



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LA ISOLIQURITIGENINA SOBRE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR  
CISPLATINO EN CÉLULAS RENALES LLCPK1.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA

Angela Patricia Moreno Londoño

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Pedraza Chaverri

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

Facultad de Odontología

Dra. Lena Ruiz Azuara

Facultad de Química

Ciudad de México, mayo 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri, en el laboratorio 209, edificio F, Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dra. Gloria Gutiérrez Venegas	Facultad de Odontología, UNAM
Dra. Lena Ruiz Azuara	Facultad de Química, UNAM

Esta tesis fue apoyada por el Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto 220046, por el Programa de Apoyo a la Investigación para Estudiantes de Posgrado (PAIP), proyecto 5000-0105 y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN 201316. Durante los estudios de maestría y el desarrollo del presente trabajo la tesista recibió una beca otorgada por CONACYT.

El jurado del examen de maestría estuvo conformado por:

Presidente	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Instituto Nacional de Nutrición
Vocal	Dr. José de Jesús García Valdés	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Gladis del Carmen Fragoso	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Vocal	Dr. Alejandro García Carranca	Instituto Nacional de Cancerología
Secretaria	Dra. Ana María Salazar Martínez	Instituto de Investigaciones Biomédicas

## DEDICATORIA

**A MIS AMIGOS...**

Vamos por una nueva aventura

*Recuerden*

*No hay fuerza motriz más grande que tu voluntad*

*Maestro de Oz y Albert Einstein*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por nunca abandonarme y por cada angelito que coloca en mi camino.

A la UNAM por ser mi casa durante mi estancia en México, estoy orgullosa de ser parte de su comunidad.

Al Dr. José Pedraza Chaverri por la oportunidad que me dio de ser parte de su grupo de investigación y desarrollar mi tesis de maestría en su laboratorio. Durante mi estancia en su laboratorio adquirí nuevos conocimientos y habilidades metodológicas que me servirán para toda mi vida profesional. Además aprendí a ser más tolerante al fracaso.

A mis compañeros del laboratorio 209 por su apoyo incondicional y hacer que mis días fuesen más agradables.

A la familia Muñoz-Ruiz por ser mis ángeles guardianes a mi llegada a México, fui afortunada de contar con ustedes, gracias por cada momento.

A mi familia y amigos en Colombia por estar siempre presentes a pesar de la distancia.

A Claudia Bello y Odalys Alvarez por ser mi familia, México fue mil veces mejor porque ustedes estaban junto a mí. Espero conservar su amistad a lo largo de los años.

# ÍNDICE

<b>I</b>	<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>i</b>
<b>II</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>iv</b>
<b>1.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>1</b>
1.1	Cisplatino .....	1
1.1.1	Modo de acción antineoplásico.....	1
1.1.2	Daño renal.....	2
1.1.3	Mecanismos de acción de cisplatino relacionados con nefrotoxicidad. ....	4
1.1.4	Alternativas de nefroprotección contra efectos ocasionados por cisplatino...	7
1.2	Regaliz.....	8
1.3	Isoliquiritigenina .....	9
1.3.1	Actividad antioxidante.....	10
1.3.2	Biotransformación.....	11
1.3.3	Estudios de la isoliquiritigenina como agente quimioterapéutico.....	13
1.3.4	Estudios de la isoliquiritigenina como agente citoprotector .....	14
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICACION</b> .....	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>HIPOTESIS</b> .....	<b>16</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
5.1	Materiales .....	18
5.2	Métodos .....	19
5.2.1	Actividad antioxidante directa de la isoliquiritigenina.....	20
5.2.2	Cultivo celular .....	21
5.2.3	Viabilidad celular .....	21
5.2.4	Fraccionamiento celular.....	22
5.2.5	Western Blot.....	22
5.2.6	Inhibición de la actividad de hemo-oxigenasa sobre el efecto de la IsoLQ en la disminución de la viabilidad celular ocasionada por cisplatino.....	23
5.2.7	Análisis estadístico .....	23
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
6.1	Actividad antioxidante directa de la isoliquiritigenina .....	24

6.2	Viabilidad de células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo (LLC-PK1) tratadas con cisplatino e isoliquiritigenina.....	25
6.3	Actividad antioxidante indirecta de la isoliquiritigenina: efecto sobre el nivel de enzimas antioxidantes.....	27
6.4	Inhibición de la actividad de hemo-oxigenasa sobre el efecto citoprotector de la IsoLQ. ....	30
6.5	Efecto de la isoliquiritigenina sobre el nivel de los factores de transcripción Nrf2 y NFkB en las células LLCPK1. ....	30
6.6	Efecto de la IsoLQ sobre marcadores de apoptosis en células tratadas con cisplatino e isoliquiritigenina. ....	32
6.7	Efecto de la isoliquiritigenina y cisplatino sobre la viabilidad de células de carcinoma de vejiga HTB4 .....	34
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>43</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>

## ABREVIATURAS

20-HETE	Ácido 20 hidroxieicosatetranoico
γGT	Gamma glutamil transpeptidasa
AAPH	2,2 azobis-(2-aminopropano) dicloruro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Factor inductor de apoptosis
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
AP-1	Proteína activadora 1
AP-N	Diaminopeptidasa
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ARN	Ácido ribonucleico
ATM	Ataxiatelangiectasia mutada
ATP	Trifosfato de adenosina
ATR	ATM relacionada con Rad3
ATCC	American Type Culture Collection
Bak	Proteína asesina del antagonista homólogo Bcl-2
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl2	Linfoma de células B 2
Bcl-xL	Linfoma de células B extra grande
Bid	Agonista de muerte con dominio interactivo BH
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
CAT	Catalasa
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
CO	Monóxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenasa-2
Ctr1	Transportador dependiente de cobre 1
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH	1,1-difenil-1-picrilhidracilo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraácetico
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ER-iPLA2	Fosfolipasa A2 independiente de Ca <sup>2+</sup> de retículo endoplasmático
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FADD	Proteína con dominio de muerte asociado a Fas
FDA	Diacetato de fluoresceína

Fe <sup>2+</sup>	Ion ferroso
g	Gravedades
GCLC	Subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GSK3β	Glucógeno sintasa cinasa 3
GST	Glutación transferasa
GTP	Trifosfato de guanosina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazino etanosulfónico.
HO-1	Hemo-oxigenasa 1
HRP	Peroxidasa de rábano
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IκBα	Inhibidor alfa del factor nuclear kappa de células B activadas
IKKα	Cinasa del inhibidor del factor nuclear kappa de células B activadas
IL-1β	Interleucina 1β
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IsoLQ	Isoliquiritigenina
JNK	Cinasas de c-Jun N-terminal
Keap1	Proteína 1 asociada a Kelch y parecida a ECH
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de sodio dibásico
KCl	Cloruro de potasio
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
MAD	Malondialdehído
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotáctica 1
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MMP-9	Metaloproteinasa 9
MRP 1/2	Proteína asociada a la resistencia a fármacos 1/2
MTT	bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-(2-il)]-2,5-difenil-tetrazolio
NaCl	Cloruro de sodio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sodio monobásico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NFκB	Factor nuclear kappa de células B activadas
NP-40	4-nonil-fenil-polietilenglicol
NQO1	NADPH quinona oxidoreductasa
Nrf2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
Oct 1/2	Transportador de cationes orgánicos
Omi/HtrA2	Omi/ Serina peptidasa 2 HtrA
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
p21	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1A
p27	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1B
PBS	Amortiguador salino de fosfatos

PGE2	Prostaglandina E2
PI3K/Akt	Cinasa de fosfatidilinositol 3 /Proteína cinasa B
PIDD	Proteína con dominio de muerte inducida por p53
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
sMaf	Proteínas pequeñas fibrosarcoma musculoaponeurótico
SnMP	Mesoporfirina dicloruro de estaño
SOD	Superóxido dismutasa
SOD-1	Superóxido dismutasa 1
STAT 1/3	Transductor de señal y activador de la transcripción
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBST	Amortiguador salino de Tris con tween 20
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral alfa
TRADD	Proteína con dominio de muerte asociado a TNFR 1
UDP	Difosfato de uridina
UGT	UDP-glucuronosiltransferasa
VCAM	Molécula de adhesión vascular

## RESUMEN

La isoliquiritigenina (IsoLQ) pertenece a la familia de flavonoides y se ha caracterizado como parte de los compuestos bioactivos de regaliz, una de las hierbas medicinales más populares en la medicina China tradicional; presenta diversas actividades biológicas incluyendo propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Por otro lado, el cisplatino es un agente antineoplásico ampliamente utilizado en el tratamiento de tumores sólidos, sin embargo, su uso está limitado por su efecto nefrotóxico. Su mecanismo de acción se ha asociado con el aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO), disminución del sistema antioxidante celular, inflamación y en consecuencia muerte celular por apoptosis y necrosis. Por lo tanto, en este proyecto se plantea evaluar el efecto de la IsoLQ sobre la muerte celular inducida por cisplatino en células epiteliales renales de túbulo proximal LLC-PK1. El pretratamiento de 24 h con 25  $\mu$ M de IsoLQ atenuó la disminución de la viabilidad y el aumento de caspasa 3 escindida ocasionada por cisplatino. Uno de los posibles mecanismos que explican este efecto es la inducción de enzimas antioxidantes que metabolizan ERO y moléculas pro-oxidantes. En este estudio se observó que la IsoLQ induce un aumento del nivel de hemo-oxigenasa 1 (HO-1) y superóxido dismutasa 1 (SOD-1), que participan en la degradación del grupo hemo y dismutación del radical anión superóxido, respectivamente. La inducción de estas enzimas puede estar mediado por la translocación del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) al núcleo, ya que se observó un aumento de esta proteína a las 4 h de tratamiento. El compuesto mesoporfirina dicloruro de estaño (SnMP) un inhibidor de la actividad enzimática de la HO-1 bloqueó el efecto citoprotector de la IsoLQ; esto sugiere que esta proteína en parte media este efecto. Por otro lado el uso de antioxidantes en terapias contra el cáncer es controversial, debido a su capacidad de inducir el sistema antioxidante de la célula y en consecuencia disminuir la producción de ERO causada por fármacos antineoplásicos, mecanismo que ha sido asociado a su efecto citotóxico en células tumorales. En este estudio se determinó que la IsoLQ disminuye la viabilidad de las células de carcinoma de vejiga (HTB4) y exacerba el daño ocasionado por cisplatino. En conclusión la IsoLQ tiene un efecto citoprotector contra la nefrotoxicidad inducida por cisplatino en las células LLC-PK1 sin interferir con su actividad antineoplásica en la línea tumoral HTB4.

# 1. ANTECEDENTES

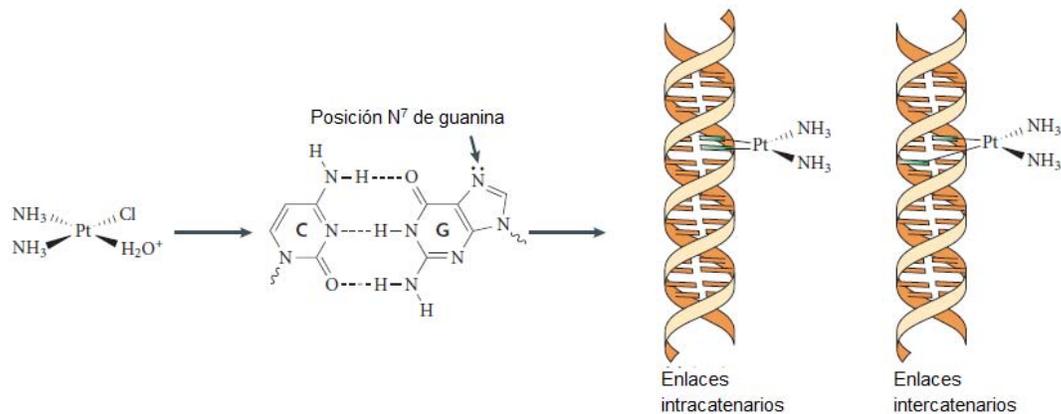
## 1.1 Cisplatino

El cisplatino (cis-diaminodicloroplatino) es un compuesto inorgánico de coordinación ampliamente utilizado por su efecto anticancerígeno, aprobado por la agencia de Alimentos y medicamentos de Estados Unidos en 1978 (Kelland 2007). Se ha utilizado sólo o en combinación con otros tipo de terapias, como la cirugía y la radioterapia en el tratamiento de pacientes con cáncer de vejiga, cáncer cervical avanzado, de testículo, ovario, pulmón, esófago, entre otros (Curran 2002; Hanigan & Devarajan 2003; Langerak & Dreisbach 2001). Sin embargo, su uso ha sido limitado debido a sus efectos secundarios como agente supresor de la médula, neurotóxico, anafiláctico, ototóxico y principalmente por su efecto nefrotóxico (Arany & Safirstein 2003; Lebowitz & Canetta 1998; Ozkok & Edelstein 2014; Williams & Whitehouse 1979). El riñón es el principal órgano encargado de su eliminación y su concentración llega a ser 5 veces más alta que en suero sanguíneo, debido a procesos de acumulación en la corteza renal (Bajorin et al., 1986; Kuhlmann et al., 1997; Rosenberg 1985). Entre el 20 y 35% de los pacientes tratados con una sola dosis de cisplatino han presentado disfunción renal (Ozkok & Edelstein 2014); proceso que puede llegar a reducirse con la disminución de la dosis, no obstante su efecto antineoplásico se ve comprometido por esta limitante (Hanigan & Devarajan 2003).

### 1.1.1 Modo de acción antineoplásico

La actividad antineoplásica de cisplatino está dada principalmente por su capacidad de formar enlaces covalentes con el ácido desoxirribonucleico (ADN). Este fármaco ingresa a las células por el transportador dependiente de cobre (Ctr1) (Ishida et al., 2002) y/o transportador de cationes orgánicos (Oct1/2) (Ciarimboli et al., 2005). En el medio intracelular los ligandos cloruro son reemplazados por agua, formando especies cargadas positivamente que al interactuar con el ADN producen aductos que distorsionan la doble hélice e impiden el proceso de replicación y transcripción (Figura 1) (Jamieson & Lippard 1999; Kelland 2007). Entre las proteínas involucradas en la detección de DNA dañado, se encuentra la cinasa ATR que activa proteínas involucradas en el arresto del ciclo celular, reparación de ADN y apoptosis; otras proteínas asociadas a estos procesos son p53, p73 y proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Siddik 2003), implicadas también en control de crecimiento, diferenciación celular y estrés oxidativo.

Otros posibles blancos del cisplatino dentro de la célula como una molécula altamente electrofílica pueden ser el ADN mitocondrial, el ácido ribonucleico (ARN), proteínas y fosfolípidos. La modificación de estas moléculas están asociadas con la toxicidad de este fármaco en células renales (Guinaim dos Santos et al., 2012; Olivero et al., 1997).



**Figura 1. Esquema reacción del cisplatino con el ADN al interior de las células.** El platino forma un enlace con el N<sup>7</sup> del anillo imidazol de guanina y en menor proporción de adenina, formando enlaces entre bases adyacentes de la misma hebra (enlaces intracatenarios) o en entre bases ubicadas en hebras opuestas (intercatenarios)(Kelland 2007)

### 1.1.2 Daño renal

El riñón es el principal órgano del cuerpo encargado de la regulación del medio interno del organismo; a través de procesos de filtración, reabsorción y secreción, mantiene el equilibrio ácido-base e hidroelectrico de éste (Fuentes et al., 1998). Se encarga también del metabolismo y excreción de xenobióticos, razón por la que es vulnerable a sufrir lesiones que pueden desencadenar insuficiencia renal (Perazella 2009).

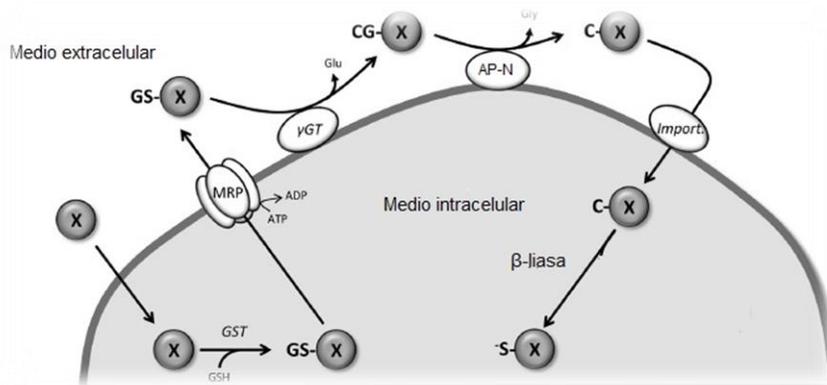
La susceptibilidad de este órgano a varios agentes pueden ser atribuidos a las siguientes propiedades (Bhadauria & Agrawal 2012; Perazella 2009):

1. Recibe aproximadamente entre el 20-25% de la sangre arterial bombeada por el corazón durante la sístole, asegurando la entrada de altos niveles del agente tóxico.
2. Su capacidad de reabsorción por transporte facilitado promueve el ingreso de compuestos tóxicos al interior de la célula.
3. Su capacidad de concentración urinaria conlleva a un incremento localizado del agente tóxico.

4. La biotransformación enzimática de xenobióticos y compuestos endógenos generan intermediarios reactivos, vía citocromo P450 y/o formación de conjugados con glutatión.
5. La alta tasa metabólica requerida para el transporte activo de varios solutos vía bomba de sodio y potasio (células asa de Henle) genera un ambiente hipóxico que incrementa la sensibilidad de las células renales ante sustancias exógenas.

La pérdida rápida de función renal implica un incremento del riesgo de muerte entre el 10 y 15% respecto a pacientes que no presentan lesión aguda renal, con una tasa de mortalidad del 50% (Chertow et al., 1998; Ramesh & Reeves 2004). Se ha informado que la nefrotoxicidad por fármacos contribuye con un 19% de casos de hospitalización por lesión aguda renal (Uchino et al., 2005). El cisplatino ocasiona daño renal gradual que se caracteriza por un decrecimiento entre el 20-40% de la tasa de filtración glomerular, aumento de creatinina y nitrógeno ureico en sangre (BUN) y reducción de potasio y magnesio en suero sanguíneo (Arunkumar et al., 2012; Kintzel 2001; Sung et al., 2008; Uozumi & Litterst 1985). Esto se debe a que el cisplatino afecta principalmente células de túbulo proximal (Daugaard 1990; Gonzales-Vitale et al., 1977; Kröning et al., 1999), que expresan en mayor proporción transportadores específicos Oct2 en la membrana basolateral (Ludwig et al., 2004; Yonezawa et al., 2005). Se ha demostrado que ratones knockout Oct 1/2 tratados con cisplatino presentaron una acumulación leve de este fármaco y menor grado de nefrotoxicidad comparados con ratones que expresan el transportador (Ciarimboli et al., 2010). Por otro lado la inhibición de éste con cimetidina (Ciarimboli et al., 2005) e imatinib (Tanihara et al., 2009) previenen la apoptosis inducida por cisplatino, ya que disminuyen su acumulación en el medio intracelular.

Otro factor importante implicado en la nefrotoxicidad del cisplatino es su metabolismo en el interior de las células. Se ha descrito que este fármaco puede transformarse en un compuesto tiol reactivo por acción de varias enzimas como la glutatión transferasa (GST) (Sadzuka et al., 1994; Townsend et al., 2009), la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ GT) (Hanigan et al., 1999; Hanigan et al., 2001), la diaminopeptidasa (AP-N) (Hausheer et al., 2011; Hughey et al., 1978; McIntyre & Curthoys 1982) y la cisteína-conjugado  $\beta$ -liasa (Katayama et al., 2011; Zhang & Hanigan 2003) (Figura 2). La inhibición de estas enzimas reduce el daño renal inducido por cisplatino, no obstante algunos autores no han descrito tal efecto (Wainford et al., 2008).



**Figura 2. Biotransformación propuesta de cisplatino en una nefrotóxica.** X representa al cisplatino; GST, glutatión transferasa;  $\gamma$ GT, gamma glutamil transpeptidasa; AP-N, diaminopeptidasa; MRP, proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos (Tomado y modificado de Hanigan & Devarajan 2003)

### 1.1.3 Mecanismos de acción de cisplatino relacionados con nefrotoxicidad.

De la compilación de varios estudios se ha propuesto que el cisplatino causa daño renal y muerte celular principalmente por estrés oxidativo, disfunción mitocondrial e inducción de proteínas proinflamatorias (Guinaim dos Santos et al., 2012; Ozkok & Edelstein 2014; Siddik 2003). Este compuesto induce principalmente dos tipos de muerte celular, necrosis y apoptosis. La necrosis se ha asociado con altas dosis de cisplatino (200-800  $\mu$ M en cultivos celulares) y se caracteriza por un daño severo a la mitocondria y disminución de la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP). La apoptosis por el contrario se presenta a dosis bajas de este fármaco y es un proceso dependiente de ATP, lo que implica un daño mitocondrial leve (Hanigan & Devarajan 2003; Lieberthal et al., 1998; Padanilam 2003).

### Estrés oxidante y apoptosis

Se ha sugerido que cisplatino al dañar los complejos de la cadena respiratoria, incrementa la producción de anión superóxido y éste a su vez podría desencadenar la producción de radical hidroxilo, altamente reactivo, capaz de modificar las bases nitrogenadas del ADN. (Kruidering et al., 1997; Luanpitpong et al., 2011; Santos et al., 2008; Turrens 2003). También se ha encontrado que cisplatino disminuye el sistema antioxidante de la célula, ya que reduce el contenido de antioxidantes no enzimáticos como glutatión (GSH) y la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), GST y glutatión reductasa (GR) (Fernández-Rojas et al., 2014; Maliakel et al., 2008), así como un aumento en marcadores de estrés oxidativo como

lipoperoxidación (fosfolípidos como cardiopilin), oxidación de proteínas con grupos tiol y un aumento del nivel de proteínas carboniladas (Santos et al., 2007). Todos estos cambios están implicados en diferentes vías de muerte celular.

La apoptosis inducida por cisplatino involucra diferentes vías, la intrínseca mitocondrial, la extrínseca por receptores de muerte y la relacionada con estrés del retículo endoplasmático (Tabla 1). Todas éstas se han relacionado con la inducción inicial de p53, asociado en parte con la generación de estrés oxidativo (Guinaim dos Santos et al., 2012; Jiang et al., 2007). Wei et al. (2007) encontraron que en ratones deficientes en p53 y tratados con cisplatino se observa una recuperación de la función renal y disminución del proceso de apoptosis en células tubulares, comparado con ratones tratados con cisplatino cuya proteína p53 es activa.

También se ha demostrado que la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) tiene un papel importante en la expresión del factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y del receptor con dominio de muerte Fas que median vías de apoptosis extrínsecas (caspasa 1 y caspasa 8, respectivamente). Además induce apoptosis vía retículo endoplasmático a través de la fosfolipasa A2 independiente Ca<sup>2+</sup> (ER-iPLA2); la inhibición de esta proteína reduce la muerte celular por apoptosis en células de túbulo proximal tratadas con cisplatino.

**Tabla 1. Vías de apoptosis inducidas por cisplatino que explican nefrotoxicidad.**

Vía de apoptosis	Activación de vía	Respuesta.
Intrínseca mitocondrial	↑ERO, proteínas proapoptóticas (Bax/Bak), PIDD-caspasa 2. ↓ Proteínas antiapoptóticas Bcl2 y Bcl-xL.	Liberación de citocromo c, factor AIF y Omi/HtrA2 de mitocondria a citoplasma, activación de caspasas 9 y 3.
Extrínseca	Unión a receptores de muerte TNF $\alpha$ -TNFR1-TRADD-FADD y Fas-FADD.	↑Caspasa 8-caspasa 3, caspasa 8-Bid, caspasa 6, 7 y 1
Retículo endoplasmático	↑ERO vía citocromo CYP2E1.	↑Caspasa 12-caspasa 9, ER-iPLA2-caspasa 3.

AIF, factor inductor de apoptosis; Bak, proteína asesina del antagonista homólogo Bcl-2; Bax, proteína X asociada a Bcl-2; Bid, agonista de muerte con dominio interactivo BH; Bcl2, linfoma de células B2; Bcl-xL, linfoma de células B extra grande; ER-iPLA2, fosfolipasa A2 independiente Ca<sup>2+</sup> de retículo endoplasmático; FADD, proteína con dominio de muerte asociado a Fas; Omi/HtrA2, Omi/Serina peptidasa 2 HtrA; PIDD, proteína con dominio de muerte inducido por p53; ERO, especies reactivas de oxígeno; TNF $\alpha$ , factor alfa de necrosis tumoral; TNFR, receptor 1 del factor de necrosis tumoral; TRADD, proteína con dominio de muerte asociado a TNFR1 (Guinaim dos Santos et al., 2012; Ozkok & Edelstein 2014; Siddik 2003).

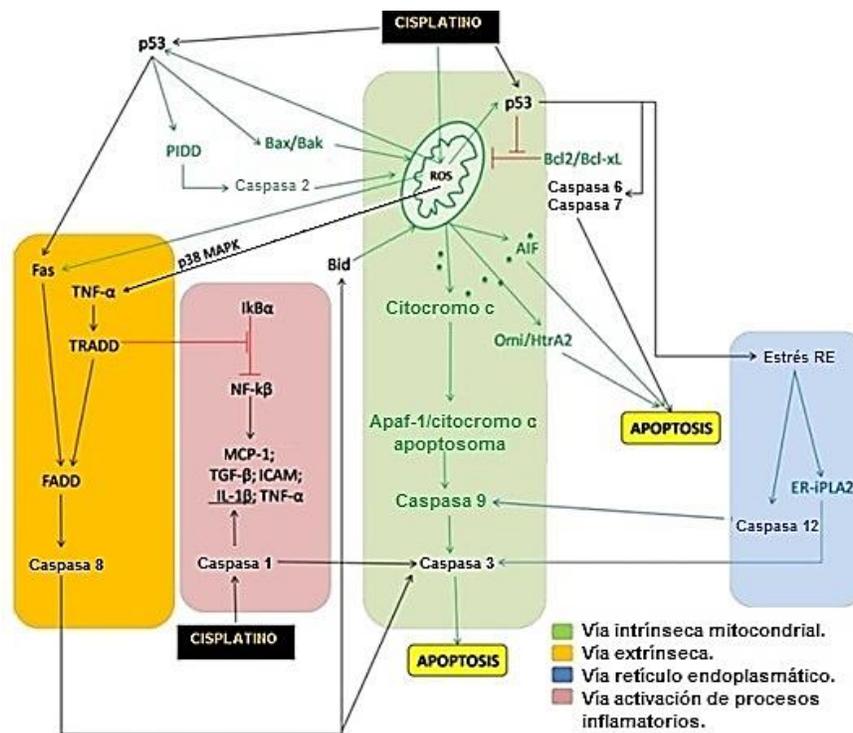
## Procesos inflamatorios inducidos por cisplatino

La capacidad proinflamatoria del cisplatino en células renales se atribuye principalmente al aumento de la expresión de TNF $\alpha$  que activa citocinas proinflamatorias y recluta leucocitos (Ramesh & Reeves 2002; Ramesh & Reeves 2004). Se ha demostrado que ésta induce a su vez la fosforilación y degradación del inhibidor alfa del factor nuclear kappa de células B activadas (I $\kappa$ B $\alpha$ ); sin su inhibidor el factor nuclear kappa de células B activadas (NF $\kappa$ B) se transloca al núcleo e induce la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias, incluidas TNF $\alpha$  (Ramseyer and Garvin 2013). El factor NF $\kappa$ B también es activado por otros estímulos incluido ERO y en parte se ha asociado su regulación con la activación de proteínas MAPK (Ilbey et al., 2009). La p38/MAPK media la síntesis de TNF $\alpha$  por degradación del represor de NF $\kappa$ B (Ramesh & Reeves 2005). La Inhibición de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK)/MAPK reduce la expresión de TNF $\alpha$  y la activación de caspasa 1, y en consecuencia disminuye la toxicidad de cisplatino (Jo et al., 2005).

El cisplatino también media la activación de la proteína activadora 1 (AP-1), un factor de transcripción que regula procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis, a través de la inducción de proteínas cinasas de c-Jun N-terminal (JNK) /MAPK. Se ha demostrado que la inhibición de JNK reduce la muerte celular y el daño renal inducidos por este fármaco (Brozovic & Osmak 2007; Francescato et al., 2007; Sánchez-Pérez & Perona 1999). El tratamiento de células con cisplatino/TNF $\alpha$  revela una inhibición de NF $\kappa$ B, un aumento de la forma fosforilada de JNK y un subsecuente aumento de la tasa de muerte celular. La relación entre las formas activas e inactivas de estas proteínas se han asociado con el balance entre proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas (Benedetti et al., 2013).

Aparte de TNF $\alpha$ , cisplatino ocasiona un aumento de otras citocinas y quimiocinas en riñón, como la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), moléculas de adhesión intercelular (ICAM), la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-2), el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) e interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 y IL-33 (Akcaay et al., 2011; Faubel et al., 2007; Ramesh & Reeves 2002), que provocan una respuesta inflamatoria sostenida por reclutamiento de células del sistema inmune. La reducción de estas moléculas por compuestos antiinflamatorios atenúa el daño renal ocasionado por cisplatino. Otra molécula muy estudiada en procesos de inflamación es la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) que produce prostaglandina 2 (PGE2), una molécula proinflamatoria involucrada en la respuesta inmune, dolor e hinchamiento; su reducción atenúa la disfunción renal inducida por cisplatino (Honma et al., 2013; Suddek et al., 2011). Jia et al. (2011) describieron que ratones knockout para esta enzima tratados con cisplatino presentaron una disminución de TNF $\alpha$ , IL- $\beta$ , sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), PGE2 y subunidades de la NADPH oxidasa, y en consecuencia el efecto toxico de este fármaco fue menor.

De lo anterior se puede deducir que los mecanismos de acción de cisplatino son complejos y están relacionados con diferentes vías (Figura 3), un desbalance en éstas puede favorecer mecanismos de supervivencia o muerte celular. Esto en parte está relacionado con la concentración de cisplatino, el tiempo de exposición o tratamiento y de moléculas coadyudantes como el TNF $\alpha$  administrado en algunos modelos experimentales.



**Figura 3.** Múltiples caminos involucrados en la inducción de nefrotoxicidad por cisplatino (Tomado de Guinaim dos Santos et al., 2012)

#### 1.1.4 Alternativas de nefroprotección contra efectos ocasionados por cisplatino

Dentro de los mecanismos terapéuticos utilizados para reducir el daño renal ocasionado por cisplatino se encuentra, la disminución de la exposición del riñón al fármaco por medio de la hidratación constante del paciente (diuresis), reemplazar la pérdida de electrolitos y reducir la dosis de cisplatino cuando la función renal se altera; sin embargo esto no es suficiente para disminuir la pérdida de filtración glomerular y la elevación de BUN (Hanigan & Devarajan 2003). Otra alternativa es la utilización de compuestos sintéticos o naturales que induzcan la activación de vías de supervivencia celular y disminuyan vías de apoptosis

y necrosis. La inhibición de proteínas involucradas en los mecanismos de acción del cisplatino también permitiría amortiguar su efecto nefrotóxico (Ozkok & Edelstein 2014).

Algunos compuestos naturales que han sido estudiados por su capacidad de secuestrar ERO y/o inducir la transcripción de genes citoprotectores son las vitaminas C, E y A, resveratrol, flavonoides como quercetina, carotenoides como licopeno y otros polifenoles, cuya administración en animales y células ha atenuado la toxicidad inducida por cisplatino. (Chirino & Pedraza-Chaverri 2009; Guinaim dos Santos et al., 2012). Sin embargo, algunas de estas moléculas pueden ser prooxidantes y exacerbar el daño oxidativo, esto depende en parte de las condiciones celulares, la presencia de iones metálicos y la dosis suministrada (Guardado et al., 2012; Carochó & Ferreira 2013). Por otro lado estos compuestos podrían interferir en la eficacia de cisplatino como antineoplásico, al estabilizar especies reactivas de oxígeno, cuya producción hace parte del mecanismo genotóxico de éste fármaco. Además también los antioxidantes podrían formar complejos que disminuyen su actividad antineoplásica y favorecen su detoxificación celular (Guinaim dos Santos et al., 2012).

## 1.2 Regaliz

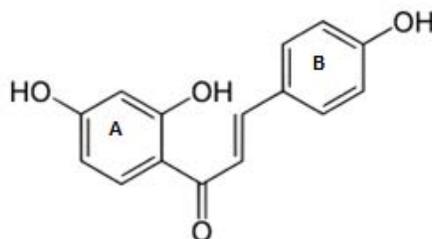
Se denomina regaliz a las raíces y tallos de las leguminosas de *Glycyrrhiza glabra*, *Glycyrrhiza uralensis* y *Glycyrrhiza inflata*. Estas se han utilizado ampliamente como hierba medicinal en el sur de Europa y partes de Asia, principalmente en la medicina China tradicional (Wang et al., 2013). Sus extractos se han utilizado para tratar síntomas como fatiga, debilidad, asma, congestión nasal, tos, espasmos y como analgésico, entre otros. Se ha resaltado también su papel como coadyudante de otras plantas medicinales, al ser un moderador y/o multiplicador de efectos. Como moderador se destaca su capacidad de detoxificar xenobióticos y de inhibir/atenuar efectos adversos del uso de otras hierbas; como multiplicador, potencia la actividad biológica y aumenta la absorción y eliminación del principio activo de otras plantas medicinales (Wagner and Ulrich-Merzenich 2009, Wang et al., 2013). En la versión número 2010 de la Farmacopeia China figura en más de 320 formulaciones actuando como ingrediente principal o como asistente entre un total de 1,062 prescripciones (Commission 2010).

Las propiedades medicinales de estas especies de plantas se deben a su composición química; entre el 3-5% corresponde al ácido glycyrrhizico y ácido glycyrrhético, considerados los compuestos activos de estas plantas. Estos se han caracterizado por tener un efecto antiinflamatorio, antiviral, hepatoprotector, neuroprotector, nefroprotector contra cisplatino y anticancerígeno, entre otros (Kao et al., 2014; Wang et al., 2013; Yu et al., 2012). No obstante se han aislado compuestos en menor proporción como terpenoides-

saponinas, terpenoides-esteroles, cumarinas y chalconas, que se han destacado por su actividad biológica.

### 1.3 Isoliquiritigenina

Dentro del grupo de chalconas que se encuentran en regaliz, la isoliquiritigenina (IsoLQ) figura como uno de los compuestos activos más ampliamente estudiados por su papel quimioterapéutico contra cáncer y su potencial como agente citoprotector. Las chalconas pertenecen a la familia de los flavonoides, cuya estructura principal es 1,3 difenil-2-propenona; el número y el tipo de sustituyentes en los anillos aromáticos son característicos de cada miembro de este grupo y se ha asociado con su actividad biológica. La IsoLQ se caracteriza por tener hidroxilada su estructura base en la posición 4 del anillo B y posición 2' y 4' del anillo A (Figura 4). En general este grupo de compuestos presentan múltiples propiedades como antiinflamatorio, antimicrobial, fungicida, antioxidante y antitumoral, entre otros, debido a su capacidad directa de secuestrar ERO y de inhibir o inducir múltiples moléculas que intervienen en diferentes procesos metabólicos (Nowaskowska 2007; Orlikova et al., 2011).



**Figura 4.** Estructura química de la isoliquiritigenina.

Varios estudios se han enfocado en determinar la relación existente entre estructura y bioactividad. De acuerdo a los grupos funcionales que presenta la IsoLQ, se ha informado que las chalconas con el enlace  $\alpha$ - $\beta$  insaturado altamente electrofílico tiene propiedades anti-inflamatorias; se ha observado disminución de la producción de óxido nítrico e inhibición del factor de transcripción NF $\kappa$ B. Por el contrario la reducción de esta instauración está relacionada con una mayor producción de estas moléculas (Foresti et al., 2005; Meng et al., 2007; Srinivasan et al., 2009; Zhao et al., 2003). El carbono carbonilo del grupo enona de las chalconas puede actuar como un electrófilo que reacciona con grupos tiol de proteínas con residuos de cisteína, como la proteína 1 asociada a kelch y parecidas a ECH (Keap1) represor del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) en citoplasma (Foresti et al., 2005).

Por otro lado uno o más sustituyentes hidroxilo en los anillos aromáticos, están asociados con una mayor actividad antiproliferativa de células tumorales en comparación a otros

sustituyentes (De Vincenzo et al., 1995; Loa et al., 2009). Otro grupo de chalconas con sustituyentes glucosídicos exhiben una menor capacidad de suprimir la proliferación de células cancerígenas, posiblemente porque su ingreso a la célula sería menor por difusión pasiva debido a su reducida lipofilicidad (Namgoong et al., 1994; Orlikova et al., 2011). Esta información sugiere que la actividad biológica de la IsoLQ y de otros compuestos está estrechamente relacionada con su estructura química. Dependiendo de sus grupos funcionales pueden participar en reacciones de adición, sustitución y oxido-reducción con múltiples moléculas en la célula; un ejemplo es la formación u estabilización de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

### 1.3.1 Actividad antioxidante

Un antioxidante es cualquier sustancia que retarda, previene o remueve el daño oxidante sobre una molécula blanco (Halliwell & Gutteridge 2007). Esto implica varios mecanismos: 1) neutralización de ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) de manera directa en función de su estructura química; 2) inhibición de enzimas prooxidantes; 3) capacidad de inducir la transcripción de genes citoprotectores (López & Denicola 2013). Según esto, poco se ha estudiado sobre la capacidad de la IsoLQ de secuestrar especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Los estudios se han limitado a evaluar su efecto sobre la disminución de la oxidación lipídica de la lipoproteína LDL por radicales peroxilo generados a partir de 2,2, azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH), donde 30  $\mu\text{M}$  de este compuesto disminuye entre el 60 y 80% su oxidación. También se ha determinado que 50  $\mu\text{M}$  de IsoLQ disminuye en un 26% el consumo de  $\beta$  caroteno en un sistema de oxidación de ácido linoleico (Vaya et al., 1997). Por otro lado Song Hwa Choi et al. (2010) y Tsutomo et al. (1988) informaron que la IsoLQ tiene la capacidad de secuestrar radicales 1,1-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) entre un 20% y 50 % a una concentración de 1000  $\mu\text{M}$ . En adición, su capacidad de secuestrar ERN no se ha estudiado ampliamente, solo se ha documentado que disminuye la oxidación de dihidrorodamina 123 por el anión peroxinitrito con una  $\text{IC}_{50}$  de 9,3  $\mu\text{M}$  (Chin et al., 2007).

Debido a la escasa información de la capacidad antioxidante de este compuesto a partir de otros métodos, es necesario determinar su habilidad de secuestrar otro de tipos se especies reactivas de oxígeno de interés biológico, ya que como se puede observar su capacidad varía dependiendo del radical evaluado.

Por otro lado la IsoLQ se ha caracterizado principalmente por su papel como antioxidante indirecto, ya que se ha encontrado que es capaz de inhibir enzimas prooxidantes e inducir un aumento de moléculas citoprotectoras. Varios estudios han informado que este compuesto inhibe la actividad enzimática de la xantina oxidasa ( $\text{IC}_{50}$ : 55,8  $\mu\text{M}$ ) (Kong et al., 2000), la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) ( $\text{IC}_{50}$  1,3  $\mu\text{M}$ ) y la COX-2 (1,6  $\mu\text{M}$  de IsoLQ disminuye el 80% de la producción de prostaglandina E2) (Kim et al., 2008), las cuales

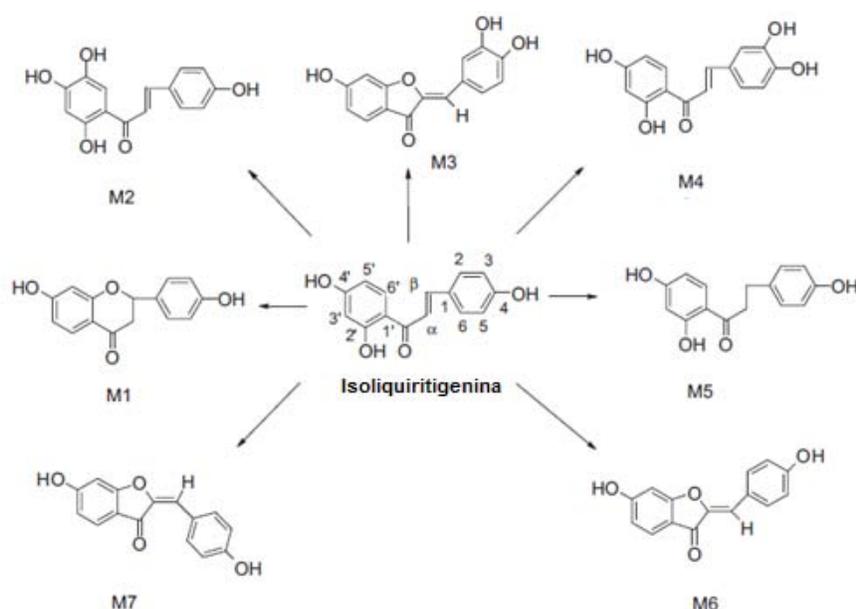
producen anión superóxido, óxido nítrico e hidroperóxidos, respectivamente. Aunque estas enzimas y los productos formados son importantes para diferentes vías metabólicas como degradación de sustratos, respuesta inmunológica e inflamatoria, a altas concentraciones el balance entre ERO, ERN y las moléculas antioxidantes endógenas se pierde y el estado de estrés oxidante resultante desencadena daño de macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Ray et al., 2012; Valko et al., 2006). Respecto a la inducción de moléculas citoprotectoras, la IsoLQ aumenta el nivel de GSH y enzimas antioxidantes como catalasa (CAT) y SOD en tejido hepático, disminuidas por efecto de la administración de tetracloruro de carbono a ratas machos Sprague-Dawley (Zhao et al., 2015). Además se ha observado que ayuda a prevenir la generación de ERO inducida por compuestos citotóxicos en varias líneas celulares (Choi et al., 2010; Kumar et al., 2007; Yang et al., 2012).

Estos efectos como antioxidante indirecto pueden estar mediados por la inducción de la translocación del factor Nrf2 al núcleo, que en combinación con proteínas pequeñas denominadas “fibrosarcoma musculoaponeurótico” (sMaf) se une a la secuencia conocida como “Elementos de respuesta antioxidante” (ARE) para activar la maquinaria transcripcional de genes de moléculas citoprotectoras como las enzimas antioxidantes (López & Denicola 2013). Luo et al. (2007) determinaron en ensayos *in vitro* que la IsoLQ alquila la proteína Keap 1 (supresor de Nrf2) en residuos específicos de cisteína (Cys<sup>151</sup>); esto sugiere que está involucrada en el bloqueo de la capacidad de Keap1 de reprimir Nrf2 en el citoplasma. Gong et al. (2015) informaron que la IsoLQ induce la translocación de Nrf2 al núcleo y en consecuencia aumenta la transcripción de genes que codifican para la subunidad catalítica de la enzima glutamato-cistein ligasa (GCLC), la UDP-glucuronosiltransferasa (UGT1A1) y proteína 2 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP2), proteínas que hacen parte del sistema detoxificante de la célula. La inducción de estas enzimas está asociado con la capacidad de la IsoLQ de inhibir el daño ocasionado por xenobióticos.

### 1.3.2 Biotransformación

La IsoLQ aunque es un compuesto potencialmente antitumoral y citoprotector, su metabolismo podría explicar en parte estas propiedades. Guo et al. (2008a) en un modelo *in vitro* de microsomas hepático humano informaron que la IsoLQ es susceptible a degradación por enzimas fase I responsables del metabolismo de xenobióticos y compuestos endógenos tóxicos. Estos autores detectaron 7 metabolitos secundarios hidroxilados (Figura 5) resultado de la acción de varias enzimas y radicales libres. Las enzimas citocromo P450 fueron responsables de la formación de los compuestos M3 y M4 y contribuyeron parcialmente a la formación de M6 y M7 junto con otras peroxidases, peróxido de hidrogeno y el radical anión superóxido. Los metabolitos M3 y M4 fueron los más abundantes.

Varios de estos metabolitos reportan actividad biológica, el compuesto M1 es anticancerígeno, anti-inflamatorio, ejerce un efecto citoprotector en células hepáticas contra daño inducido por acetaminofén, cadmio, tetracloruro de carbono, entre otros compuestos citotóxicos (Kim et al., 2004; Kim et al., 2006; Kim et al., 2008; Zhang et al., 2015 ). El compuesto M3 ha mostrado propiedades antimutagénicas, anti-inflamatorias y efecto citoprotector contra estrés oxidativo inducido por terbutil hidroperóxido en células HepG2 (Hong et al., 2012; Lee et al., 2010; Lee et al., 2014; Park et al., 2004). Por último se ha descrito que el compuesto M4 presenta una mayor capacidad antioxidante que la IsoLQ debido posiblemente a que tiene un sustituyente hidroxilo adicional (Nerya et al., 2004) y además tiene propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas. Iwashita et al. (2000) describieron que este compuesto inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en células B16 de melanoma, leucemia HL60 y adenocarcinoma de colon humano (Iwashita et al., 2000; Orlikova et al., 2011)



**Figura 5.** Estructuras de compuestos identificados como resultado del metabolismo enzimático fase I de la IsoLQ; M1 4',7-dihidroxi flavanona (liquiritigenina), M2 2',4,4',5' tetrahidroxichalcona, M3 3',4,4'-trihidroxichalcona (sulfuretina), M4 2',4',3,4-tetrahidroxichalcona (buteina), M5 2',4,4'-trihidroxidihidrochalcona (davidigenina), M6 trans-6,4'-dihidroxi aurona, M7 cis-6,4'-dihidroxi aurona (Guo et al., 2008a).

Por otro lado, Guo et al. (2008b) también encontraron que la IsoLQ es susceptible de ser metabolizada por enzimas de fase II que se caracterizan por generar metabolitos

secundarios solubles, menos activos y de rápida excreción vía renal o biliar. Varias de las enzimas de fase II encargadas de la conjugación de xenobióticos son la UDP-glucuronosiltransferasa (UGT), sulfotransferasas, N-acetil transferasas y glutatión transferasas. Se describió que las enzimas de la primera familia mencionada son las responsables del metabolismo de la IsoLQ en microsomas de hígado, intestino y riñón en un modelo *in vitro*. La IsoLQ se eliminó rápidamente a través de la glucoronidación, su tiempo de vida media fue de 20,1 min en este caso y de 141 min cuando su metabolismo está dado por enzimas citocromo P450. Esto indica que las enzimas fase II están involucradas en el rápido metabolismo y eliminación de la IsoLQ, y en consecuencia podrían afectar su actividad farmacológica.

Estudios sobre farmacocinética de la IsoLQ en modelos *in vivo* describen una rápida absorción de éste compuesto y la formación de metabolitos secundarios producto de su biotransformación. Lee et al. (2013) identificaron tres tipos de compuestos en plasma entre los primeros 5 a 30 min luego de su administración, glucoronidos resultantes de la conjugación de la IsoLQ, liquiritigenina (M1, Figura 5) y sus correspondientes glucoronidos. Además informaron que la distribución de estos metabolitos a los 30 y 180 min después de la administración de IsoLQ fue mayor en hígado >intestino delgado>intestino grueso>riñón. De este estudio se puede deducir que la IsoLQ se absorbe rápidamente pero su biodisponibilidad es baja debido a su metabolismo, lo que puede afectar su actividad biológica y diferir entre diferentes órganos.

### **1.3.3 Estudios de la isoliquiritigenina como agente quimioterapéutico**

La IsoLQ ha sido principalmente estudiada por su potencial como anti-cancerígeno, actuando en diversas fases de crecimiento y propagación de células tumorales. Se ha descrito que la IsoLQ es capaz de atenuar la sobreproducción de ERO y ERN, disminuir la generación de moléculas endógenas promotoras de tumores, como prostaglandinas y óxido nítrico, reducir la proliferación indiferenciada de células tumorales por arresto del ciclo celular y activación de vías de apoptosis. Por último se ha informado que este compuesto inhibe la migración e invasión de cáncer de próstata y mama en estudios *in vitro*, respaldados con la disminución del tamaño de tumores y de metástasis en modelos *in vivo* (tabla 2)(Orlikova et al., 2011).

**Tabla 2.** Estudios del efecto de la IsoLQ sobre las diferentes etapas de carcinogénesis evaluados en algunas líneas celulares de cáncer e inducción de tumores en animales.

<b>Etapas de carcinogénesis</b>	<b>Modelo</b>	<b>Efecto de la IsoLQ</b>
Promoción de crecimiento.	Inducción de papiloma cutáneo. Cáncer de mama.	Inhibición de progresión de tumores debido a la atenuación de la producción de PGE2 y el ácido 20-HETE.
Proliferación	Cáncer cervical, próstata, pulmón, colon, hígado, mama, leucemia.	Inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular, por activación de vía ATM/p53/p21, p27; disminución de proteínas antiapoptóticas Bcl2/Bcl-xL y aumento de proteínas proapoptóticas Bax/Bak
Migración e invasión	Cáncer de mama Cáncer de próstata	Disminución de proteínas EGF, ICAM, VCAM y MMP-9.
Metástasis	Cáncer de riñón Cáncer de mama	Reducción de nódulos metastásicos en pulmón

ATM, ataxia telangiectasa mutada; Bcl2, linfoma de células B 2; Bcl-xL, Linfoma de células B extra grande; EGF, factor de crecimiento epidérmico; ICAM, molécula de adhesión intercelular 1; MMP-9, metaloproteínasa 9; p21, inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1A; p27, inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1B; PGE2, prostaglandina E2; VCAM, molécula de adhesión vascular 1; 20-HETE, ácido 20-hidroxi-eicosatetranoico (Auyeung & Ko 2010; Cuendet et al., 2010; Cuendet et al., 2006; Hsu et al., 2009; Hsu et al., 2004; Hsu et al., 2005; Kwon et al., 2009; Lau et al., 2010; Li et al., 2013; Lorusso & Marech 2013; Yamamoto et al., 1991; Yamazaki et al., 2002; Zhang et al., 2010; Zheng et al., 2014; Zu et al., 2009).

### 1.3.4 Estudios de la isoliquiritigenina como agente citoprotector

Se han realizado varios estudios sobre el potencial de la IsoLQ como citoprotector frente a la inducción de daño por sustancias tóxicas en ensayos *in vitro* e *in vivo*. En la Tabla 3 se presentan algunos estudios donde se observó este efecto. Diferentes líneas celulares se han utilizado para determinar el mecanismo que este compuesto desencadena para atenuar el estrés oxidativo, inflamación y apoptosis inducido por estímulos tóxicos. Aunque no hay registros de su papel en células renales, Lee et al. (2008) observaron en un modelo de xenotransplante de células de cáncer de colon (CT26) en ratones BALB/c que la IsoLQ disminuye el efecto nefrotóxico y hepatotóxico del cisplatino, sin afectar la actividad antineoplásica de este fármaco. La IsoLQ es capaz de reducir BUN, creatinina y óxido nítrico en suero sanguíneo; restablece parcialmente los niveles de glutatión en tejido hepático y disminuye los niveles de malondialdehído (MAD) en tejido hepático y renal.

**Tabla 3.** Estudios sobre el efecto de la IsoLQ como agente citoprotector en diferentes modelos de daño celular.

Modelo	Inductor	Consecuencias	Efecto de IsoLQ	Autor
Raw 264.7 macrófagos	LPS	Inducción de eventos proinflamatorios.	Disminución de iNOS, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , por inducción de HO-1 mediada por ERK1/2 MAPK	Lee S et al. (2009)
Raw 264.7 macrófagos	LPS	Inducción de eventos proinflamatorios.	Disminución de COX-2, iNOS, TNF $\alpha$ y IL-6 por disminución de la translocación del factor NF-kB al núcleo vía supresión de la fosforilación de IKK $\alpha/\beta$ , ERK1/2 y p38 MAPKs.	Kim J et al. (2008)
HT22 células neuronales del hipocampo	Glutamato	Neurotoxicidad.	Disminución de apoptosis y ERO intracelular. Previene la pérdida del potencial de membrana y disminuye el nivel de proteínas Bax en mitocondria y la liberación de AIF a citosol.	Yang E et al. (2012)
HUVECs	TNF $\alpha$	Estrés oxidativo y activación de procesos inflamatorios.	Disminución de moléculas de adhesión celular por inhibición de la translocación de NFkB al núcleo. Disminución de ERO intracelular.	Kumar S et al. (2007)
HpG2 células hepáticas	Acido araquidónico+hierro	Induce estrés oxidativo y disfunción mitocondrial	Inhibe apoptosis y pérdida del potencial de membrana por inactivación de GSK3 $\beta$ mediado por activación de AMPK.	Choi et al. (2010)
Ratones macho C57BL/6	Dieta alta en grasa	Acumulación de grasa en hígado, ocasiona lesión hepática por estrés oxidativo y respuesta inflamatoria.	Atenúa la acumulación de grasa en hígado. Disminuye la formación de TBARS y ERN e inhibe la expresión de iNOS y COX-2, enzimas prooxidantes.	Kim Y et al. (2010)
Ratas Sprague-Dawley	Tetracloruro de carbono	Oxidación lipídica de la membrana plasmática con posterior degeneración y necrosis de hepatocitos.	Disminución de MDA, TNF $\alpha$ y COX-2. Restablecimiento de los niveles de GSH, enzimas CAT y SOD en tejido hepático.	Zhao Z et al. (2015)

AIF, factor inductor de apoptosis; AMPK, proteína cinasa activada por AMP; CAT, catalasa; COX-2, ciclooxigenasa 2; GSH, glutatión; GSK3 $\beta$ , glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$ ; HO-1, hemo-oxigenasa-1; IL-1 $\beta$ , interleucina-1  $\beta$ ; IL-6, interleucina 6; iNOS, sintasa de óxido nítrico inducible; HUVECs, células endoteliales aisladas de cordón umbilical humano; MAPKs (JUN-1, ERK, p38) proteínas cinasas activadas por mitógenos; MDA, malondialdehído; ERO, especies reactivas de oxígeno; SOD, superóxido dismutasa; TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; TNF $\alpha$ , factor alfa de necrosis tumoral.

## 2. JUSTIFICACION

El cisplatino es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento contra diferentes tipos de cáncer, no obstante genera efectos colaterales principalmente nefrotóxicos, debido a que el riñón es el principal órgano encargado de su eliminación. La incidencia de disfunción renal ocasionada por este fármaco es del 25%. En varios estudios se ha propuesto que vías de señalización relacionadas con estrés oxidativo y eventos de inflamación podrían explicar la muerte celular inducida por cisplatino en células renales. Por esta razón, un gran número de investigaciones se han enfocado en el uso de compuestos antioxidantes directos, indirectos y bi-funcionales como amortiguadores del efecto tóxico del cisplatino, en parte por su capacidad de neutralizar especies ERO y ERN e inducir la expresión de moléculas citoprotectoras como glutatión y enzimas antioxidantes. Sin embargo, su uso clínico es puesto en duda debido a la posible interferencia que puedan causar en la eficacia antitumoral de cisplatino.

Por otra parte se ha descrito que la IsoLQ, una chalcona perteneciente a la familia de flavonoides presenta propiedades tanto anticancerígenas como citoprotectoras; esto indica que sus efectos biológicos varían dependiendo del tipo de célula y podría no actuar de manera indiscriminada como el cisplatino. Son escasos los estudios sobre la capacidad antioxidante de esta chalcona, no obstante se ha descrito en modelos *in vitro* que es capaz de promover la reducción de ERO intracelular, inhibir enzimas prooxidantes e inducir la translocación del factor de transcripción Nrf2 al núcleo, y además disminuir proteínas pro-inflamatorias en diversos modelos de inducción de daño celular. Por lo anterior, se propone que la IsoLQ podría reducir los efectos nefrotóxicos inducidos por cisplatino.

## 3. HIPOTESIS

Dado los antecedentes de la IsoLQ en otros modelos de daño celular, se postula que este compuesto es capaz de disminuir la muerte celular inducida por cisplatino en las células LLCPK1, a través de la reducción del proceso de apoptosis y regulación positiva del sistema antioxidante celular sin interferir en la actividad antineoplásica de este fármaco.

## **4. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la IsoLQ sobre la muerte de células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo (LLC-PK1) inducida por cisplatino, así como su efecto sobre la actividad antineoplásica en células de carcinoma de vejiga (HTB4)

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Evaluar la actividad antioxidante directa de la IsoLQ como parte de la caracterización de este compuesto.

Establecer las condiciones donde la IsoLQ ejerce un efecto citoprotector contra el daño por cisplatino en las células LLCPK1.

Determinar el efecto de la IsoLQ sobre el sistema antioxidante de las células LLCPK1 como posible mecanismo de citoprotección frente a la citotoxicidad inducida por cisplatino.

Evaluar el efecto de la IsoLQ sobre la muerte inducida por cisplatino en células LLCPK1 a través de la medición del nivel celular de proteínas involucradas en el proceso de apoptosis.

Determinar si la IsoLQ interfiere con la actividad antineoplásica del cisplatino en las células HTB4 de carcinoma de vejiga.

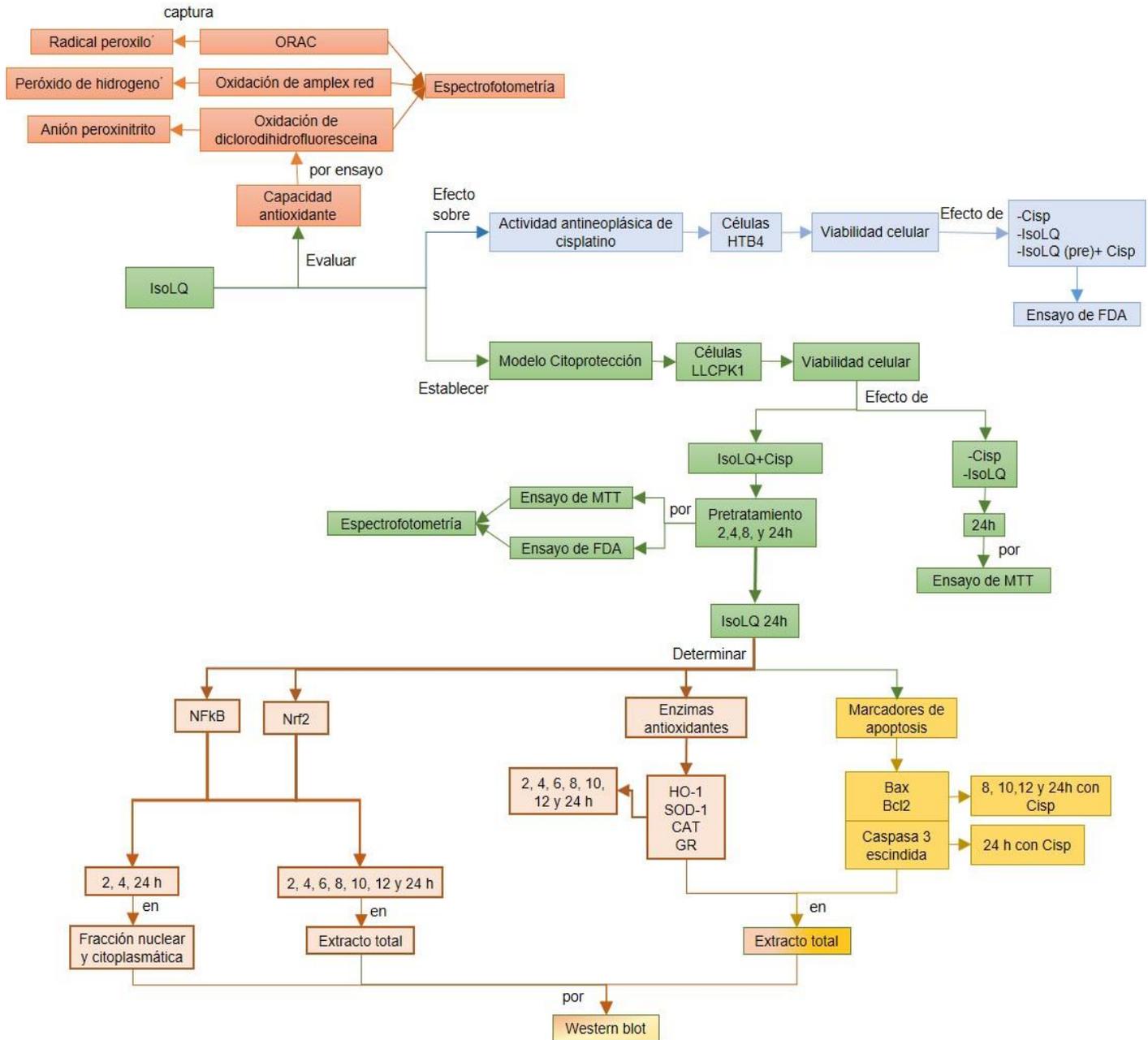
## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales

Las células epiteliales de túbulo proximal de cerdo (LLCPK1) y las células de carcinoma de vejiga T24 (HTB4) se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, EUA). El Cisplatino P4394 (cis-Diamminedichloroplatinum II), diacetato de fluoresceína (FDA) y bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-(2-il)]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT), ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazino etanosulfónico (HEPES), tris (hidroximetil) aminometano, ditiotreitól (DTT), dimetil sulfóxido, tween 20, dodecil sulfato de sodio (SDS), 4-nonil-fenil-polietilenglicol (NP-40), desoxicolato de sodio, triton X-100, 2-mercaptoetanol, fluoruro de sodio, ortovanadato de sodio, pirofosfato de sodio, glicerolfosfato, AAPH (2,2 azobis-(2-aminopropano) dicloruro), fluoresceína, amplex red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina), peroxidasa de rábano (HRP), ácido dietilenetriaminopentaacético (DTPA), dimetil sulfóxido (DMSO), glicerol, cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) y tripsina-EDTA se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EUA). El medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el suero fetal bovino (SFB) y penicilina/estreptomina fueron adquiridos de Biowest (Riverside, MO, EUA). Isoliquiritigenina (4,2',4'-trihidroxichalcona) fue obtenida de AK scientific (Union City, CA, EUA). El cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), fosfato de sodio monobásico ( $Na_2HPO_4$ ), fosfato de sodio dibásico ( $KH_2PO_4$ ), carbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ), etilendiamino-tetra-acético (EDTA) disódico, peróxido de hidrógeno, alcohol isopropílico y ácido clorhídrico se obtuvieron de JT Baker (Center Valley, PA, EUA). El cloruro de potasio (KCl) fue obtenido de Mallickrodt pcl (St. Louis, MO, EUA). El compuesto mesoporfirina dicloruro de estaño se obtuvieron de Frontier Scientific (Logan, UT, EUA). El reactivo Bradford se obtuvo de Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). Las membranas de nitrocelulosa se adquirieron de GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido). Los anticuerpos fluorescente IRDye 800CW y IRDye 680RD se obtuvieron de LI-COR (Lincoln, NE, EUA). Los anticuerpos primarios para glutatión reductasa (GR) y lámina b1 se adquirieron de Abcam (Cambridge, MA, EUA). Los anticuerpos primarios para hemo-oxigenasa 1 y superóxido dismutasa (SOD-1) se compraron a Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, EUA). El anticuerpo para Nrf2 se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA). El anticuerpo para NFkB se compró a Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). El anticuerpo para Bcl2 se adquirió de eBioscience (Waltham, MA, EUA). El anticuerpo para Bax se obtuvo de GeneTex (Irvine, CA, EUA), el anticuerpo para caspasa 3 escindida se adquirió de Cell Signaling Technology (Danver, MA, EUA) y el anticuerpo para  $\alpha$  tubulina se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO, EUA).

## 5.2 Métodos

Para el desarrollo de este estudio se implementaron diferentes métodos que se describen brevemente más adelante. En la figura 6 se muestra un diagrama del diseño experimental donde cada color representa la estrategia experimental seguida para cada objetivo; en este se muestran los tiempos evaluados, los ensayos utilizados y técnicas implementadas.



**Figura 6.** Esquema de la metodología seguida para abordar cada uno de los objetivos planteados en este estudio.

### **5.2.1 Actividad antioxidante directa de la isoliquiritigenina**

Se evaluó la capacidad de la IsoLQ de neutralizar o secuestrar el radical peroxilo, peróxido de hidrógeno y anión peroxinitrito, que hacen parte del grupo de ERO asociadas con la citotoxicidad de cisplatino. Se realizaron curvas dosis-respuesta (IsoLQ entre 0 y 1000  $\mu\text{M}$ ) para determinar la IC<sub>50</sub> de la IsoLQ frente a cada una de las ERO mencionadas, sin embargo, solo se presentan datos a las concentraciones donde se observó una reducción de la oxidación de las moléculas blanco. La solución stock de este compuesto se realizó en DMSO (vehículo) y las diluciones se hicieron en agua. En cada uno de los ensayos se verifico que las concentraciones del vehículo utilizadas no presentarán actividad antioxidante frente a estas ERO.

#### **Capacidad de capturar radical peroxilo (Ensayo ORAC)**

Este ensayo se realizó según la metodología propuesta por Prior et al. (2003). Se basa en la generación de radicales peroxilo por calentamiento del compuesto AAPH en presencia de oxígeno; este radical oxida a la fluoresceína y provoca un decaimiento de la fluorescencia emitida por este compuesto. La IsoLQ fue adicionada a una solución de 19 mM de AAPH y 34 nM de fluoresceína, la mezcla se incubó a 37°C por 1.5 h y la fluorescencia fue medida a una longitud de onda de excitación y emisión de 485 nm y 520 nm, respectivamente.

#### **Capacidad de capturar peróxido de hidrógeno**

Se determinó a partir de la oxidación del compuesto amplex red (0.1 mM) por peróxido de hidrógeno (50  $\mu\text{M}$ ) en presencia de la enzima HRP-peroxidasa (0.2 U/mL). El producto fluorescente llamado resorufina se midió a una longitud de onda de excitación y emisión de 530 nm y 585 nm respectivamente, a los 30 min de incubación de la mezcla de reacción. En presencia de un antioxidante se espera una menor formación del producto fluorescente (Floriano-Sánchez et al., 2006)

#### **Capacidad de capturar anión peroxinitrito**

Este ensayo se realizó a partir de la generación inicial del anión peroxinitrito, por reacción entre peróxido de hidrógeno acidificado y nitrito de potasio (Beckman et al., 1994). La concentración de peroxinitrito se determinó a 302 nm utilizando el coeficiente extinción molar de 1670  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . El anión peroxinitrito oxida a la diclorodihidrofluoresceína (DCDHFDA) y produce el compuesto fluorescente diclorofluoresceína, cuya longitud de excitación y emisión es de 488 y 525 nm, respectivamente. En este estudio se utilizó una concentración de 50  $\mu\text{M}$  del anión, 3 mM de DCDHFDA y 1mM DTPA, este último actúa como agente quelante; la mezcla de reacción se incubo con diferentes concentraciones de IsoLQ por 30 min y la fluorescencia fue registrada al inicio y final de este periodo. En presencia de un antioxidante se espera una menor formación del producto fluorescente.

## **5.2.2 Cultivo celular**

Las células LLC-PK1 y HTB4 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de penicilina/estreptomina a 37°C en una atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se subcultivaron tres veces por semana cuando alcanzaban un 90% de confluencia. Para esto, las células se despegaban de las cajas Petri incubando con tripsina-EDTA a 37°C, se centrifugaban a 800 g por 3 minutos, se resuspendían con DMEM suplementado con SFB y se realizaba una dilución 1:2 para seguir cultivándolas. Previo a cada experimento las células se despegaron, sembraron en placas multipozos, y se dejaron crecer por 24h. Los compuestos de interés fueron administrados a las células en medio con antibiótico sin SFB.

## **5.2.3 Viabilidad celular**

Se realizaron ensayos dosis-respuesta para la IsoLQ y cisplatino a concentraciones entre 5-25 µM (vehículo<0.1%) y 15-60 µM, respectivamente. La viabilidad celular se determinó a las 24 horas de tratamiento, con el objetivo de conocer si la IsoLQ ocasiona citotoxicidad en las células LLC-PK1 y determinar la concentración efectiva 50 de cisplatino (concentración que inhibe el 50% la viabilidad celular). Posteriormente para determinar las condiciones en las que la IsoLQ tiene un efecto citoprotector frente a la citotoxicidad ocasionada por cisplatino se evaluó la viabilidad celular a las 2, 4, 8 y 24 horas de pretratamiento con IsoLQ (5-25 µM). La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT y FDA, este último solo se utilizó para verificar el efecto de la IsoLQ a las 24 h de pretratamiento.

### **5.2.3.1 Ensayo de MTT**

Este ensayo se fundamenta en la reducción del compuesto bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a formazan por enzimas oxido-reductasas presentes en las células (László K 2011). Transcurrido los tiempos de tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X y fueron incubadas con 0.3 mg/mL de MTT a 37°C por 4 h. Posteriormente se retiró el medio de los pozos, los cristales de formazan precipitados fueron disueltos con 0.04 N de HCl en isopropanol y se midió su absorbancia a 570 nm. Los datos se expresaron como porcentaje de reducción de MTT generado por las células tratadas respecto a las células control.

### **5.2.3.2 Ensayo de FDA**

En método de fluorescein diacetato (FDA) se fundamenta en la deacetilación de este compuesto por estereasas no específicas presentes en citoplasma, la fluoresceína resultante es retenida en la célula y su longitud de excitación y emisión es 485 y 520 nm respectivamente. Las células se lavaron con amortiguador de fosfatos salino (PBS) 1X y

se incubaron en la oscuridad con 12  $\mu\text{M}$  de FDA en medio DMEM sin SFB por 5 min a 37°C. La lectura de fluorescencia se realizó en un lector de placas. Los datos se expresaron como el porcentaje de deacetilación generado por las células tratadas respecto a las células control.

#### **5.2.4 Fraccionamiento celular**

Para aislar la fracción nuclear y citoplasmática de las células tratadas a los tiempos indicados, se utilizaron dos soluciones, el amortiguador 1 (10 mM HEPES, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 0,5% Triton X-100) y el amortiguador 2 (1M NaCl, 0.2 Mm EDTA, 20% de glicerol y 0.5 mM DTT) (Bindu et al., 2011)

Las células se lavaron con PBS 1X frío y se dejaron en esta misma solución, se rasparon de las cajas de 100 mm de diámetro que las contenían y se centrifugaron a 800 g por 10 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en el amortiguador I que tenía en solución inhibidores de fosfatasas y proteasas. Posteriormente las células se sometieron a vortex por 20 s, se incubaron en baño de hielo por 15 min y después se centrifugaron a 800 g por 10 minutos. El sobrenadante se centrifugó a 12000 g por 5 min para obtener la fracción citoplasmática y la pastilla se resuspendió en un volumen igual de ambos amortiguadores (1 y 2) para lisar los núcleos recolectados. La mezcla se sometió a vortex por 15 s, se incubó por 15 min en baño de hielo y se centrifugó a 12000 g por 5 min; el sobrenadante de esta última parte corresponde a la fracción proteica nuclear. Ambas fracciones se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

#### **5.2.5 Western Blot**

Las células se lavaron con PBS 1X y se lisaron con la solución RIPA 1X que contiene inhibidores de proteasas y fosfatasas; las células se dejaron en inmersión a 4°C toda la noche y posteriormente se centrifugaron a 12000 g por 5 min a 4°C para separar la fracción proteica total de otros compuestos. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida de diferente porcentaje dependiendo de la masa de la proteína de interés. Se cargaron 15  $\mu\text{g}$  de proteína para la detección de enzimas antioxidantes, 20  $\mu\text{g}$  para los factores de transcripción (Nrf2 y NFkB) y 30  $\mu\text{g}$  para proteínas involucradas en la apoptosis. La transferencia se realizó en membranas de nitrocelulosa y se utilizaron como controles de corrida y transferencia un pool de proteínas entre 10 y 250 KDa de Bio-RAD.

Las membranas se bloquearon con una solución de leche al 4% por 1 h y se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche. Posteriormente éstas se lavaron con TBS-T 1X y se incubaron por 1 hora con el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente; finalmente las membranas se lavaron con amortiguador salino de tris con tween 20 (TBST-T) 1X, PBS 1X y se escanearon en un fotodocumentador LI-COR Odissey. El análisis de imagen se hizo con el software Imagic Studio Lite versión 5.2

#### **5.2.6 Inhibición de la actividad de hemo-oxigenasa sobre el efecto de la IsoLQ en la disminución de la viabilidad celular ocasionada por cisplatino.**

El compuesto mesoporfirina dicloruro de estaño (SnMP) es un inhibidor competitivo de la actividad de la hemo-oxigenasa, y aunque no es específico para esta enzima ya que inhibe otras proteínas que tienen grupos hemo dentro de su estructura, ha sido ampliamente utilizado para determinar el papel de la HO en modelos de citoprotección (Pittalà V et al., 2013). La IsoLQ aumenta los niveles de esta enzima en las células LLCPK1 por lo que se utilizó este inhibidor para determinar su efecto sobre la actividad de la IsoLQ en este modelo de daño. Las células LLCPK1 fueron pre-tratadas con 25  $\mu$ M de IsoLQ por 24 horas y posteriormente con la IC<sub>50</sub> de cisplatino y 10  $\mu$ M del compuesto SnMP por 24 h; la viabilidad celular fue determinada por el ensayo de FDA descrito anteriormente.

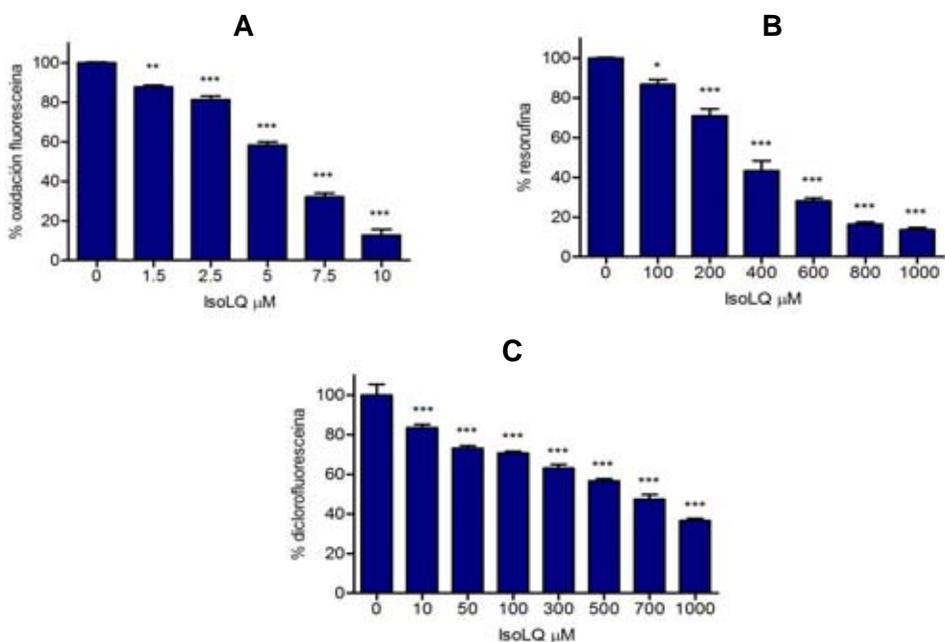
#### **5.2.7 Análisis estadístico**

Todos los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Se realizó un análisis de varianza de una vía seguido de la prueba Bonferroni de comparaciones múltiples. Se consideran diferencias significativas los valores  $p < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Actividad antioxidante directa de la isoliquiritigenina

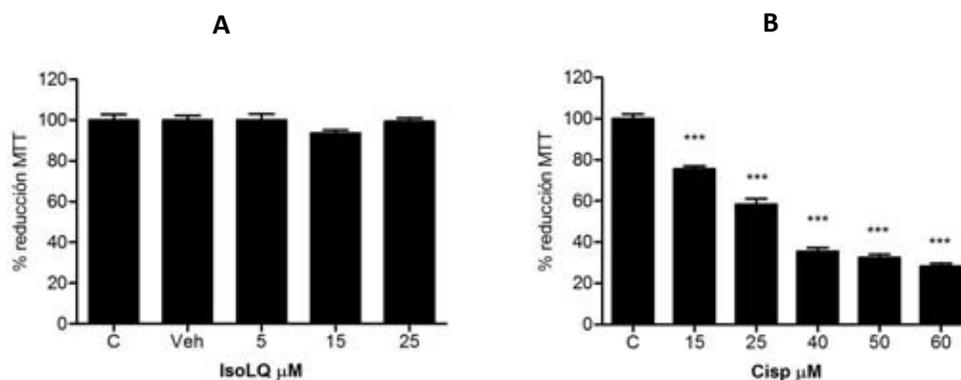
En la figura 6 se presenta la actividad antioxidante de la IsoLQ frente a algunas ERO, en función del porcentaje del producto formado por la oxidación de la molécula blanco a un tiempo determinado. La IsoLQ fue capaz de capturar el radical peroxilo, evitando la oxidación de la fluoresceína, vía concentración dependiente (figura 7A), con una  $IC_{50}$  de  $5.8 \pm 0.43 \mu M$ . También se determinó que a medida que aumenta la concentración de IsoLQ, disminuye la oxidación de amplex red (figura 7B) y diclorodihidrofluoresceína (figura 7C) por parte de peróxido de hidrógeno y anión peroxinitrito, respectivamente. La  $IC_{50}$  de la IsoLQ para peróxido de hidrógeno fue  $324.36 \pm 39.04 \mu M$  y de  $642.7 \pm 25.3 \mu M$  para anión peroxinitrito.



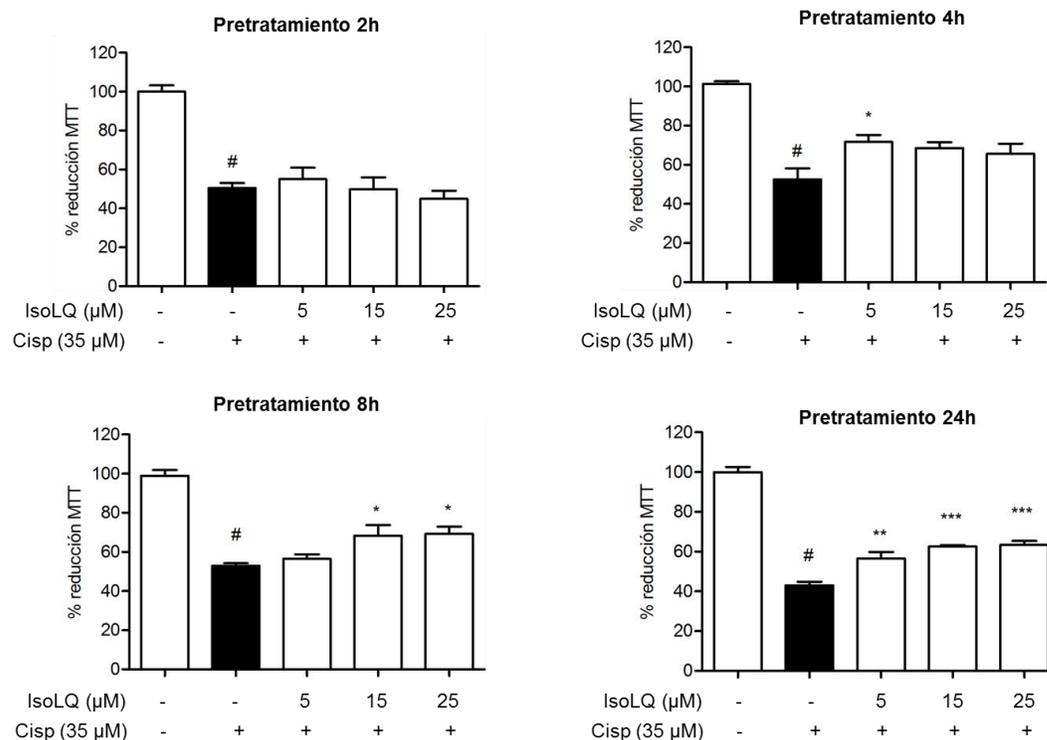
**Figura 7.** Actividad antioxidante de la isoliquiritigenina (IsoLQ) frente a **A)** radical peroxilo (n: 8), **B)** peróxido de hidrógeno (n: 4) y **C)** anión peroxinitrito (n: 4). Los datos se representan por la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  respecto al control.

## 6.2 Viabilidad de células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo (LLC-PK1) tratadas con cisplatino e isoliquiritigenina.

El cisplatino disminuye la viabilidad de las células LLCPK1 vía concentración dependiente (Figura 8B) como estaba previsto y su  $IC_{50}$  se encuentra entre 25 y 34  $\mu\text{M}$  a las 24 h de incubación, según los resultados obtenidos por el ensayo de MTT. Por otro lado, las concentraciones de IsoLQ utilizadas (0-25  $\mu\text{M}$ ) no fueron tóxicas para las células (Figura 8A). Posteriormente, para establecer las condiciones bajo las cuales este compuesto tiene un efecto citoprotector sobre la toxicidad inducida por cisplatino, se evaluó el efecto de la concentración (5-25  $\mu\text{M}$ ) y el tiempo de pre-tratamiento sobre la viabilidad celular. En la figura 9 se observan diferencias significativas respecto a cisplatino a partir de las 4h de pretratamiento, no obstante no se observa ningún efecto dosis-respuesta ni cambios significativos entre las 4 y 24 h de incubación. El máximo porcentaje de cito-protección fue de un 20% al tratar las células con 25  $\mu\text{M}$  de IsoLQ por 24 h de pretratamiento.

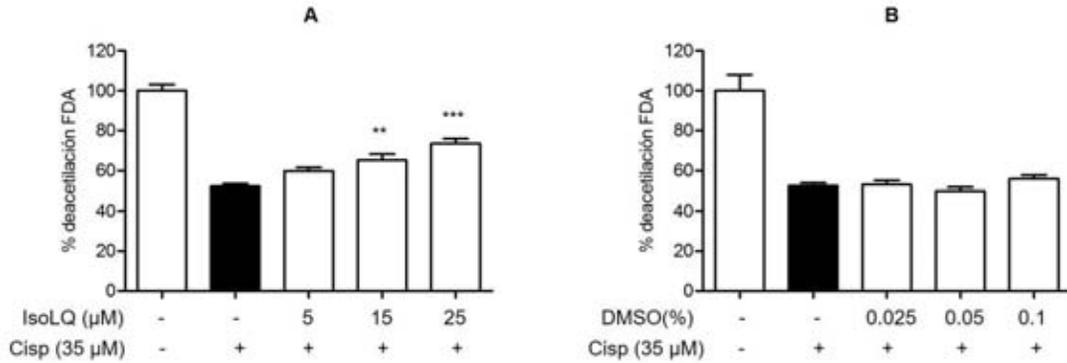


**Figura 8.** (A) La isoliquiritigenina (IsoLQ) no ejerce un efecto tóxico en las células LLCPK1 y (B) cisplatino (Cisp) disminuye su viabilidad celular. Las células fueron tratadas con varias concentraciones de IsoLQ y Cisp por 24 horas de incubación. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT. (A) IsoLQ (n= 5) y (B) Cisplatino (n= 3). Los datos se representan por la media  $\pm$  EEM. \*\*\*  $p < 0.001$ , vs control (C). Veh (vehículo, DMSO < 0.1 %)



**Figura 9.** El pretratamiento con isoliquiritigenina (IsoLQ) a diferentes concentraciones y tiempos reduce el efecto citotóxico de cisplatino (Cisp). Las células LLC PK1 fueron tratadas por 2, 4, 8 y 24 horas con IsoLQ seguida de la incubación con Cisp 35 μM por 24 horas. La viabilidad fue determinada por el ensayo de MTT. Los datos se presentan como la media ± EEM (n= 3). # p<0.001 vs control (sin IsoLQ ni Cisp); \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs Cisp.

Para confirmar el efecto observado a las 24 h de pretratamiento con IsoLQ, se utilizó el ensayo de FDA que se fundamenta en la actividad de esterasas para medir viabilidad celular (Figura 10). Con este ensayo se observa el mismo comportamiento de citoprotección observado con el ensayo de MTT y además se demuestra que el vehículo (DMSO<0,1%) de la IsoLQ no afecta la disminución de la viabilidad celular ocasionada por cisplatino.

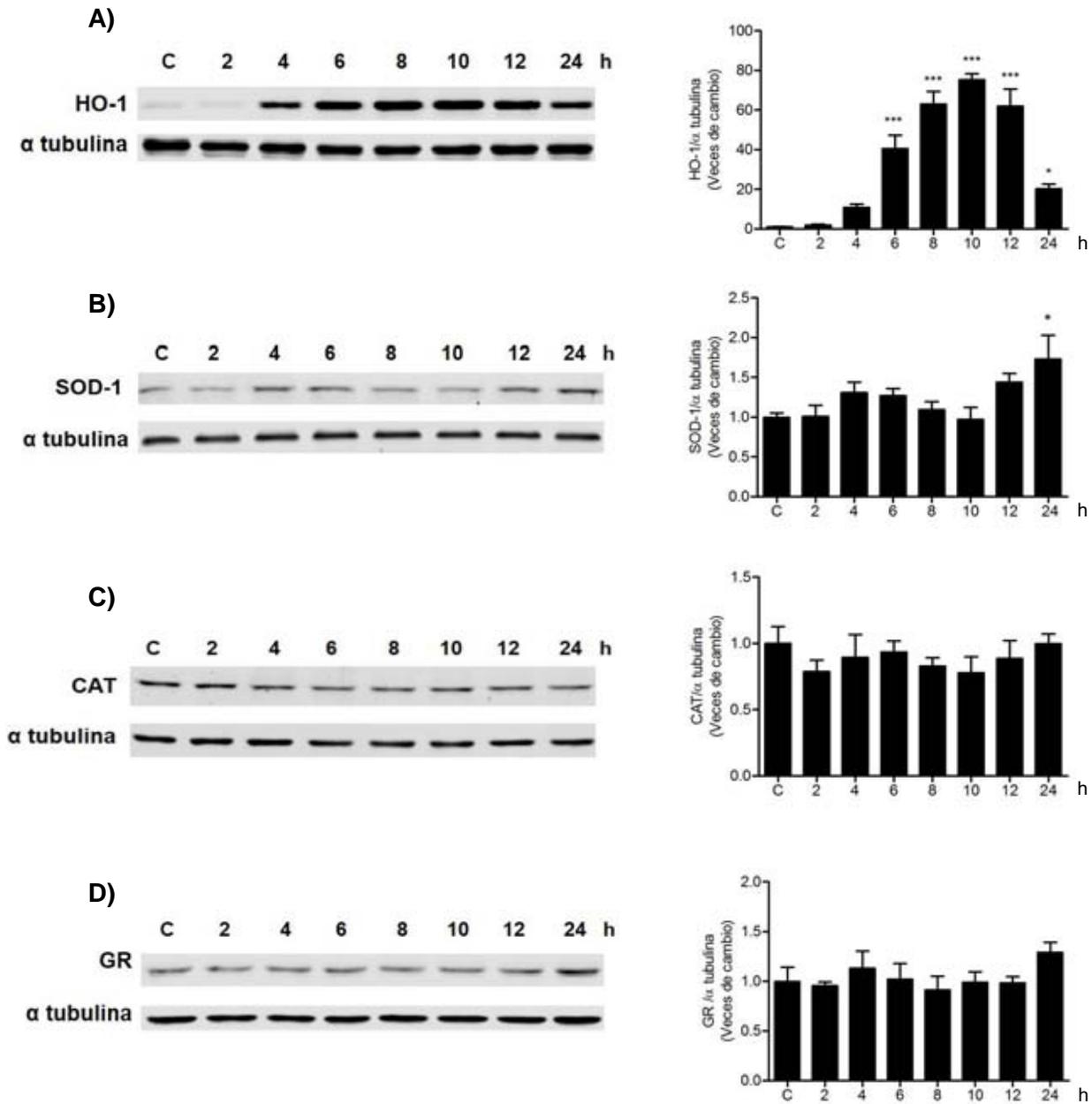


**Figura 10.** El pretratamiento con isoliquiritigenina (IsoLQ) por 24 h atenúa la citotoxicidad de cisplatino (Cisp) en las células LLCPK1 y su vehículo (DMSO <0.1%) no afecta la muerte inducida por cisplatino. **(A)** Las células LLCPK1 fueron tratadas con o sin IsoLQ por 24 h y posteriormente con Cisp 35 μM. **(B)** Las células fueron tratadas con o sin DMSO (0,025-0,1 %) por 24 h, seguido de Cisp 35 μM por 24 h de incubación. Los datos se presentan como la media ± EEM (n= 3). # p<0.0001 vs control, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs Cisp.

### 6.3 Actividad antioxidante indirecta de la isoliquiritigenina: efecto sobre el nivel de enzimas antioxidantes.

Se determinó el efecto de la IsoLQ sobre el nivel de algunas enzimas antioxidantes como HO-1, SOD-1, CAT y GR. A diferencia de los experimentos anteriores, de aquí en adelante solo se utilizó la concentración de 25 μM, ya que fue esta concentración la que presentó el mayor porcentaje de citoprotección. Se observa que la IsoLQ induce un incremento significativo de la proteína HO-1 desde las 6 h de incubación (40 veces), con un máximo a las 10 h (75 veces) y un posterior descenso a las 12 y 24 h de tratamiento (62 y 20 veces, respectivamente) (Figura 11A). Para las otras proteínas evaluadas no se encontró este comportamiento y solo se determinó que la IsoLQ incrementa significativamente 1,7 veces el nivel de SOD-1 a las 24 horas de tratamiento (Figura 11B). Por último no se observaron cambios en los niveles de proteína de CAT y GR a ninguno de los tiempos evaluados (Figura 11 C y D).

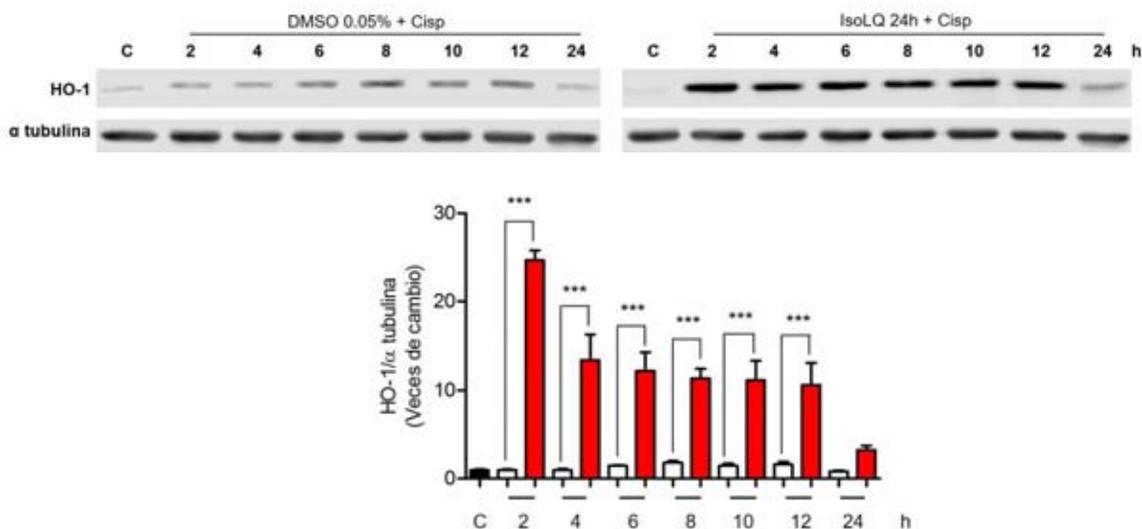
De acuerdo a estos resultados podemos suponer que la HO-1 está implicada en el efecto citoprotector de la IsoLQ observado en los ensayos de viabilidad, y aunque el máximo valor se encontró a las 10 h de tratamiento, se decidió escoger el tiempo de 24 h para futuros ensayos debido a que bajo esta condición también se incrementa el nivel de SOD-1.



**Figura 11.** Inducción diferencial de enzimas antioxidantes durante el tratamiento con isoliquiritigenina. Niveles de expresión de **(A)** hemo-oxigenasa 1 (HO-1), **(B)** superóxido dismutasa 1 (SOD-1), **(C)** catalasa (CAT) y **(D)** glutatión reductasa (GR) se determinaron por western blot. Las células LLCPK1 se trataron con IsoLQ 25  $\mu$ M por diferentes tiempos. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM (n= 3). \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 vs control.

## La IsoLQ aumenta los niveles de HO-1 en las células LLCPK1 durante el tratamiento con cisplatino.

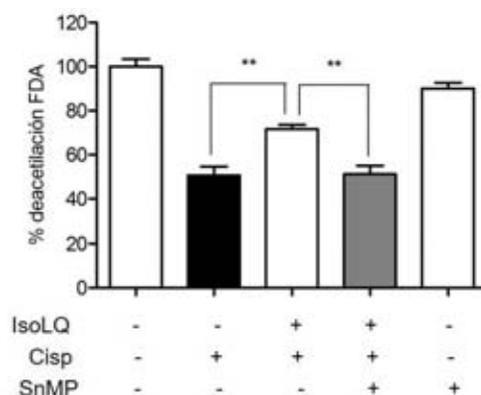
La HO-1 es una proteína importante en la respuesta de la célula frente al daño generado por cisplatino, su inhibición y silenciamiento ocasiona un mayor daño celular mientras que su sobreexpresión tiene un efecto citoprotector en las células LLCPK1 (Lever et al., 2016). Por esta razón se determinó si las células pretratadas con IsoLQ mantienen niveles altos de HO-1 durante el tratamiento con cisplatino (Figura 12). Se observaron valores 24 veces más altos que las no pre-tratadas a las 2h de tratamiento con cisplatino y 10 veces mayores después de las 4 horas, disminuyendo solo hasta las 24 h de tratamiento. Las células no pre-tratadas con IsoLQ presentaron solo un aumento significativo de esta enzima a las 8 h de tratamiento con cisplatino ( $p < 0.001$ ), con un incremento de 1,8 veces respecto al control, con valores similares entre las 10 y 12 h (1.5 y 1.6 veces, respectivamente) de tratamiento. Esto nos indica que la sobreexpresión de HO-1 observada durante el tiempo de pretratamiento con IsoLQ se mantiene en niveles altos durante el tratamiento con cisplatino; esto podría ser debido a una baja tasa de degradación de esta enzima, lo que podría contribuir a una rápida respuesta antioxidante por parte de la célula ante el daño por cisplatino.



**Figura 12.** El pretratamiento con isoliquiritigenina (IsoLQ) mantiene niveles altos de hemo-oxigenasa 1 (HO-1) durante el tratamiento con cisplatino (Cisp). Las células LLCPK-1 se trataron con IsoLQ 25  $\mu$ M (barras rojas) o con DMSO 0,05 % (barras blancas) por 24 h y después con Cisp 35  $\mu$ M por diferentes tiempos. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM (n= 3). \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 6.4 Inhibición de la actividad de hemo-oxigenasa sobre el efecto citoprotector de la IsoLQ.

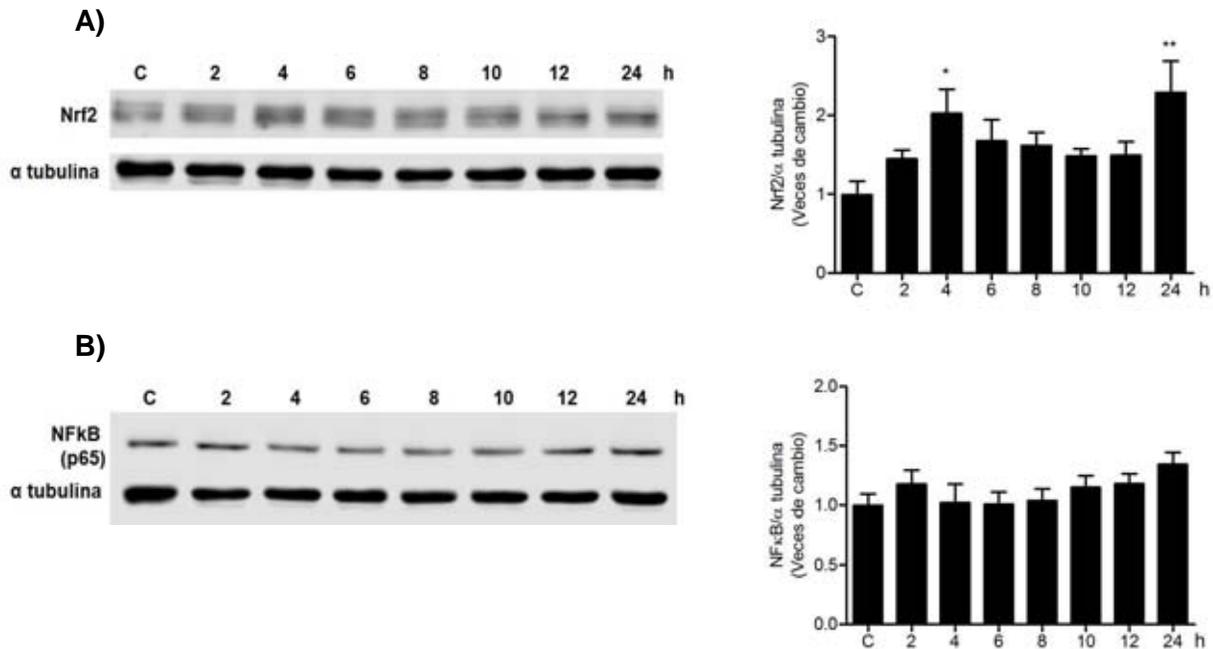
La participación de la HO-1 en el efecto citoprotector de la IsoLQ se evaluó utilizando SnMP, un inhibidor de la actividad de la HO-1. Al colocar 10  $\mu$ M de este compuesto en co-tratamiento con cisplatino se pierde el efecto obtenido al pre-tratar las células con IsoLQ (Figura 13). Este resultado muestra que el efecto protector de la IsoLQ contra la muerte inducida por cisplatino se debió en parte a la sobreexpresión de HO-1.



**Figura 13.** La mesoporfirina dicloruro de estaño (IV) (SnMP) inhibe el efecto citoprotector de la isoliquiritigenina (IsoLQ) sobre la toxicidad inducida por cisplatino. Las células LLCPK1 se trataron con o sin IsoLQ por 24 h y después con Cisp y con o sin el SnMP 10  $\mu$ M por 24 horas. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de FDA. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM (n= 3). \*\* p<0.01.

#### 6.5 Efecto de la isoliquiritigenina sobre el nivel de los factores de transcripción Nrf2 y NFkB en las células LLCPK1.

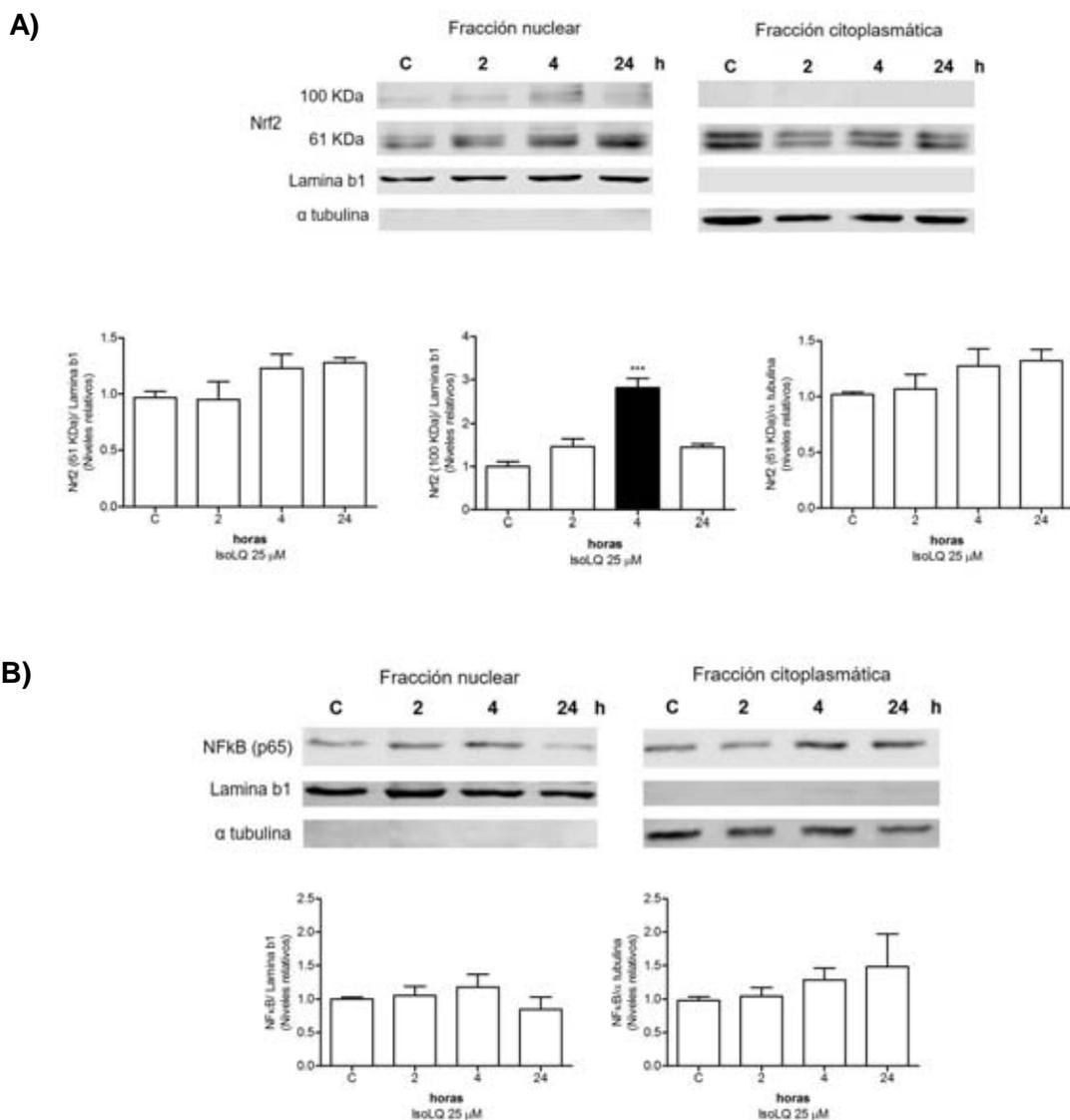
Para dilucidar el mecanismo por el cual la IsoLQ induce un aumento en los niveles de HO-1, se determinó el nivel de los factores de transcripción Nrf2 y NFkB, involucrados en la inducción de esta enzima. La IsoLQ induce un aumento de 2 veces el nivel de Nrf2 a las 4 y 24 horas de tratamiento respecto al control, y no ocasiona cambios en el nivel de NFkB a los tiempos evaluados (Figura 14). No obstante, se realizó un fraccionamiento celular para determinar si estos cambios están asociados con la translocación de estas proteínas al núcleo y por consiguiente con su función de inducir la transcripción de genes como la HO-1 y otras proteínas relacionadas con la respuesta antioxidante y supervivencia celular.



**Figura 14.** Cambios en la expresión de los factores de transcripción **(A)** Nrf2 y **(B)** NFkB en extracto proteico total de células LLC PK1 tratadas con IsoLQ 25  $\mu$ M por diferentes tiempos. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM (n= 3). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs control.

Como se observa en la figura 15A el nivel de Nrf2 (61KDa) no presentó diferencias significativas en ninguna de las fracciones (citoplasmática y nuclear) a los tiempos evaluados. Por otro lado es necesario resaltar que en la fracción nuclear se observa una banda a 100 KDa que registra un aumento de 2.8 veces a las 4 h de tratamiento, a diferencia de la fracción citoplasmática donde estas bandas no aparecen o presentan baja intensidad. Varios autores han descrito cambios en la banda de 100 KDa, que posiblemente corresponde a formas fosforiladas de Nrf2, asociadas a la activación de esta proteína (Kang et al., 2002; Pi et al., 2007; Granado-Serrano et al., 2010; Qin y Hou 2016)

Por el contrario el nivel de la proteína NFkB no presentó cambios significativos en ninguna de las fracciones celulares evaluadas respecto al control (Figura 15B); no obstante, se observa una disminución en la abundancia de esta proteína en la fracción nuclear y un aumento en la fracción citoplasmática a las 24 h de tratamiento con IsoLQ.

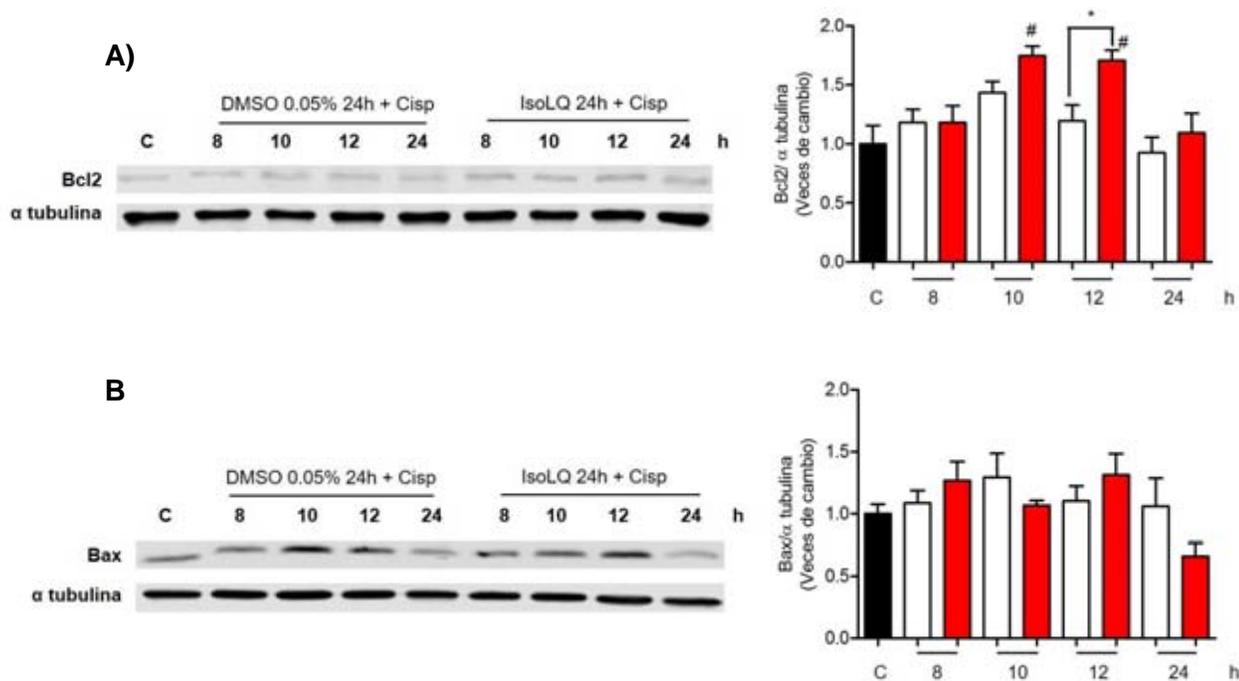


**Figura 15.** Localización celular de los factores de transcripción **(A)** Nrf2 y **(B)** NFkB en las células LLCPK1 tratadas con IsoLQ 25  $\mu$ M por diferentes horas. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM (n= 3). \*\*\* p<0.001 vs control.

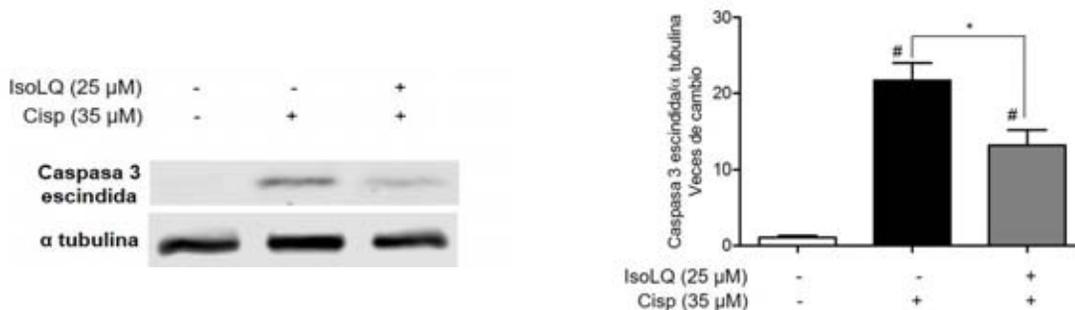
## 6.6 Efecto de la IsoLQ sobre marcadores de apoptosis en células tratadas con cisplatino e isoliquiritigenina.

Uno de los principales mecanismos de muerte inducido por cisplatino es a través de la apoptosis vía intrínseca, regulada en parte por el balance entre proteínas antiapoptóticas como Bcl2 y proteínas proapoptóticas como Bax. En este estudio se midió el nivel de estas dos proteínas a las 8, 10, 12 y 24 horas de tratamiento con cisplatino en células sin y pre-tratadas con IsoLQ por 24 h (Figura 16). Se observa que no se presentaron cambios

significativos en el nivel de Bax entre los dos grupos experimentales y el control; sin embargo en las células tratadas con IsoLQ el nivel de Bcl2 a las 10 y 12 h de tratamiento con cisplatino aumentó 1.7 veces respecto al control con una posterior caída a las 24 h. Entre las células tratadas con cisplatino, aquellas que recibieron IsoLQ presentaron un aumento significativo del 42.8% del nivel de esta proteína a las 12 h de tratadas con cisplatino respecto a las que no fueron pretratadas con esta chalcona. Además el cisplatino aumentó en 21 veces la expresión de caspasa 3 escindida respecto al control, mientras que el pretratamiento con IsoLQ disminuyó este en un 40%; esto nos confirma que la IsoLQ disminuye la muerte celular dada por la activación de caspasas ejecutoras, específicamente la caspasa 3 (Figura 17)



**Figura 16.** Cambios en el nivel de Bcl2 (**A**) y Bax (**B**) en células LLCPK1 tratadas o no con IsoLQ. Las células se trataron con IsoLQ 25  $\mu$ M (barras rojas) o DMSO 0.05% (barras blancas) por 24 h y posteriormente con Cisp 35  $\mu$ M por diferentes tiempos. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM (n=3). \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$  vs control (C).

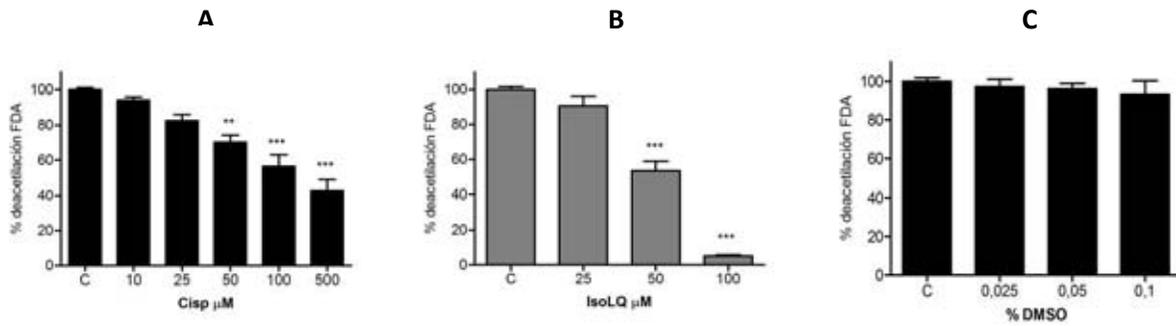


**Figura 17.** La IsoLQ reduce el nivel de proteína caspasa 3 escindida en células LLCPK1 tratadas con cisplatino. Las células fueron tratadas con o sin IsoLQ 25  $\mu$ M por 24 h y posteriormente con Cisp 35  $\mu$ M por diferentes tiempos. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM (n=3). \*  $p < 0.05$ ; #  $p < 0.05$  vs control.

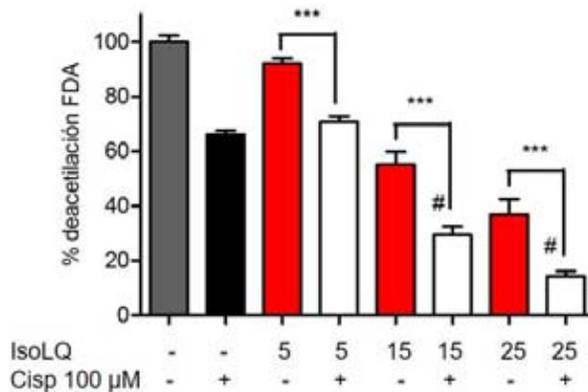
### 6.7 Efecto de la isoliquiritigenina y cisplatino sobre la viabilidad de células de carcinoma de vejiga HTB4

Para evaluar el efecto de la IsoLQ sobre la actividad antineoplásica de cisplatino, se determinó la viabilidad de las células de carcinoma de vejiga HTB4 al administrarles cisplatino e IsoLQ por 24 h de forma independiente, para posteriormente determinar si la IsoLQ afecta la disminución de la viabilidad ocasionada por cisplatino en un modelo de pretratamiento de 24 h. En la figura 18 se observa que a medida que aumenta la concentración de cisplatino (10-500  $\mu$ M) e IsoLQ (25-100  $\mu$ M) disminuye la viabilidad de las células HTB4. A partir de estos resultados se deduce que la IsoLQ tiene una mayor potencia ya que se requieren menores concentraciones de IsoLQ que de cisplatino para disminuir la viabilidad celular al 50% (Cisp 100  $\mu$ M e IsoLQ 50  $\mu$ M). De igual forma se determinó que el vehículo que se utiliza para administrar la IsoLQ (DMSO < 0,1%) no afecta la viabilidad de estas células (Figura 18C).

Por otro lado cuando las células se trataron con IsoLQ (5-25  $\mu$ M) por 24 h y posteriormente con cisplatino por 24 h (Figura 19), se observó una reducción de la viabilidad de aproximadamente el 22% comparadas con las células tratadas solo con IsoLQ y una disminución significativa a partir del pretratamiento con 15  $\mu$ M ( $p < 0.001$ ) respecto al tratamiento solo con cisplatino 100  $\mu$ M. Es necesario resaltar que las concentraciones evaluadas en este experimento son las mismas que se utilizaron para determinar el efecto citoprotector de la IsoLQ en las células LLCPK1 (células no tumorales) ante el daño con cisplatino; esto nos indica un efecto diferencial de este compuesto entre células tumorales y no tumorales.



**Figura 18.** La isoliquiritigenina (IsoLQ) y cisplatino (Cisp) disminuyen la viabilidad de las células de carcinoma de vejiga HTB4. Las células HTB4 se trataron con diferentes concentraciones de Cisp (A), IsoLQ (B) y DMSO (C) por 24 h. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de FDA. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM (n= 3). \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs control.



**Figura 19.** El pretratamiento con isoliquiritigenina (IsoLQ) mejora la toxicidad inducida por cisplatino en las células HTB4. Las células se trataron con diferentes concentraciones de IsoLQ por 24 h y posteriormente con o sin cisplatino 100  $\mu$ M por 24 horas. Los datos se representan por la media  $\pm$  EEM (n=4). \*\*\* p<0.001, # p<0.001 vs a Cisp solo (barra negra).

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La IsoLQ es una chalcona que se ha caracterizado por su actividad antineoplásica en varias líneas celulares tumorales y también como citoprotector en varios modelos *in vitro* e *in vivo* de daño por agentes tóxicos, destacándose por su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiapoptótica. El objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto de la IsoLQ sobre el efecto nefrotóxico de cisplatino así como su efecto sobre la actividad antineoplásica de éste; para ello se utilizaron dos líneas celulares, una de túbulo proximal de cerdo LLCPK1 que representan el tipo de célula en el riñón que más daño recibe cuando se administra cisplatino (Pabla y Dong 2008) y la línea tumoral HTB4 de carcinoma de vejiga.

Inicialmente se determinó que a concentraciones por debajo de 25  $\mu\text{M}$  de IsoLQ la viabilidad celular no cambia respecto al control (figura 8A) mientras que a concentraciones superiores esta disminuye (datos no reportados). Esto concuerda con lo informado por otros autores, quienes describen una caída de la viabilidad a concentraciones por encima de 20  $\mu\text{M}$  en otras líneas celulares (Kwon et al., 2007; Lee et al., 2009; Kang et al., 2010). Esto sugiere que el efecto observado en este estudio es dependiente de la dosis suministrada, a dosis bajas la IsoLQ podría estar activando vías de señalización que favorecen la supervivencia celular, mientras que a dosis altas es tóxica; esto corresponde a un carácter hormético por parte de este compuesto (Mattson 2008). Por esta razón se evaluaron dosis entre 5 y 25  $\mu\text{M}$  en un modelo de pre tratamiento de 24 h frente al daño ocasionado por cisplatino; bajo esas condiciones, 25  $\mu\text{M}$  de IsoLQ atenuó la disminución de la viabilidad celular (Figura 9 y 10A ) y activación de caspasa 3 (Figura 17) ocasionada por este antineoplásico. Dada esta evidencia se investigó un posible mecanismo por el que la IsoLQ podría estar reduciendo la muerte ocasionada por cisplatino en las células LLCPK1.

El cisplatino induce daño renal por aumento en la producción de ERO, como anión peroxinitrito, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y anión superóxido, cuyo incremento se ha asociado con las primeras etapas de daño. Sin embargo, podrían estar presente hasta la muerte celular, provocando modificaciones en lípidos y proteínas, contribuyendo de esta forma al daño celular (Chirino y Pedraza 2009). En este estudio se determinó que la IsoLQ presenta actividad antioxidante frente al radical peroxilo, anión peroxinitrito y peróxido de hidrógeno a las condiciones especificadas en la metodología (Figura 7), lo que podría estar contribuyendo a su acción cito-protectora frente al daño por cisplatino; además se ha reportado que compuestos derivados de su metabolismo también presentan actividad antioxidante (Nerya et al., 2004; Guo et al., 2008). No obstante, no se observó un efecto en la viabilidad celular a horas tempranas de pretratamiento con IsoLQ, y aunque podría estar contribuyendo en horas tardías (entre 8 y 24 h de pretratamiento) se sugiere un mecanismo por inducción de proteínas cito-protectoras como las enzimas antioxidantes.

Dentro de las enzimas antioxidantes evaluadas, la IsoLQ ocasionó un aumento significativo en los niveles de HO-1 desde las 6 horas de pretratamiento (Figura 11), manteniendo niveles altos hasta las primeras 12 h de tratamiento con cisplatino (Figura 12), lo que puede estar asociado con la atenuación de la muerte inducida por este fármaco registrada desde las 8 h de pretratamiento con IsoLQ, no obstante solo se presentó un aumento de SOD-1 a las 24 h de pretratamiento sin observarse ningún cambio en el nivel de CAT y GR.

Aunque desconocemos si la IsoLQ podría estar induciendo un aumento en la expresión de otras enzimas antioxidantes en las células LLCPK1, otros autores han informado que la IsoLQ induce un aumento en la expresión de los genes que codifican enzimas como la NADPH quinona oxidoreductasa (NQO1) y GCLC involucrada en la síntesis de glutatión, en tejido de colon e hígado de ratas Sprague-Dawley (Cuendet et al., 2010) y células HepG2 (Gong et al., 2015), respectivamente. Cuendet et al. (2010) también informo que la IsoLQ aumentó la actividad de GST y los niveles de GSH en tejido hepático. Según esto, la IsoLQ induce por si sola el nivel de expresión de algunas enzimas antioxidantes, y además se ha reportado que es capaz de prevenir la disminución del nivel de glutatión, el nivel de las proteínas NQO1, HO-1 y de la actividad enzimática de CAT y SOD provocado por tetracloruro de carbono en ratones (Zhao et al., 2015) y triptolite (Cao et al., 2016) en células hepáticas.

En varios estudios se ha reportado que el cisplatino disminuye el nivel de glutatión y la actividad de varias enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GR (Sadzuka et al., 1992; Kruidering et al., 1997; Kim et al., 2011), no obstante en este trabajo no se midió si la IsoLQ es capaz de prevenir este efecto o si la expresión de estas proteínas estaba alterada. Sin embargo se determinó que el nivel de HO-1 durante el tratamiento con cisplatino fue mayor en las células tratadas con IsoLQ (Figura 12).

La HO-1 es una enzima que cataliza la degradación del grupo hemo en biliverdina, hierro y monóxido de carbono, posteriormente la biliverdina se reduce a bilirrubina por acción de la enzima biliverdin reductasa; todos estos productos se han sugerido como los principales mediadores del efecto citoprotector de la HO-1 en varios modelos *in vitro* e *in vivo* de daño celular y tisular (Prawan et al., 2005; Gozzelino et al., 2014). La HO-1 es inducida por un amplio número de estímulos fisiológicos y patológicos, incluidos señales de estrés celular, citoquinas y factores de crecimiento (Sikorsk et al., 2004; Hill-Kapturczak 2007), inhibir su actividad y su expresión genera un severo daño celular. Por ello varios investigadores han optado por inducir su expresión como una alternativa para amortiguar el daño generado por varios estímulos tóxicos (Prawan et al., 2005).

Existe evidencia que la inhibición de la actividad enzimática de esta proteína por meso y proto porfirinas en líneas celulares de túbulo proximal y su deficiente expresión en ratones knockout resulta en un severo daño celular en respuesta al tratamiento con cisplatino, mientras que su sobreexpresión génica e inducción química reducen su efecto nefrotóxico (Shiraishi et al., 2000; Schaaf et al., 2002; Jung et al., 2014; Tayem et al., 2014; Bolisetty et al., 2015). Esto soporta el papel citoprotector de la expresión de HO-1 en el daño renal

inducido por cisplatino; nosotros demostramos que la IsoLQ induce esta enzima y que su inhibición por SnMP bloquea su efecto sobre la muerte celular inducida por cisplatino (Figura 13). Este hallazgo puede estar relacionado con la regulación del proceso de apoptosis. En varios modelos de daño se ha asociado la expresión de HO-1 con un aumento en el nivel de proteínas antiapoptóticas como Bcl2 y Bcl-xL (Di Noia et al., 2005; Olszanecki et al., 2007; Goodman et al., 2007). Estas proteínas inhiben proteínas proapoptóticas efectoras como Bax y Bak, y en consecuencia disminuyen o inhiben la apoptosis vía mitocondrial (Tait y Green et al., 2010)

En nuestro estudio mostramos que la IsoLQ ocasionó un aumento en el nivel de Bcl2 a las 10 y 12h de tratamiento con cisplatino y aunque no se observaron diferencias en el nivel de Bax (Figura 16), la activación de caspasa 3 se redujo cuando la IsoLQ se adicionó a las células LLCPK1 (Figura 17). Tayem et al. (2014) informaron que el compuesto protoporfirina de estaño revierte el efecto citoprotector de conjugados de isocianatos de cisteína, al reestablecer el nivel de actividad de caspasa 3 en las células LLCPK1 tratadas con cisplatino. Bolisetty et al. (2015) también observaron un aumento en la actividad de caspasa 3 en los túbulos proximales de ratones HO-1<sup>-/-</sup> que fueron tratados con cisplatino, comparados con los ratones HO-1<sup>+/+</sup> que recibieron el mismo tratamiento. Según esto, la HO-1 sería uno de los reguladores esenciales del efecto citoprotector de la IsoLQ en este modelo de daño. Es necesario aclarar que las metaloporfirinas al tener una estructura similar al grupo hemo no son selectivas y pueden inhibir otras hemoproteínas como la HO-2, la sintasa de óxido nítrico (NOS) y citocromos P450 (Pittalà et al., 2013); por esta razón se recomienda confirmar este hallazgo con inhibidores específicos o con técnicas moleculares como la delección del gen o silenciamiento de su expresión.

Los mecanismos por los cuales la HO-1 regula el proceso de apoptosis no están claramente dilucidados, no obstante sus efectos antiapoptóticos están relacionados con su actividad enzimática, ya que disminuye los niveles endógenos del grupo hemo libre. Ésta es una molécula que a altas concentraciones es citotóxica debido a que es un agente prooxidante (Gozzelino et al., 2014). Se ha informado que el cisplatino ocasiona un aumento del contenido del grupo hemo libre que al degradarse libera ion ferroso (Fe<sup>2+</sup>); éste cataliza la producción de radicales libres por la reacción de Fenton y en parte explica la nefrotoxicidad ocasionada por cisplatino (Agarwal et al., 1995; Baliga et al., 1998).

La inducción de HO-1 está acoplada con la inducción de ferritina y ferroportina, proteínas encargadas del almacenamiento y exportación del hierro intracelular; estas proteínas impiden que el hierro actúe como un agente prooxidante, de modo que su uso mimetiza el efecto citoprotector de la HO-1 en modelos de isquemia-reperfusión en hígado y nefrotoxicidad por cisplatino (Berberat et al., 2003; Zarjou et al., 2013). De igual forma la biliverdina y bilirrubina, productos de la degradación del grupo hemo, tienen efecto antiapoptótico como consecuencia de su capacidad antioxidante, lo que evita la activación sostenida de la proteína JNK por ERO (Kamata et al., 2005; Ray et al., 2012). La proteína JNK activa factores de transcripción que inducen la expresión de genes de proteínas

proapoptóticas y además modula su actividad (Dhanasekaran y Reddy 2008). Kim et al. (2006) determinaron que la bilirrubina disminuye la producción de ERO inducida por cisplatino en las células auditivas HEI-OC1 y atenúa la caída de la viabilidad ocasionada por este fármaco.

El monóxido de carbono (CO) producto de la degradación del grupo hemo también presenta efectos cito-protectores mediados por la activación de MAPK cinasas (p38) y de cinasas de fosfatidilinositol 3/Proteína cinasa B (PI3K/Akt), que están involucradas en procesos de supervivencia y muerte celular (Zhang X, et al., 2003; Silva et al., 2006; Kim et al., 2013). Zhang X et al. (2005) informaron que el CO modula diferencialmente a las proteínas transductor de señal y activador de la transcripción 1/3 (STAT 1/3) mediante la activación de las cinasas PI3K/Akt y p38 MAPK en un modelo de anoxia y reoxigenación en células endoteliales PAEC. Estos factores de transcripción median respuestas pro y antiapoptóticas, un ejemplo de ello es la reducción de la expresión de Fas y actividad de caspasa 3 cuando se administró CO en este modelo de estudio. Tayem et al. (2006) observaron que la nefrotoxicidad inducida por cisplatino fue atenuada por una molécula de liberación de CO (CORM-3) en células LLCPK1 por disminución de la actividad de caspasa 3; efecto que se bloquea al inhibir la proteína guanilato ciclasa que cataliza la ciclación molecular de trifosfato de guanósina (GTP) a monofosfato de guanósina cíclico (cGMP); este último es un segundo mensajero que modula funciones fisiológicas, como vasodilatación, inflamación y apoptosis (Shen et al., 2016).

Por otro lado la HO-1 también regula indirectamente la apoptosis mediante la activación de PI3K/Akt y p38. Estas proteínas no solo están involucradas en la inducción de esta enzima por fosforilación del factor de transcripción Nrf2 (Martin et al., 2004; Harrison et al., 2006; Kim et al., 2010; Chen et al., 2012), también regulan procesos de supervivencia celular que están relacionados con los efectos citoprotectores de la HO-1 (Brunt et al., 2006; Yeh et al., 2009).

La regulación de la HO-1 se da principalmente a nivel transcripcional por varios factores de transcripción como AP-1, NFκB, STAT y Nrf2, no obstante numerosos estudios han reportado que la inducción de esta enzima está regulada principalmente por Nrf2 (Sikorski et al., 2004; Paine et al., 2010). Aunque se observó que la IsoLQ promueve la translocación de esta proteína al núcleo a las 4h de tratamiento con IsoLQ (Figura 15), no se observaron cambios en todas las enzimas antioxidantes evaluadas y que se conoce son reguladas por Nrf2 (CAT y GR); esto puede deberse al rápido recambio de esta proteína, cuyo tiempo de vida media es menor a 20 min (Baird et al., 2011) y/o a que otros factores de transcripción están involucrados en la inducción diferencial de estas enzimas. Es importante demostrar que Nrf2 en la fracción nuclear se está uniendo a la secuencia ARE de la región promotora de los genes que codifican estas enzimas y evaluar la dependencia de su expresión por Nrf2 en este modelo.

La IsoLQ es capaz de inducir un aumento de la expresión de Nrf2 en otras líneas celulares como la HepG2, Gong et al. (2015) informo que 20  $\mu$ M de IsoLQ aumentó el nivel de esta proteína en el núcleo de estas células a las 8 h de tratamiento, y como consecuencia la transcripción de algunos genes regulados por este factor de transcripción fue incrementado, entre ellos el gen que codifica la enzima glutamato cistein ligasa involucrada en la biosíntesis de glutatión. Cao et al. (2016) también observaron que la IsoLQ aumenta el nivel de HO-1 y NQO1 vía Nrf2 en células HepG2, lo que explicaría su efecto hepatoprotector frente al daño con triptolido.

En conjunto los resultados presentados demuestran que la IsoLQ tiene un efecto moderado sobre la nefrotoxicidad inducida por cisplatino en parte por su capacidad de inducir HO-1 en las células LLCPK1, mediado posiblemente por la translocación de Nrf2 al núcleo en horas tempranas durante el pretratamiento.

Debido a que el uso de suplementos antioxidantes es controversial durante el tratamiento contra el cáncer, algunos autores informan que estos disminuyen el daño oxidativo generado por la radioterapia y la quimioterapia, mientras que otros reportan que los antioxidantes pueden proteger tejidos normales de la toxicidad inducida por los fármacos antineoplásicos sin alterar el crecimiento del tumor (Lawenda et al., 2008; Tong et al., 2015). En este estudio se determinó si la IsoLQ interfiere con la actividad antitumoral de cisplatino en las células HTB4 de cáncer de vejiga.

Primero se encontró que la IsoLQ disminuyó la viabilidad de estas células en concentraciones arriba de 25  $\mu$ M (figura 18) a las 24 horas de incubación, y se observó una mayor caída de esta después de un periodo de 24 h solo con medio sin suero fetal (figura 19); esto sugiere que las células no tienen la capacidad de recuperarse después de suspendido el estímulo, lo que corresponde a lo encontrado por varios autores, quienes han reportado que la IsoLQ tiene propiedades anti proliferativas y apoptóticas en diferentes tipos de cáncer (Peng et al., 2015). Sun et al. (2013) encontraron que la IsoLQ disminuye los niveles intracelulares de ERO, aumenta la proporción GSH/GSSG y disminuye el nivel de Nrf2 en las células HepG2 (carcinoma hepático) durante las 6 primeras horas de tratamiento, sin embargo los niveles de ERO aumentan después de este tiempo y en consecuencia genera un desequilibrio redox por la sobreproducción de ERO y una débil defensa antioxidante. A ese tiempo las células presentaron una mayor sensibilidad a la radioterapia debido a la generación de ERO inducida por los rayos-X, lo que resulto en la inhibición del crecimiento celular y un aumento de células en apoptosis. Esto es un claro ejemplo de que la IsoLQ puede actuar como una molécula prooxidante al inducir un ambiente intracelular reductivo y disminuir la defensa antioxidante de células cancerígenas.

Ya establecido que la IsoLQ es citotóxica para las células HTB4, se determinó el efecto de este compuesto sobre la actividad de cisplatino en un modelo de pretratamiento, para esto se trabajó con las mismas dosis de IsoLQ utilizadas con las células LLCPK1 en el modelo de citoprotección. En este caso se observó un efecto contrario en las células tumorales

HTB4, la IsoLQ exacerba la muerte celular cuando se administra 24 h antes que el cisplatino en comparación a cuando solo se suministra este fármaco o la IsoLQ (Figura 19). Lee et al. (2008) reportan que la IsoLQ disminuye el volumen de tumor en ratones BALB/c inoculados con células de cáncer de colon (CT26), no obstante cuando se suministró vía oral dos horas antes que cisplatino no se observó ningún cambio en comparación a cuando solo se administró este fármaco. La IsoLQ en este caso tuvo un efecto nefroprotector y hepatoprotector ante la toxicidad del cisplatino.

De lo anterior concluimos que la IsoLQ no interfiere con la actividad antineoplásica de cisplatino, por el contrario puede exacerbar el daño ocasionado por éste en algunas líneas tumorales y además tener un efecto citoprotector en células no tumorales.

## 8. CONCLUSIONES

- La IsoLQ disminuye el daño ocasionado por cisplatino en las células LLCPK1, posiblemente por su capacidad de inducir un aumento del nivel de Nrf2 en núcleo y la expresión de enzimas antioxidantes como HO-1 y SOD-1.
- La HO-1 en parte media el efecto citoprotector de la IsoLQ frente al daño por cisplatino en las células LLC-PK1, debido posiblemente a las propiedades antiapoptóticas de los productos de la degradación del grupo hemo a nivel celular.
- La IsoLQ ejerce un efecto tóxico dependiente de la concentración en la línea tumoral HTB4.
- La IsoLQ no afecta la actividad antineoplásica de cisplatino en las células HTB4 en un modelo de pretratamiento de 24 h, por el contrario exagera el daño ocasionado por este fármaco.

## 9. PERSPECTIVAS

- Para determinar si realmente la HO-1 está mediando el efecto citoprotector de la IsoLQ contra el daño con cisplatino, se recomienda hacer ensayos de viabilidad celular y determinación de marcadores de apoptosis en células transfectadas con un plásmido que codifique para un ARN de interferencia shHO-1.
- Es importante demostrar que Nrf2 en la fracción nuclear se está uniendo a la secuencia ARE de la región promotora del gen que codifica para la HO-1. Para esto se recomienda transfectar las células con un constructo que tenga la secuencia ARE del promotor del gen de la HO-1 y un gen reportero como la luciferasa o la proteína verde fluorescente GFP, además se pueden hacer ensayos de cambio de la corrida electroforética (EMSA). También se sugiere transfectar las células con ARN de interferencia shNrf2 para determinar la dependencia de la expresión de HO-1 por Nrf2 en este modelo.
- Estudiar los posibles mecanismos que median el efecto citotóxico de la IsoLQ en las células HTB4 y evaluar su efecto en células epiteliales de vejiga no tumorales.
- Evaluar en un modelo *in vivo* el efecto nefroprotector de la IsoLQ frente al daño con cisplatino y demostrar que no interfiere con la actividad antineoplásica de este fármaco en un modelo de implante xenográfico de tumor, profundizando en las respuestas diferenciales entre células tumorales y no tumorales. Además determinar si esto está relacionado con la biodisponibilidad de la IsoLQ en cada órgano.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology*, 105, 121-126.
- Akcay A, Nguyen Q, He Z, Turkmen K, Won Lee D, Hernando AA, et al., (2011). IL-33 Exacerbates Acute Kidney Injury. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 22(11), 2057-2067.
- Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21, 143-52
- Arany I, Safirstein RL (2003). Cisplatin Nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology* 23: 460-464
- Arunkumar P, Wiswanatha G, Radheshyam N, Mukund H, Belliyappa M (2012). Science behind cisplatin-induced nephrotoxicity in humans: A clinical study. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2, 640-644
- Agarwal A, Balla J, Alam A, Croatt A, & Nath K (1995). Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: A protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney International*, 48, 1298-1307.
- Auyeung K-W, Ko J-S (2010). Novel herbal flavonoids promote apoptosis but differentially induce cell cycle arrest in human colon cancer cell. *Investigational New Drugs* 28, 1-13
- Badary OA, Abdel-Maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH (2005). Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sciences* 76, 2125-35
- Baird L, & Dinkova-Kostova AT (2011). The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Archives of Toxicology*, 85(4), 241-272.
- Bajorin D, Bosl G, Alcock N, Niedzwiecki D, Gallina E, Shurgot B (1986). Pharmacokinetics of cis-diamminedichloroplatinum (II) after administration in hypertonic saline. *Cancer Research* 46, 5969-5972
- Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, & Shah S (1998). Role of cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney International*, 54, 1562-1569.
- Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H & Crow JP (1994). Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods in Enzymology*, 233, 229-240.
- Benedetti G, Fredriksson L, Herpers B, Meerman J, van de Water B, de Graauw M (2013). TNF $\alpha$ -mediated NF-kB survival signaling impairment by cisplatin enhances JNK activation allowing synergistic apoptosis of renal proximal tubular cells. *Biochemical Pharmacology* 85, 274-286
- Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B, et al. (2003). Heavy chain ferritin acts as an anti-apoptotic gene that protects livers from ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal*, 7(12), 1724-1730.
- Bhadoria D, Agrawal N (2012). Toxic acute kidney injury. *Clinical Queries: Nephrology* 0101(29-33)

- Bindu S, Pal C, Dey S, Goyal M, Alam A, Iqbal MS, et al. (2011). Translocation of Heme Oxygenase-1 to Mitochondria Is a Novel Cytoprotective Mechanism against Non-steroidal Anti-inflammatory Drug-induced Mitochondrial Oxidative Stress, Apoptosis, and Gastric Mucosal Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 286(45), 39387-39402.
- Bolisetty S, Traylor A, Joseph R, Zarjou A, & Agarwal A (2015). Proximal tubule-targeted heme oxygenase-1 in cisplatin-induced acute kidney injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 310(5), F385-F394.
- Brozovic A, Osmak M (2007). Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Letters* 251, 1-16
- Brunt KR, Fenrich KK, Kiani G, Yat Tse M, Pang SC, Ward CA, et al. (2006). Protection of Human Vascular Smooth Muscle Cells From H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Apoptosis Through Functional Codependence Between HO-1 and AKT. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(9), 2027-2034.
- Cao L-J, Li H-D, Yan M, Li Z-H, Gong H, Jiang P, et al. (2016). The Protective Effects of Isoliquiritigenin and Glycyrrhetic Acid against Triptolide-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells Involve Nrf2 Activation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1-8.
- Carocho M, Ferreira I (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology* 51, 15-25.
- Ciarimboli G, Deuster D, Knief A, Sperling M, Holtkamp M, et al. (2010). Organic Cation Transporter 2 Mediates Cisplatin-Induced Oto- and Nephrotoxicity and Is a Target for Protective Interventions. *The American Journal of Pathology* 176, 1169-80
- Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstadt H, Koepsell H, et al. (2005). Cisplatin Nephrotoxicity Is Critically Mediated via the Human Organic Cation Transporter 2. *The American Journal of Pathology* 167, 1477-84
- Chen H-H, Chen Y-T, Huang Y-W, Tsai H-J, & Kuo C-C (2012). 4-Ketopinoresinol, a novel naturally occurring ARE activator, induces the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced cell injury via activation of PI3K/AKT signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(6), 1054-1066.
- Chirino YI, & Pedraza-Chaverri J (2009). Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(3), 223-242.
- Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Camacho-Carranza R, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, et al. (2010). Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology* 276, 41-8
- Commission CP. 2010. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. Beijing
- Cuendet M, Guo J, Luo Y, Chen S, Oteham CP, et al. (2010). Cancer chemopreventive activity and metabolism of isoliquiritigenin a compound found in Licorice. *Cancer Prevention Research* 3, 221-32
- Cuendet M, Oteham CP, Moon RC, Pezzuto JM (2006). Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. *Journal of natural products* 69, 460-3

- Curran W (2002). New chemotherapeutic agents: update of major chemoradiation trials in solid tumors. *Oncology* 63, 29-38
- Chen Y, Zheng R, Jia Z, Ju Y (1990). Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free radical biology and medicine* 9, 19-21
- Cheng G, Hutter K, Zeller W (1995). Positive correlation between cellular glutathione and acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Cell Biology Toxicology* 12, 273-81
- Chertow GMMD, Levy EMMD, Hammermeister KEMD, Grover FMD, Daley JMD (1998). Independent Association between Acute Renal Failure and Mortality following Cardiac Surgery 12. *The American Journal of Medicine* 104, 343-8
- Chin Y-W, Jung H-A, Liu Y, Su B-N, Castoro JA, et al. (2007). Antioxidant Constituents of the Roots and Stolons of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*). *Journal Agricultural and Food Chemistry* 55, 4691-7
- Chirino YI, Pedraza-Chaverri J (2009). Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology* 61, 223-42
- Choi SH, Kim YW, Kim SG (2010). AMPK-mediated GSK3 beta inhibition by isoliquiritigenina contributes to protecting mitochondria against iron-catalyzed oxidative stress. *Biochemical Pharmacology* 79, 1352-62
- Dhanasekaran DN, & Reddy EP (2008). JNK Signaling in Apoptosis. *Oncogene*, 27(48), 6245-6251.
- Daugaard G (1990). Cisplatin nephrotoxicity: experimental and clinical studies. *Danish medical bulletin* 37, 1-12
- De Vincenzo R, Scambia G, Benedetti Panici P, Ranelletti FO, Bonanno G, et al. (1995). Effect of synthetic and naturally occurring chalcones on ovarian cancer cell growth: structure-activity relationships. *Anti-cancer drug design* 10, 481-90
- Di Noia MA, Van Driesche S, Palmieri F, Yang L-M, Quan S, Goodman AI, et al. (2006). Heme Oxygenase-1 Enhances Renal Mitochondrial Transport Carriers and Cytochrome c Oxidase Activity in Experimental Diabetes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 15687-15693.
- Dringer R, Gutterer J (2002). Glutathione reductase from bovine brain. *Methods Enzymology* 348, 281-8
- Faubel S, Lewis EC, Reznikov L, Ljubanovic D, Hoke TS, et al. (2007). Cisplatin-Induced Acute Renal Failure Is Associated with an Increase in the Cytokines Interleukin (1L)-1beta, IL-18, IL-6, and Neutrophil Infiltration in the Kidney. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322, 8-15
- Fernandez-Checa J, Kaplowitz N (1990). The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Analytical Biochemistry* 190, 212-219
- Fernandez-Rojas B, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Pedraza-Chaverri J (2014). C-Phycocyanin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibition of oxidative stress. *Food & Function* 5, 480-90
- Floriano-Sánchez E, Villanueva C, Noel Medina-Campos O, Rocha D, Javier Sánchez-González D, et al. (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 Radical Research* 40, 523-33
- Foresti R, Hoque M, Monti D, Green CJ, Motterlini R (2005). Differential Activation of Heme Oxygenase-1 by Chalcones and Rosolic Acid in Endothelial Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312, 686-93
- Francescato HDC, Costa RS, Júnior FB, Coimbra TM (2007). Effect of JNK inhibition on cisplatin-induced renal damage. *Nephrology Dialysis Transplantation* 22, 2138-48
- Fuentes X, Castiñeiras M, Queraltó J (1998). *Bioquímica Clínica y Patología molecular*. Editorial Reverté S.A.
- Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan J, Chaudière J. (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in toxicology* 11, 1176-83
- Ghibelli, L. and M. Diederich (2010). Multistep and multitask Bax activation. *Mitochondrion* 10(6), 604-613.
- Gong H, Zhang B-K, Yan M, Fang P-F, Li H-d, Hu C-p, et al. (2015). A protective mechanism of licorice (*Glycyrrhiza uralensis*): Isoliquiritigenin stimulates detoxification system via Nrf2 activation. *Journal of Ethnopharmacology*, 162, 134-139.
- Gonzales-Vitale J, Hayes D, Cvitkovic E, Sternberg S (1977). the renal pathology in clinical trials of cis-platinum (II) diamminedichloride. *Cancer* 39, 1362-71.
- Goodman A, Olszanecki R, Yang L, Quan S, Li M, Omura S, et al. (2007). Heme oxygenase-1 protects against radiocontrast-induced acute kidney injury by regulating anti-apoptotic proteins. *Kidney International*, 72, 945-953.
- Gordon MH, Jing Ang (1995). Antioxidant Activity of Flavonoids Isolated from Licorice. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 43, 1784-1788
- Gozzelino, R., V. Jeney, et al. (2014). "Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50(1), 323-354.
- Granado-Serrano AB, Martín MA, Haegeman G, Goya L, Bravo L, & Ramos S (2010). Epicatechin induces NF-kB, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2-p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells. *British Journal of Nutrition*, 103(2), 168-179.
- Guardado E, Molina E, Joao M, Uriarte E (2012). Antioxidant and prooxidant effects of polyphenolic compounds and structure activity relationship evidence. In Nutrition, well being and health, ed. Dr Jaouad Bouayed, pp 23-48: InTech.
- Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Martínez-Abundis E, Tapia E, Zarco-Márquez G, Zazueta C, et al. (2010). Protective effect of sulforaphane against cisplatin-induced mitochondrial alterations and impairment in the activity of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 and glutamyl cysteine ligase: Studies in mitochondria isolated from rat kidney and in LLC-PK1 cells. *Toxicology Letters*, 199(1), 80-92.

- Guinaim dos Santos NA, Carvalho MA, Martins NM, & Cardozo dos Santos A (2012). Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Archives of Toxicology*, 86, 1233-1250.
- Guo J, Dongting L, Nikolic D, Zhu D, Pezzuto J, & Van Breemen R (2008a). *In vitro* metabolism of isoliquiritigenin by human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 36(2), 461-468.
- Guo J, Liu A, Cao H, Luo Y, Pezzuto J, & Van Breemen R (2008b). Biotransformation of the Chemopreventive Agent 2',4',4'-Trihydroxychalcone (Isoliquiritigenin) by UDP-Glucuronosyltransferases. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 36(10), 2104-2112.
- Habig WH, Pabst MJ, & Jakoby WB (1974). Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Hayes JD, & Dinkova-Kostova AT (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 199-218.
- Halliwell B, & Gutteridge JMC (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (4 ed.). New York: Oxford University Press.
- Hanigan MH, & Devarajan P (2003). Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Therapy*, 1, 47-61.
- Hanigan MH, Gallagher BC, Townsend DM, Gabarra V (1999).  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Carcinogenesis* 20, 553-559
- Hanigan MH, Lykissa ED, Townsend DM, Ou C-N, Barrios R, Lieberman MW (2001).  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase-Deficient Mice Are Resistant to the Nephrotoxic Effects of Cisplatin. *The American Journal of Pathology* 159, 1889-1894
- Harrison EM, McNally SJ, Devey L, Garden OJ, Ross JA, & Wigmore SJ (2006). Insulin induces heme oxygenase-1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in renal cells. *The FEBS Journal*, 273(11), 2345-2356.
- Hausheer FH, Parker AR, Petluru PN, Jair KW, Chen S, et al. (2011). Mechanistic study of BNP7787-mediated cisplatin nephroprotection: modulation of human aminopeptidase N. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 67, 381-91.
- Hernández-Damián J, Andérica-Romero AC, & Pedraza-Chaverri J (2014). Paradoxical Cellular Effects and Biological Role of the Multifaceted Compound Nordihydroguaiaretic Acid. *Arch. Pharm* (347), 685-697.
- Hill-Kapturczak N, Jarmi T, & Agarwal A (2007). Growth Factors and Heme Oxygenase-1: Perspectives in Physiology and Pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(12), 2197-2208.
- Hong S-I, Kwon S-H, You I-J, Jung Y-H, Kim M-J, et al. (2012). Neuroprotection of sulfuretin is mediated by inhibition of microglial inflammatory activation in BV-2 cells. *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology* 26, Supp 845.1

- Honma S, Takahashi N, Shinohara M, Nakamura K, Mitazaki S, et al. (2013). Amelioration of cisplatin-induced mouse renal lesions by a cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitor. *European Journal of Pharmacology* 715, 181-8
- Hsu YL, Chia CC, Chen PJ, Huang SE, Hunag SC, Kuo PL. (2009). Shallot and licorice constituent isoliquiritigenin arrests cell cycle progression and induce apoptosis through the induction of ATM/P53 and initiation of the mitochondrial system in human cervical carcinoma HeLa cells *Molecular nutrition and food research* 53, 826-35
- Hsu YL, kuo PL, Chiang LC, Lin CC (2004). Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human non-small cell lung cancer a549 cells. *Clinical experimental pharmacology and physiology* 31(7), 414-418.
- Hsu YL, Kuo PL, Lin CC (2005). Isoliquiritigenin induces apoptosis and cell cycle arrest through p53-dependent pathway in HepG2 cells. *Lifes Sciences* 77, 279-92
- Hughey RP, Rankin BB, Elce JS, Curthoys NP (1978). Specificity of a particulate rat renal peptidase and its localization along with other enzymes of mercapturic acid synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 186, 211-7
- Ibrahim MY, Hashim NM, Mariod AA, Mohan S, Abdulla MA, Abdelwahab SI, et al. (2014).  $\alpha$ -Mangostin from *Garcinia mangostana* Linn: An updated review of its pharmacological properties. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(3), 317-329.
- Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A, & Somay A (2009). Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Human Reproduction*, 24(7), 1717-1725.
- Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 14298-302
- Iwashita K, Konbori M, Yamaki K, Tsushida T (2000). Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64, 1813-20
- Jamieson ER, Lippard SJ (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical Reviews* 99, 2467-98
- Jia Z, Wang N, Aoyagi T, Wang H, Liu H, Yang T (2011). Amelioration of cisplatin nephrotoxicity by genetic or pharmacologic blockade of prostaglandin synthesis. *Kidney International* 79, 77-88
- Jiang M, Wei Q, Pabla N, Dong G, Wang C-Y, et al. (2007). Effects of hydroxyl radical scavenging on cisplatin-induced p53 activation, tubular cell apoptosis and nephrotoxicity. *Biochemical Pharmacology* 73, 1499-510
- Jo S-K, Cho WY, Sung SA, Kim HK, Won NH (2005). MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis. *Kidney International* 67, 458-66
- Joung E, Li M, Lee H, Somparn N, Jung Y, et al. (2007). Capsaicin induces heme oxygenase-1 expression in HepG2 cells via activation of PI3K-Nrf2 signaling:

- NAD(P)H: quinone oxidoreductase as a potential target. *Antioxidants and redox signaling* 9, 2087-98
- Jung S-H, Kim H-J, Oh G-S, Shen A, Lee S, Choe S-K, et al. (2014). Capsaicin Ameliorates Cisplatin-Induced Renal Injury through Induction of Heme Oxygenase-1. *Molecules and Cells*, 37(3), 234-240.
- Kamata H, Honda S-i, Maeda S, Chang L, Hirata H, & Karin M (2005). Reactive Oxygen Species Promote TNF Induced Death and Sustained JNK Activation by Inhibiting MAP Kinase Phosphatases. *Cell*, 120(5), 649-661.
- Kang KW, Lee SJ, Park JW, & Kim SG (2002). Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulates Nuclear Translocation of NF-E2-Related Factor 2 through Actin Rearrangement in Response to Oxidative Stress. *Molecular Pharmacology*, 62(5), 1001-1010.
- Kang S-W, Choi J-S, Choi Y-J, Bae J-Y, Li J, Kim DS, et al. (2010). Licorice isoliquiritigenin dampens angiogenic activity via inhibition of MAPK-responsive signaling pathways leading to induction of matrix metalloproteinases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(1), 55-65.
- Kao T-C, Wu C-H, Yen G-C (2014). Bioactivity and Potential Health Benefits of Licorice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 542-53
- Karch J, Kwong JQ, Burr AR, Sargent MA, Elrod JW, Peixoto PM, et al. (2013). Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *eLife*, 2, e00772.
- Katayama R, Nagata S, Iida H, Yamagishi N, Yamashita T, Furuhashi K (2011). Possible role of cysteine-S-conjugate  $\beta$ -Lyase in species differences in cisplatin nephrotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2053-9
- Kelland L (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 7, 573-84
- Kim SC, Byun SH, Yang CH, Kim CY, Kim JW, & Kim SG (2004). Cytoprotective effects of Glycyrrhizae radix extract and its active component liquiritigenin against cadmium-induced toxicity (effects on bad translocation and cytochrome c-mediated PARP cleavage). *Toxicology*, 197(3), 239-251.
- Kim YW, Ki SH, Lee JR, Lee SJ, Kim CW, Kim SC, et al. (2006). Liquiritigenin, an aglycone of liquiritin in Glycyrrhizae radix, prevents acute liver injuries in rats induced by acetaminophen with or without buthionine sulfoximine. *Chemico-Biological Interactions*, 161(2), 125-138.
- Kim H-J, So H-S, Lee J-H, Lee J-H, Park C, Park S-Y, et al. (2006). Heme oxygenase-1 attenuates the cisplatin-induced apoptosis of auditory cells via down-regulation of reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(10), 1810-1819.
- Kim J-Y, Park SJ, Yun K-J, Cho Y-W, Park H-J, Lee K-T (2008). Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via attenuation of NF- $\kappa$ B in raw 264.7 macrophages. *European Journal of Pharmacology* 584, 175-84
- Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, Lee JR, Cho IJ, Yang CH, et al. (2008). Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent iNOS and

- proinflammatory cytokines production. *British Journal of Pharmacology*, 154(1), 165-173.
- Kim KC, Kang KA, Zhang R, Piao MJ, Kim GY, Kang MY, et al. (2010). Up-regulation of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression by eckol, a phlorotannin compound, through activation of Erk and PI3K/Akt. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(2), 297-305.
- Kim YM, Kim TH, Kim YW, Yang YM, Ryu DH, et al. (2010). Inhibition of liver X receptor- $\alpha$ -dependent hepatic steatosis by isoliquiritigenin, a licorice antioxidant flavonoid, as mediated by JNK1 inhibition. *Free Radical Biology and Medicine* 49, 1722-34
- Kim Y-H, Choi J-H, Rim H-K, Kang H-J, Chang S-G, Park J-H, et al. (2011). 23-Hydroxytormentonic Acid and Niga-Ichgoside F1 Isolated from *Rubus coreanus* Attenuate Cisplatin-Induced Cytotoxicity by Reducing Oxidative Stress in Renal Epithelial LLC-PK1 Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(6), 906-911.
- Kim HJ, Joe Y, Kong JS, Jeong S-O, Cho GJ, Ryter SW, et al. (2013). Carbon Monoxide Protects against Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury via ROS-Dependent Akt Signaling and Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1-11.
- Kintzel P (2001). Anticancer Drug-Induced Kidney Disorders. *Drug Safety* 24, 19-38
- Kong LD, Zhanga Y, Pan X, Tana RX, Cheng CHK (2000). Inhibition of Xantine Oxidase by liquiritigenin and Isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. *CLMS, Celular and Molecular Life Sciences* 57, 501-5
- Kröning R, Katz D, Lichtenstein A, Nagami G (1999). Differential effects of cisplatin in proximal and distal renal tubule epithelial cell lines. *British Journal of Cancer* 79, 293-299
- Kruidering M, Van De Water B, De Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF (1997). Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Porcine Proximal Tubular Cells: Mitochondrial Dysfunction by Inhibition of Complexes I to IV of the Respiratory Chain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280, 638-649
- Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler H (1997). Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrology Dialysis Transplantation* 12, 2478-2480
- Kumar S, Sharma A, Madan B, Sigal V, Ghosh B (2007). Isoliquiritigenina inhibits I $\kappa$ B kinase activity and ROS generation to block TNF- $\alpha$  induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells. *Biochemical Pharmacology* 73, 1602-12
- Kunchandy E, Rao MNA (1990). Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics* 58, 237-40
- Kupcsik L (2011). Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. In *Mammalian cell viability methods and protocols*, ed. MJ Stoddart, pp. 13-19: Humana Press
- Kwon H-M, Choi Y-J, Choi J-S, Kang S-W, Bae J-Y, Kang I-J, et al. (2007). Blockade of Cytokine-Induced Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression by Licorice

- Isoliquiritigenin Through NF- $\kappa$ B Signal Disruption. *Experimental Biology and Medicine*, 232(2), 235-245.
- Kwon GT, Cho HJ, Chung WY, Park KK, Moon A, Park JH (2009). Isoliquiritigenin inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased JNK/AP-1 signaling. *Journal of Nutritional Biochemistry* 20, 663-676
- Langerak A, Dreisbach L (2001). *Chemotherapy Regimens and Cancer Care*. ed. L Bioscience. Georgetown, Texas
- Lau GTY, Ye L, Leung LK (2010). The Licorice Flavonoid Isoliquiritigenin Suppresses Phorbol Ester-induced Cyclooxygenase-2 Expression in the Non-tumorigenic MCF-10A Breast Cell Line. *Planta Med* 76, 780-785.
- Lawenda BD, Kelly KM, Ladas EJ, Sagar SM, Vickers A, & Blumberg JB (2008). Should Supplemental Antioxidant Administration Be Avoided During Chemotherapy and Radiation Therapy? *Journal of the National Cancer Institute*, 100(11), 773-783.
- Lebwohl D, Canetta R (1998). Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European Journal of Cancer* 34, 1522-34.
- Lee CK, Son SH, Park KK, Park J, Lim SS, Chung WY (2008). Isoliquiritigenin inhibits tumor growth and protects the kidney and liver against chemotherapy-induced toxicity in a mouse xenograft model of colon carcinoma. *Journal of Pharmacology Sciences* 106, 444-51
- Lee D-S, Jeong G-S, Li B, Park H, Kim Y-C (2010). Anti-inflammatory effects of sulfuretin from *Rhus verniciflua* Stokes via the induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages. *International Immunopharmacology* 10, 850-8
- Lee D-S, Kim K-S, Ko W, Li B, Jeong G-S, et al. (2014). The Cytoprotective effect of sulfuretin against tert-butyl hydroperoxide induced hepatotoxicity through Nrf2/ARE and JNK/ERK MAPK mediated heme oxygenase-1 expression. *International Journal Molecular Sciences* 15, 8863-77
- Lee K-M, Kang H-S, Yun C-H, Kwak H-S (2012). Potential *in vitro* Protective Effect of Quercetin, Catechin, Caffeic Acid and Phytic Acid against Ethanol-Induced Oxidative Stress in SK-Hep-1 Cells. *Biomolecules & Therapeutics* 20, 492-8.
- Lee SH, Kim JY, Seo GS, Kim YC, Sohn DH (2009). Isoliquiritigenin, from *Dalbergia odorifera*, up-regulates anti-inflammatory heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages. *Inflammation Research* 58, 257-62
- Lee YK, Chin Y-W, Bae J-K, Seo JS, Choi YH (2013). Pharmacokinetics of isoliquiritigenin and its metabolites in rats: low bioavailability is primarily due to the hepatic and intestinal metabolism. *Planta Medica* 79, 1656-65
- Lever JM, Boddu R, George JF, & Agarwal A (2016). Heme Oxygenase-1 in Kidney Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 25(3), 165-183.
- Li Y, Zhao H, Wang Y, Zheng H, Yu W, et al. (2013). Isoliquiritigenin induces growth inhibition and apoptosis through downregulating arachidonic acid metabolic network and the deactivation of PI3K/Akt in human breast cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology* 272, 37-48

- Lieberthal W, Menza SA, Levine JS (1998). *Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells*. F315-F27 pp.
- Loa J, Chow P, Zhang K (2009). Studies of structure activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 63, 1007-16
- López C, Denicola A (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular assays. *Analytica Chimica Acta* 763, 1-10
- Lorusso V, Marech I (2013). Novel plant-derived target drugs: a step forward from licorice? *Expert opinion on therapeutic targets*. 17, 333-5
- Luanpitpong S, Nimmannit U, Chanvorachote P, Leonard S, Pongrakhananon V, et al. (2011). Hydroxyl radical mediates cisplatin-induced apoptosis in human hair follicle dermal papilla cells and keratinocytes through Bcl-2-dependent mechanism. *Apoptosis* 16, 769-82
- Ludwig T, Riethmuller C, Gekle M, Schwerdt G, Oberleithner H (2004). Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int* 66, 196-202
- Luo Y, Egger A, Liu D, Liu G, Mesecar A, Van Breemen R. (2007). Sites of alkylation of human Keap1 by natural chemoprevention agents. *Journal American Society for Mass Spectrometry* 18, 2226-32
- Maliakel DM, Kagiya TV, Nair CKK (2008). Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and tocopherol. *Experimental and Toxicologic Pathology* 60, 521-527
- Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J., et al. (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. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 8919-8929.
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis Defined. *Ageing research reviews*, 7(1), 1-7.
- McIntyre T, Curthoys NP (1982). Renal catabolism of glutathione characterization of a particulate rat renal dipeptidase that catalyzes the hydrolysis of cysteinylglycine. *The Journal of Biological Chemistry* 257, 11915-11921
- Meng CQ, Ni L, Worsencroft KJ, Ye Z, Weingarten MD, et al. (2007). Carboxylated, Heteroaryl-Substituted Chalcones as Inhibitors of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression for Use in Chronic Inflammatory Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* 50, 1304-15
- Namgoong SY, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP (1994). Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sciences* 54, 313-20
- Nerya O, Musa R, Khatib S, Tamir S, Vaya J (2004). Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry* 65: 1389-95
- Nowaskowska Z. 2007. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry* 42, 125-37
- Olivero OA, Chang PK, Lopez-Larrazza DM, Cristina Semino-Mora M, Poirier MC (1997). Preferential formation and decreased removal of cisplatin "DNA adducts in Chinese

- hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 391, 79-86
- Olszanecki R, Rezzani R, Omura S, Stec DE, Rodella L, Botros FT, et al. (2007). Genetic suppression of HO-1 exacerbates renal damage: reversed by an increase in the antiapoptotic signaling pathway. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 292(1), F148-F157.
- Orlikova B, Tasdemir D, Golais F, Dicato M, Diederich M (2011). Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. *Genes and Nutrition* 6, 125-47
- Ozkok A, Edelstein CL (2014). Pathophysiology of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. *BioMed Publishing International* 2014, 1-9
- Pabla N, & Dong Z (2008). Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International*, 73(9), 994-1007.
- Padanilam BJ (2003). Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 284, F608-F27
- Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, & Immenschuh S (2010). Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochemical Pharmacology*, 80(12), 1895-1903.
- Park K-Y, Jung G-O, Lee K-T, Choi J, Choi M-Y, et al. (2004). Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 73-9
- Peng F, Du Q, Peng C, Wang N, Tang H, Xie X, et al. (2015). A Review: The Pharmacology of Isoliquiritigenin. *Phytotherapy Research*, 29(7), 969-977.
- Pittalà V, Salerno L, Romeo G, Modica MN, & Siracusa MA (2013). A Focus on Heme Oxygenase-1 (HO-1) Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 20(30), 3711-3732.
- Prawan A, Kundu JK, & Surh Y-J (2005). Molecular Basis of Heme Oxygenase-1 Induction: Implications for Chemoprevention and Chemoprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(11-12), 1688-1703.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, et al. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 3273-3279
- Perazella MA (2009). Renal Vulnerability to Drug Toxicity. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 4, 1275-83
- Pi J, Bai Y, Reece JM, Williams J, Liu D, Freeman ML, et al. (2007). Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free radical biology & medicine*, 42(12), 1797-1806.
- Qin S, & Hou D-X (2016). Multiple regulations of Keap1/Nrf2 system by dietary phytochemicals. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(8), 1731-1755.
- Ramesh G, Reeves WB (2002). TNF $\alpha$  mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *The Journal of Clinical Investigation* 110, 835-42

- Ramesh G, Reeves WB (2004). Inflammatory cytokines in acute renal failure. *Kidney International* 66, S56-S61
- Ramesh G, Reeves WB (2005). p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 289, F166-F74
- Ramseyer VD, & Garvin JL (2013). Tumor necrosis factor alpha: regulation of renal function and blood pressure. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 304(10), F1231-F1242.
- Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 24, 981-90
- Rajo AI, Medina-Campos ON, Rada P, Zúñiga-Toalá A, López-Gazcón A, Espada S, et al. (2012). Signaling pathways activated by the phytochemical nordihydroguaiaretic acid contribute to a Keap1-independent regulation of Nrf2 stability: Role of glycogen synthase kinase-3. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(2), 473-487.
- Rosenberg B (1985). Fundamental studies with cisplatin. *Cancer* 55, 2303-2306.
- Sadzuka Y, Shoji T, & Takino Y (1992). Effect of cisplatin on the activities of enzymes which protect against lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 43(8), 1872-1875.
- Sadzuka Y, Shimizu Y, Takino Y, Hirota S (1994). Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat by inducers and an inhibitor of glutathione S-transferase. *Biochemical Pharmacology* 48, 453-9
- Sánchez-Pérez I, Perona R (1999). Lack of c-Jun activity increases survival to cisplatin. *FEBS Letters* 453, 151-8
- Sánchez-Pérez Y, Morales-Bárceñas R, García-Cuellar CM, López-Marure R, Calderon-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, et al. (2010). The  $\alpha$ -mangostin prevention on cisplatin-induced apoptotic death in LLC-PK1 cells is associated to an inhibition of ROS production and p53 induction. *Chemico-Biological Interactions*, 188(1), 144-150.
- Santos NAG, Bezerra CSCo, Martins NM, Curti C, Bianchi MLP, Santos AC (2008). Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 61, 145-55.
- Santos NAG, Catão CS, Martins NM, Curti C, Bianchi MLP, Santos AC (2007). Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Archives of Toxicology* 81, 495-504.
- Schaaf GJ, Maas RFM, de Groene EM, & Fink-Gremmels J (2002). Management of Oxidative Stress by Heme Oxygenase-1 in Cisplatin-induced Toxicity in Renal Tubular Cells. *Free Radical Research*, 36(8), 835-843.
- Shen K, Johnson DW, & Gobe GC (2016). The role of cGMP and its signaling pathways in kidney disease. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 311(4), F671-F681.

- Shiraishi F, Curtis LM, Truong L, Poss K, Visner GA, Madsen K, et al.,. (2000). Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 278(5), F726-F736.
- Siddik ZH (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22, 7265-7279.
- 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. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 286(3), F425-F441.
- Silva G, Cunha A, Grégoire IP, Seldon MP, & Soares MP (2006). The Antiapoptotic Effect of Heme Oxygenase-1 in Endothelial Cells Involves the Degradation of p38 alpha MAPK Isoform. *The Journal of Immunology*, 177(3), 1894-1903.
- Song Hwa Choi, Young Woo Kim, Sang Geon Kim (2010). AMPK-mediated GSK3B inhibition by isoliquiritigenin contributes to protecting mitochondria against iron-catalyzed oxidative stress. *Biochemical Pharmacology* 79, 1352-62.
- Srinivasan B, Johnson TE, Lad R, Xing C (2009). Structure Activity Relationship Studies of Chalcone Leading to 3-Hydroxy-4,3',4',5'-tetramethoxychalcone and Its Analogues as Potent Nuclear Factor kB Inhibitors and Their Anticancer Activities. *Journal of Medicinal Chemistry* 52, 7228-7235
- Suddek GM, El-kenawi AE, Abdel-Aziz A, El-Kashef HA (2011). Celecoxib, a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Attenuates Renal Injury in a Rat Model of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Chemotherapy* 57, 321-326
- Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 34, 497-500
- Sung MJ, Kim DH, Jung YJ, Kang KP, Lee AS, et al. (2008). Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury. *Kidney Int* 74, 1538-47
- Sun C, Zhang H, Ma X-f, Zhou X, Gan L, Liu Y-y, et al. (2013). Isoliquiritigenin Enhances Radiosensitivity of HepG2 Cells via Disturbance of Redox Status. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 65(3), 433-444.
- Tait SWG, & Green DR (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(9), 621-632.
- Tanihara Y, Masuda S, Katsura T, Inui K-i (2009). Protective effect of concomitant administration of imatinib on cisplatin-induced nephrotoxicity focusing on renal organic cation transporter OCT2. *Biochemical Pharmacology* 78, 1263-1271
- Tayem Y, Johnson TR, Mann BE, Green CJ, & Motterlini R (2006). Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by a carbon monoxide-releasing molecule. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 290(4), F789-F794.
- Tayem Y, Green CJ, Motterlini R, & Foresti R (2014). Isothiocyanate-cysteine conjugates protect renal tissue against cisplatin-induced apoptosis via induction of heme oxygenase-1. *Pharmacological Research*, 81, 1-9.
- Tong L, Chuang C-C, Wu S, & Zuo L (2015). Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Letters*, 367, 18-25.

- Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lapus M, Hanigan MH (2003). Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 14, 1-10
- Townsend DM, Tew KD, He L, King JB, Hanigan MH (2009). Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 63, 79-85
- Tsutomo Hatano, Harumi Kawaka, Taeko Yasuhara, Takuo Okuda (1988). Two New flavonoids and Other Constituents in Licorice Root: Their Relative Astringency and Radical Scavenging Effects. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 2090-7
- Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 552, 335-44
- Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al. (2005). Acute renal failure in critically ill patients: A multinational, multicenter study. *JAMA* 294, 813-818
- Uozumi L, Litterst C (1985). The effect of cisplatin on renal ATPase activity in vivo and *in vitro*. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 15, 96-9
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1-40
- Vaya J, Belinky PA, Aviram M (1997). Antioxidant constituents from Licorice roots: isolation structure, elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 302-13
- Wagner H, & Ulrich-Merzenich G (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2-3), 97-110.
- Wainford RD, Weaver RJ, Stewart KN, Brown P, Hawksworth GM (2008). Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway. *Toxicology* 249, 184-193.
- Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, & Kensler TW (2010). When NRF2 Talks, Who's Listening? *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(11), 1649-1663.
- Wang X, Zhang H, Chen L, Shan L, Fan G, Gao X (2013). Liquorice, a unique "guide drug" of traditional Chinese medicine: A review of its role in drug interactions. *Journal of Ethnopharmacology* 150, 781-90.
- Wei Q, Dong G, Yang T, Megyesi J, Price PM, Dong Z (2007). Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity. *American journal of physiology. Renal physiology* 293, F1282-F91
- Williams C, Whitehouse J. (1979). Cis-platinum: a new anticancer. *British Medical Journal* 1, 1689-91
- Yamamoto S, Aizu E, Jiang H, Nakadate T, Kiyoto I, et al. (1991). The potent anti-tumor-promoting agent isoliquiritigenin. *Carcinogenesis* 12, 317-23
- Yamazaki S, Tatu M, Endo H, Hamamoto T, Baba M, et al. (2002). Isoliquiritigenin suppresses pulmonary metastasis of mouse renal cell carcinoma. *Cancer Letters* 183, 23-30
- Yang E-J, Min JS, Ku H-Y, Choi H-S, Park M-K, et al. (2012). Isoliquiritigenin isolated from *Glycyrrhiza uralensis* protects neuronal cells against glutamate-induced

- mitochondrial dysfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 421, 658-64
- Yang MS, Chan HW, Yu LC (2006). Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology* 226, 126-30
- Yeh C-H, Chen T-P, Wang Y-C, Lin Y-M, & Lin PJ (2009). HO-1 Activation Can Attenuate Cardiomyocytic Apoptosis via Inhibition of NF- $\kappa$ B and AP-1 Translocation Following Cardiac Global Ischemia and Reperfusion. *Journal of Surgical Research*, 155(1), 147-156.
- Yonezawa A, Masuda S, Nishihara K, Yano I, Katsura T, Inui K-i (2005). Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochemical Pharmacology* 70, 1823-1831.
- Yu K, Chen F, Li C (2012). Absorption, Disposition, and Pharmacokinetics of Saponins from Chinese Medicinal Herbs: What Do We Know and What Do We Need to Know More? *Current Drug Metabolism* 13, 577-98.
- Zarjou A, Bolisetty S, Joseph R, Traylor A, Apostolov EO, Arosio P, et al. (2013). Proximal tubule H-ferritin mediates iron trafficking in acute kidney injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(10), 4423-4434.
- Zhang L, Hanigan MH (2003). Role of Cysteine S-conjugate  $\beta$  liase in the metabolism of cisplatin. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*. 306, 988-994
- Zhang X, Shan P, Alam J, Davis RJ, Flavell RA, & Lee PJ (2003). Carbon Monoxide Modulates Fas/Fas Ligand, Caspases, and Bcl-2 Family Proteins via the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway during Ischemia-Reperfusion Lung Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 22061-22070.
- Zhang X, Shan P, Alam J, Fu X-Y, & Lee PJ (2005). Carbon Monoxide Differentially Modulates STAT1 and STAT3 and Inhibits Apoptosis via a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and p38 Kinase-dependent STAT3 Pathway during Anoxia-Reoxygenation Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 8714-8721.
- Zhang X, Yeung ED, Wang J, Panzhinskiy EE, Tong C, et al. (2010). Natural antioxidant-isoliquiritigenina selectively inhibits proliferation of prostate cancer cells. *Clinical experimental pharmacology and physiology* 37, 841-8
- Zhang Y, He Y, Yu H, Ma F, Wu J, & Zhang X (2015). Liquiritigenin Protects Rats from Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Injury through PGC-1 $\alpha$  Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 9.
- Zhao F, Nowaskowska H, Daikonnya A, Kondo K, Kitanaka S (2003). Inhibitors of Nitric Oxide Production from Hops (*Humulus lupulus L.*). *Biochemical pharmaceutical bulletin* 26: 61-65.
- Zhao Z, Park SM, Guan L, lee JR, Kim SC (2015). Isoliquiritigenin attenuates oxidative hepatic damage induced by carbon tetrachloride with or without buthionine sulfoximine. *Chemico-Biological Interactions* 225, 13-20
- Zheng H, Li Y, Wang Y, Zhao H, Zhang J, et al. (2014). Downregulating of COX-2 and CYP4A signaling by isoliquiritigenin inhibits human breast cancer metastasis through

preventing anoikis resistance, migration and invasion. *Toxicology and Applied Pharmacology* 280, 10-20

Zu Y, Liu X, Fu Y, Shi X, Wu N, Yao L, et al. (2009). Cytotoxic activity of isoliquiritigenin towards CCRF-CEM leukemia cells and its effect on DNA damage. *Planta Medica*, 75(10), 1134-1140