



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio de la vía Keap1/Nrf2/ARE en la inducción de la
proteína citoprotectora hemo oxigenasa-1 por ácido
nordihidroguayarático**

T E S I S

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

PRESENTA

Areli López Gazcón Zamudio



México, D.F.

2009



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.

Jurado Asignado:

Presidente: Dr. José Pedraza Chaverrí.

Vocal: Dra. Perla Carolina Castañeda López.

Secretario: M. en C. Omar Noel Medina Campos.

1er. Suplente: Dra. Sobeida Sánchez Nieto.

2° Suplente: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 209, Edificio "F", Facultad de Química, UNAM.

Asesor: M. en C. Omar Noel Medina Campos

Sustentante: Areli López Gazcón Zamudio

Gran parte del trabajo experimental de esta tesis se realizó gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al proyecto # 89641.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia:

Para mi madre, eres una gran mujer, te agradezco mucho el apoyo, tus desvelos y tu amor incondicional que me has brindado.

Para mi padre, por todo el cariño que me das, tus consejos y la fortaleza que me inspiras.

Para mi hermana Karina, eres una gran persona, gracias por estar siempre para mí y apoyarme cuando lo necesito. Sé que siempre vas a estar ahí para ayudarme.

Para mi hermano Valentín, por todos los momentos que compartimos, las risas y las travesuras.

Gracias a ustedes estoy realizando otro logro en mi vida y estoy muy feliz de poder compartirlo. Los quiero.

Para mis abuelitos y tíos, por el apoyo que nos brindan a mí y a mi familia.

Para mi tío Alfonso, estoy agradecida contigo por los mensajes de aliento, por el apoyo y por el cariño que me das.

A mis amigos por todos los momentos de alegría que hemos vivido. Este camino no habría sido el mismo sin ustedes.

A Jonathan, gracias por todo tu apoyo y por motivarme a ser una mejor persona.

A los del laboratorio

Les agradezco mucho el haberme dado la oportunidad de trabajar con ustedes, por todo su apoyo y por brindarme todo lo necesario para cumplir una meta más en mi vida.

Resumen

1. Antecedentes	1
1.1 Radicales libres (RL)	1
1.2 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN)	2
1.3 Sistema antioxidante	5
1.3.1 Catalasa	6
1.3.2 Glutación peroxidasa y glutación reductasa	7
1.3.3 Superóxido dismutasas	7
1.3.4 Glutamato cisteína ligasa y glutación	8
1.3.5 Peroxiredoxinas	9
1.3.6 Tioredoxinas	9
1.4 Estrés oxidante	10
1.5 Proteínas citoprotectoras	10
1.5.1 Hemo oxigenasa	11
1.5.2 Hemo oxigenasa-1	12
1.6 El sistema Keap1/Nrf2/ARE	13
1.7 Ácido nordihidroguayarético (NDGA)	15
1.7.1 Distribución y propiedades medicinales de <i>Larrea tridentata</i>	15
1.7.2 Propiedades del NDGA en modelos <i>in vivo</i> e <i>in Vitro</i>	16
1.8 Peróxido de hidrógeno	17
2. Justificación	19
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos particulares	21

5. Metodología	22
5.1 Cultivo celular	22
5.1.1 Tripsinización	22
5.1.2 Conteo de células	22
5.1.3 Siembra de células (para crecimiento)	23
5.1.4 Siembra de células (para experimentos)	23
5.1.5 Cosecha de células	24
5.2 Tratamientos y determinaciones experimentales	24
5.2.1 Exposición a NDGA y estudios curso temporales y de concentración respuesta	24
5.2.1.1 Viabilidad celular	25
5.2.1.2 Actividad de HO	26
5.2.1.3 Western blot de HO-1	27
5.3 Valoración de la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE	29
5.3.1 Estudios de translocación nuclear del Nrf2	29
5.3.1.1 Inmunocitoquímica	29
5.3.1.2 Fraccionamiento celular	30
5.3.1.2.1 Western blot para Nrf2	31
5.3.1.2.2 Cuantificación de proteínas	32
5.3.1.3 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	32
5.3.1.3.1 Fragmentación el ADN	33
5.3.1.3.2 Inmunoensayo de western blot	36
5.3.1.4 Unión del Nrf2 a la secuencia ARE	36
5.3.1.4.1 Estudios de retardo electroforético (EMSA)	36
5.3.1.4.1.1 Síntesis de sondas ARE biotiniladas y de sondas ARE sin marca	38
5.3.1.4.1.2 Alineamiento complementario de las sondas ARE	39
5.4 Valoración del efecto protector de HO-1 inducido por NDGA ante el reto oxidante con H ₂ O ₂	40
5.4.1 Estudios de concentración-respuesta ante la exposición a H ₂ O ₂	40

5.4.2 Viabilidad celular	40
5.5 Significado funcional de la expresión de la HO-1	41
5.5.1 Co-incubación con el inhibidor mesoporfirina de estaño (SnMP).	41
5.6 Análisis estadístico	41
6. Resultados	42
6.1 Efecto del NDGA sobre la actividad de HO	42
6.2 Efecto del NDGA sobre la expresión de la proteína HO-1	43
6.3 Activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE	44
6.3.1 Inmunocitoquímica	44
6.3.2 Fraccionamiento celular	45
6.3.3 Translocación nuclear de Nrf2	46
6.3.3.1 Western blot	46
6.3.3.2 Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	49
6.3.3.3 Ensayo de retardo electroforético (EMSA)	50
6.4 Valoración del efecto y significado funcional de la inducción de HO-1 ante la exposición a H ₂ O ₂	53
7. Discusión	56
8. Conclusión	61
9. Perspectivas	62
10. Apéndice 1, reactivos	63
10.1 Apéndice 2, soluciones	67
11. Referencias	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína activadora-1
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ASB	Albúmina sérica bovina
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CO	Monóxido de carbono
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM/AB	Medio de Dulbecco modificado con antibiótico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Dithiothreitol
EBNA	Antígeno nuclear del virus Epstein-Barr
ECL	Quimioluminiscencia incrementada
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
EGTA	Ácido etileno-glicol tetraacético
EMSA	Ensayo de retardo electroforético (electrophoretic mobility shift assay)
EpRE	Electrophile response element
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FCI	Solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GCL	γ - glutamil-cisteína sintetasa
GPx	Glutación peroxidada
GS	Glutación sintasa
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperacina-1-etanesulfónico
HIF-1	Factor 1 inducible por hipoxia

HNO ₂	Ácido nitroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO	Hemo oxigenasa
HO-1	Hemo oxigenasa 1
HO-2	Hemo oxigenasa 2
HOCl	Ácido hipocloroso
HSP	Proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins)
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
L [•]	Radical carbonado
LLC-PK1	Células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo
LH	Ácido graso insaturado
LO [•]	Radical alcoxilo
LOO [•]	Radical peroxilo
LOOH	Hidroperóxido de lípido o lipoperóxido
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido
NDGA	Ácido nordihidroguayarético
NFKB	Factor nuclear kappa de células B activadas
NO ⁺	Catión nitrosilo
NO ₂ ⁺	Catión nitronio
NO [•]	Óxido nítrico
NO ₂ [•]	Dióxido de nitrógeno
Nrf2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor)
¹ O ₂	Oxígeno singulete
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
O ₃	Ozono
OH [•]	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Peroxinitrito

PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PBS-T	Amortiguador salino de fosfatos con Tween-20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fenilmetil sulfonil fluoruro
Prx	Peroxiredoxina
RL	Radical libre
RO [•]	Alcoxilo
RO ₂ [•]	Peroxilo
ROOH	Peróxidos orgánicos
SDS	Lauril sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SnMP	Mesoporfirina de estaño
SOD	Superóxido dismutasa
TBE	Amortiguador tris-ácido bórico-EDTA
TE Buffer	Amortiguador tris-EDTA
THP-1	Células de monocitos de humanos
Trx R	Tioredoxina reductasa
Trx-S ₂	Tioredoxina oxidada
Trx-SH ₂	Tioredoxina

RESUMEN.

En las células normalmente se generan radicales libres así como metabolitos intermediarios derivados del oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo, etc.) conocidos como especies reactivas del oxígeno (ERO), pero cuando la producción de estas moléculas reactivas sobrepasa la capacidad de las células para neutralizarlas se presenta el estrés oxidante, condición que se ha vinculado con el daño y la muerte celular observados en diversas enfermedades degenerativas.

Para contrarrestar los efectos de los radicales libres y de las ERO, los organismos poseen defensas antioxidantes que son producidas en el propio organismo (antioxidantes endógenos enzimáticos como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y hemo oxigenasa-1, entre otras, y antioxidantes no enzimáticos como glutatión, bilirrubina, biliverdina y proteínas transportadoras de metales) o que son ingeridas mediante la dieta (antioxidantes exógenos no enzimáticos como selenio, carotenoides, y vitaminas C y E).

Los antioxidantes exógenos se encuentran en frutas, verduras y plantas. Un ejemplo de estos antioxidantes es el ácido nordihidroguayarático (NDGA), un compuesto encontrado en la planta *Larrea tridentata* y del que se ha descrito que inactiva algunas ERO y que además induce la síntesis de la proteína citoprotectora hemo oxigenasa-1 (HO-1) en células neuronales a través de una vía de señalización celular conocida como vía Keap1/Nrf2/ARE.

En condiciones normales Nrf2 y Keap1 están unidos y localizados en el citosol, pero en presencia de un estímulo o de un inductor de proteínas citoprotectoras Nrf2 se separa de Keap1, migra al núcleo y se une a la secuencia ARE para activar la transcripción de los genes de proteínas citoprotectoras como la hemo oxigenasa.

Con los antecedentes de que en el gen de la HO-1 hay sitios de unión para otros factores de transcripción como la proteína activadora-1, el factor inducible por hipoxia y NFkB y de que la respuesta a un determinado inductor puede ser diferente dependiendo del tipo celular, el objetivo de esta tesis fue determinar si en células LLC-PK1 de túbulo proximal de cerdo el tratamiento con NDGA puede inducir la expresión de la HO-1 a través de la vía Keap1/Nrf2/ARE y evaluar

además, de presentarse esta inducción, si esta respuesta confiere protección a las células cuando son sometidas a una condición de estrés oxidante como lo es la exposición a H_2O_2 .

Los resultados obtenidos indicaron que en células LLC-PK1 el tratamiento con NDGA indujo la expresión de la enzima HO-1 a través de la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE. En particular, el tratamiento con NDGA 15 μ M causó un aumento significativo tanto en la actividad de HO (5.6 \pm 0.9 veces a las 6 horas y de 5.9 \pm 1.1 veces a las 12 horas) como en los niveles de proteína de HO-1 (8.9 \pm 1.8 veces a las 6 horas y de 9.3 \pm 2.8 veces a las 12 horas).

También se determinó que la inducción de la HO-1 fue consecuencia de la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE ya que los ensayos de western blot en extractos nucleares mostraron que Nrf2 incrementó su presencia alcanzando un nivel máximo a las 3 h (3.3 \pm 0.4 veces) lo que coincidió con las imágenes obtenidas en los ensayos de inmunocitoquímica. También se demostró mediante el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina que Nrf2 se unió al ácido desoxirribonucleico (ADN) y los ensayos de retardo electroforético indicaron que se unió específicamente a la secuencia correspondiente al ARE.

Los ensayos de viabilidad celular mostraron que las células LLC-PK1 expuestas previamente a NDGA y luego a H_2O_2 presentaron mayor viabilidad que las células expuestas solamente a esta ERO (87.2 \pm 5.3% vs. 49.0 \pm 4.5% respectivamente) lo que indica que la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE y la consecuente inducción de la expresión de la HO-1 confirieron a las células resistencia ante el estrés oxidante.

El papel de la HO-1 en la protección celular ante el estrés oxidante se puso de manifiesto al emplear un inhibidor de esta enzima, ya que la viabilidad de las células tratadas con NDGA y con H_2O_2 en presencia del inhibidor se redujo a valores similares a los de la viabilidad de las células expuestas solamente a H_2O_2 (57.0 \pm 5.6% y 49.0 \pm 4.5%, respectivamente).

Los resultados obtenidos permiten concluir que en las células LLC-PK1 el antioxidante NDGA induce la expresión de la proteína citoprotectora HO-1 a través de la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE, lo cual hizo a estas células más resistentes ante las condiciones oxidantes de exposición a H_2O_2 .

1. ANTECEDENTES.

En muchos estudios se ha demostrado que el consumo de alimentos de origen vegetal disminuye el riesgo de desarrollar cáncer, enfermedades cardiovasculares, depresión del sistema inmunológico, disfunción cerebral y cataratas así como condiciones crónicas como artritis e inflamación (Atkinson *et al.*, 2005; Calder *et al.*, 2009; Feskanich *et al.*, 2000; Michels *et al.*, 2000; Sadruddin & Arora, 2009), reduce los efectos colaterales adversos de compuestos usados para tratar algunas enfermedades (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2000; Razo-Rodríguez *et al.*, 2008) y aminora las alteraciones observadas en modelos experimentales de daño renal (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2004) y neuronal (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2009) lo cual ha llevado a intentar la identificación de los componentes específicos responsables de los efectos positivos en la salud por el consumo de frutas y verduras. Una explicación que ha encontrado una gran aceptación es que ello es debido a la presencia de nutrientes antioxidantes tales como las vitamina C y E, carotenoides, flavonoides, selenio, zinc, etc., los que interfieren con el daño causado al ADN, proteínas y lípidos por las especies oxidantes producidos en los procesos metabólicos normales (Atkinson *et al.*, 2005; Balsano & Alisi, 2009; Halliwell & Gutteridge, 1989; Prior, 2003).

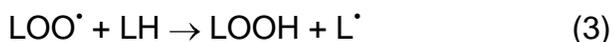
1.1 RADICALES LIBRES (RL).

Para entender lo que son las especies oxidantes mencionadas en la sección anterior hay que definir a los radicales libres. Éstos son átomos o moléculas muy reactivos porque tienen un electrón desapareado o libre que les permite sustraer un electrón de moléculas estables cercanas para alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el RL ha sustraído un electrón, la molécula estable que se lo cedió se convierte en un radical libre por tener un electrón desapareado. Se inicia así una reacción en cadena ya que este nuevo RL reacciona con otra molécula estable para quitarle un electrón y transformarse por lo tanto en un RL.

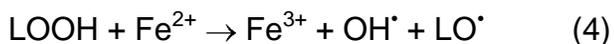
Un ejemplo de este mecanismo lo constituye el proceso de lipoperoxidación que se inicia cuando un radical (por ejemplo el radical hidroxilo, OH^\bullet) reacciona con un ácido graso insaturado (LH) produciendo un radical carbonado (L^\bullet , reacción 1) al cual se le adiciona rápidamente oxígeno, para formar un radical peroxilo (LOO^\bullet , reacción 2):



El radical peroxilo quita un átomo de hidrógeno de otro ácido graso insaturado generando así un hidroperóxido de lípido o lipoperóxido (LOOH) así como un nuevo radical L^\bullet (reacción 3) que continúa la generación de RL:



Incluso el lipoperóxido formado en este proceso puede reaccionar con metales como el Fe^{2+} y generar otros radicales como el OH^\bullet y el radical alcoxilo (LO^\bullet) como se indica en la reacción 4:



1.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) Y DE NITRÓGENO (ERN).

Durante la respiración celular, en la membrana interna de la mitocondria, el oxígeno molecular recibe cuatro electrones y cuatro protones para reducirse a agua (reacción conocida como reducción tetravalente del oxígeno). Sin embargo, en los sistemas biológicos también ocurre la reacción de reducción parcial o univalente del oxígeno, proceso en el que el oxígeno molecular acepta uno a uno los 4 electrones lo que conduce a la producción de especies de oxígeno reducidas de manera incompleta que son conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO) (Fig. 1).

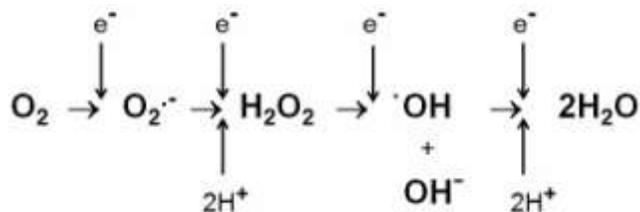


Fig. 1. Reducción univalente del oxígeno con la consecuente formación de ERO.

Esta adición uno a uno de los cuatro electrones al oxígeno genera de manera secuencial los siguientes productos:

- Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Radical hidroxilo ($\cdot OH$) y
- Agua

Los 3 primeros productos son ERO. El $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 participan en la generación de oxidantes adicionales y más reactivos como el $\cdot OH$, peroxinitrito ($ONOO^-$) y ácido hipocloroso ($HOCl$).

En una de las vías de generación del $\cdot OH$, resultado de la reacción entre el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 , las sales de hierro juegan un papel catalítico y esta reacción es conocida como reacción de Haber-Weiss catalizada por metales (Halliwell & Gutteridge, 1990).

El $O_2^{\cdot-}$ al reaccionar con el óxido nítrico (NO^{\cdot}) genera $ONOO^-$, una especie reactiva de nitrógeno (ERN) que puede generar otras ERN como el radical libre dióxido de nitrógeno (Radi *et al.*, 2001).

Otra ERO es el oxígeno singulete (1O_2) del que existen dos isoformas:

- El estado sigma ($^1\Sigma$) que es un radical libre debido a que conserva los dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos (uno de esos electrones tiene giro paralelo y otro electrón tiene giro antiparalelo) y
- El estado delta ($^1\Delta$), también posee dos electrones aunque éstos se encuentran apareados en un solo orbital, por lo que no es un radical libre. El estado $^1\Sigma$ es muy inestable y por ello en los sistemas biológicos sólo tiene importancia el estado $^1\Delta$ el cual se genera cuando los electrones que han sido

excitados por la luz pasan su energía de excitación a uno de los electrones desapareados del O_2 , los que cambian su sentido de giro. Esta especie también puede formarse durante la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ en las reacciones de Haber-Weiss y por la descomposición del H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Entre las ERO y las ERN hay moléculas que son radicales libres y moléculas que no lo son (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

ERO		ERN	
Radicales	No radicales	Radicales	No radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	Óxido nítrico (NO^{\cdot})	Ácido nitroso (HNO_2)
Hidroxilo (OH^{\cdot})	Ácido hipocloroso ($HOCl$)	Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot})	Catión nitrosilo (NO^+)
Peroxilo (RO_2^{\cdot})	Singulete (1O_2) forma $^1\Delta$ Singulete (1O_2) forma $^1\Sigma$		Peroxinitrito ($ONOO^-$)
Alcoxilo (RO^{\cdot})	Ozono (O_3)		Catión nitronio (NO_2^+)

La vida media de estas especies es relativamente corta debido a su capacidad de reaccionar con todas las moléculas que estén a su alrededor lo que provoca alteraciones y daño a los componentes celulares.

Sin embargo, estas especies no son intrínsecamente nocivas ya que las células los producen en procesos fisiológicos como:

- Metabolismo celular del oxígeno
- Inflamación
- Auto-oxidación de catecolaminas
- Síntesis de prostaglandinas
- Oxidación de xantina e hipoxantina
- Señalización celular.

Así entonces las especies reactivas son producidas continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula pero son inactivados o mantenidos dentro de determinados niveles por un conjunto de mecanismos denominados antioxidantes, lo cual es muy importante ya que se ha observado que al elevarse las concentraciones fisiológicas de estas especies se generan diversas alteraciones celulares como resultado de la oxidación de moléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Halliwell & Gutteridge, 1989).

1.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE.

Una molécula antioxidante se define como toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (Halliwell & Gutteridge, 1989). En la sección anterior se mencionó que los RL, las ERO y las ERN producidos por las células son mantenidos en determinados niveles o neutralizados, esto se lleva a cabo por la acción de un sistema antioxidante que está constituido por enzimas y moléculas sin actividad enzimática (Tabla 2).

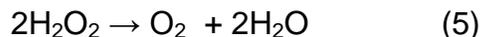
Tabla 2. Sistema antioxidante celular.

Sistema enzimático	Sistema no enzimático
Catalasa	Ácido úrico
Glutamato cisteína ligasa	Albúmina
Glutación peroxidada	Bilirrubina
Glutación reductasa	Biliverdina
Glutación S transferasa	β-carotenos
Hemo oxigenasa	Glutación
NAD(P)H quinona óxido reductasa 1	Proteínas transportadoras de metales
Peroxirredoxinas	Vitamina C
Superóxido dismutasa	Vitamina E
Tioredoxinas	Vitamina K

Enseguida se describen de manera muy general algunos de los componentes del sistema antioxidante celular.

1.3.1 Catalasa.

Esta enzima se localiza en los eritrocitos y en los peroxisomas de casi todos los tejidos y contiene un grupo hemo como cofactor y se encarga de la descomposición del H_2O_2 transformándolo en H_2O y O_2 (Aebi, 1982) (reacción 5).



Reacción de descomposición de H_2O_2 por la catalasa.

Esta enzima también puede actuar sobre fenoles y alcoholes transformándolos en H_2O como se describe en la reacción 6.



Descomposición de fenoles o alcoholes ($R'H$) por la catalasa.

1.3.2 Glutación peroxidasa y glutatión reductasa.

Las glutatión peroxidasas (GPx) son enzimas que contienen selenocisteína y se encargan de la eliminación del H_2O_2 o de peróxidos orgánicos acoplando la reducción de esas moléculas con la oxidación del glutatión reducido (GSH) originando glutatión oxidado (GSSG) (Ursini *et al.*, 1995). El GSSG es reducido por la glutatión reductasa para regenerar al GSH, estableciéndose así un ciclo redox (Fig. 2). Para llevar a cabo lo anterior, la glutatión reductasa requiere de fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NADPH), el cual puede ser sintetizado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

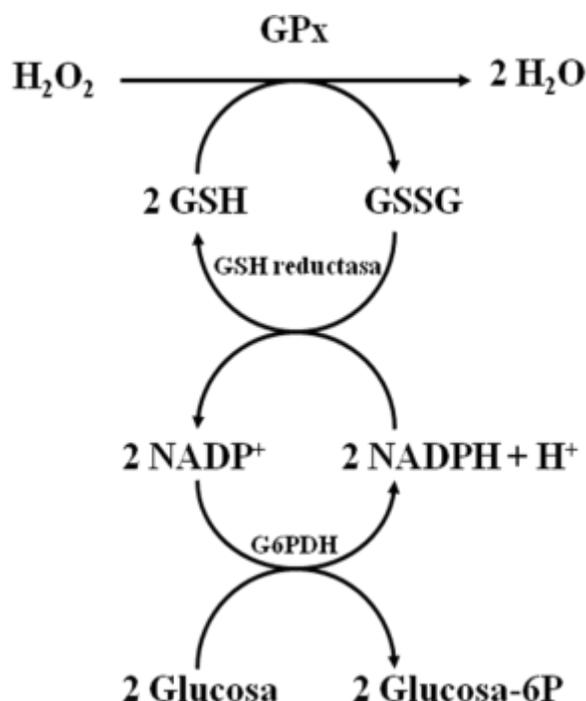
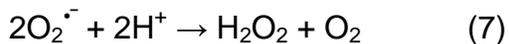


Fig. 2. Reacciones de la glutatión peroxidasa y de la glutatión reductasa.

1.3.3 Superóxido dismutasas.

La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (reacción 7) (McCord & Fridovich, 1969). Existen 3 isoformas de esta enzima: 1) la SOD dependiente de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD) distribuída en el citosol y llamada por ello citosólica o intracelular, 2) la SOD dependiente de manganeso (Mn-SOD)

que se localiza sólo en las mitocondrias y, 3) la Cu,Zn-SOD extracelular distribuída principalmente en la matriz extracelular de los tejidos y en el plasma, líquido sinovial y linfa (Marklund, 1982).



Reacción de la superóxido dismutasa.

1.3.4 Glutamato cisteína ligasa y glutatión.

Esta enzima cataliza el primer paso en la síntesis de glutatión (Fig. 3). Se conoce también como γ - glutamil-cisteína sintetasa (GCL) y se compone de 2 subunidades: la subunidad catalítica y la subunidad moduladora. El segundo paso en la síntesis del glutatión lo cataliza la enzima glutatión sintasa (GS) (Forman & Dickinson, 2003).

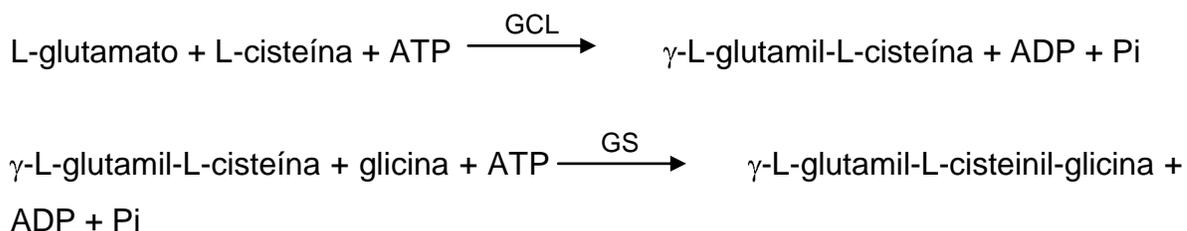


Fig. 3. Síntesis del glutatión. GCL= glutamato-cisteína ligasa; GS= glutatión sintasa.

El glutatión es un tripéptido formado por los aminoácidos ácido glutámico, glicina y cisteína (Fig. 4). Se encuentra en concentraciones milimolares en las células y su función es la de eliminar compuestos ya sea por su conjugación con ellos, mediante la acción de la glutatión S transferasa, o mediante su acción directa como en el caso con H_2O_2 en la reacción catalizada por la GPx. El glutatión oxidado resultante es regenerado a su estado reducido por la enzima glutatión reductasa o también por la tioredoxina (Nordberg & Arnér, 2001).

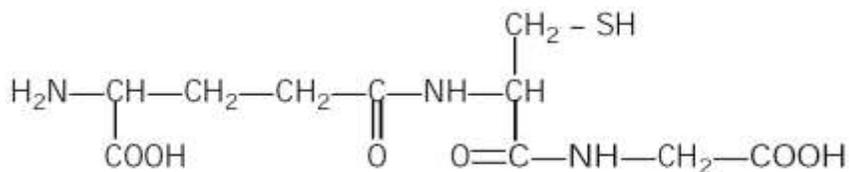


Fig. 4. Estructura del glutatión.

1.3.5 Peroxiredoxinas.

Las peroxiredoxinas son enzimas antioxidantes tiol-dependientes, presentes en todos los organismos, cuya función biológica es la reducción del H_2O_2 y peróxidos orgánicos (ROOH) a su correspondiente alcohol a expensas de un reductor que en general es el glutatión o la tioredoxina (Nordberg & Arnér, 2001). Todas las peroxiredoxinas tienen una cisteína conservada en el extremo amino donde se produce la oxidación por parte de los peróxidos que detoxifican. También son conocidas como tioredoxina peroxidasas o tiol peroxidasas porque usan a la tioredoxina como donador de electrones (Fig. 5).

1.3.6 Tioredoxinas.

El sistema de las tioredoxinas consiste de 2 enzimas: la tioredoxina y la tioredoxina reductasa. Esta última cataliza la regeneración de la tioredoxina usando NADPH (Fig. 5). De esta manera la tioredoxina puede seguir actuando como un eficiente agente antioxidante al reducir moléculas oxidadas como glutatión y peroxiredoxinas (Nordberg & Arnér, 2001).

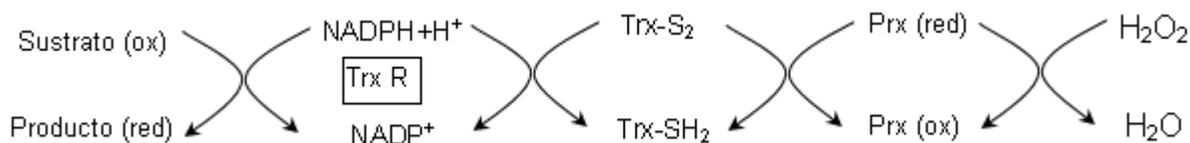


Fig. 5. Sistema de peroxiredoxinas y tioredoxinas. Prx= peroxiredoxina; Trx-SH_2 = tioredoxina; Trx-S_2 = tioredoxina oxidada; Trx R= tioredoxina reductasa.

1.4 ESTRÉS OXIDANTE.

Cuando la producción de los RL, de las ERO y de las ERN sobrepasa la capacidad de las células para neutralizarlas se produce daño celular que se puede hacer evidente por la peroxidación de lípidos de membrana, la oxidación de proteínas y/o el daño al ADN (Davies, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1989). A esta condición de desequilibrio se denomina estrés oxidante el cual está involucrado en varias enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas y en los procesos degenerativos asociados al envejecimiento (Ames *et al.*, 1993; Halliwell & Gutteridge, 1990).

1.5 PROTEÍNAS CITOPROTECTORAS

Para protegerse del daño causado por el estrés oxidante, en las células se induce rápidamente la expresión de proteínas citoprotectoras las cuales disminuyen el estrés oxidante mediante la inactivación de las ERO.

Los antioxidantes protegen de manera directa o indirecta a las células, es decir pueden inactivar directamente a las ERO u otras moléculas reactivas o pueden estimular los mecanismos de inactivación y detoxificación de esas moléculas estimulando la síntesis de proteínas citoprotectoras de fase II (Dinkova-Kostova *et al.*, 2004; Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2005).

Las proteínas responsables de la detoxificación de los compuestos electrofílicos (originados por las proteínas de fase I que en su mayoría son los citocromos P450) son conocidas como proteínas de fase II y realizan su función a través de 2 procesos:

- 1) La transformación en compuestos menos reactivos mediante procesos de reducción, ó
- 2) La conjugación con sustratos endógenos como glutatión, ácido glucorónico o sulfato.

Los conceptos de proteínas de fase I y de fase II se derivan de las observaciones de Williams (1967) quien sugirió que las reacciones metabólicas de los xenobióticos ocurren en 2 etapas:

La fase I involucra reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis que dan como resultado la adición de grupos funcionales a los xenobióticos.

La fase II consiste en reacciones de conjugación de los productos de las reacciones de la fase I con ligandos endógenos lo que hace a dichos productos menos tóxicos, más solubles y de más fácil eliminación.

El balance final de estas reacciones es la protección celular o citoprotección contra el estrés oxidante (Chen & Kong, 2004) y la potencial auto-reparación de las células expuestas al estrés oxidante (Kang *et al.*, 2005).

En la tabla 3 se presentan algunas de las proteínas de fase II y sus funciones.

Tabla 3. Proteínas citoprotectoras de fase II.

Enzima	Función
γ -glutamato-cisteína ligasa	Síntesis de GSH
Catalasa	Descompone H_2O_2
Ferritina	Almacena hierro
Glutación reductasa	Regeneración de GSH
Glutación S transferasas	Conjugación de compuestos, reducción de hidroperóxidos
Hemo oxigenasa	Elimina al grupo hemo libre, genera antioxidantes
NADPH quinona óxido reductasa	Inactiva derivados de quinonas
Superóxido dismutasa (SOD)	Elimina $O_2\cdot^-$
Tioredoxina reductasa	Regeneración de tioredoxina reducida
UDP glucoronil transferasas	Conjugación de metabolitos con ligandos endógenos

Tomada de Hotzclaw *et al.*, (2004).

1.5.1 HEMO OXIGENASA.

Una de las enzimas pertenecientes al grupo de proteínas de fase II es la hemo oxigenasa (HO, E.C. 1.14.99.3) que es la encargada de catalizar el primer paso de la degradación del grupo hemo generando los productos CO, Fe^{2+} y biliverdina. Esta última molécula luego es convertida a bilirrubina por la acción de la biliverdina reductasa (Tenhunen *et al.*, 1968) (Fig. 6).

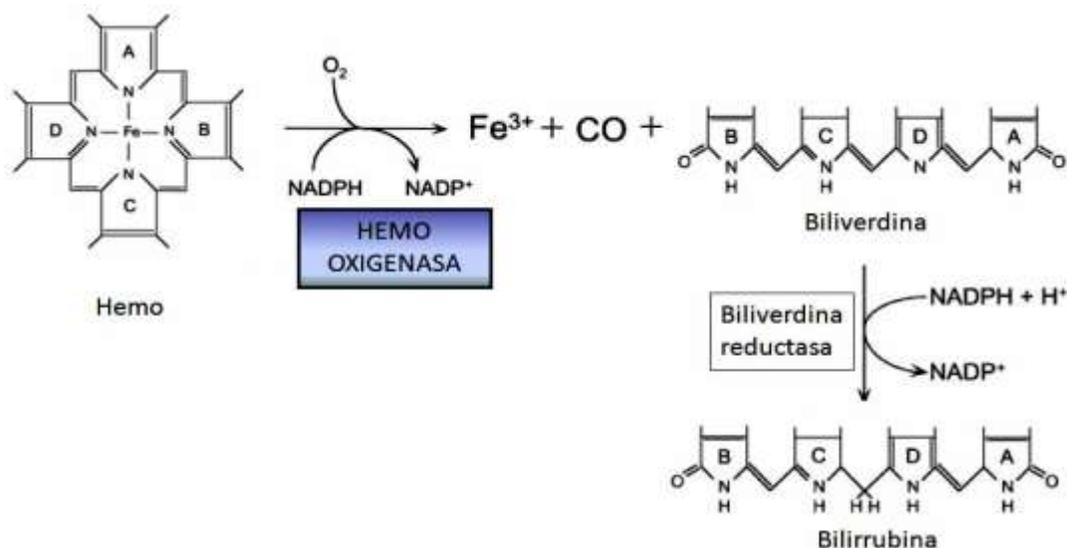


Fig. 6. Catabolismo del grupo hemo por la hemo oxigenasa (Agarwal & Nick, 2000).

La HO se ha caracterizado como una proteína asociada al retículo endoplásmico aunque algunos informes indican que también se localiza en el núcleo, la mitocondria y la membrana plasmática (Kim *et al.*, 2004; Ryter *et al.*, 2006) y se han descrito dos isoformas denominadas HO-1 y HO-2 que son codificadas por genes diferentes (Cruse & Maines, 1988). La HO-1 es de expresión inducible y es bioquímica y estructuralmente distinta a la HO-2 (Braggins *et al.*, 1986) cuya expresión es constitutiva.

1.5.2 HEMO OXIGENASA-1.

Esta enzima pertenece a una familia de proteínas de estrés cuya regulación transcripcional responde a condiciones ambientales adversas. De entre esas moléculas, la expresión de proteínas de choque térmico (HSP; **H**eat **S**hock **P**roteins por sus siglas en inglés) constituyen una respuesta global de las células a la desnaturalización de proteínas debido a la hipertermia (Subjeck & Shyy, 1986) y aunque esta enzima no presenta aparente homología en su secuencia de aminoácidos con las HSP y tampoco posee actividad de proteína chaperona, en las regiones de su promotor tiene elementos de respuesta a choque térmico similares a los identificados en las regiones regulatorias de varios genes HSP por

lo que en algunas ocasiones se ha clasificado como una proteína de choque térmico de 32 KDa (HSP32), aunado al hecho de que aumenta su expresión en respuesta a hipertemia, aunque aparentemente esta última respuesta solamente se presenta en roedores (Shibahara *et al.*, 1987).

La HO-1 se induce como respuesta a varias condiciones como la exposición a metaloporfirinas (hemo, protoporfirina de cobalto), medicamentos, metales (cobalto, estaño, cadmio), radiación ultravioleta, agentes químicos e hipertermia (Abraham & Kappa, 2008; Morse & Choi, 2002). En la región promotora del gen de esta proteína hay una amplia variedad de elementos regulatorios, entre los que se incluyen sitios de unión a ADN para factores de transcripción que se activan como respuesta al estrés oxidante, tales como NF κ B, Nrf2 y la proteína activadora-1 (AP-1) (Lavrovsky *et al.*, 1994).

Debido a que varios de los estímulos que inducen la expresión de HO-1 son pro-oxidantes y a que hay evidencias de que su inducción provee un efecto de protección celular en diferentes modelos de daño celular como diabetes (Di Noia *et al.*, 2006), insuficiencia renal (Barrera *et al.*, 2003; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2004; Nath, 2007; Sikorsky *et al.*, 2004), hipertensión (Sacerdoti *et al.*, 1989), daño neuronal (González-Reyes *et al.*, 2009; Panahian *et al.*, 1999) y aterosclerosis (Ishikawa *et al.*, 2001), la detección de esta isoforma ha sido usada como evidencia de estrés oxidante (Yachie *et al.*, 1999).

1.6 EL SISTEMA KEAP1/NRF2/ARE.

Se ha reportado que más de 100 genes están relacionados con la respuesta al estrés oxidante y que sus productos regulan una gran variedad de actividades celulares como la transducción de señales (Hensley *et al.*, 2000) así como la proliferación y los mecanismos de defensa inmunológicos (Jaiswal, 2004) pero son pocos los factores de transcripción que se conoce son activados por el estrés oxidante (Schulze *et al.*, 1997) como NF κ B (Schreck *et al.*, 1992), AP-1 (Surh *et al.*, 2005), el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) (Haddad, 2003) y Nrf2 (Jaiswal, 2004, Kang *et al.*, 2005).

EL factor de transcripción Nrf2 forma parte de un mecanismo común por el cual la mayoría de las proteínas citoprotectoras de fase II son inducidas y son 3 los componentes que participan en este proceso:

- (i) La proteína 1 asociada a Kelch y parecida a ECH (Keap1; **K**elch-like **E**CH-**a**ssociated **p**rotein **1**),
- (ii) El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2; **N**uclear Factor Erythroid **2**-**r**elated **f**actor) y
- (iii) El elemento de respuesta antioxidante (ARE; **A**ntioxidant **R**esponse **E**lement). Esta secuencia específica, 5'-TGAC***GCA-3' (Rushmore *et al.*, 1991), también se conoce como elemento de respuesta a electrófilos ó EpRE (**E**lectrophile **R**esponse **E**lement) y está presente en las regiones regulatorias de los genes de proteínas citoprotectoras.

La proteína Keap1 es una metaloproteína de zinc con abundancia de cisteínas (de los 624 aminoácidos, 25 son residuos de cisteínas) que en condiciones normales está unida al Nrf2 y forma además un complejo con la proteína Culin-3, lo que permite la ubiquitinación del Nrf2 y su subsiguiente degradación por la vía del proteosoma, pero en presencia de un estímulo, la interacción de los inductores de las proteínas de fase II con Keap1 ocasiona cambios conformacionales que causan la disociación del complejo Keap1/Nrf2 lo que permite que el Nrf2 migre al núcleo celular en donde se combina con pequeños factores de transcripción llamados Maf y se une al ARE para activar la transcripción de genes citoprotectores (Motohashi & Yamamoto, 2004) (Fig. 7).

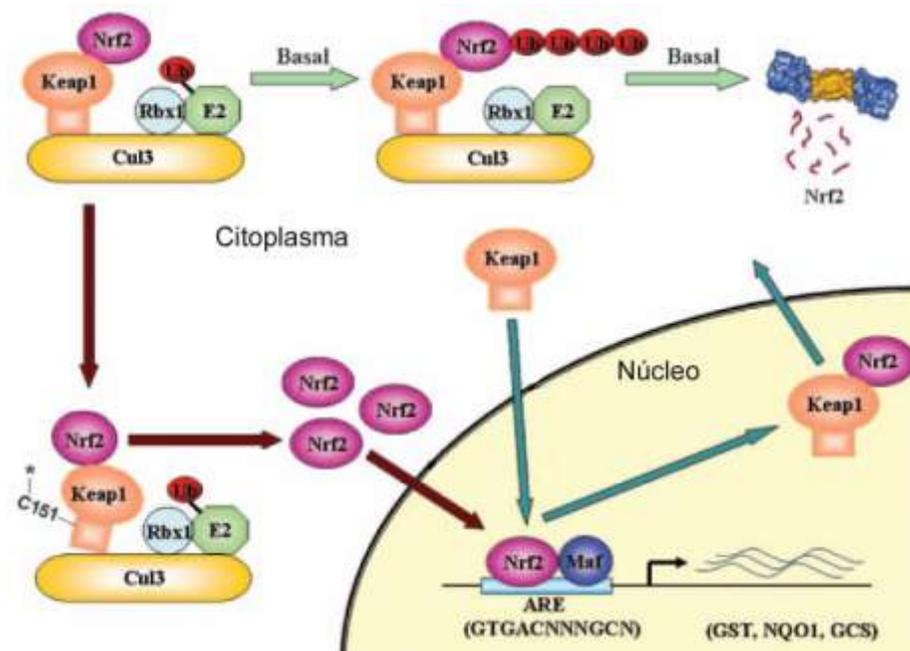


Fig. 7. Modelo de la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE (modificada de Motohashi & Yamamoto, 2004).

1.7 ÁCIDO NORDIHDROGUAYARÉTICO (NDGA).

Larrea tridentata tiene un contenido notable de productos biológicamente activos, ya que aproximadamente hasta un 50% del peso seco de sus hojas está constituido por diversos metabolitos secundarios (Argueta, 1994; Lara y Márquez, 1996; Romo de Vivar, 1985; Xue *et al.*, 1988) y se ha descrito que las flores, las hojas, tallos verdes y pequeños tallos leñosos contienen NDGA con una alta concentración en las hojas (38.3 mg/g) y en los tallos verdes (32.5 mg/g) (Hyder *et al.*, 2002).

1.7.1 Distribución y propiedades medicinales de *Larrea tridentata*.

Larrea tridentata es un arbusto de hoja perenne de 1-3 m de altura, es bifurcado y nudoso. Pertenece a la familia Zygophyllaceae y es conocida con los nombres de “arbusto del creosote”, “chaparral”, “gobernadora”, “hediondilla” o “covil” y abunda en las áreas desérticas de algunos estados del norte de nuestro país, así como en el suroeste de Estados Unidos. Esta planta ha sido empleada desde hace mucho tiempo en la medicina tradicional ya que infusiones de sus

hojas, ramas y raíces se han utilizado para el tratamiento de trastornos relacionados con el aparato genitourinario y la diabetes, en tanto que la tintura, extractos alcohólicos de la planta y las hojas en polvo para el tratamiento de artritis, reumatismo, diarrea y enfermedades de la piel, entre otros (Arteaga *et al.*, 2005).

1.7.2 Propiedades del NDGA en modelos *in vivo* e *in vitro*.

El NDGA es un compuesto que contiene dos grupos o-catecoles (Fig. 8). Su nombre químico es 4,4'-(2,3-dimetil-1,4-butanediil)bis[1,2-bencenediol] y en varios estudios se ha demostrado que ejerce diversos efectos biológicos como la disminución de la presión arterial (Gowri *et al.*, 1999), la reducción en la infiltración de macrófagos en el pulmón de ratas expuestas a ozono (Floriano-Sánchez *et al.*, 2006), la inhibición tanto *in vivo* como *in vitro* de la multiplicación celular en un gran número de tipos de cáncer humano y en modelos carcinogénicos (Birkenfeld *et al.*, 1987, Moody *et al.*, 1998) y la reducción de la replicación de algunos virus como el de la inmunodeficiencia humana (Hwu *et al.*, 2008) y el del herpes (Chen *et al.*, 1998).

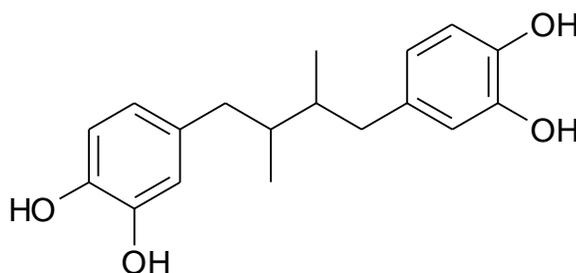


Fig. 8. Estructura del NDGA.

Esta molécula presenta capacidad antioxidante directa ya que se ha demostrado en ensayos *in vitro* que neutraliza ERO como ONOO^- , $^1\text{O}_2$, OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ y HOCl (Floriano-Sánchez *et al.*, 2006) y se ha reportado que ejerce un efecto protector sobre el riñón que se relacionó con la disminución del estrés oxidante en la nefropatía diabética (Anjaneyulu & Chopra, 2004) así como en la

insuficiencia renal inducida por dicromato de potasio (Yam-Canul *et al.*, 2008) lo cual podría explicarse, además de su actividad antioxidante directa sobre las ERO, con el hecho de que induce la expresión de la HO-1 mediante la activación de la vía antioxidante Nrf2/HO-1 y protege a cultivos de neuronas granulares del cerebelo de los efectos del estrés oxidante causados por el ácido nitropropiónico y por el H₂O₂ (Guzmán-Beltrán *et al.*, 2008). Dicho estudio identificó al NDGA como una nueva herramienta terapéutica potencial para activar el eje Nrf2/HO-1 y proporcionar protección contra el estrés oxidante.

1.8 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

El H₂O₂ es un agente muy utilizado en varios productos domésticos (desinfectantes, blanqueadores libres de cloro, removedores de pintura, desinfectantes de lentes de contacto, tintes de cabello y productos blanqueadores de dientes, entre algunos otros). En la industria su uso principal es el de agente blanqueador en la elaboración de papel, en la medicina se usa para la esterilización de material oftálmico y endoscópico y en la desinfección de heridas (Watt *et al.*, 2004).

Este compuesto es un líquido miscible con el agua y aparentemente capaz de atravesar las membranas celulares, aunque las vías que usa para hacerlo no han sido establecidas (Halliwell & Gutteridge, 1989). Químicamente es poco reactivo, puede actuar medianamente como un agente oxidante o como un agente reductor, pero no oxida rápidamente a la mayoría de las moléculas biológicas (ADN, lípidos y proteínas) a menos que estas últimas moléculas posean grupos tioles (Levine *et al.*, 1999).

Desde el punto de vista biológico el H₂O₂ resulta peligroso debido a su fácil conversión a radical OH[•] ante la exposición a la luz ultravioleta o a su interacción con metales de transición como el hierro o el cobre, proceso conocido como reacción de Fenton (Halliwell & Gutteridge, 1990) y esta peligrosidad disminuye debido a que las células han desarrollado mecanismos para almacenar a los metales de transición en proteínas de manera que no pueden catalizar la reacción de generación de OH[•] u otros radicales (Halliwell & Gutteridge, 1989; Halliwell &

Gutteridge, 1990b). La peligrosidad de esta molécula también se dá porque, además de ser uno de los sustratos en la reacción de Fenton, también puede proveer el otro sustrato de esta reacción al liberar el hierro contenido en las hemo-proteínas (Puppo & Halliwell, 1988).

En determinadas circunstancias los niveles celulares de H_2O_2 aumentan como en el caso de infecciones (Chandramathi *et al.*, 2009), por fumar (Guatura *et al.*, 2000), en el hipertiroidismo experimental (Araujo *et al.*, 2008), en la epilepsia (Jarret *et al.*, 2008), en la hemodiálisis (Rysz *et al.*, 2007), en la fibrosis pulmonar (Psathakis *et al.*, 2006) y durante la mioglobinuria (Barrouillet *et al.*, 1999). Este aumento puede presentarse como consecuencia de la disminución de las enzimas que catalizan su degradación (Miller *et al.*, 2008; Pedraza-Chaverrí *et al.*, 1999) o por un aumento en su producción (Dale *et al.*, 2008) lo que tiene como consecuencia que las células estén expuestas a un ambiente oxidante con la posibilidad de sufrir daños y alteraciones.

2. JUSTIFICACIÓN

El consumo de alimentos de origen natural reduce la incidencia de enfermedades degenerativas (Feskanich *et al.*, 2000; Michels *et al.*, 2000) debido a la presencia de varios antioxidantes lo que hace evidente la importancia de estas moléculas como agentes de prevención e igual de importante es identificar a esos compuestos y determinar los mecanismos por los cuales confieren resistencia a las células, de manera que los estudios con antioxidantes derivados de plantas como el NDGA, tienen un gran interés.

El NDGA es una molécula antioxidante que causa efectos citoprotectores en varios tipos celulares y que induce la expresión de HO-1 en células neuronales activando la vía Keap1/Nrf2/ARE, pero no se conoce si será capaz de inducir esta enzima en células renales a través de la misma vía, por lo que obtener esta información permitirá establecer si este compuesto causa la misma respuesta en diferentes líneas celulares a través de la misma vía, puesto que existe información que indica que la expresión de la HO puede ser inducida por otras vías de señalización en las que participan otros factores de transcripción como el factor HIF-1 (Ockaili *et al.*, 2005), el factor de choque térmico (HSF), el factor nuclear kappa de células B activadas (NFkB) y la proteína activadora 1 (AP-1) (Alam & Cook, 2007).

Además se ha visto que un determinado inductor puede causar respuestas diferentes en la inducción de las proteínas citoprotectoras lo que puede depender del tipo celular ya que por ejemplo la tert-butil hidroquinona, un potente inductor de HO-1 y de genes relacionados con el ARE en varios tipos celulares como hepatocitos (Huang *et al.*, 2000), células de glándula suprarrenal de rata (Li *et al.*, 2007) y neuronas (Johnson *et al.*, 2002), causa poco aumento en la expresión de HO-1 en células de monocitos de humanos (THP-1) (Ogborne *et al.*, 2005) mientras que el resveratrol, otro inductor de HO-1, no induce ningún cambio en la expresión de HO-1 en estas mismas células (Ogborne *et al.*, 2005).

3. HIPÓTESIS

La exposición de células LLC-PK1 a NDGA causará la sobreexpresión de HO-1 la cual será dependiente de la activación de la vía de señalización Keap1/Nrf2/ARE y como consecuencia el sistema antioxidante celular ofrecerá resistencia frente a un reto oxidante.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar si el NDGA induce la expresión de la HO-1 en las células LLC-PK1, y de ser así, estudiar el mecanismo intracelular por medio del cual el NDGA causa este efecto y valorar si la HO-1 inducida por este compuesto tiene la capacidad de proteger a estas células frente a un modelo de daño asociado a estrés oxidante como lo es la exposición a H₂O₂.

4.2 Objetivos particulares

Debido a que se ha demostrado que los mecanismos de señalización intracelular para la inducción de HO-1 pueden ser específicos del tipo celular se pretende:

- ✓ Investigar el mecanismo intracelular por medio del cual el NDGA induce a la HO-1 explorando la vía de señalización Keap1/Nrf2/ARE.
- ✓ Determinar si la inducción de la HO-1 por el tratamiento con NDGA confiere protección ante la exposición a H₂O₂.

5. METODOLOGÍA

5.1 CULTIVO DE CÉLULAS

Las células LLCPK1 se cultivaron en medio Eagle de Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con SFB al 10% y con antibiótico (penicilina/estreptomicina) al 1% y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de O₂ al 95% y CO₂ al 5% en cajas de Petri de 60 ó 100 mm en una incubadora NUAIRE modelo NU4750. Se trabajó en un ambiente estéril en un gabinete de seguridad biológica Clase II Tipo A2 modelo NU425-400 de la marca Nuaire.

5.1.1 Tripsinización

En el momento en que las células alcanzaron del 90% al 100% de confluencia se les retiró el medio y se lavaron con amortiguador salino de fosfatos (PBS) estéril con pH 7.5. Para despegarlas se les adicionó tripsina recombinante Tryple Express (a las cajas de Petri de 100 mm se les añadió 1 mL de tripsina y a las cajas de 60 mm se añadieron 0.5 mL) y se colocaron durante 10-15 min a 37°C en la incubadora. La solución de células en tripsina se colocó en un tubo estéril de 15 mL y las cajas en donde crecieron las células se lavaron con 1 ó 2 mL de medio de cultivo. El lavado se agregó a la solución de células y ésta se centrifugó a 1,000 rpm (130 x g) durante 3 min en una centrífuga de mesa Heraeus modelo Megafuge. El sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió, con ayuda de una micropipeta, en 1 mL de DMEM suplementado. Las células vivas se contaron usando una cámara de Neubauer.

5.1.2 Conteo de células

Diez µL de la suspensión celular se mezclaron con 40 µL de solución de azul de tripano al 0.4%, 10 µL de esta mezcla se colocaron en la cámara de Neubauer y con ayuda del microscopio se contaron las células vivas (no teñidas de azul) en los 5 cuadrantes de la cámara de Neubauer.

5.1.3 Siembra de células (para crecimiento)

Una vez conocido el número de células en la suspensión celular se añadieron 4 mL de medio DMEM a la suspensión celular y el volumen total (5 mL) se vació en 2 cajas nuevas de Petri de 60 mm (2.5 mL por caja) las cuales se colocaron en la incubadora durante 1 ó 2 días (período en el que las células alcanzaron el 90% de confluencia).

En el caso de las cajas de 100 mm a la suspensión celular se le añadieron 11 ml de DMEM suplementado y el volumen total se distribuyó en cantidades similares en 2 cajas nuevas de 100 mm.

En condiciones de 100% de confluencia el número promedio de células en las cajas de 60 mm fue de 1,000,000, mientras que en las cajas de 100 mm el número promedio de células fue de 2,500,000.

5.1.4 Siembra de células (para experimentos)

Se siguió el procedimiento descrito en el párrafo anterior, sólo que a diferencia de sembrar las células en cajas de 60 mm ó de 100 mm para crecerlas, éstas se colocaron en cajas de 60 ó de 100 mm ó en placas de 24, 48 ó 96 pozos para que cuando alcanzaran la confluencia fueran sometidas a los tratamientos descritos más adelante.

El número de células sembradas en las cajas de Petri o placas de pozos fueron los siguientes:

- Cajas Petri de 60 mm: 700,000 células.
- Cajas Petri de 100 mm: 1,700,000 células.
- Cajas de 96 pozos: 25,000 células por pozo.
- Cajas de 48 pozos: 75,000 células por pozo.
- Cajas de 24 pozos: 150,000 células por pozo.

Cuando se alcanzó el 90% - 100% de confluencia se retiró el medio suplementado y se reemplazó con medio DMEM con antibiótico al 1% sin suero fetal bovino (DMEM/AB) por 24 h antes de iniciar el tratamiento correspondiente.

5.1.5 Cosecha de células

Para obtener el botón celular se retiró la solución con el tratamiento correspondiente y las células se lavaron 2 veces con 1 mL de PBS el cual se retiró casi en su totalidad. Enseguida las células se rasparon o cosecharon y con ayuda de una micropipeta se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL para centrifugarlas a máxima velocidad durante 10 s en una centrífuga de mesa Beckman modelo Microfuge E. El sobrenadante se desechó y en algunas ocasiones el botón celular se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardó a -40°C mientras que en otras se sometió inmediatamente al procedimiento experimental correspondiente.

5.2 TRATAMIENTOS Y DETERMINACIONES EXPERIMENTALES.

5.2.1 Exposición a NDGA y estudios curso temporales y de concentración respuesta.

Las células en cultivo se trataron con NDGA a diferentes concentraciones (5 a 500 μM) y tiempos (1 a 24 h); así como con H_2O_2 (0.1 a 20 mM durante 1 a 6 h) para establecer las condiciones de trabajo mediante las determinaciones de viabilidad celular y de actividad de HO.

Una vez determinados la concentración y tiempo de exposición adecuados, es decir, las condiciones en las que el NDGA no causó citotoxicidad y en las que el H_2O_2 causó la disminución de 50% en la viabilidad celular, los grupos de estudio fueron los siguientes:

1. CT
2. NDGA (15 μM por 6 h)
3. H_2O_2 (1 mM por 2 h)
4. NDGA+ H_2O_2 (15 μM por 6 h y 1 mM por 2 h, respectivamente)

La solución de NDGA 15 μM se preparó de la siguiente manera:

Se preparó una solución 1 mM de NDGA en dimetil sulfóxido (DMSO) al 1%:

- Se pesaron 2.8 mg de NDGA
- Se disolvieron en 0.0925 mL de DMSO
- Se añadieron 9.1636 mL de H_2O destilada

Esta solución se esterilizó por filtración y a partir de ella se preparó una solución 15 μ M en DMEM/AB. La concentración final de DMSO fue de 0.015%.

La solución de H₂O₂ 1 mM se preparó a partir de la solución comercial al 30% (8.82 M) la cual se diluyó 100 veces para obtener una solución 88.2 mM:

- 0.05 mL de la solución al 30%
- 4.95 mL de H₂O

Esta solución se esterilizó por filtración y a partir de ella se preparó una solución 1 mM en DMEM/AB.

5.2.1.1 VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se valoró con el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este método se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa de las células vivas lo que origina un compuesto de color azul (formazán) (Fig. 9).

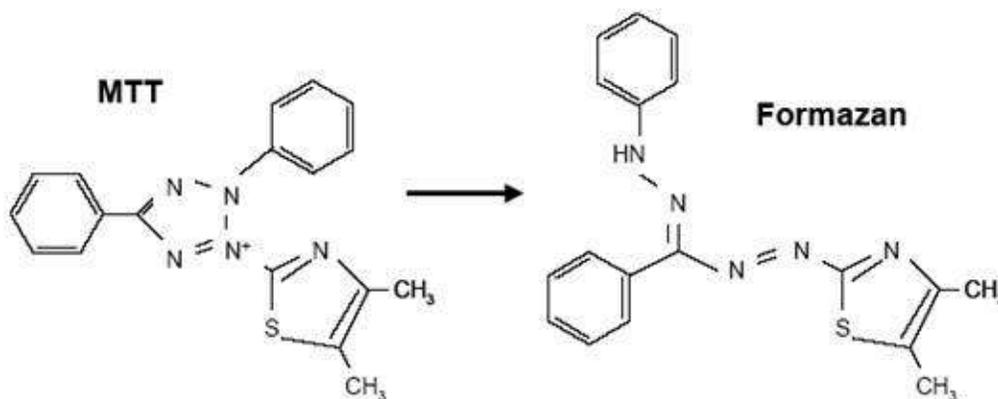


Fig. 9. Fundamento del ensayo de viabilidad celular.

Las células se sometieron a los tratamientos correspondientes y al final de los mismos el medio se reemplazó con DMEM/AB y las células se incubaron por 24 h. Al final de este período se añadió MTT al medio de las células (80 μ L de una solución de 1 mg/mL por cada mL de medio) y al cabo de 1 hora en la incubadora

el medio con MTT se retiró y el formazán generado se solubilizó en isopropanol ácido (isopropanol con HCl 0.04 M; 250 µL/pozo) a 4°C. Se determinó la densidad óptica (D.O.) a 570 nm en un espectrofluorómetro Synergy HT (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, EUA). Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción del MTT.

La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. El porcentaje de viabilidad se obtuvo de la siguiente forma:

$$\%Viabilidad = \frac{D.O. \text{ células tratadas}}{D.O. \text{ células control}} \times 100$$

5.1.1.2 ACTIVIDAD DE HO.

Este ensayo se basa en la determinación de la bilirrubina que se produce por la acción secuencial de las enzimas HO y biliverdina reductasa usando como sustrato inicial al grupo hemo. La bilirrubina se midió realizando un barrido de 550 nm a 450 nm en el espectrofotómetro Beckman Coulter modelo DU-640. Para el cálculo de actividad se utilizó la diferencia de densidades ópticas de 464 nm a 530 nm (ΔDO) y el coeficiente de extinción molar de la bilirrubina ($\epsilon = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 464 nm de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{(\Delta DO \text{ muestra} - \Delta DO \text{ blanco}) \cdot 1/2}{40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot (\text{mg proteína})} \cdot 10^6 = (\text{horas de incubación}) \cdot 10^6 = \text{pmol/mg de proteína} \cdot \text{h}$$

Las células cosechadas de cajas de 60 mm ó el botón celular guardado a -40°C se resuspendieron en 0.3 mL de amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM pH 7.4 con MgCl_2 2 mM con ayuda de una micropipeta y se lisaron aplicando ultrasonido durante 10 s con una potencia de 1.5 usando un sonicador Fisher Scientific modelo XL-2000. El lisado se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 10,000 x g por 20 min a 4°C y el sobrenadante se usó para medir la actividad de HO con un método espectrofotométrico (Barrera *et al.*, 2003).

El ensayo se realizó en tubos eppendorf de 1.5 ml que contenían la siguiente mezcla de reacción:

Sobrenadante	175 μ L
Solución "master mix"	50 μ L
NADPH 8 mM	25 μ L

La solución "master mix" tiene la siguiente composición:

- Hemina 2 mM (el sustrato de la HO)
- Citosol hepático de ratón (fuente de biliverdina reductasa que convierte la biliverdina a bilirrubina)
- Glucosa-6-fosfato 20 mM (sustrato de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (400 U/mL; enzima que regenera NADPH)

Esta mezcla se incubó 1 h a 37°C en ausencia de luz y la reacción se detuvo añadiendo 0.5 ml de cloroformo para extraer la bilirrubina formada. Los tubos se agitaron 2 veces en vórtex por 15 s y se centrifugaron a velocidad máxima por 45 s en la centrifuga de mesa Beckman Microfuge E. Se tomó la fase inferior y se leyó la D.O. a 464 nm y 530 nm. Los resultados se expresaron en pmol bilirrubina/mg proteína/h.

5.2.1.3 WESTERN BLOT DE HO-1.

Las células cosechadas de cajas de 60 mm ó el botón celular guardado a -40°C se resuspendieron en 0.3 ml de amortiguador de lisis (Tris HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, ácido etileno-glicol tetraacético (EGTA) 1 mM, tritón al 1%, pirofosfato de sodio 2.5 mM, glicerofosfato 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y 3 μ l de una solución de inhibidores de proteasas de Sigma-Aldrich (ver Apéndice 1), se lisaron con ultrasonido y se centrifugaron de la misma manera descrita en el ensayo de actividad de HO. La concentración de proteínas totales se determinó en el sobrenadante.

Veinticinco μg de proteínas totales se colocaron en 10 μl de amortiguador de carga de Laemmli 2X, se desnaturalizaron en agua hirviendo por 2 min y se sometieron a una electroforesis desnaturalizante en geles de SDS-poliacrilamida al 12.5% durante 2.5 h con un voltaje constante de 100 volts en un equipo "SE 250 Mighty Small" (GE Healthcare Life Sciences) y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por 1 h a 400 mA en una cámara de transferencia "TE 22 MINI Transfer Tank" (GE Healthcare Life Sciences). Para ambos procedimientos se usó una fuente de poder modelo EPS 2A/200 (Farmacia Biotech).

La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con leche en polvo al 5% en PBS con Tween- 20 al 0.1% (PBS-T) durante 1 h y se lavó con PBS-T durante 10 min (3 veces), luego se incubó con el anticuerpo anti HO-1 diluído 1:1,000 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS-T) por 1 h y luego de 3 lavados de 10 min con PBS-T se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano anti-conejo usando una dilución 1:10,000 en PBS-T. La proteína de HO-1 se detectó mediante quimioluminiscencia usando un estuche de reactivos de quimioluminiscencia mejorada. Para normalizar la expresión de HO-1, la misma membrana se incubó con el anticuerpo anti-tubulina (1:7,000 en PBS-T) y con el anticuerpo secundario anti-ratón (1:10,000 en PBS-T). Las señales obtenidas en las placas de autorradiografía (Hybond ECL; GE Healthcare Life Sciences) se cuantificaron usando un programa de densitometría ImageJ 1.38X (National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Los resultados se expresaron como el cociente del porcentaje de unidades arbitrarias de desitometría HO-1/tubulina.

5.3 VALORACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL Nrf2 INDUCIDA POR NDGA.

Para determinar si la incubación de las células con NDGA indujo la translocación del Nrf2 al núcleo celular se realizaron ensayos de:

- Inmunocitoquímica
- Western blot en las fracciones citosólicas y nucleares
- Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

5.3.1 Estudios de translocación nuclear.

5.3.1.1 Inmunocitoquímica.

Esta técnica permite localizar proteínas presentes en los tejidos o células, tomando como base una reacción de antígeno-anticuerpo. El antígeno es la proteína o parte de la proteína que se pretende detectar en el tejido o en la célula y el anticuerpo específico para ese antígeno que se añade a la muestra está conjugado con moléculas fluorescentes, con peroxidasa de rábano o partículas de oro que hacen posible su posterior detección.

Para realizar este ensayo fue necesario esterilizar cubreobjetos redondos de 18 mm de diámetro y de 1 mm de grosor en una autoclave, colocarlos en los pozos de una placa de 12 pozos (Corning #3512), tratarlos con poli-L-lisina al 0.025% por 12 h y lavarlos con PBS estéril.

Las células se sembraron sobre los cubreobjetos y se trataron con NDGA 15 μ M durante 1, 3, 6, 12 y 24 h tiempos en los que las células se mantuvieron en la incubadora.

Una vez cumplidos los tiempos de exposición, los procedimientos siguientes se realizaron fuera del cuarto de cultivo.

Las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS frío por 5 min, se permeabilizaron con tritón al 1% (en H₂O) por 20 min, se lavaron 3 veces con PBS por 5 min y se bloquearon con una solución de ASB 1%-tritón 1%-glicina 0.3 M (en H₂O) durante 30 min.

Para incubar los cubreobjetos con el menor volumen de solución de anticuerpo primario y de anticuerpo secundario acoplado a la molécula

fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC), se usó un rectángulo de vidrio sobre el que se colocaron y fijaron dos tiras de papel parafilm. Sobre la tira inferior se colocaron 15 μ L de las soluciones de anticuerpos por cada uno de los cubreobjetos utilizados. Posteriormente los cubreobjetos se colocaron sobre cada una de las gotas de anticuerpo (con las células orientadas hacia la solución de anticuerpo) y luego se cubrieron con la otra tira de papel parafilm.

Los cubreobjetos con células se incubaron con la solución de anticuerpo anti-Nrf2 (C20) diluido 1:25 en ASB 1%-triton 1% (en H₂O) por 2.5 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Luego las células se lavaron 3 veces con PBS por 5 min y a partir del siguiente paso (adición del anticuerpo secundario) se evitó en la medida de lo posible la exposición a la luz.

Los cubreobjetos se incubaron toda la noche a 4°C en una cámara húmeda con una solución del anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a FITC diluido 1:50 en ASB 1%-triton 1% (en H₂O), se lavaron 3 veces con PBS por 5 min, el núcleo celular se tiñó con una solución de Hoechst 33258 al 0.0002% (2 μ g/mL en PBS) por 1 min, las células se lavaron con PBS por 5 min y luego con H₂O destilada, se realizó el montaje de los cubreobjetos (con las células orientadas hacia el portaobjetos) en portaobjetos usando 5 μ L del medio acuoso Fluoromount y finalmente, para evitar el secado y el movimiento del cubreobjetos, la unión entre los cubreobjetos y los portaobjetos se selló con barniz transparente de uñas.

Las células se observaron en un microscopio invertido de fluorescencia Nikon modelo TS-100F usando el filtro B-2AC (longitud de onda de excitación de 450 nm a 490 nm) para detectar la señal de fluoresceína y el filtro UV-2A (longitud de onda de excitación de 330 nm a 380 nm) para detectar la señal de Hoechst.

5.3.1.2 Fraccionamiento celular.

Una vez que las células alcanzaron la confluencia en cajas Petri de 60 mm se les retiró el medio suplementado, se les adicionó NDGA 15 μ M durante 1, 3, 6, 12 y 24 h y se mantuvieron en la incubadora. Una vez cumplidos los períodos de incubación las células se cosecharon y se congelaron en nitrógeno líquido.

El fraccionamiento celular se hizo de acuerdo a Sun y colaboradores (2007): Los botones celulares se resuspendieron en 5 volúmenes de amortiguador hipotónico de lisis (ácido 4-(2-hidroxietil)piperacina-1-etanesulfónico (HEPES) 10 mM pH 8.0, KCl 1 mM, MgCl₂ 1.5 mM, dithiothreitol (DTT) 1 mM, fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM y 5 µl de la solución de inhibidores de proteasas), se incubaron durante 15 min en hielo, se les agregó nonidet P-40 a una concentración final de 0.1%, se agitaron en “vórtex” por 10 s y se centrifugaron a 6,000 rpm (4,670 x g) por 1 min a 4°C en una centrifuga Beckman modelo J2-21. Los sobrenadantes obtenidos se centrifugaron a 14,000 rpm (25,400 x g) durante 20 min a 4°C y los sobrenadantes resultantes se consideraron como la fracción citosólica. Los botones celulares de esta última centrifugación se resuspendieron en 7 volúmenes del amortiguador de lisis nuclear (HEPES) 20 mM pH 7.5, MgCl₂ 1.5 mM, ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) 0.2 mM, glicerol al 20%, NaCl 420 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y 7 µl de la solución de inhibidores de proteasas, se incubaron durante 30 min a 4°C y se centrifugaron a 13,000 rpm (22,000 x g) durante 5 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se consideraron como la fracción nuclear.

5.3.1.2.1 Western blot para Nrf2.

Para realizar este ensayo las condiciones para la electroforesis, obtención y bloqueo de la membrana de nitrocelulosa, así como los períodos de incubación con los anticuerpos primarios y secundarios y la detección por quimioluminiscencia fueron similares a las descritas en el western blot de HO-1.

Las incubaciones con el anticuerpo anti Nrf2 (C20) y con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Assay Designs Inc., # cat. SAB-300) se hicieron con soluciones diluídas 1:1,000 y 1:15,000, respectivamente.

Para normalizar la expresión del Nrf2 en la fracción citosólica, la misma membrana se incubó con el anticuerpo anti-tubulina diluido 1:5,000 y con el anticuerpo secundario anti-ratón diluido 1:7,000, mientras que para normalizar la expresión de Nrf2 en la fracción nuclear la membrana se incubó con el anticuerpo

anti-lamina B1 diluido 1:5,000 y con el anticuerpo secundario anti-conejo diluido 1:5,000. Las señales obtenidas se cuantificaron usando el programa de densitometría ImageJ versión 1.38X y los resultados se expresaron como el cociente del porcentaje de unidades arbitrarias de densitometría Nrf2/tubulina (para el citosol) y Nrf2/lamina B1 (para la fracción nuclear).

5.3.1.2.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de proteínas se realizó por un método colorimétrico (Lowry *et al.*, 1951).

Se preparó una curva patrón con albúmina sérica bovina (0, 5, 10, 15, 25, 35 y 50 µg/0.2 mL) así como las diluciones apropiadas de las muestras.

Para las muestras en las que se midió la actividad de HO el sobrenadante se diluyó 1:25, para las fases obtenidas en el fraccionamiento celular la fracción citosólica se diluyó 1:20 y la fracción nuclear se diluyó 1:20.

A cada tubo se le adicionó 1 mL de la solución C (ver apéndice 2), se agitaron en un “vórtex” y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Después se adicionaron 100 µL de la solución D (Folín 1 N), se agitaron y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. La densidad óptica se determinó a 660 nm en un espectrofotómetro BioTek Synergy HT o en un espectrofotómetro Beckman DU-640. Los resultados se expresaron como mg/mL.

5.3.1.3 INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP).

Esta técnica permite analizar la interacción proteínas-ADN en regiones específicas del genoma de las células mediante el entrecruzamiento de las proteínas con el ADN, la fragmentación y solubilización de la cromatina y el uso de un anticuerpo específico para la proteína de interés.

Una vez que las células alcanzaron el 100% de confluencia en cajas Petri de 60 mm se incubaron con NDGA 15 µM por 3 h a 37°C, se retiró el medio con NDGA, se añadió medio con formaldehído al 1% (67.5 µL de formaldehído al 37% en 2.5 mL de medio) por 10 min a temperatura ambiente para entrecruzar las histonas con el ADN, se retiró el medio, se lavó 2 veces con PBS frío

(suplementado con PMSF 1 mM e inhibidores de proteasas), las células se cosecharon en un tubo eppendorf de 1.5 ml que se centrifugó a máxima potencia por 30 s en una centrifuga de mesa Beckman modelo microfugue E, se retiró el sobrenadante y se obtuvo el botón celular que se congeló en nitrógeno líquido o se sometió enseguida al ensayo de ChIP usando un estuche de Millipore (# cat. 17-295) realizando los siguientes procedimientos:

5.3.1.3.1 Fragmentación de ADN.

La primera etapa de este ensayo consistió en obtener el ADN de las células y fragmentarlo en segmentos de entre 200 y 1,000 pares de bases. Para ello el botón celular se resuspendió en 300 μ L de amortiguador de lisis ("SDS Lysis Buffer") a los que se le añadieron en el momento de usar 3 μ L de PMSF 100 mM y 5 μ L de la solución de inhibidores de proteasas.

Para romper el ADN la suspensión celular se sometió al siguiente procedimiento:

1. Se aplicó ultrasonido por 12 períodos de 10 s con intervalos de 1 min empleando un sonicador Fisher Scientific modelo XL-2000 en potencia 4 (durante este proceso hay 2 condiciones muy importantes que se deben cumplir: 1) Mantener las muestras en hielo para no desnaturalizar al ADN debido al calor generado por el ultrasonido y 2) No generar espuma durante la aplicación del ultrasonido ya que ésta impide la ruptura completa del ADN).
2. Se añadieron 8 μ L de NaCl 5 M a cada tubo y se incubaron a 65°C por 4 h para revertir el entrecruzamiento de histonas con el ADN.
3. Se aisló el ADN usando una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (FCI) (25:24:1) realizando lo siguiente:
4. Se tomaron 200 μ L de la solución incubada a 65°C y se mezclaron con 200 μ L de la solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se agitó por inversión, se centrifugó a 12,000 x g por 5 min a temperatura ambiente, se separó la fase acuosa (fase superior) y se repitió el proceso de añadir 200

- μ L de la solución FCI, centrifugar y recuperar la fase acuosa 2 veces más para eliminar por completo las proteínas.
5. Se añadió 1 volumen de cloroformo para eliminar el fenol residual, se agitó por inversión.
 6. Se centrifugó a 12,000 x g por 5 min a temperatura ambiente, se obtuvo la fase superior.
 7. Para precipitar el ADN se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.5 y 2 volúmenes de etanol absoluto.
 8. Se incubó 1 h a -80°C o toda la noche a -40°C .
 9. Se centrifugó a 10,000 rpm (13,000 x g) por 10 min a 4°C , se retiró el sobrenadante con una micropipeta.
 10. El botón se secó a temperatura ambiente invirtiendo el tubo.
 11. Se añadió 1 mL de etanol al 70% frío.
 12. Se centrifugó a 12,000 rpm (18,500 x g) por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante.
 13. El botón se secó a temperatura ambiente invirtiendo el tubo.
 14. El botón se resuspendió en 50 μ L de amortiguador tris-EDTA pH 8.0.
 15. Diez μ L de la muestra se mezclaron con 10 μ L de amortiguador de azul de bromofenol 6X.
 16. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en amortiguador tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 0.5X con pH 8.0 y con bromuro de etidio (0.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 70 volts por 45 min usado una cámara de electroforesis horizontal GIBCO modelo Horizon 5.8.
 17. El ADN se visualizó en un transiluminador ultravioleta de la marca UVP modelo White/UV TMW-20.

Una vez demostrado que el procedimiento de fragmentación de ADN era el adecuado, otras muestras se sometieron al mismo proceso de fragmentación pero en lugar de añadir el NaCl 5 M (paso 2 del procedimiento anterior) las células se sometieron al siguiente procedimiento:

- El resuspendido celular se lisó con ultrasonido aplicando 12 períodos de 10 s con intervalos de 1 min (en hielo).

- Se centrifugó a 13,000 rpm (22,000 x g) por 10 min a 4°C.
- Se colocaron 200 µL del sobrenadante en un tubo eppendorf de 2 mL.
- Se agregaron 1.8 mL de “ChIP dilution buffer”, 5 µL de la solución de inhibidores de proteasas y 75 µL de la solución de “Protein A/Agarose/Salmon Sperm DNA (50% slurry)”.
- Esta mezcla se incubó con agitación por 30 min a 4°C.
- Se centrifugó a 2,500 rpm (810 x g) por 5 min a 4°C y el sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- Se añadieron 20 µL del anticuerpo anti-Nrf2 (H-300).
- La mezcla se incubó toda la noche a 4°C con rotación.
- Se añadieron 60 µL de la solución “Protein A/Agarose/Salmon Sperm DNA (50% Slurry)”.
- Se incubó por 2 h a 4°C con rotación.
- Se centrifugó a 1,000 rpm (130 x g) por 1 min a 4°C y se retiró el sobrenadante.
- Al botón resultante (complejo de Proteína A/Agarosa/Anti-Nrf2/Histonas) se le añadió 1 mL de la solución “Low Salt Immune Complex Wash Buffer”.
- Se incubó por 5 min a 4°C con rotación.
- Se centrifugó a 2,000 rpm (520 x g) por 2 min a 4°C y el sobrenadante se desechó.
- Al botón resultante se le agregó 1 mL de la solución “High Salt Immune Complex Wash Buffer”.
- Se incubó 5 min a 4°C con rotación.
- se centrifugó a 2,000 rpm (520 x g) por 3 min a 4°C y el sobrenadante se desechó.
- Se añadió 1 mL de la solución “LiCl Immune Complex Wash Buffer”.
- Se incubó 5 min a 4°C con rotación.
- Se centrifugó a 2,500 rpm (810 x g) por 3 min a 4°C y el sobrenadante de nueva cuenta se desechó.
- Se añadió otra vez 1 mL de la solución “TE Buffer”,

- Se incubó 5 min a 4°C con rotación,
- Se centrifugó a 2,500 rpm (810 x g) por 3 min a 4°C y el sobrenadante también se desechó.

Al final de todo este proceso el botón obtenido era un complejo de Proteína A/anti-Nrf2/histonas/ADN el cual fue sometido de inmediato a un inmunoensayo de western blot.

5.3.1.3.2 Inmunoensayo de western blot.

El botón se resuspendió en 25 µL de amortiguador de Laemmli 2X, las muestras se desnaturalizaron en agua hirviendo por 10 min, se tomaron 20 µL de cada muestra y se sometieron a una electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 12.5% a 100 volts durante 2.5 h. Se realizó la transferencia de muestras por 1 h a 400 mA a una membrana de nitrocelulosa la cual se bloqueó con leche en polvo al 5% (en PBS-T) durante 1 h, se lavó 3 veces con PBS-T durante 10 min, se incubó con una solución de anticuerpo anti-Nrf2 (C-20) diluido 1:1,000 (en PBS-T) por 1 h y luego de 3 lavados de 10 min con PBS-T se incubó por 1 h con una solución de anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano anti-conejo diluido 1:15,000 (en PBS-T). La detección del Nrf2 se realizó por quimioluminiscencia y usando placas de autorradiografía Hybond ECL.

5.3.1.4 ESTUDIOS DE UNIÓN DE NRF2 A LA SECUENCIA ARE.

5.3.1.4.1 Ensayo de retardo electroforético (EMSA; Electrophoretic Mobility Shift Assay).

Este método es utilizado para analizar las interacciones entre el ADN y las proteínas y se basa en el hecho de que el complejo ADN-proteína migra a una velocidad menor (retardo) que el ADN libre durante una electroforesis. Para identificar la proteína que se une al ADN se agrega un anticuerpo específico para esa proteína de manera que si la proteína de interés está unida al ADN, el anticuerpo se unirá a la proteína y este complejo de ADN-proteína-anticuerpo migra a una velocidad aún menor (super-retardo) en relación con el complejo ADN-proteína y con el ADN libre.

El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del estuche “LightShift Chemiluminiscent EMSA” el cual utiliza un método no radioactivo para la detección de las interacciones ADN-proteínas. El ADN que contiene la secuencia ARE (el sitio de unión para Nrf2) estaba marcado con biotina y se incubó con la fracción nuclear que se obtuvo de las células LLC-PK1, esta mezcla se sometió a una electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida al 12.5% y se transfirió a una membrana de nylon (Biodyne, Thermo Scientific). La sonda biotinilada se detectó empleando estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano y un sustrato quimioluminiscente que están incluidos en el estuche.

Sistema de control EBNA (antígeno nuclear del virus Epstein-Barr)

El estuche incluye componentes para verificar que el procedimiento de detección se haya realizado correctamente y el esquema general de reacciones fue el siguiente:

Reacción	Componentes de la reacción	Descripción	Resultado
1	ADN control (ADN biotinilado del EBNA)	Se establece la posición de la banda que corresponde a la sonda marcada con biotina.	
2	ADN biotinilado del EBNA + extracto nuclear EBNA	La proteína se une a la sonda y el retardo electroforético se presenta.	
3	ADN biotinilado a EBNA + extracto nuclear EBNA + ADN EBNA sin biotina	La señal que se detecta en la reacción 2 ya no se observa debido a la competencia del exceso de sonda no marcada.	

Las reacciones se incubaron por 20 min a temperatura ambiente y se añadieron 5 μ L de amortiguador de carga 5X, luego se sometieron a una electroforesis desnaturizante en geles de SDS-poliacrilamida al 12.5% durante

1.5 h con un voltaje constante de 80 volts en un equipo “SE 250 Mighty Small” (GE Healthcare Life Sciences) usando como amortiguador de corrida un amortiguador de TBE 1X. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nylon por 30 min a 380 mA en una cámara de transferencia “TE 22 MINI Transfer Tank” (GE Healthcare Life Sciences) empleando como amortiguador de transferencia amortiguador TBE 0.5X. Luego entrecruzó el ADN a la membrana con luz UV en un entrecruzador “Stratalinker® UV Crosslinker”, aplicándose 120 mJ/cm² por 45 s.

La membrana de nylon se bloqueó con “Blocking Buffer” durante 15 min con agitación suave, se incubó con la enzima estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano diluida 1:3,000 en “Blocking Buffer” por 15 min con agitación suave. Se realizaron 4 lavados de 5 min con la solución “Wash Buffer 1X” y se agregó la solución “Substrate Equilibration Buffer” durante 5 min. Los complejos se detectaron mediante quimioluminiscencia en placas de autorradiografía Hyperfilm ECL.

5.3.1.4.1.1 Síntesis de sondas ARE biotiniladas y de sondas ARE sin marca

Para realizar el ensayo EMSA usando las fracciones nucleares de las células LLCPK1 tratadas con NDGA se solicitó a la compañía Accesolab S.A. de C.V. la síntesis de los siguientes oligonucleótidos:

- **Sonda ARE marcada con biotina en el extremo 3' (dirección 5'→3')**
Secuencia -GATCTTTTATGCTGAGTCATGGTTT-Biotina
- **Sonda ARE marcada con biotina en el extremo 3' (dirección 3'→5')**
Secuencia -ACGTAAACCATGACTCAGCATAAAA-Biotina
- **Sonda ARE sin marca (dirección 5'→3')**
Secuencia -GATCTTTTATGCTGAGTCATGGTTT
- **Sonda ARE sin marca (dirección 3'→5')**
Secuencia -ACGTAAACCATGACTCAGCATAAAA

Se prepararon soluciones 50 μM de cada oligonucleótido en un amortiguador de tris 10 mM/EDTA 1 mM/NaCl 50 mM pH 8.0 en H_2O estéril sin dietilpircarbonato (DEPC) en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles.

A partir de las soluciones 50 μM se prepararon soluciones 1 μM de cada oligonucleótido en amortiguador usando el amortiguador recién mencionado en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles.

5.3.1.4.1.2 Alineamiento complementario de las sondas ARE.

En tubos para PCR de 0.25 ml se mezclaron 25 μl del oligonucleótido biotinilado ARE 5'→3' (1 μM) con 25 μl del oligonucleótido biotinilado ARE 3'→5' (1 μM).

En otros tubos para PCR se mezclaron 25 μl del oligonucleótido sin marca ARE 5'→3' (1 μM) con 25 μl del oligonucleótido sin marca ARE 3'→5' (1 μM).

Para generar la sonda ARE biotinilada de doble hebra y la sonda ARE sin marca de doble hebra los tubos se colocaron en un termociclador GeneAmp[®] PCR System c/700 (versión 2.02) de PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, EUA) y se realizó el siguiente procedimiento programado:

- Un ciclo de 5 min a 95°C
- Setenta ciclos de 1 min cada uno (al final de cada ciclo la temperatura disminuyó 1°C de manera que al final de los 70 ciclos se llegó a una temperatura de 25°C)
- Un ciclo de 30 min a 4°C

Al final de este procedimiento las sondas ARE se guardaron a -80°C

Para realizar en ensayo de EMSA con las fracciones nucleares de células normales y de células tratadas con NDGA 15 μM por 3 h se usaron 20 femtomoles de la sonda biotinilada ARE de doble hebra por cada reacción y 4 picomoles de sonda sin marca ARE por cada reacción (de acuerdo a las instrucciones del estuche) y la detección se realizó por quimioluminiscencia en placas Hybond ECL.

5.4 VALORACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE HO-1 INDUCIDO POR NDGA ANTE EL RETO OXIDANTE CON H₂O₂.

Se establecieron las condiciones en las que la exposición de las células a H₂O₂ causó el 50% de reducción en la viabilidad mediante estudios curso temporales y de dosis repuesta.

Para evaluar si la posible inducción de HO-1 por NDGA era capaz de conferir resistencia a las células ante la exposición a H₂O₂ éstas se expusieron previamente a la concentración y durante el tiempo en que el NDGA indujo la mayor actividad de HO-1 y luego a las condiciones en que el H₂O₂ disminuyó la viabilidad celular en un 50%.

5.4.1 ESTUDIOS DE CONCENTRACIÓN-RESPUESTA ANTE LA EXPOSICIÓN A H₂O₂

Cuando las células alcanzaron el 90-100% de confluencia en placas de 48 pozos el DMEM con SFB se retiró y enseguida se manejaron las siguientes condiciones:

1. Grupo CT, (DMEM/AB)
2. Grupo H₂O₂, (H₂O₂ 1 mM por 2 h)
3. Grupo NDGA, (NDGA 15 µM por 6 h)
4. Grupo NDGA+H₂O₂, (NDGA 15 µM por 6 h y enseguida H₂O₂ 1 mM por 2 h)

5.4.2 VIABILIDAD CELULAR

Las células se incubaron por 6 h a 37°C en una atmósfera de CO₂/O₂ (5%/95%). Una vez terminados los períodos de tratamiento a los grupos 2, 3 y 4 se les retiró la solución de tratamiento, se les adicionó DMEM/AB 1% y se incubaron por 24 h. Se tomaron fotos representativas de cada grupo y enseguida se añadieron al medio 20 µL de una solución de MTT de 1 mg/mL. Las células se incubaron durante 1 h más en la incubadora, al término de este período el medio se retiró y el formazán generado se solubilizó en isopropanol ácido (250 µL/pozo) a 4°C. La D.O. del formazán se midió a 570 nm en un espectrofluorómetro BioTek Synergy HT. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción del MTT.

5.5 SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LA EXPRESIÓN DE LA HO-1.

5.5.1 Co-incubación con el inhibidor mesoporfirina de estaño (SnMP).

Se estudió el papel que la HO-1 desempeña en las células coincubando éstas con un inhibidor de esta enzima (SnMP 10 μ M) después de haberlas incubado con NDGA y antes de exponerlas a H₂O₂ y se determinaron los cambios en la viabilidad celular.

La solución de SnMP 10 μ M se preparó de la siguiente manera:

Se preparó una solución 250 μ M SnMP dimetil sulfóxido (DMSO) al 1%:

- Se pesaron 2 mg de NDGA
- Se disolvieron en 2 mL de NaOH 0.1M
- Se añadieron 8 mL de amortiguador de fosfatos 10 mM pH7.5
- Se ajustó el pH a 7.5

Esta solución se esterilizó por filtración y a partir de ella se preparó una solución 10 μ M en DMEM/AB.

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos se presentan como promedio \pm error estándar, se analizaron con el programa Prism 5.02 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) usando la prueba ANOVA seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni o de Dunnet. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a valores de $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS.

6.1 Efecto del NDGA sobre la actividad de HO.

Con el propósito de establecer si la exposición de las células LLC-PK1 al NDGA induce la expresión de la actividad de la enzima HO se realizaron estudios curso temporales empleando diferentes concentraciones de NDGA así como tiempos de exposición. Los resultados de esos experimentos se presentan en la Fig. 10.

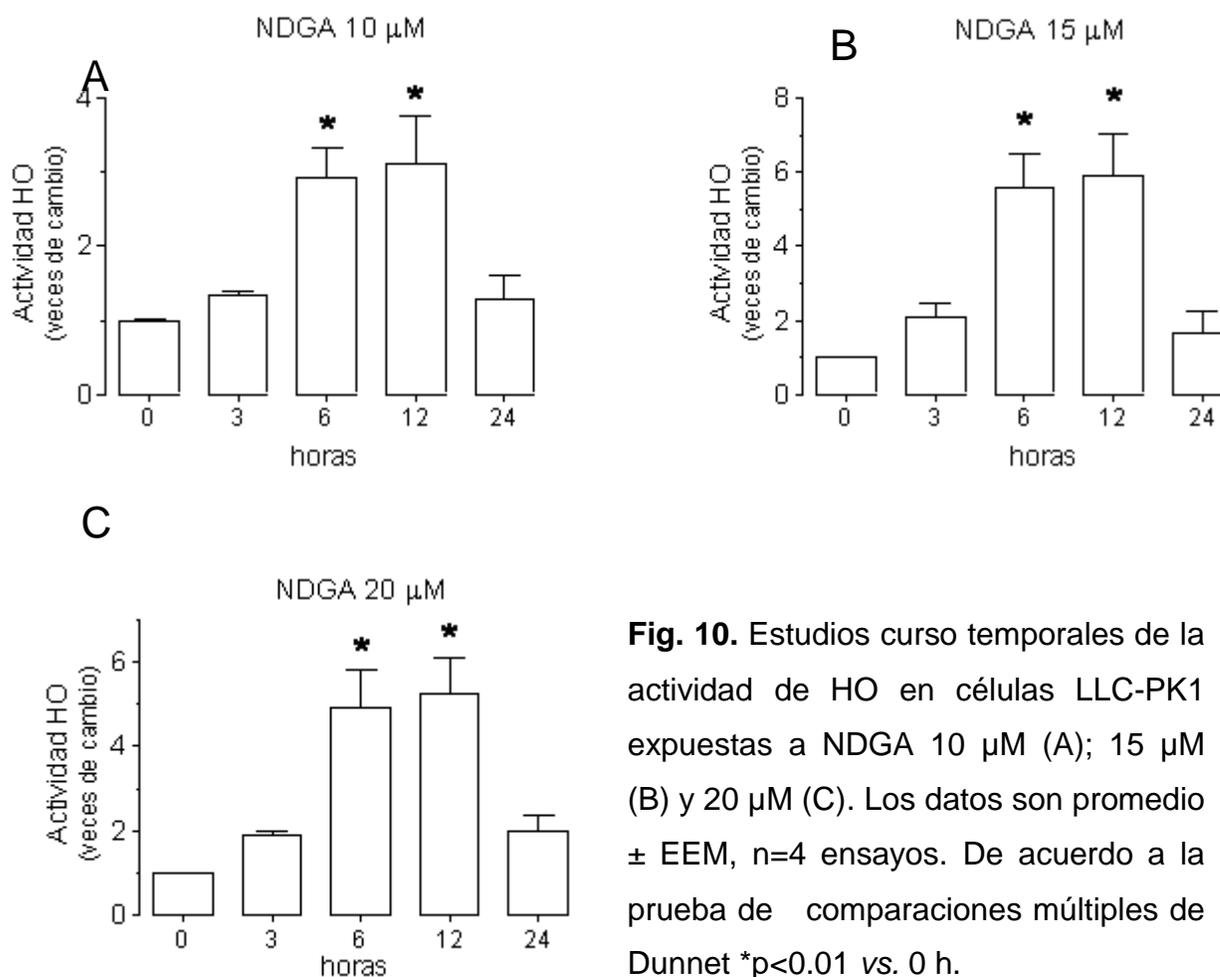


Fig. 10. Estudios curso temporales de la actividad de HO en células LLC-PK1 expuestas a NDGA 10 μM (A); 15 μM (B) y 20 μM (C). Los datos son promedio \pm EEM, n=4 ensayos. De acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet *p<0.01 vs. 0 h.

Se observó que la exposición de las células a las 3 concentraciones de NDGA causó un aumento en la actividad de hemo oxigenasa. El patrón de aumento fue muy similar en las 3 concentraciones pero los aumentos máximos se

presentaron con las concentraciones de 15 y 20 μM y debido a ello se decidió utilizar para las siguientes determinaciones la concentración de NDGA 15 μM .

En la Fig. 10B se observa que después de 3 h de exposición al NDGA las células presentaron un aumento en la actividad enzimática que fue evidente desde las 3 h (2.1 ± 0.4 veces vs. el tiempo 0 h) aunque no hubo diferencias significativas, mientras que los aumentos observados a las 6 h (5.6 ± 0.9 veces) y 12 horas (5.9 ± 1.1 veces), sí fueron significativamente diferentes ($p < 0.01$ vs. tiempo 0 h). Veinticuatro horas después la actividad disminuyó casi a valores normales (1.6 ± 0.6 veces, no significativo vs. tiempo 0 h).

6.2 Efecto del NDGA sobre la expresión de la proteína HO-1.

Al igual que en la actividad de HO, el tratamiento con NDGA causó un aumento en los niveles de la proteína HO-1 (Fig. 11). Debido a que la actividad de HO no cambió significativamente a las 3 h de exposición al NDGA, el inmunoensayo de western blot se realizó con células expuestas al NDGA durante 6, 12 y 24 h. El análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (corregido considerando la expresión de tubulina) indicó que los incrementos fueron de 8.9 ± 1.8 veces a las 6 h ($p < 0.01$ vs. 0 h); de 9.3 ± 2.8 veces a las 12 h ($p < 0.01$ vs. 0 h) y de 4.2 ± 1.7 veces a las 24 h (no significativo vs. 0 h) (Fig. 12).

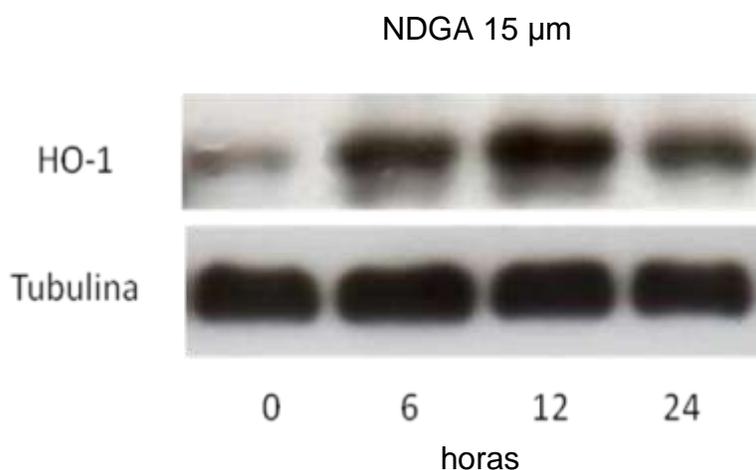


Fig. 11. Western blot de HO-1 y de tubulina en células LLC-PK1 expuestas a NDGA. La detección se realizó por quimioluminiscencia. Imagen representativa de 3 ensayos.

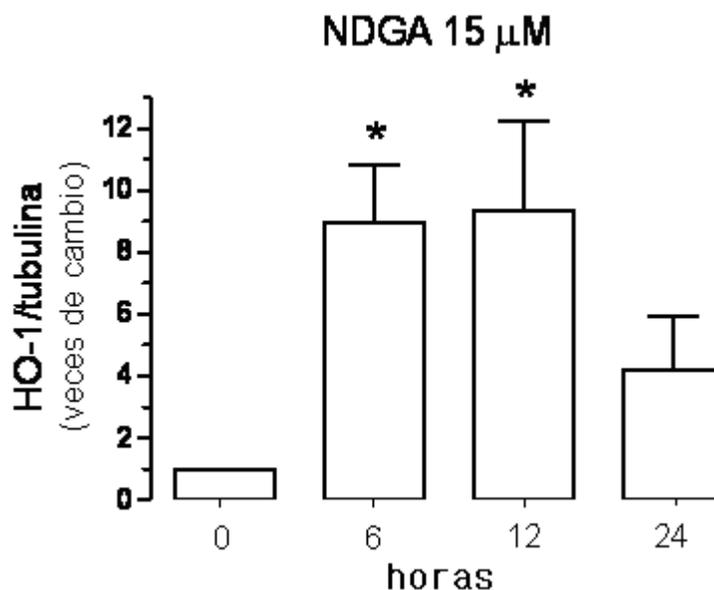


Fig. 12. Análisis densitométrico de la expresión de HO-1 en células tratadas con NDGA a diferentes tiempos. Los datos son promedio \pm EEM, $n = 3$ ensayos. * $p < 0.01$ vs. 0 h.

6.3 Activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE.

Una vez que se determinó que el NDGA indujo la expresión de HO en las células LLC-PK1 se realizaron varios procedimientos y análisis para determinar si esa inducción se realizaba a través de la vía de señalización celular Keap1/Nrf2/ARE.

6.3.1 Inmunocitoquímica.

Para corroborar la traslocación nuclear del Nrf2 inducida por la exposición a NDGA observada por medio del western blot, otras células expuestas a los mismos tiempos a este compuesto se sometieron al ensayo de inmunocitoquímica.

En la Fig. 13 se presentan imágenes representativas de las células (en campo claro (panel A), de fluorescencia para el Nrf2 (panel B) y de fluorescencia nuclear (panel C)) que indican claramente que la señal del Nrf2 se presenta a las 3 y 6 h en la región nuclear de las células. Esta ubicación nuclear se corroboró con la tinción de los núcleos celulares con Hoechst, una molécula que se une preferentemente a secuencias adenina-timina del ADN emitiendo un color azul al ser excitado con luz ultravioleta.

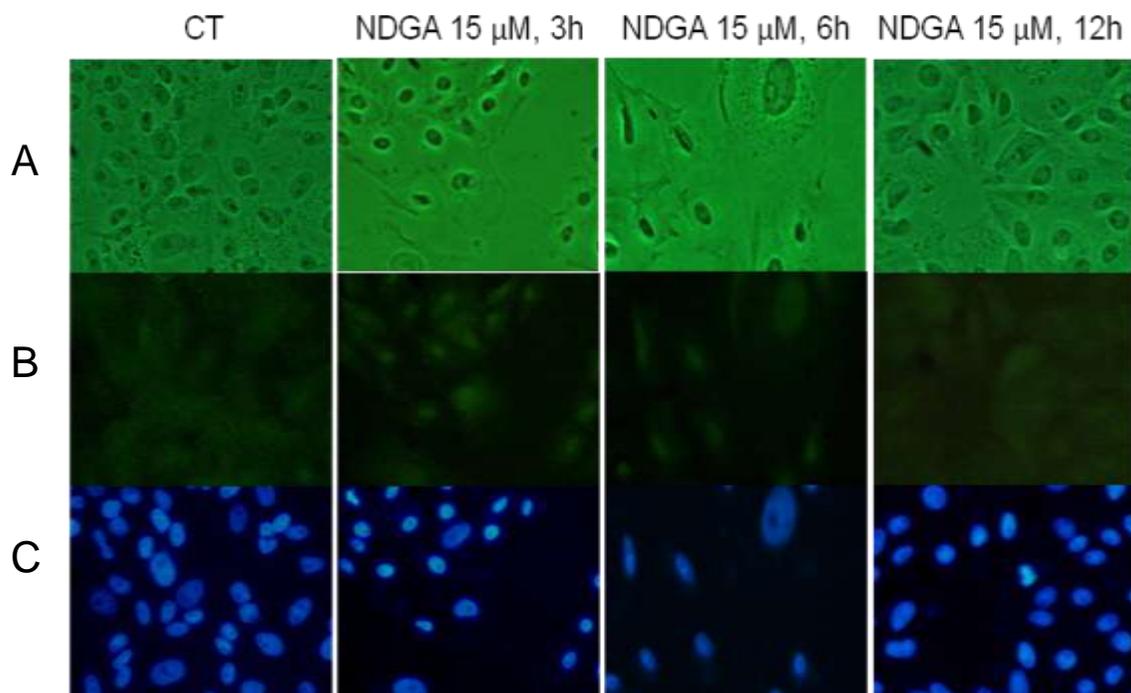


Fig. 13. El NDGA indujo la traslocación nuclear del Nrf2 en las células LLC-PK1. A= microscopía de campo claro; B= inmunocitoquímica de fluorescencia para Nrf2; C= Tinción nuclear fluorescente con Hoechst 33258. Imágenes representativas de 3 ensayos y obtenidas con amplificación 40X.

6.3.2 Fraccionamiento celular.

Se obtuvieron las fracciones citosólicas y nucleares de las células LLC-PK1 con el propósito de determinar si el Nrf2 se trasladó a la fracción nuclear después de haber sido expuestas por 6 h a NDGA 15 μ M. El proceso de fraccionamiento celular se validó realizando inmunoensayos de western blot empleando el anticuerpo anti-tubulina como marcador de fracción citosólica y el anticuerpo anti-lamina B1 como marcador de fracción nuclear. En la Fig. 14 se observa que en la fracción citosólica no hubo señal para lamina B1 mientras que en la fracción nuclear no hubo señal para tubulina.

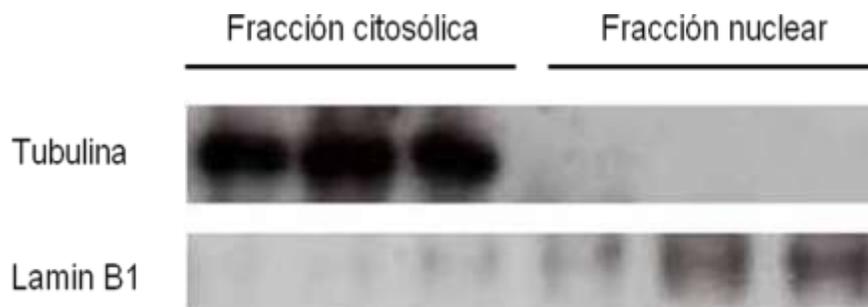


Fig. 14. Western blot para tubulina en la fracción citosólica y para lamina B1 en la fracción nuclear de células LLC-PK1 normales. La detección se realizó por quimioluminiscencia. Imagen representativa de 3 ensayos.

6.3.3 Translocación nuclear de Nrf2.

6.3.3.1 Western blot.

Con las fracciones citosólicas y nucleares de las células expuestas durante 3, 6 y 12 h al NDGA se realizó el inmunoensayo de western blot para Nrf2 el cual reveló que tanto en la fracción citosólica (Fig. 15) como en la fracción nuclear (Fig. 17) se detectó este factor de transcripción. El análisis densitométrico indicó que en el citosol los niveles de Nrf2 (normalizados con los niveles de tubulina) aumentaron 1.13 ± 0.11 ; 1.43 ± 0.24 y 1.63 ± 0.15 veces ante la exposición a NDGA $15 \mu\text{M}$ durante 3, 6 y 12 horas, respectivamente (Fig. 16). Por lo que respecta a la fracción nuclear se observó que el NDGA indujo un aumento máximo en la señal del Nrf2 a las 3 h y dicha señal disminuyó paulatinamente a las 6 y 12 h (Fig. 17) lo que indicó sin duda alguna el traslado del Nrf2 al núcleo celular. El análisis densitométrico de la señal del Nrf2 se normalizó en la fracción nuclear con la señal de lamina B1 (Fig. 18).

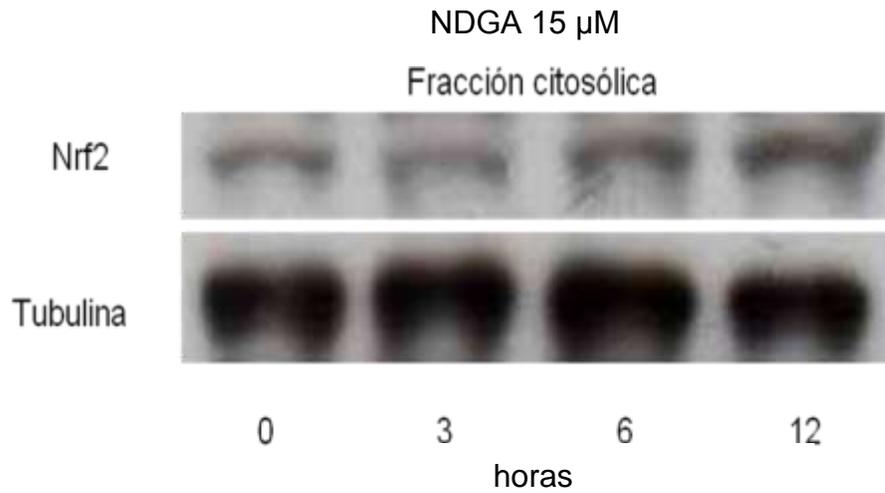


Fig. 15. Western blot para Nrf2 y para tubulina en la fracción citosólica de células tratadas con NDGA. La detección se realizó por quimioluminiscencia. Imagen representativa de 3 ensayos.

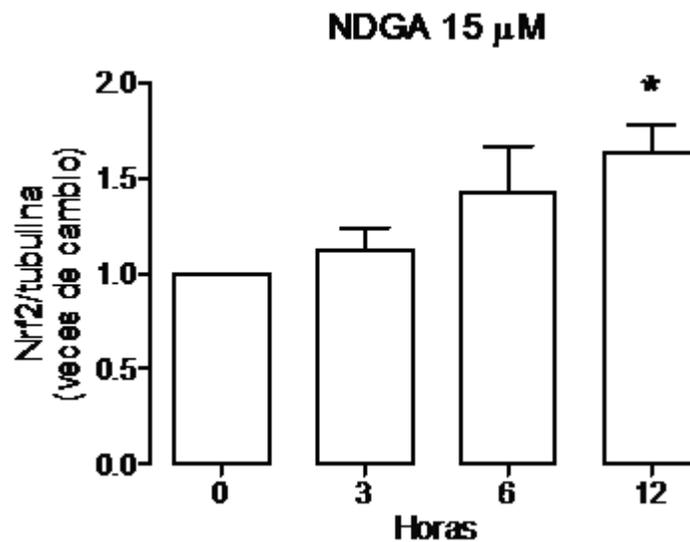


Fig. 16. Cuantificación densitométrica de los ensayos de western blot para Nrf2 y para tubulina en la fracción citosólica de células tratadas con NDGA 15 μ M. Los datos son promedio \pm EEM, n= 3 ensayos. * p <0.05 vs. 0 horas.

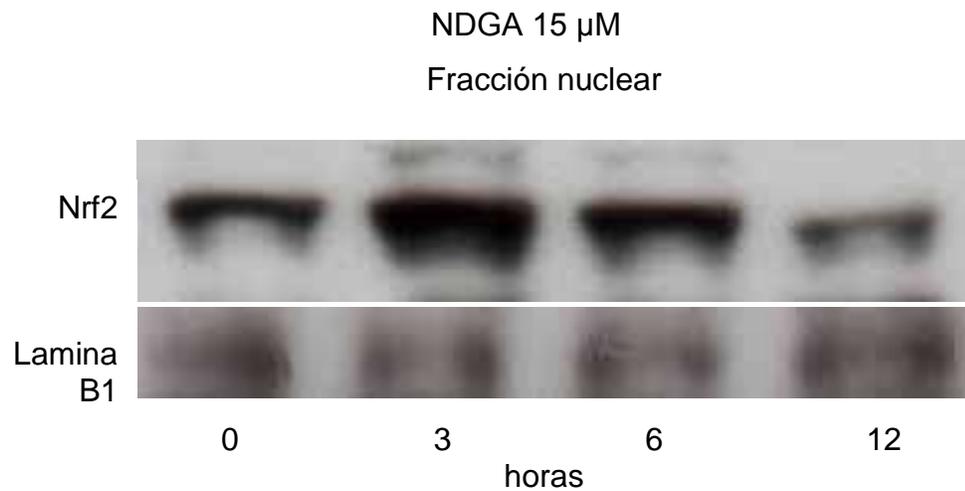


Fig. 17. Western blot para Nrf2 y para lamina B1 en la fracción nuclear de células tratadas con NDGA. La banda del Nrf2 corresponde a un peso aproximado de 110 KDa. La detección se realizó por quimioluminiscencia. Imagen representativa de 3 ensayos.

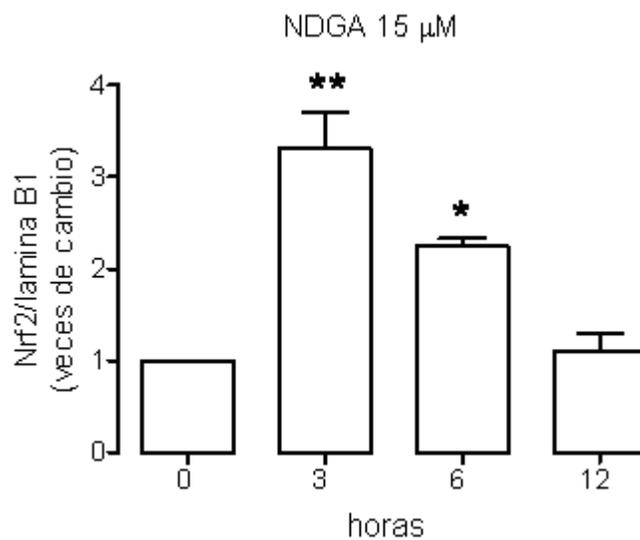
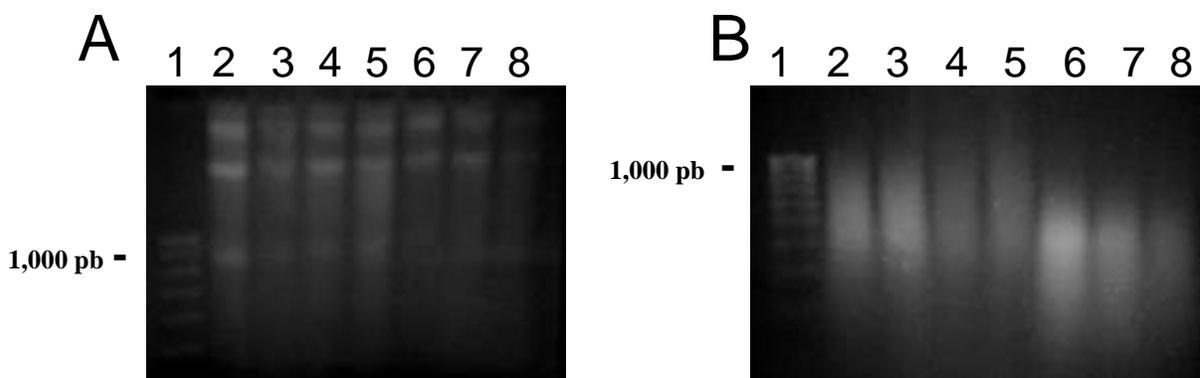


Fig. 18. Cuantificación densitométrica de los ensayos de western blot para Nrf2 y para lamina B1 en la fracción nuclear de células tratadas con NDGA 15 μ M. Los datos son promedio \pm EEM, n = 3 ensayos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ vs. 0 h.

6.3.3.2 ChIP

Los resultados obtenidos con el western blot y con la inmunocitoquímica indican que el Nrf2 se trasladó al núcleo celular en respuesta a la exposición al NDGA, pero estos métodos no son los apropiados para determinar si el Nrf2 se unió al ADN celular. Para ello otras células, expuestas durante 3 h con NDGA 15 μ M (tiempo determinado por los resultados obtenidos con el western blot e inmunocitoquímica en función de la translocación nuclear del Nrf2), se sometieron al ensayo de ChIP, un método que determina si una proteína en particular se une o está localizada en una secuencia de ADN.

En este método es necesario entrecruzar las proteínas con el ADN mediante el uso de formaldehído. La cromatina, con las proteínas unidas a ella, se aísla y se rompe en fragmentos pequeños que se usan como sustrato para realizar una inmunoprecipitación con un anticuerpo específico a una de las proteínas unidas al ADN. Después de revertir el entrecruzamiento del ADN y de las proteínas se realiza un inmunoensayo para determinar si una proteína específica estuvo unida al ADN inmunoprecipitado. En la figura 19 se presentan 2 procedimientos de fragmentación del ADN que se realizaron en células LLC-PK1 normales.



Una vez que se comprobó que el método de fragmentación del ADN fue el adecuado, otras células se sometieron al ensayo de ChIP. En la figura 20 se observa el resultado de este ensayo que muestra claramente una señal más intensa en las células expuestas a NDGA lo que indica que esa molécula indujo la unión del Nrf2 al ADN.



Fig. 20. El NDGA indujo la unión del Nrf2 al ADN celular. El complejo ADN/proteínas se inmunoprecipitó y se sometió al inmunoensayo de western blot. La señal para Nrf2 se detectó por quimioluminiscencia. Las células fueron tratadas con NDGA 15 μ M por 3 h.

6.3.3.3 EMSA.

Finalmente, para determinar si el factor de transcripción Nrf2 se unió a la secuencia ARE como consecuencia de la exposición a NDGA, las células LLC-PK1 expuestas a NDGA 15 μ M durante 3 h se sometieron al ensayo de EMSA, un método que es muy útil para identificar proteínas que interactúan con el ADN y que se basa en las diferencias de migración en un gel de poliacrilamida no desnaturizante entre el ADN libre y el ADN unido a una proteína.

En la figura 21 se presentan los resultados del EMSA con los componentes del control de EBNA y en la figura 22 se presentan los resultados del ensayo de EMSA los cuales indican claramente que el NDGA causó la unión del Nrf2 con la secuencia ARE.

En la figura 22 se observa en la línea 7 una banda de retardo que corresponde al complejo Nrf2/ARE (indicada por la flecha), mientras que en las células normales dicha banda no es apreciable (línea 3).

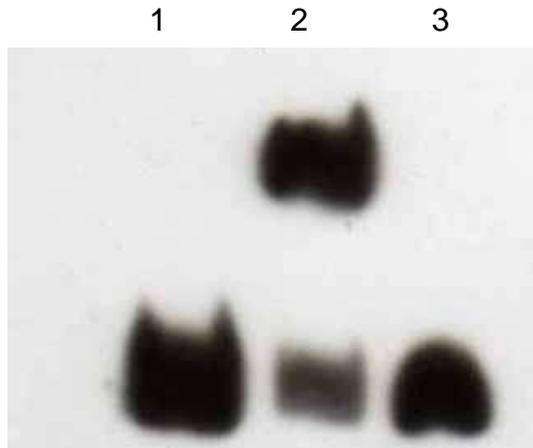


Fig. 21. Ensayo EMSA con los componentes del módulo de optimización y control del estuche LightShift Chemiluminescent EMSA Kit de Pierce. 1= ADN biotinilado del EBNA; 2= ADN biotinilado del EBNA+ extracto de EBNA; 3= exceso de ADN sin marca de EBNA.

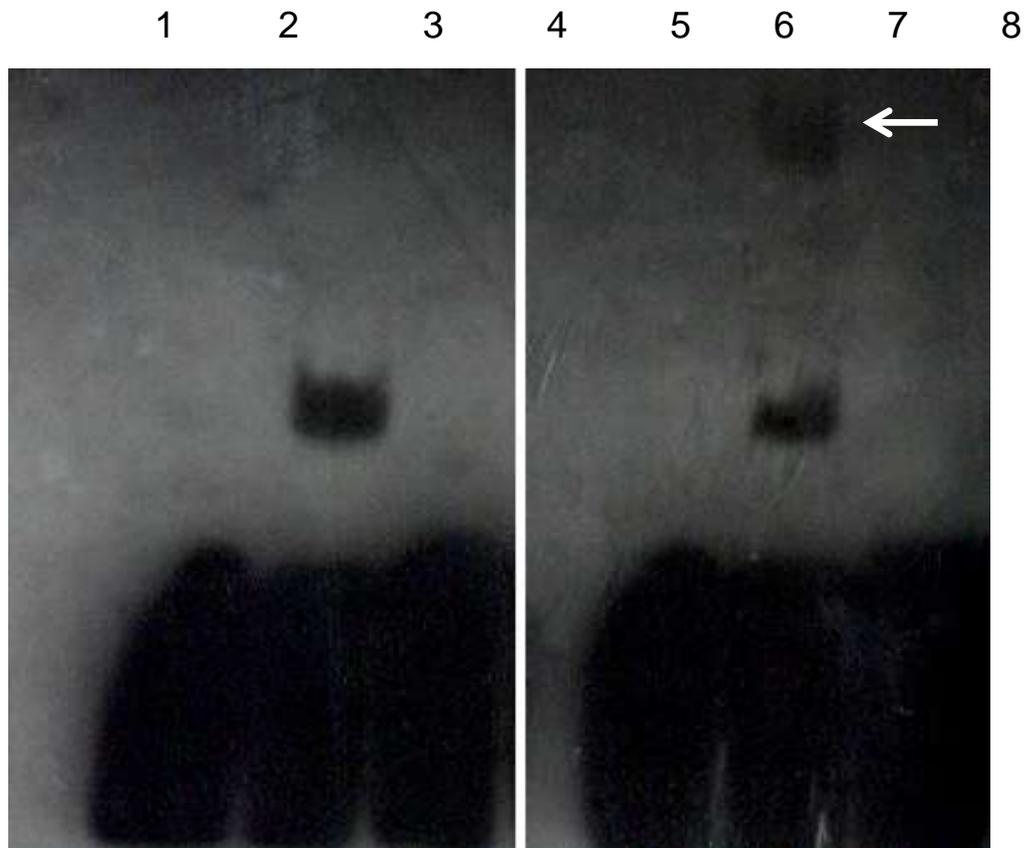


Fig. 22. Imagen de un ensayo de retardo electroforético (EMSA) de proteínas nucleares de células LLC-PK1 normales (líneas 1 a 4) y de células tratadas con NDGA 15 μ M por 3 h (líneas 5 a 8). Los extractos nucleares se incubaron con la secuencia del elemento de respuesta antioxidante (ARE) marcada con biotina. 1 y 5 = Proteínas nucleares; 2 y 6 = secuencia ARE; 3 y 7 = secuencia ARE+proteínas nucleares; 4 y 8 = secuencia ARE+proteínas nucleares+exceso de secuencia ARE sin biotina. La flecha señala el retardo de la secuencia ARE en las células tratadas con NDGA

Con el fin de demostrar que la proteína que se une a la secuencia ARE es el Nrf2, se realizaron otros ensayos de EMSA con células expuestas a NDGA en los que además se incluyó el anticuerpo anti-Nrf2. En la figura 23 se presentan los mismos resultados que en las líneas 5 a 8 de la figura 22: En la línea 3 se observa una banda de retardo causado por la unión del Nrf2 a la secuencia ARE (indicada por el asterisco) y en la línea 5 se presenta una banda de super-retardo causado por la unión del anticuerpo anti-Nrf2 al complejo ADN/Nrf2 (indicada por la flecha), lo que demuestra que la proteína que se unió al ADN era el Nrf2.

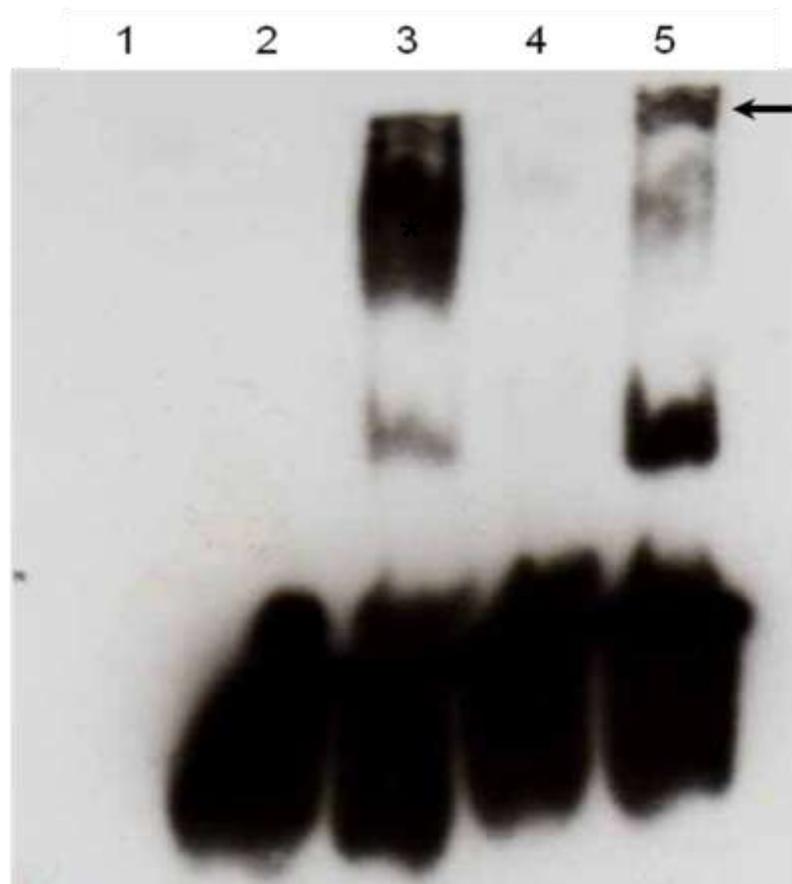


Fig. 23. Imagen de un ensayo de retardo y de super-retardo electroforético (EMSA) de proteínas nucleares de células LLC-PK1 tratadas con NDGA 15 μ M por 3 h. Los extractos nucleares fueron incubados con la secuencia del elemento de respuesta antioxidante (ARE) marcada con biotina. 1= Proteínas nucleares; 2= secuencia ARE; 3= secuencia ARE+proteínas nucleares; 4=secuencia ARE+proteínas nucleares+exceso de secuencia ARE sin biotina; 5= secuencia ARE+proteínas nucleares+anti-Nrf2. El asterisco indica el retardo y la flecha señala el super-retardo de la secuencia ARE (complejo ARE/Nrf2/anti-Nrf2).

6.4 Valoración del efecto y significado funcional de la inducción de HO-1 ante la exposición a H₂O₂

Una vez demostrado que el NDGA indujo la expresión de HO-1 a través de la vía de señalización Keap1/Nrf2/ARE se procedió a determinar si la inducción de esta enzima citoprotectora podría evitar o atenuar los efectos de una condición oxidante como lo es la exposición a H₂O₂.

Para ello se realizaron estudios curso temporales y de dosis respuesta exponiendo a las células LLC-PK1 a H₂O₂ encontrándose que la exposición a una concentración 1 mM de H₂O₂ por 2 horas causó una disminución del 50% en la viabilidad celular (Fig. 24).

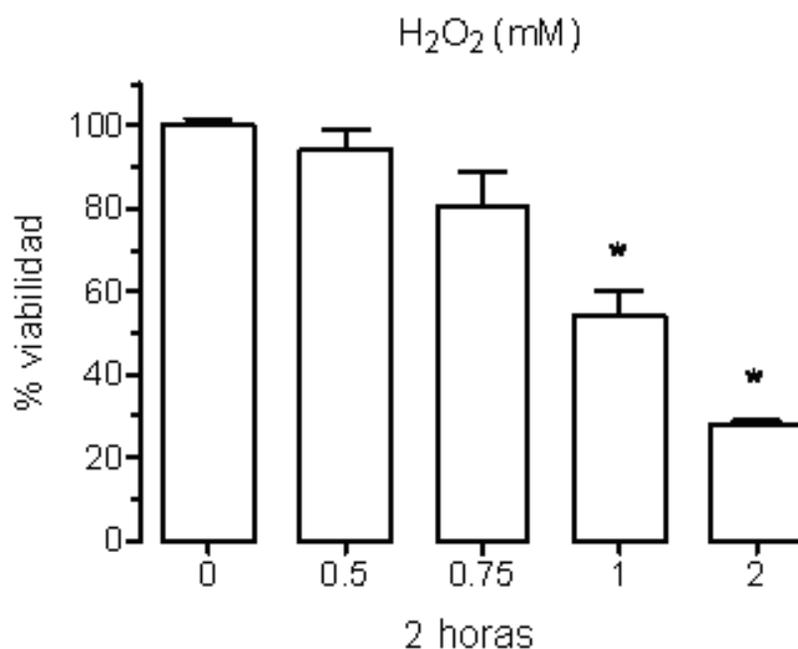


Fig. 24. Efecto del H₂O₂ sobre la viabilidad celular. Los datos son promedio \pm EEM (n=4). *p<0.001 vs. 0 μ M (Dunnet).

Los siguientes experimentos para determinar si la sobre-expresión de HO-1 inducida por el NDGA podría atenuar la disminución en la viabilidad de las células LLC-PK1 causada por la exposición a H₂O₂ consistieron en exponer a las células a NDGA 15 μ M por 6 h y enseguida a H₂O₂ 1 mM por 2 h. Después de la exposición al H₂O₂ las células se incubaron por 24 h, se midió su viabilidad y se obtuvieron

imágenes de microscopía. Los resultados de los ensayos con MTT indicaron que el tratamiento con NDGA evitó la disminución en la viabilidad de las células expuestas a H_2O_2 , es decir, que las células tratadas con NDGA fueron más resistentes ante la condición oxidante (Fig. 25), lo cual se reflejó en la morfología celular (Fig. 27).

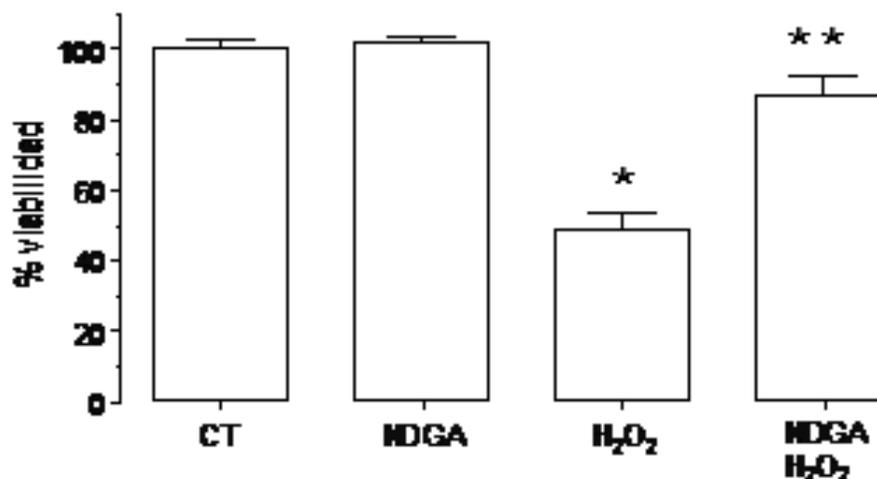


Fig. 25. Efecto del NDGA sobre la citotoxicidad causada por el H_2O_2 . Los datos son promedio \pm EEM (n=4). * $p < 0.001$ vs. CT, ** $p < 0.001$ vs. H_2O_2 .

Con el propósito de determinar si la sobre-expresión de la HO-1 era la responsable de la protección celular ante la exposición a H_2O_2 un grupo de células se incubó primero con NDGA por 6 h, luego por 30 min con un inhibidor de la HO-1 y finalmente con H_2O_2 1 mM por 2 h. Los resultados indicaron que el efecto de protección en la viabilidad celular fue anulado, lo que indica que la HO-1 es la responsable, en gran medida, de la resistencia celular ante la condición oxidante causada por la exposición a H_2O_2 (Fig. 26).

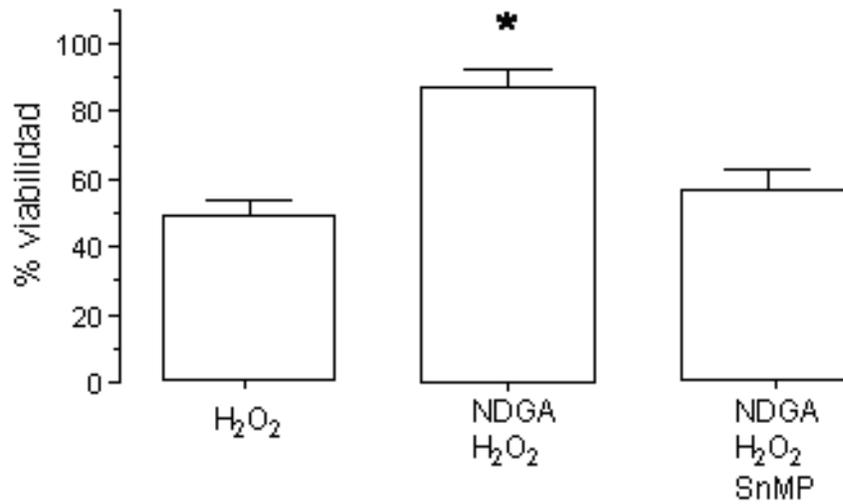


Fig. 26. La expresión de HO-1 inducida por NDGA es responsable de la resistencia a la citotoxicidad causada por el H₂O₂. Los datos son promedio \pm EEM (n=4). *p<0.001 vs. H₂O₂ y vs. NDGA+H₂O₂+SnMP. SnMP= Mesoporfirina de estaño.

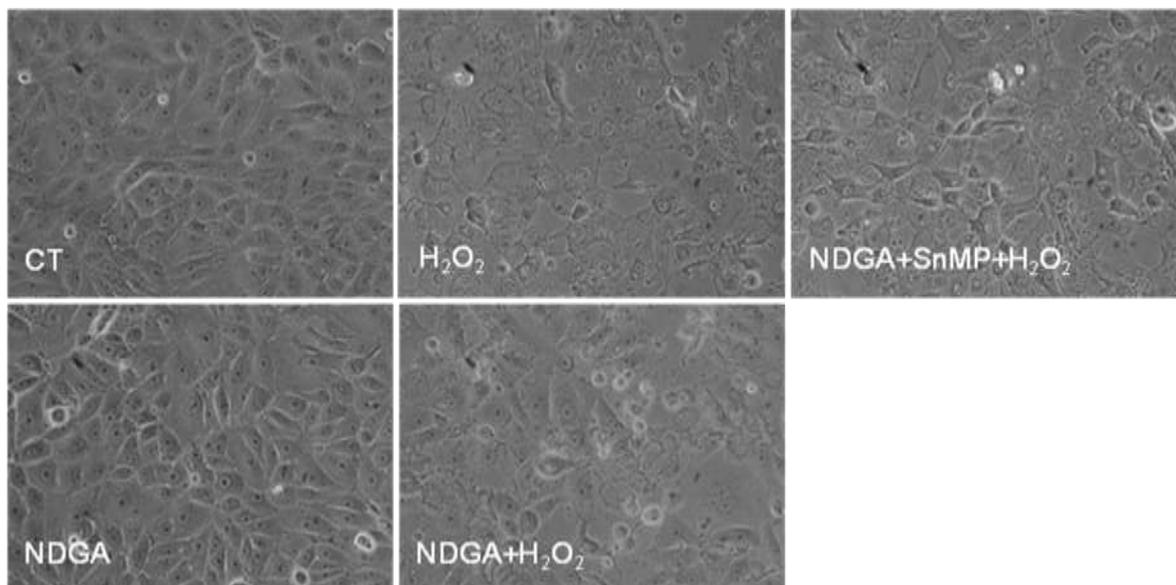


Fig. 27. Imágenes de microscopia de contraste de fases obtenidas 24 horas después de haber expuesto a las células LLC-PK1 a NDGA 15 μ M por 6 h; a H₂O₂ 1 mM por 2 h y a SnMP por 30 min.

7. DISCUSIÓN.

El mecanismo por el cual el Nrf2 induce la expresión de HO-1 ha sido ampliamente descrito en muchos trabajos los cuales indican que la vía de señalización celular Keap1/Nrf2/ARE es un sistema muy importante en la expresión de proteínas citoprotectoras de fase II. En esta vía el factor de transcripción Nrf2 normalmente se encuentra en el citosol unido a su proteína represora Keap1 lo que permite la señalización del Nrf2 por ubiquitina para que sea dirigido al proteosoma en donde es degradado continuamente. Sin embargo, bajo determinados estímulos el Nrf2 se separa de Keap1 y migra al núcleo para unirse a una secuencia específica en el ADN denominada ARE y activar la expresión de las proteínas citoprotectoras (Itoh *et al.*, 1997; Motohashi & Yamamoto, 2004) con lo que las células desarrollan las líneas de defensa ante los retos oxidantes. Esta respuesta incluye la síntesis de proteínas como las glutatión S transferasas, la glutamil-cisteína ligasa, la NADPH quinona óxido reductasa 1, la ferritina, la superóxido dismutasa y la HO-1, entre otras (Holtzclaw *et al.*, 2004).

Se ha descrito que una gran variedad de compuestos pueden activar la vía Keap1/Nrf2/ARE (Dinkova-Kostova *et al.*, 2004) lo que ha ocasionado la búsqueda y caracterización de compuestos que activen esta vía con el propósito de diseñar estrategias que protejan a las células del daño causado por el estrés oxidante mediante la inducción de la expresión de proteínas citoprotectoras.

Teniendo como marco teórico la información anterior, esta tesis se diseñó para determinar si en células de túbulo proximal de cerdo la exposición a NDGA, un compuesto antioxidante, podía inducir la sobre-expresión de la enzima citoprotectora HO-1 y si esta respuesta era positiva, determinar si esta inducción se realizaba a través de la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE y valorar si esta inducción podría hacer resistentes a estas células ante las condiciones de un modelo oxidante como lo es la exposición a H₂O₂.

La inducción de HO-1 se ha observado en un gran número de tipos celulares por diferentes condiciones (revisado por Abraham & Kappa, 2008), sin embargo hay pocos informes que describen si la administración o ingesta de compuestos de origen natural estimulan la expresión de HO-1. Entre esos

compuestos destacan la curcumina (Balogun *et al.*, 2003) que es el componente más abundante de una planta de origen asiático de nombre *Curcuma longa*; el sulforafano (Talalay & Fahey, 2001) un isotiocianato que se sintetiza a partir de la glucorafanina, un glucosinolato, presente en altas concentraciones en el brócoli y en otros vegetales como el repollo, la coliflor y las coles de Bruselas que son miembros de la familia Brassicaceae; el ácido lipoico (Ogborne *et al.*, 2004) un ditiol presente en carnes rojas, riñón, corazón, hígado, espinacas, brócoli, coles y tomates; los compuestos polifenólicos carnosol (Martin *et al.*, 2004) y resveratrol (Zhuang *et al.*, 2003), derivados de los romeros y las uvas, respectivamente; y el cafestol y el kahweol (Cavin *et al.*, 2002) dos diterpenos derivados del café. La información proporcionada por los trabajos recién mencionados indica que la inducción de la expresión de la HO-1 es consecuencia de la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que en las células de túbulo proximal de cerdo el tratamiento con NDGA indujo un aumento en la actividad de HO desde las 3 horas aunque éste aumento no fue significativo, a diferencia de los aumentos de casi 6 veces observados a las 6 y 12 horas que sí fueron significativos (Fig. 10). De igual manera hubo un aumento en la expresión de la proteína HO-1 (Figs. 11 y 12) que coincidió con el patrón observado en la actividad de HO. Estos aumentos en la actividad de HO y en la expresión de HO-1 fueron consecuencia de la unión del Nrf2 al ARE ya que los análisis de inmunocitoquímica (Fig. 13) y de western blot (Figs. 17 y 18) revelan claramente que el Nrf2 migró al núcleo celular en donde se demostró, mediante el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina, que se unió al ADN (Fig. 20) y de manera específica a la secuencia correspondiente al ARE tal y como lo demuestran los ensayos de retardo (Fig. 22) y super-retardo electroforético (Fig. 23).

Esta secuencia de eventos confirma claramente que la exposición de las células LLC-PK1 a NDGA activó la vía de señalización Keap1/Nrf2/ARE e indujo la expresión de HO-1, tal y como lo habían ya demostrado en neuronas. De esta manera, los resultados de este trabajo, junto con los de Guzmán-Beltrán y colaboradores (2008), incorporan al NDGA a la lista de compuestos de origen

natural integrada por curcumina, sulforafano, ácido lipoico, carnosol, resveratrol, cafestol y kahweol que son capaces de promover la expresión de las proteínas citoprotectoras a través de la activación del ARE.

El mecanismo exacto por el cual el ARE se activa no se conoce con certeza, pero hay evidencias que indican que los inductores de proteínas de fase II modifican directamente a Keap1 causando la disociación del complejo Keap1/Nrf2 (Hong *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2005). Holtzclaw (2004) y Dinkova-Kostova y colaboradores (2004) han descrito que los inductores de las proteínas de fase II pertenecen por lo menos a diez clases teniendo en común su afinidad con grupos sulfhidrilo y la capacidad de modificar específicamente los grupos tioles de las cisteínas del factor Keap1. Un ejemplo de esta interacción con Keap1 es el que presenta el sulforafano, el cual interactúa con las cisteínas de Keap1 mediante la formación de un aducto causando la formación de enlaces disulfuro intramoleculares o intermoleculares (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002).

Sin embargo hay otros mecanismos propuestos en la inducción de genes que dependen o contienen al ARE. Uno de ellos sugiere que las condiciones de estrés redox o electrofílico (causadas por ejemplo, por la disminución de los niveles de glutatión), pueden de manera independiente a la interacción inductor-Keap1, activar la vía de fosforilación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) que directa o indirectamente modulan la expresión de genes que contienen al ARE (Zipper & Mulcahy, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Otro mecanismo propuesto es que el Nf2 es fosforilado por la proteína cinasa C, u otra cinasa, lo que causa su separación de Keap1, la migración al núcleo y la unión al ARE (Huang *et al.*, 2002).

Los datos de viabilidad celular revelaron que la exposición al H₂O₂ 1 mM durante 2 horas causó una disminución del 50% en este parámetro (Fig. 24). En muchos trabajos se ha descrito que concentraciones de H₂O₂ mayores a 50 µM resultan tóxicas a muchas células animales, vegetales y bacterianas en cultivo, aunque los valores de la dosis letal 50 y el tipo de muerte celular (apoptosis o necrosis) dependen del tipo celular, de su estado fisiológico, así como del tiempo

de exposición y de la concentración de H_2O_2 (Clement *et al.*, 1998; González-Flecha & Demple, 1997; Hampton & Orrenius, 1997) y en particular se ha demostrado que la exposición de células LLC-PK1 a concentraciones de H_2O_2 de 1 a 5 mM causa necrosis (Lee *et al.*, 2006) condición que también se observó en las células sometidas a exposición con H_2O_2 en este trabajo y que fue evitada con el tratamiento previo por 6 horas con NDGA (Fig. 25). Estos resultados coinciden con la información referente a que el resultado global de la inducción de HO-1 ha sido el de conferir protección a las células ante diferentes modelos experimentales de daño. Por ejemplo, la inserción del gen de HO-1 en modelos animales confiere protección a la vasculatura, disminuyendo la formación del radical $O_2^{\bullet-}$, así como la excreción urinaria de isoprostanos y la generación de moléculas inflamatorias en diversos modelos oxidantes, normalizado la presión arterial en animales hipertensos y prevenido la toxicidad por hemoglobina. Además la inducción farmacológica de esta enzima también presenta la misma tendencia de protección. Muchos de esos informes que ejemplifican y apoyan este concepto se encuentran en las amplias revisiones de Abraham & Kappa (2008) y de Sikorski y colaboradores (2004).

El mecanismo por el cual la sobreexpresión de HO-1 disminuyó la citotoxicidad del H_2O_2 puede asociarse al efecto del NDGA sobre la expresión de otras enzimas antioxidantes como SOD, catalasa y glutatión peroxidasa ya que la expresión de estas proteínas también está bajo el control de la vía Keap1/Nrf2/ARE (Holtzclaw *et al.*, 2004) e incluso se puede considerar la posibilidad de que los productos de la reacción de la HO, es decir la biliverdina, la bilirrubina y el monóxido de carbono hayan contribuido a esta disminución ya que se ha indicado que las dos primeras moléculas tienen capacidad antioxidante pues son capaces de atrapar ERO y ERN (Mancuso *et al.*, 2006) y son capaces de ofrecer protección celular (González-Reyes *et al.*, 2009), al igual que el monóxido de carbono, ante situaciones de estrés oxidante (Abraham & Kappa, 2008; Clark *et al.*, 2000; Kirkby & Adin, 2006).

Sin embargo, el hecho de que la protección celular conferida por el NDGA ante el reto oxidante se haya anulado cuando se empleó la mesoporfirina de estaño, un inhibidor de la HO (Fig. 26), resalta la importancia que la HO tiene en el mecanismo de protección celular ante la exposición a H₂O₂.

8. CONCLUSIÓN.

Los resultados obtenidos demostraron que en las células LLC-PK1 el NDGA induce la expresión de la HO-1 mediante la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE lo cual hace a estas células más resistentes ante las condiciones oxidantes de exposición a H₂O₂.

9. PERSPECTIVAS

Considerando que en las células LLC-PK1 el NDGA activa la vía Keap1/Nrf2/ARE quedan abiertas las siguientes perspectivas:

- Investigar el o los mecanismos precisos por los cuales el NDGA causa la activación de esta vía de señalización analizando:
 - o El efecto sobre Keap1
- Determinar la expresión de otras proteínas de fase II (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc.) para evaluar la contribución de estas en efecto protector conferido por el NDGA.
- Aclarar si los productos de la reacción de HO participan en la protección celular.
- Evaluar si hay cambios en el sistema antioxidante no enzimático (glutatión, albúmina, transferrina, etc.).
- Analizar si se presentan cambios en la distribución o niveles de Keap1.

10. APÉNDICE 1

REACTIVOS (entre paréntesis se indica el número de catálogo).

Anticuerpos:

Assay Designs, Inc.

- Anticuerpo anti-hemo oxigenasa-1 (SPA-895)
- Anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (SAB-300)
- Anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (SAB-100)

Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

- Anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a isotiocianato de fluoresceína (111-095-144)

Santa Cruz Biotechnology, Inc.

- Anticuerpo anti-lamina B1, H90 (sc-20682)
- Anticuerpo anti-Nrf2, C-20 (sc-722)
- Anticuerpo anti-Nrf2, H-300 (sc-13032)

Sigma-Aldrich

- Anticuerpo anti-tubulina (T-9026)

Células

American Type Culture Collection (ATCC)

- Células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo, LLC-PK1 (CL-101)

Reactivos varios

Assay Designs, Inc.

- Hemo oxigenasa-1 (SPP-730)

Biorad

- Marcadores teñidos de peso molecular, rango intermedio para proteínas (161-0305)
- Marcadores de peso molecular para ADN de 100 pares de bases (1708352)

Fluka

- Bis-benzimida ó Hoechst 33258 (14530)

GE Healthcare Life Sciences

- Membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (RPN303D)
- Placas de autorradiografía Hyperfilm ECL (RPN3103k)

GIBCO

- Antibiótico penicilina y estreptomina (15140-122)
- Azul de tripano al 0.4% (15250-061)
- Medio de cultivo sin rojo de fenol (13000-021)
- Medio Eagle de Dulbecco modificado (12800-017))
- Suero fetal bovino (16000-044)
- Tripsina recombinante Tryple Express (12604-013)

JT Baker

- Ácido clorhídrico (9535)
- Alcohol metílico (9070)
- Bicarbonato de sodio (3506)
- Cloroformo (9180)
- Cloruro de sodio (3624)
- EDTA disódico (8993)
- Fosfato de potasio dibásico (3828)
- Fosfato de potasio monobásico (3246)
- Fosfato de sodio dibásico (3828)
- Fosfato de sodio monobásico (3818)
- Hidróxido de sodio (3722)
- Isopropanol (9084)

- Peróxido de hidrógeno (2186)
- Sulfato de cobre (1843)

Mallinckrodt

- Cloruro de potasio (6858)
- Tartrato de sodio y potasio (2367)

Millipore

- Estuche para ensayo de inmunoprecipitación de cromatina “Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit” (17-295)
- Filtros stericap de 0.22 micras y capacidad de 500 ml (SCGVU05RE)
- Estuche con reactivos para detección por quimioluminiscencia “Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate” (WBKLS0500)

Pierce Biotechnology, Inc.

- Estuche de detección de retardo electroforético por quimioluminiscencia “LightShift Chemiluminescent EMSA kit” (20148)

Sigma Aldrich

- Acetato de sodio (S-2889)
- Ácido nordihidroguayarático (N-2036)
- Acrilamida (A-3553)
- Agarosa (A-5093)
- Albúmina sérica bovina (A-6793)
- Azul de bromofenol (B-5525)
- Bis-acrilamida (M-7279)
- Bromuro de etidio (E-8751)
- Cloruro de magnesio (M-8266)
- Dimetil sulfóxido (D-5879)
- Ditiotreitól (D-0632)
- Fijador para autorradiografía (P-8307)
- Formaldehído (P-6148)
- Formamida (F-5786)

- Fluoruro de fenilo metilo sulfonilo, PMSF (P-7626)
- Glicerol (G-6279)
- Glicina (G-8898)
- Glucosa-6-fosfato (G-7879)
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6378)
- Hemina (H-9039)
- HEPES (H-3375)
- Inhibidores de proteasas (P-8340. Contiene 4-(2-Aminoetil)bencenosulfonil fluoruro hidrocloreto (AEBSF) 104 mM, aprotinina 80 μ M, leupeptina 2 mM, bestatina 4 mM, pepstatina A 1.5 mM y trans-epoxi-succinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano (E-64) 1.4 mM)
- Medio acuoso de montaje Fluoromount (F-4680)
- Mercaptoetanol (M-7154)
- MTT (M-2128)
- NADPH- β (N-1630)
- Nonidet P40 (N-3516)
- Paraformaldehído (P-6148)
- Persulfato de amonio (A-3678)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (F-9252)
- Revelador para autorradiografía (P-7042)
- SDS (L-4509)
- Solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (P-3803)
- TEMED (T-9281)
- Tris HCl (T-3253)
- Tritón (X-100)
- Trizma base (T-1503)
- Tween 20 (P-7949)
- Xileno cianol (X-4126)

10.1 APÉNDICE 2

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

CULTIVO CELULAR.

- PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

El contenido de un sobre de medio Eagle de Dulbecco modificado (DMEM) se disolvió en 950 ml de H₂O destilada, se añadieron 3.7 g de bicarbonato de sodio, se ajustó el pH a 7.3 con HCl 1 M y se aforó a 1 L.

La solución se esterilizó por filtración dentro del gabinete de seguridad biológica usando los filtros Stericup de Millipore y se almacenó a 4°C hasta su uso.

- PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SUPLEMENTADO.

Este procedimiento se realizó dentro del gabinete de seguridad biológica. Para preparar el medio DMEM con suero fetal bovino al 10% y antibiótico al 1% se mezclaron 445 ml de medio DMEM estéril, 50 mL de suero fetal bovino y 5 mL del antibiótico penicilina/estreptomicina.

La solución se esterilizó por filtración usando filtros Stericup de 500 mL y se almacenó a 4°C hasta su uso.

- Amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.5

Na₂HPO₄ 80 mM

NaH₂PO₄ 20 mM

NaCl 100 mM

Esterilizar por filtración

VIABILIDAD CELULAR

- Solución de MTT (1 mg/mL)

- Isopropanol ácido (96 ml de isopropanol + 4 ml de HCl 1 M)

ACTIVIDAD DE HO

- Amortiguador de fosfato de potasio/MgCl₂
- Solución “master mix”
 - Hemina 2 mM
 - Glucosa-6-fosfato 20 mM
 - Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 400 U/mL
 - Citosol hepático de ratón
- Obtención de citosol hepático de ratón
 - Disectar el hígado de ratón y eliminar la vesícula biliar.
 - Homogenizar el hígado en 3 volúmenes de amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M pH 7.4
 - Aplicar ultrasonido durante 1 min en potencia 3 (manteniendo el homogenado en hielo)
 - Centrifugar a 3,000 x g por 5 min a 4°C (rotor JA-20)
 - Obtener el sobrenadante
 - Centrifugar a 12,000 x g por 20 min a 4°C (rotor JA-20)
 - Obtener el sobrenadante
 - Centrifugar a 45,000 rpm por 50 min a 4°C (rotor 50Ti)
 - Obtener el sobrenadante (citosol hepático)
 - Hacer alícuotas de 0.2 ml
 - Almacenar a -40°C
- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE LOWRY:
 - Albúmina sérica bovina (ASB) al 0.05% (5 mg en 10 ml de H₂O destilada).
 - Solución A:
 - Na₂CO₃ al 2% (20 g en 1,000 ml)
 - NaOH al 0.4% (4 g en 1,000 ml)
 - Tartrato de sodio al 0.02% (0.2 g en 1,000 ml)
 - Almacenar a temperatura ambiente

Solución B:

CuSO_4 al 0.5% (0.5 g en 100 ml)

Almacenar a temperatura ambiente

Solución C: Solución A al 98% y solución B al 2%.

Se prepara al momento del ensayo y la cantidad a preparar depende del número de muestras y de los 7 tubos de la curva estándar. A cada tubo se le agrega 1 ml de esta solución.

Solución D: Folín 1 N (diluir con H_2O)

Se prepara al momento del ensayo y la cantidad a preparar depende del número de muestras y de los 7 tubos de la curva estándar. A cada tubo se le agrega 0.1 ml de esta solución.

WESTERN BLOT

- Amortiguador de lisis celular
 - Tris HCl 20 mM (pH 7.5)
 - NaCl 150mM
 - Na_2EDTA 1 mM
 - EGTA 1 mM
 - Triton al 1%
 - Pirofosfato de sodio 2.5 mM
 - Glicerofosfato 1 mM
 - Ortovanadato de sodio 1 mM
 - Inhibidores de proteasas
- Solución de revelador:
 - 50 ml del concentrado + 450 ml de H_2O
- Solución de fijador:
 - 100 ml del concentrado + 473 ml de H_2O

ELECTROFORESIS EN SDS-POLIACRILAMIDA

- Gel de poliacrilamida al 12.5% (gel de resolución):

H ₂ O	2.5 ml
Acrilamida 29%/bis-acrilamida 1%	3.04 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	1.9 ml
SDS 10%	0.076 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.076 ml
TEMED	0.003 ml

- Gel de poliacrilamida al 5% (gel de apilamiento):

H ₂ O	2.1 ml
Acrilamida 29%/bis-acrilamida 1%	0.5 ml
Tris 0.5 M pH 6.8	0.38 ml
SDS 10%	0.03 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.03 ml
TEMED	0.003 ml

- Amortiguador de Laemmli 2X
 - Tris-HCl 100 mM pH 6.8
 - Ditiotreitol 200 mM
 - SDS 4%
 - Azul de bromofenol 0.2%
 - Glicerol 20%

- Amortiguador de electroforesis SDS-PAGE
 - Tris base 25 mM (3.02 g)
 - Glicina 250 mM (18.8 g)
 - SDS 0.1% (1 g)
 - Disolver en 980 ml de agua
 - Ajustar el pH a 8.3
 - Aforar a 1 L.
 - Mantener en refrigeración

- Amortiguador de transferencia
 - Metanol 20% (400 ml)
 - Tris base 25 mM (6.0 g)
 - Glicina 192 mM (28.8 g)
 - SDS 0.1% (2.0 g)
 - Disolver en 1.45 L de agua
 - Ajustar el pH a 8.3
 - Aforar a 2 L
 - Mantener en refrigeración

- Solución de PBS-T, pH 7.5
 - Na_2HPO_4 80 mM
 - NaH_2PO_4 20 mM
 - NaCl 100 mM
 - Tween-20 al 0.1%

FRACCIONAMIENTO CELULAR

- Amortiguador hipotónico de lisis
 - HEPES 10 mM pH 8.0
 - KCl 1 mM
 - MgCl_2 1.5 mM
 - DTT 1 mM
 - PMSF 1 mM
 - inhibidores de proteasas

- Amortiguador de lisis nuclear
 - HEPES 20 mM
 - MgCl_2 1.5 mM
 - EDTA 0.2 mM
 - Glicerol al 20%

NaCl 420 mM
DTT 1 mM
PMSF 1 mM
Inhibidores de proteasas

ChiP

- Tris-borato TBE 5x
 - Tris base 108 g
 - Ácido bórico 27.5 g
 - EDTA 0.5 M pH 8.9 20 mL
- TBE 0.5x
 - EDTA 0.001M
 - Tris-borato 0.045 M
- TE buffer
 - Tris HCl 10 mM
 - EDTA 1mM pH 8.0
- Gel de agarosa 2%
 - Agarosa 0.6 g
 - TBE 0.5x pH 8.0 30 mL
 - BrET (10 mg/mL) 2 μ L

11. Referencias.

- Abraham NG & Kappa A. 2008. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 60:79-127.
- Aebi HE. 1982. Catalase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (vol. III), 3 ed., Weinheim, Verlag Chemie, págs. 273-286.
- Agarwal A & Nick HS. 2000. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 gene ablation and expression. *J Am Soc Nephrol* 11:965-973.
- Alam J & Cook JL. 2007. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:166-174.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7915-7922.
- Anjaneyulu M & Chopra K. 2004. Nordihydroguaiaretic acid, a lignin, prevents oxidative stress and the development of diabetic nephropathy in rats. *Pharmacology* 72:42-50.
- Araujo AS, Schenkel P, Enzweiler AT. 2008. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *J Mol Endocrinol* 41:423-430.
- Argueta, V. 1994. *Atlas de Plantas Medicinales Tradicionales Mexicanas*, vol. II. Instituto Nacional Indigenista, México, págs. 669-670.
- Arteaga S, Andrade-Cetto A, Cárdenas R. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote Bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol* 98:231-239.
- Atkinson CJ, Nestby R, Ford YY, Dodds PA. 2005. Enhancing beneficial antioxidants in fruits: a plant physiological perspective. *Biofactors* 23:229-234.
- Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R. 2003. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 371:887-895.
- Balsano C & Alisi A. 2009. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Curr Pharm Des* 15:3063-3073.

- Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverrí J. 2003. HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by $K_2Cr_2O_7$. *Free Radic Biol Med* 34:1390-1398.
- Barrouillet M, Moiret A, Cambar J. 1999. Protective effects of polyphenols against cadmium-induced glomerular mesangial cell myocontracture. *Arch Toxicol* 73:485-488.
- Benov L, Szejnberg L, Fridovich I. 1998. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic Biol Med* 25:826-831.
- Birkenfeld S, Zaltsman Y, Krispin M, Zakut H, Zor U, Kohen F. 1987. Antitumor effects of inhibitors of arachidonic acid cascade on experimentally induced intestinal tumors. *Dis Colon Rectum* 30:43-46.
- Bowie A & O'Neill LAJ. 2000. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* 59:13-23.
- Braggins PE, Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. 1986. Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem Biophys Res Commun* 141:528-533.
- Burdon RH, Gill V, Alliangana D. 1996. Hydrogen peroxide in relation to proliferation and apoptosis in BHK-21 hamster fibroblasts. *Free Radic Res* 24:81-93.
- Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, Folkerts G, Friedmann PS, Frost GS, Guarner F, Løvik M, Macfarlane S, Meyer PD, M'Rabet L, Serafini M, van Eden W, van Loo J, Vas Dias W, Vidry S, Winklhofer-Roob BM, Zhao J. 2009. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr* 101 Suppl 1:S1-45.
- Cavin C, Holzhaeuser D, Scharf G, Constable A, Huber WW, Schilter B. 2002. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem Toxicol* 40:1155-1163.

- Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. 2000. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem J* 3:615-619.
- Clement MV, Ponton A, Pervaiz S. 1998. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Lett* 440:13-18.
- Cruse I & Maines MD. 1988. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J Biol Chem* 263:3348-3353.
- Chandramathi S, Suresh K, Anita ZB, Kuppusamy UR. 2009. Elevated levels of urinary hydrogen peroxide, advanced oxidative protein product (AOPP) and malondialdehyde in humans infected with intestinal parasites. *Parasitology* 136:359-363.
- Chen C & Kong ANT. 2004. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic Biol Med* 36;12:1505-1516.
- Chen H, Teng L, Li JN, Park R, Mold DE, Gnable J, Hwu JR, Tseng WN, Huang RC. 1998. Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 2. Targeting herpes simplex virus replication by the mutation insensitive transcription inhibitor tetra-O-methyl-NDGA. *J Med Chem* 41:3001-3007.
- Dale DC, Boxer L, Liles WC. 2008. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112:935-945.
- Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:67-101.
- Davies KJA. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50:279-289.
- Di Noia MA, Van Driesche S, Palmieri F, Yang LM, Quan S, Goodman AI, Abraham NG. 2006. Heme oxygenase-1 enhances renal mitochondrial transport carriers and cytochrome c oxidase activity in experimental diabetes. *J Biol Chem* 281:15687-15693.

- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P. 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11908-11913.
- Dinkova-Kostova AT, Fahey JW, Talalay P. 2004. Chemical structures of inducers of nicotinamide quinone oxidoreductase 1 (NQO1). *Methods Enzymol* 32:423-448.
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Wakabayashi N. 2005. Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* 44:6889-6899.
- Feskanich D, Ziegler RG, Michaud DS, Giovannucci EL, Speizer FE, Willet WC, Colditz GA. 2000. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst* 92:1812-1823.
- Floriano-Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos O, Rocha D, Sánchez-González DJ, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent *in vitro* scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents *in vivo* ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res* 40:523-533.
- Forman HJ & Dickinson DA. 2003. Oxidative signaling and glutathione synthesis. *Biofactors* 17:1-12.
- Gomes A, Fernandez E, Lima JL. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* 65:45-80.
- González-Flecha B & Demple B. 1997. Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:382-388.
- González-Reyes S, Orozco-Ibarra M, Guzmán-Beltrán S, Molina-Jijón E, Massieu L, Pedraza-Chaverri J. 2009. Neuroprotective role of heme-oxygenase 1 against iodoacetate-induced toxicity in rat cerebellar granule neurons: Role of bilirubin. *Free Radic Res* 43:214-223.
- Gowri M, Reaven G, Azhar S. 1999. Masoprocol lowers blood pressure in rats with fructose-induced hypertension. *Am J Hypertens* 12:744-746.

- Griendling KK & Harrison DG. 1999. Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circ Res* 85:562-563.
- Guatura SB, Martinez JA, Santos Bueno PC, Santos ML. 2000. Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption. *Sao Paulo Med J* 118:93-98.
- Guzmán-Beltrán S, Espada S, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J, Cuadrado A. 2008. Nordihydroguaiaretic acid activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects cerebellar granule neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett* 447:167-171.
- Haddad JJ. 2003. Science review: Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for hypoxia-inducible factor-1 α . *Critical Care* 7:47-54.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. 1989. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon, 1:142.
- Halliwell B & Gutteridge JM. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186:1-85.
- Halliwell B & Gutteridge JM. 1990b. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280:1-8.
- Hampton MB & Orenius S. 1997. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 15;414:552-556.
- Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. 1999. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 27:146-159.
- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. 2000. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 28:1456-1462.

- Holtzclaw WD, Dinkova-Kostova AT, Talalay P. 2004. Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Advan Enzyme Regul* 44:335-367.
- Hong F, Freeman ML, Liebler DC. 2005. Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chem Res Toxicol* 18:1917-1926.
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. 2000. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 97: 12475–12480.
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. 2002. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 277:42769-42774.
- Hyder PW, Fredrickson EL, Estell RE, Tellez M, Gibbens RP. 2002. Distribution and concentration of total phenolics, condensed tannins, and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in creosote bush (*Larrea tridentata*). *Biochem Syst Ecol* 30:905-912.
- Hwu JR, Hsu MH, Huang RC. 2008. New nordihydroguaiaretic acid derivatives as anti-HIV agents. *Bioorg Med Chem Lett* 18:1884-1888.
- Immenschuh S & Ramadori G. 2000. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 60:1121-1128.
- Ishikawa K, Sugawara D, Wang Xp, Suzuki K, Itabe H, Maruyama Y, Lulis AJ. 2001. Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in LDL-receptor knockout mice. *Circ Res* 88:506-512.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236:313-322.

- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. 2003. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* 8:379-391.
- Jaiswal AK. 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 36:1199-1207.
- Jarrett SG, Liang LP, Hellier JL, Staley KJ, Patel M. 2008. Mitochondrial DNA damage and impaired base excision repair during epileptogenesis. *Neurobiol Dis* 30:130-138.
- Johnson DA, Andrews GK, Johnson JA. 2002. Activation of the antioxidant response element in primary cortical neuronal cultures derived from transgenic reporter mice. *J Neurochem* 81:1233-1241.
- Kang KW, Lee SJ, Kim SG. 2005. Molecular mechanism of Nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7:1664-1673.
- Kanki K, Umemura T, Kitamura Y, Ishii Y, Kuroiwa Y, Kodama Y, Itoh K, Yamamoto M, Nishikawa A, Hirose M. 2008. A possible role of Nrf2 in prevention of renal oxidative damage by ferric nitrilotriacetate. *Toxicol Pathol* 36:353-261.
- Katoh Y, Iida K, Kang MI, Kobayashi A, Mizukami M, Tong KI, McMahon M, Hayes JD, Itoh K, Yamamoto M. 2005. Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Arch Biochem Biophys* 433, 342-350.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:89-116.
- Kim HP, Wang X, Galbiati F, Ryter SW, Choi AM. 2004. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J* 18:1080-1089.
- Kirkby KA & Adin CA. 2006. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F563–F571.
- Lara F & Márquez C, 1996. *Plantas Medicinales de México: Composición, usos y actividad biológica*. UNAM, México, págs. 59-61.

- Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG. 1994. Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5987-5991.
- Lee HT, Kim M, Jan M, Emala CW. 2006. Anti-inflammatory and antinecrotic effects of the volatile anesthetic sevoflurane in kidney proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F67-F78.
- Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER. 1999. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev* 107:323-332.
- Li HY, Zhong YF, Wu SY, Shi N. 2007. NF-E2 related factor 2 activation and heme oxygenase-1 induction by *tert*-butylhydroquinone protect against deltamethrin-mediated oxidative stress in PC12 cells. *Chem Res Toxicol* 20:1242-1251.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Mancuso C, Pani G, Calabrese V. 2006. Bilirubin: an endogenous scavenger of nitric oxide and reactive nitrogen species. *Redox Rep* 11:207-213.
- Marklund SL. 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl Acad Sci USA* 79:7634-7638.
- Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM, Cuadrado A. 2004. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem* 279:8919-8929.
- Matsugo AS, Packer L, Konishi T. 1998. Assay of protein-bound lipoic acid in tissues by a new enzymatic method. *Anal Biochem* 258:299-304.
- McCord JM & Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055.

- Michels KB, Edward Giovannucci, Joshipura KJ, Rosner BA, Stampfer MJ, Fuchs CS, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC. 2000. Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 92:1740-1752.
- Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Peña-Silva R, Heistad DD. 2008. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol* 52:843-850.
- Moody T, Leyton J, Martinez A, Hong S, Malkinson A, Mulshine JL. 1998. Lipoxygenase inhibitors prevent lung carcinogenesis and inhibit non-small cell lung cancer growth. *Exp Lung Res* 24:617-628.
- Morse D & Choi A. 2002. Heme oxygenase-1. The “Emerging molecule” has arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:8-16.
- Motohashi H & Yamamoto M. 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* 10:549-557.
- Mukherjee S, Gangopadhyay H, Das DK. 2008. Broccoli: a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily. *J Agric Food Chem* 56:609-617.
- Nath KA. 2007. Renal response to repeated exposure to endotoxin: implications for acute kidney injury. *Kidney Int* 71:477-479.
- Nordberg J & Arnér SJ. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31:1287-1312.
- Ockaili R, Natarajan R, Salloum F, Fisher BJ, Jones D, Fowler AA 3rd, Kukreja RC. 2005. HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H542–H548.
- Ogborne RM, Rushworth SA, Charalambos CA, O'Connell MA. 2004. Haem oxygenase-1: a target for dietary antioxidants. *Biochem Soc Trans* 32:1003–1005.

- Ogborne RM, Rushworth SA, O'Connell MA. 2005. α -lipoic acid-induced heme oxygenase-1 expression is mediated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase in human monocytic cells. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 25:2100-2105.
- Panahian N, Yoshiura M, Maines MD. 1999. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J Neurochem* 72:1187-1203.
- Pedraza Chaverrí J, Granados-Silvestre MD, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. 1999. Effect of the in vivo catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic Biol Med* 27:245-253.
- Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME. 2000. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 29:602-611.
- Pedraza-Chaverrí J, Barrera D, Hernández-Pando R, Medina-Campos ON, Cruz C, Murguía F, Juárez-Nicolás C, Correa-Rotter R, Torres N, Tovar AR. 2004. Soy protein diet ameliorates renal nitrotyrosine formation and chronic nephropathy induced by puromycin aminonucleoside. *Life Sci* 74:987-999.
- Pedraza-Chaverrí J, Reyes-Fermín LM, Nolasco-Amaya EG, Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, González-Cuahutencos O, Rivero-Cruz I, Mata R. 2009. ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of α -mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Exp Toxicol Pathol* 61:491-501.
- Prior RL. 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 78:570S-578S.
- Psathakis K, Mermigkis D, Papatheodorou G, Loukides S, Panagou P, Polychronopoulos V, Siafakas NM, Bouros D. 2006. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Invest* 36:362-367.
- Puppo A & Halliwell B. 1988. Formation of hydroxyl radicals in biological systems. Does myoglobin stimulate hydroxyl radical formation from hydrogen peroxide? *Free Radic Res Commun* 4:415-422.

- Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. 2001. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 30:463-488.
- Razo-Rodríguez AC, Chirino YI, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Pedraza-Chaverri J. 2008. Garlic powder ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress. *J Med Food* 11:582-586.
- Romo de Vivar A. 1985. *Productos naturales de la flora mexicana*. Limusa, México.
- Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. 1991. The antioxidant responsive element: activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 266:11632-11639.
- Rysz J, Stolarek RA, Pedzik A, Fijalkowska J, Luczynska M, Sarniak A, Kasielski M, Makowka A, Nowicki M, Nowak D. 2007. Increased exhaled H₂O₂ and impaired lung function in patients undergoing bioincompatible hemodialysis. *Int J Artif Organs* 30:879-888.
- Ryter SW, Alam J, Choi AMK. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86:583-650.
- Sacerdoti D, Escalante B, Abraham NG, McGiff JC, Levere RD, Schwartzman ML. 1989. Treatment with tin prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Science* 243:388-390.
- Sadruddin S & Arora R. 2009. Resveratrol: biologic and therapeutic implications. *J Cardiometab Syndr* 4:102-106.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10:2247-2258.
- Schreck Albermann K, Baeuerle PA. 1992. Nuclear factor K_b: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (A Review). *Free Radic Res* 97:221-237.
- Schulze-Osthoff K, Bauer M, Vogt M, Wesselborg S, Bauerle PA. 1997. En: Forman, H. J.; Cadenas, E., eds. *Reactive oxygen intermediates as primary signals and second messengers in the activation of transcription factors*. New York: Chapman & Hall 239-259.

- Shibahara S, Muller RM, Taguchi H. 1987. Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* 262:12889-12892.
- Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. 2004. The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F425-F441.
- Spencer JP, Jenner A, Aruoma OI, Cross CE, Wu R, Halliwell B. 1996. Oxidative DNA damage in human respiratory tract epithelial cells. Time course in relation to DNA strand breakage. *Biochem Biophys Res Commun* 224:17-22.
- Subjeck JR & Shyy T. 1986. Stress protein systems of mammalian cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 250:C1-C17.
- Sun Z, Zhang S, Chan JY, Zhang DD. 2007. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol* 27:6334-6349.
- Surh YJ, Kundu JK, Hye-Kyung Na, Lee JS. 2005. Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. *J Nutr* 135: 2993S–3001S.
- Talalay P & Fahey JW. 2001. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *J Nutr* 131:3027S–3033S.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 61:748-755.
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohé L. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252:38-53.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol I, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84.
- Vepa S, Scribner WM, Parinandi NL, English D, Garcia JG, Natarajan V. 1999. Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 277:L150-L158.

- Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. 1998. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 333:291-300.
- Watt BE, Proudfoot AT, Vale JA. 2004. Hydrogen peroxide poisoning. *Toxicol Rev* 23:51-57.
- Weisiger RA & Fridovich I. 1973. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 248:4793-4796.
- Williams RT. 1967. Comparative pattern of drug metabolism. *Fed Proc* 26:1029-1039.
- Xue HZ, Lu ZZ, Konno C, Soejarto DD, Cordell GA, Fong HHS, Hodgson W. 1988. 3 β -(3,4-hydroxycinnamoyl)-erythrodiol and 3 β -(3,4-dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 27:233-235.
- Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. 1999. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103:129-135.
- Yam-Canul P, Chirino YI, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Villanueva C, Pedraza-Chaverri J. 2008. Nordihydroguaiaretic acid attenuates potassium dichromate-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol* 46:1089-1096.
- Zhang H, Liu H, Iles KE, Liu RM, Postlethwait EM, Laperche Y, Forman HJ. 2006. 4-Hydroxynonenal induces rat γ -glutamyl transpeptidase through mitogen-activated protein kinase-mediated electrophile response element/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:174-181.
- Zhuang H, Kim YS, Koehler RC, Doré S. 2003. Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons. *Ann NY Acad Sci* 993:276-286.
- Zipper LM & Mulcahy RT. 2003. Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells. *Toxicol Sci* 73:124-134.