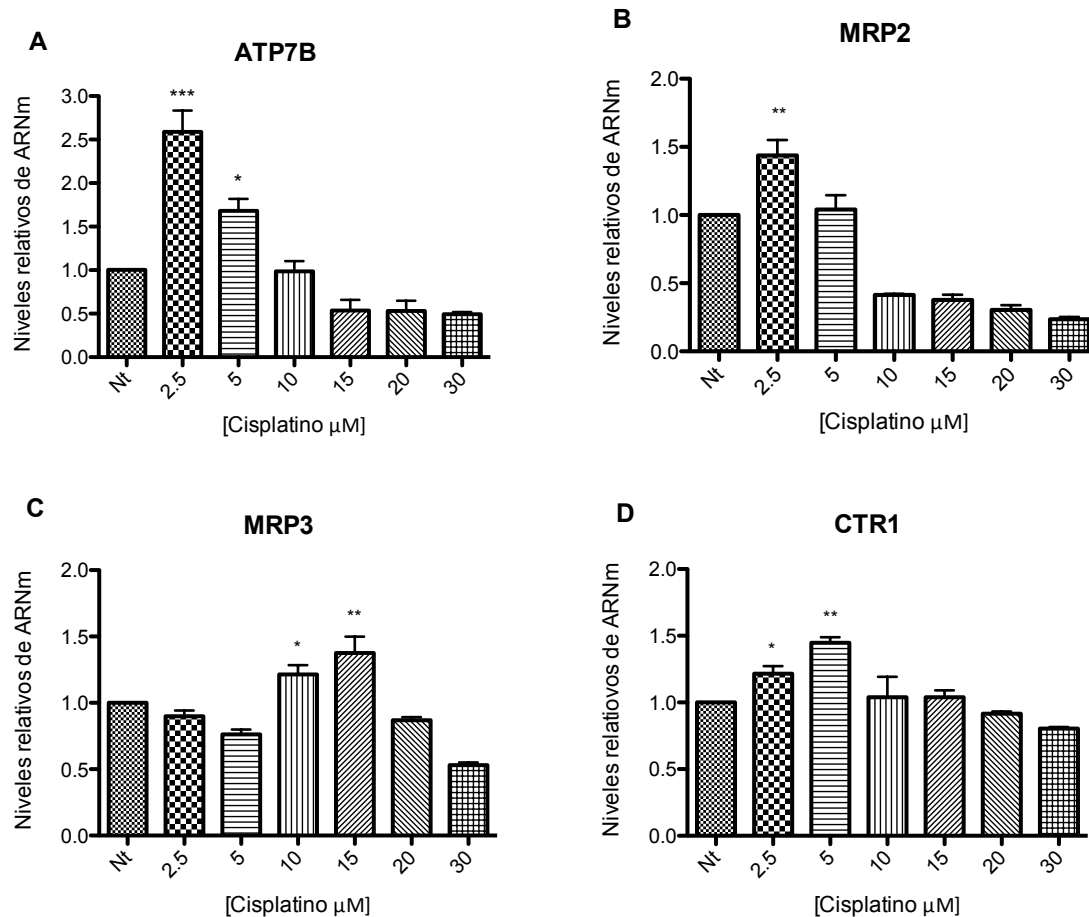


Figura 5.- Expresión de los genes *ATP7B*; *MRP2*; *MRP3* y *CTR1* en células HepG2 tratadas con diferentes concentraciones cisplatino RTqPCR Expresión de los genes A) *ATP7B*; B) *MRP2*; C) *MRP3*; D) Expresión del gen *CTR1*.-Se observan cambios en la expresión de los genes *ATP7B*, *MRP2* y *CTR1* a concentraciones de 2.5 y 5 μ M de cisplatino con 24h de exposición, mientras que en el gen *MRP3* se observan cambios a concentraciones de 10 y 15 μ M. El experimento fue realizado por RTqPCR y normalizado con RNP13A. Cada columna representa la media + D.E., de al menos tres experimentos independientes contra las células sin tratamiento. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una vía con una prueba estadística Tukey y un nivel de significancia de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Para corroborar la activación del factor de transcripción Nrf2, se determinó por microscopia confocal la localización de Nrf2 en las células HepG2 tratadas a concentraciones de 2.5, 5 y 10 μ M de cisplatino. Las imágenes (Figura 6) muestran que Nrf2 se localiza en el citoplasma de las células no tratadas. Sin embargo, el tratamiento con 2.5, 5 y 10 μ M de cisplatino ocasiona que el Nrf2 se localice en mayor proporción en el núcleo, sugiriendo que el factor de transcripción está en posibilidad de activar sus genes blanco.

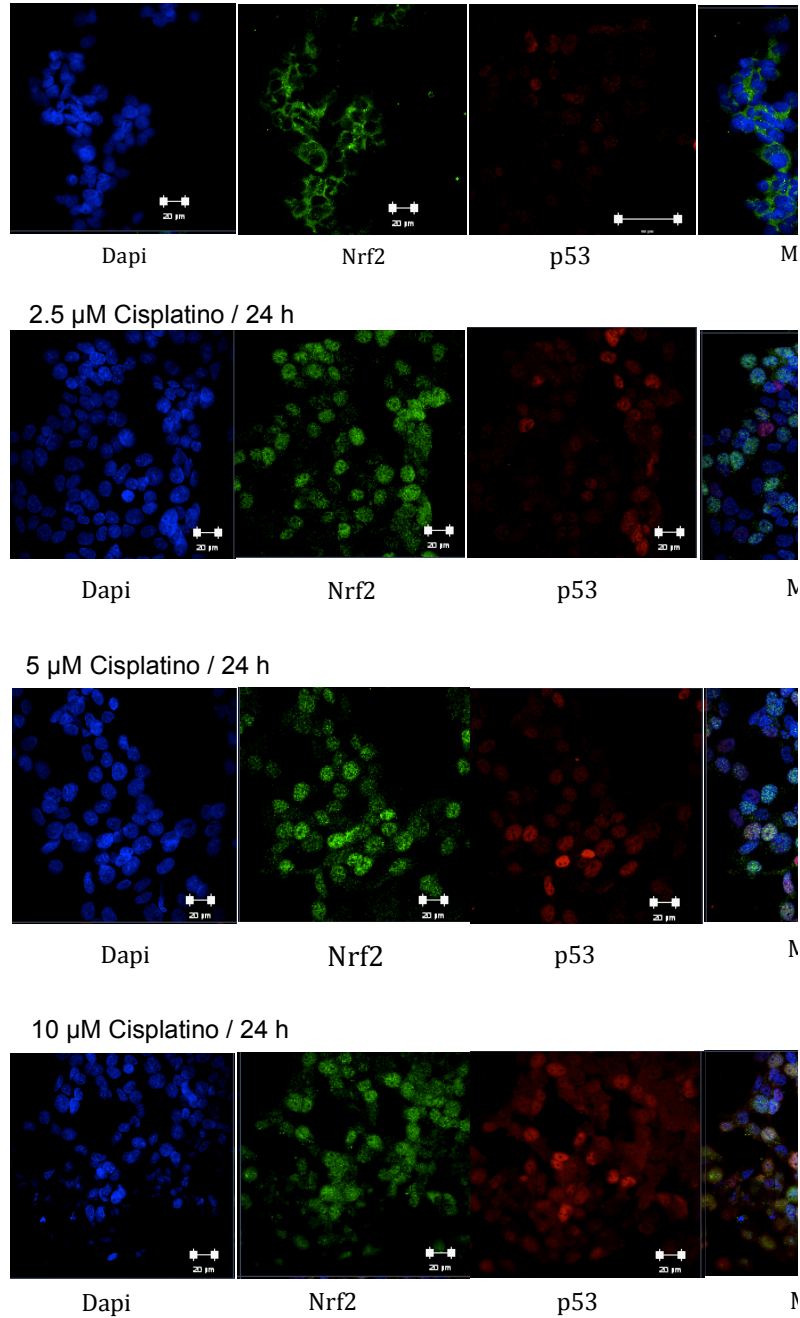


Figura 5.- Microscopia confocal de Nrf2 en células HepG2 tratadas con cisplatino. Las células fueron tratadas a concentraciones de 2.5, 5 y 10 μ M de cisplatino durante 24h. Los núcleos fueron marcados con Dapi, Nrf2 marcado con A488, p53 marcado con A495. Se observa translocación de Nrf2 al núcleo conforme incrementa la concentración de cisplatino.

DISCUSIÓN:

En este estudio se evaluó la participación de Nrf2 y sus genes blanco como un posible sistema citoprotector en la línea de hepatoblastoma HepG2 tratada con concentraciones moderadas (2.5, 5 y 10 μ M) de cisplatino durante 24 hs. La respuesta celular de protección se mantiene a tiempos mayores ya que desde las 24 hs de exposición con el fármaco se presentó un efecto citoestático el cual permanece aún después de 48 y 72 hs.

En el estudio, se evaluó el efecto citotóxico tanto en la línea celular HepG2 como en la línea de hepatocarcinoma Huh7 a diferentes concentraciones de cisplatino. Los resultados de las pruebas muestran que no se presenta citotoxicidad en ambas líneas celulares a concentraciones de 2.5 y 5 μ M de cisplatino durante 24 hs de exposición, ya que no se presentan cambios significativos en la proliferación celular a 48 y 72 hs, como muestra la gráfica 1A y 1B. Este comportamiento sugiere la presencia de un efecto citoestático, el cual se estudio en la línea celular HepG2 a través de la vía p53/p21, ya que esta línea no presenta mutaciones en p53 a diferencia de Huh7. Posteriormente, se estudio la expresión de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular: Cdk2 y p21, Cdk2 lo promueve, mientras que p21 lo inhibe. Los resultados mostraron una disminución en la expresión de la proteína Cdk2 y un incremento de la proteína p21 a concentraciones de 2.5 y 5 μ M de cisplatino a las 24 hs. Esto resultados sugieren que desde las 24 hs de exposición con el fármaco el ciclo celular de HepG2 podría estar comprometido en una respuesta citoestática. Con el fin de corroborar este efecto se evaluaron las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo. Los resultados mostraron un mayor porcentaje celular en fase de síntesis a 48 y 72 hs de exposición con concentraciones de 2.5, 5 y 10 μ M de cisplatino, sin mostrar cambios en la proliferación como muestra la tabla 1A, lo que evidencian una respuesta citoestática. Estos resultados están de acuerdo con los datos reportados por Quin y Ng (2002), en donde observan que a bajas dosis de cisplatino se induce un arresto transitorio en la fase G1 y un bloqueo en la fase de

síntesis a través de la sobre expresión de las proteínas p53 y p21 en la línea celular HepG2. Se ha reportado que algunos de los fármacos quimioterapéuticos tiene efecto en la progresión del ciclo celular, principalmente en mitosis y en la replicación del ADN en células tumorales. (te Poele et al., 2002). El cisplatino es uno de ellos, es ampliamente usado en diferentes tipos de cáncer, actúa principalmente en la fase de síntesis uniéndose a las bases nitrogenadas del ADN para formar aductos que impiden la replicación del material genético. En el caso de nuestro estudio, se hace evidente que la concentración administrada de cisplatino es importante en la respuesta celular de la línea HepG2.

Sin embargo la participación de p21 no solo podría estar presente en el arresto del ciclo celular en la línea HepG2, sino también en la vida media y en la activación de Nrf2, ya que se ha reportado que bajo condiciones de estrés moderado generado por H₂O₂, p21 desestabiliza el complejo Nrf2-Keap1 a través de su motivo 154KRR el cual interactúa directamente con los motivos 29DLG y 79ETGE de Nrf2, compitiendo contra Keap1 para su unión y comprometiendo la ubiquitinación de Nrf2, dando como resultado el incremento de la expresión de Nrf2 y de sus genes detoxificantes (Chen et al., 2009). Con este antecedente, se podría considerar que la respuesta de Nrf2 podría estar dada tanto por el efecto de el cisplatino en las células HepG2 tratadas con concentraciones moderadas de cisplatino durante 24 hs, como de la proteína p21. Además, ante la acumulación del estrés celular ocasionado por el fármaco, los niveles de p21 provocarán una inhibición en el ciclo celular, como se propone en la Figura B.

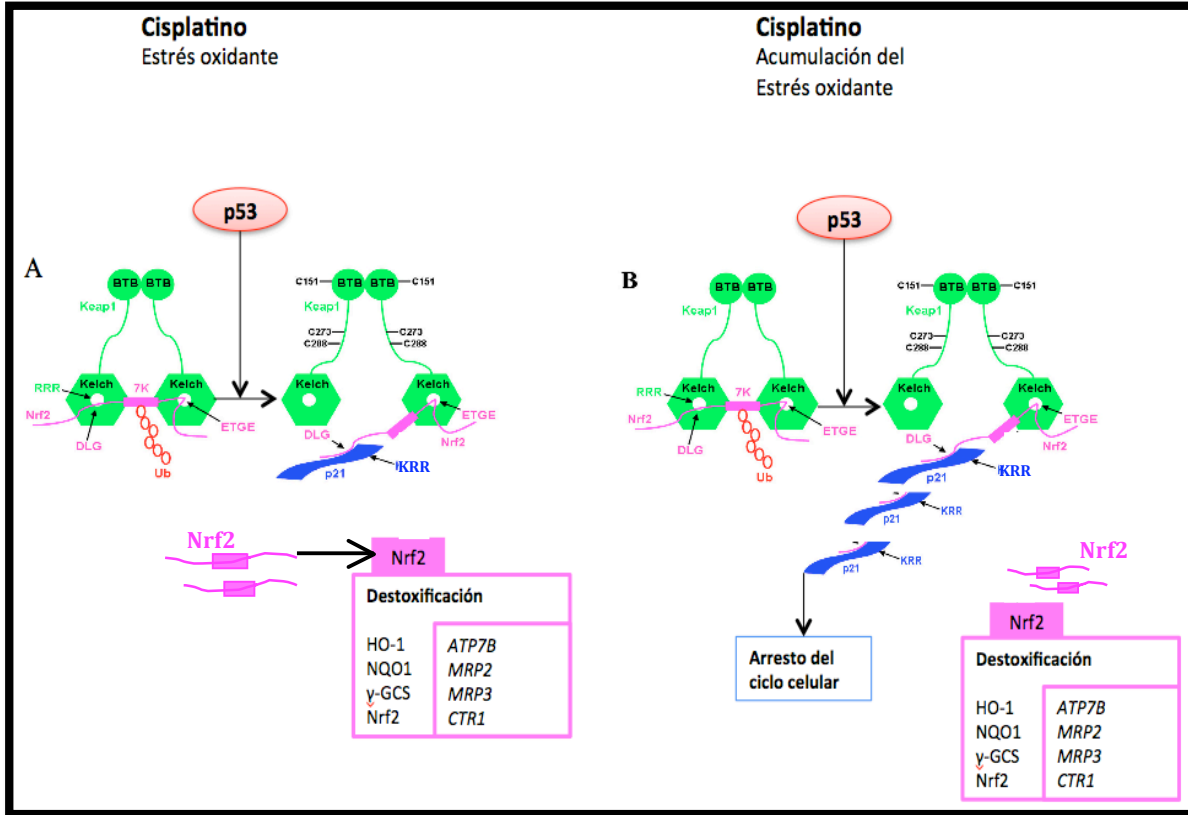


Figura B.- Modelo de citoprotección en la línea celular de cáncer hepático HepG2. A) Muestra la participación de la respuesta antioxidante y destoxicante regulada por Nrf2 ante concentraciones moderadas de cisplatino (2.5 y 5 μ M). A) Respuesta de la línea celular HepG2 en la acumulación del estrés oxidante a través del incremento de p21 y evidencia de arresto del ciclo celular. Tomado y modificado de Chen et al., 2009.

Tomando este en cuenta, se determinó la expresión de la proteína Nrf2 y algunos de sus genes blanco en la línea celular HepG2 tratadas con 2.5 y 5 μ M de cisplatino durante 24 hs de exposición. Los resultados mostraron incremento significativo en la expresión de Nrf2, NQO1, HO-1 y γ -GCS como respuesta a la exposición a cisplatino. Estos resultados son apoyados con datos de otros modelos de cáncer que muestran un comportamiento similar en el incremento de Nrf2 y de sus genes blanco (Maher et al., 2007; Cho et al., 2008; 2009; Homma et al., 2009; Jiang et al., 2010; Hong et al., 2010).

Dado que Nrf2, además de dar una respuesta citoprotectora a través de la inducción de proteínas antioxidantes, también participa en la inducción de algunos transportadores, importantes para la salida de metabolitos en el hepatocito. Por ello, se analizó la expresión de los genes transportadores *ATP7B*, *MRP2*, *MRP3* y *CTR1*. Los resultados mostraron incremento en la expresión de los transportadores *ATP7B* y *MRP2* a concentraciones de 2.5 y 5 μ M de cisplatino, mientras que el transportador *MRP3* mostró incremento a las concentraciones de 10 y 15 μ M de cisplatino. Estos datos sugieren que las células tratadas con cisplatino podrán disminuir más rápidamente la concentración intracelular del tóxico que provocará un menor daño a nivel celular.

Datos de la literatura indican que el transportador CTR1 internaliza compuestos órgano-metálicos tales como cobre y platino en la célula, sin embargo algunos reportes indican una función destoxificante en condiciones de estrés generado por xenobióticos (Howell et al. 2006a; Holzer y Howell, 2006; Gupta y Lutsenko, 2009), por lo que con el cisplatino, el transportador CTR1 podría participar en el proceso de destoxificación.

Con el fin de aportar más evidencias de que el Nrf2 se encuentra activado, se determinó la localización de Nrf2 por microscopia confocal. Los resultados mostraron presencia de Nrf2 en el núcleo de las células HepG2 tratadas con cisplatino, sugiriendo que el factor de transcripción se encuentra activado y participa en la respuesta protectora mediante la participación de genes antioxidantes, destoxificantes y de transportadores los cuales podrían estar relacionados con una respuesta citoprotectora en la línea celular de cáncer hepático HepG2.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con cisplatino en la línea celular de cáncer hepático HepG2 activa un sistema citoprotector mediado por Nrf2 y sus genes blanco, lo cual confiere resistencia a la muerte celular que podría explicar la respuesta quimiorresistente.

BIBLIOGRAFÍAS

Adachi T, Nakagawa H, Chung I, et al. Nrf2-dependent and -independent induction of ABC transporters ABCC1, ABCC2, and ABCG2 in HepG2 cells under oxidative stress. *J Exp Ther Oncol* 2007;6: 335–48.

Baird RD, Kaye SB. Drug resistance reversal—are we getting closer? *Eur J Cancer* 2003; 39: 2450–61.

Bataille AM, Manautou JE. Nrf2: A Potential Target for New Therapeutics in Liver Disease. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 92:340–8.

Borst P, Evers R, Kool M, et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1295–1302.

Chan J, Han XL, Kan YW. Cloning of Nrf1, and NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11371-5.

Chen W, Sun Z, Wang XJ, et al. Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell* 2009;34:663–73.

Cho JM, Manandhar S, Lee HR, et al. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance. *Cancer Lett* 2008;260:96–108.

Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, et al. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 8477–86. doi: 10.1128/MCB.24.19.8477-8486.2004.

Dhakshinamoorthy S, Jaiswal AK. Small Maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 gene. *J Biol Chem* 2000; 275, 40134–141.

Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001;42: 1007–17.

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, et al. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 265–9.

Gopalakrishnan A, Tony Kong AN. Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NF- kappa B and AP-1 in abnormal cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2008; 46,1257-70.

Gupta A, Lutsenko S. Human copper transporters: Mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Future Med Chem* 2009;1:1125–42.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144, 646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013

Hayashi A, Suzuki H, Itoh K, et al. Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 824–9.

Hayes JD, Chanas SA, Henderson CJ, et al. The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. *Biochem Soc Trans* 2000; 28, 33–41.

Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci* 2009; 34:176–88.

Homma S, et al. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3423–32.

Hong YB, Kang HJ, Kwon SY, et al. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 regulates drug resistance in pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2010; 39: 463–72.

Igarashi K, Kataoka K, Itoh K, et al. Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature* 1994; 367: 568-72.

Ishikawa T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* 1992; 463-8.

Iskander K, Jaiswal AK. Quinone oxidoreductase in protection against myelogenous hyperplasia and benzene toxicity. *Chem Biol Interact* 2005; 153: 147-57.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999; 13:76–86.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* 2003; 8:379–91

Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 2004; 36:1208–13.

Ji L, Li H, Gao P, et al. Nrf2 Pathway Regulates Multidrug-Resistance-Associated Protein 1 in Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* 2013; 8(5): e63404.

Jiang T, Chen N, Zhao, et al. High levels of Nrf2 determines chemoresistance in type II endometrial cancer. *Cancer Res* 2010; 70: 5486–96.

Kang M, Kobayashi A, Wakabayashi N, et al. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2046-51.

Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:573–84.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 89–116.

Kim YR, Oh JE, Kim MS, et al. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol* 2010; 220:446–51.

Klaassen CD, Slitt AL. Regulation of hepatic transporters by xenobiotic receptors. *Curr Drug Metab* 2005; 6: 309–28.

Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, et al. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res* 2000; 60: 1312-6.

Kobayashi A, Ito E, Toki T, et al. Molecular cloning and functional characterization of a new Cap 'n' collar family transcription factor Nrf3. *J Biol Chem* 1999; 274: 6643-52.

Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 2004; 24:7130–9.

Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, et al. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 2006; 26:221–9.

Konstantinopoulos PA, et al. Keap1 mutations and Nrf2 pathway activation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 5081–9.

Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, et al. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* 2008; 58: 262-70.

Lee JM, Chan K, Kan YW, et al. Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 9751-56.

Li W, Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* 2009; 48:91–104.

Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013; 53:401–26.

Maher JM, Cheng X, Slitt AL, et al. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 956-62.

Mandlekar S, Hong JL, Kong AN. Modulation of metabolic enzymes by dietary phytochemicals: a review of mechanisms underlying beneficial versus unfavorable effects. *Curr Drug Metab* 2006; 7: 661–75.

McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, et al. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element- driven gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278:21592–600.

Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 2012; 22:66–79.

Moi P, Chan K, Asunis I, et al. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9926-30.

Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* 2004; 10: 549–57.

Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002; 14, 381-95.

Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, et al. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26S proteasome. *J Biol Chem* 2003; 278:4536–41.

Nioi P, Nguyen T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362: 816–21.

Ohta T, Lijima K, Miyamoto M, et al. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res* 2008; 68:1303–9.

Okada K, Shoda J, Taguchi K, et al. Ursodeoxycholic acid stimulates Nrf2-mediated hepatocellular transport, detoxification, and antioxidative stress systems in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295:G735–47.

Organización Panamericana de la Salud Health Situation in the Americas. *Basic Indicators*. OPS. 2011. Recuperado 2013 septiembre. Disponible en: http://ais.paho.org/chi/brochures/2011/BI_2011_ENG.pdf

Osburn WO, Kensler TW. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res* 2008; 659, 31-9.

Qin LF, Ng IO. Induction of apoptosis by Cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells. *Cancer Lett* 2002;175:27–38.

Qu K, Lin T, Wei J, et al. Cisplatin induces cell cycle arrest and senescence via upregulating P53 and P21 expression in HepG2 cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2013 Sep;33(9):1253-9.

Rushworth SA, Bowles KM, MacEwan DJ. High basal nuclear levels of Nrf2 in acute myeloid leukemia reduces sensitivity to proteasome inhibitors. *Cancer Res* 2011; 71: 1999–2009.

Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 2002; 4, E131-6.

Shibata T, Kokubu A, Gotoh M, et al. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology* 2008; 135:1358–1368, 1368 e1351–e1354.

Shibata T, Ohta T, Tong KI, et al. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:13568–73.

Shim GS, Manandhar S, Shin DH, et al. Acquisition of doxorubicin resistance in ovarian carcinoma cells accompanies activation of the NRF2 pathway. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1619–1631. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.006

Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* 2006; 3:e420.

Singh A, et al. RNAi mediated silencing of nuclear factor erythroid 2 related factor 2 gene expression in non small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res* 2008; 68: 7975–84.

Slocum SL, Kensler TW. Nrf2: Control of sensitivity to carcinogens. *Arch Toxicol* 2011; 85: 273–84.

Smith DL, Nolden LK, Mills GB, et al. Apoptosis, senescence and cancer. InGewirtz DA, Holt SE and Grant S, editors. *Humana Press, New Jersey*, 2007.p 313-334

Solis LM, et al. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non small cell lung carcinoma and association with clinic pathologic features. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3743–53.

Stacy DR, Ely K, Massion PP, et al. Increased expression of nuclear factor E2 p45-related factor 2 (NRF2) in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2006; 28:813–8.

Sugeno H, Takebayashi Y, Higashimoto M, et al. Expression of copper- transporting P-type aenosine triphosphatase (ATP7B) in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 1045-8.

Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, et al. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 219–34.

Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol* 2006; 26:2887–2900.

te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, et al. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2002; 62: 1876-83.

Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14960-5.

World Health Organization. *Cáncer*. Fact sheets num. 297. Octubre, 2011. Recuperado 2013 septiembre. Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>

Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* 2006; 38:769–89.

Zhang P, Singh A, Yegnasubramanian S. Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2010; 9:336–46.