



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Caracterización de la vía NRF2-KEAP1 durante la progresión del
carcinoma hepatocelular *in vivo*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

DAFNE GUERRERO ESCALERA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. JULIO ISRAEL PÉREZ CARREÓN
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR:

DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. OSBALDO RESÉNDIS ANTONIO
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

México D.F. agosto 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica - Aristóteles

Jurado asignado

Dr. Tovar Palacio Armando Roberto

Dra. Maldonado Jiménez Perla Deyanira

Dra. Macías Silva Marina

Dr. Espinosa Aguirre Jesús Javier

Dr. Pérez Carreón Julio Isael

Agradecimientos

A mi tutor, Dr. Julio Isael Pérez Carreón, por dedicarme su tiempo y paciencia para realizar este proyecto.

A mi comité tutor conformado por la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez y al Dr. Osbaldo Resendis Antonio, por sus aportaciones a este proyecto.

A mi mamá Roselia Escalera Montes, y a mis hermanas Eglantina Guerrero Escalera y Adriana Guerrero Escalera, por ser siempre mi fortaleza, por enseñarme a ser una persona responsable, por enseñarme el camino de la honestidad y por brindarme su amor y apoyo incondicional.

Al Dr. Juan Carlos Pérez Monter, por dedicarme su tiempo y paciencia al enseñarme, por brindarme todas las herramientas necesarias para llevar a cabo un proyecto de doctorado, por su sencillez, por contagiarme su entusiasmo y encausar mi camino en la ciencia.

Al Dr. Jaime Arellanes Robledo, por ser mi ejemplo a seguir, por sus grandes aportaciones en este proyecto, por dedicarme tiempo, por su paciencia, por ser siempre tan asertivo, por su calidad humana, su sencillez y sobre todo su amistad.

A la Bióloga Alma Estanez Hernández, por sus enseñanzas, por su calidez y su amistad.

A mis amigos M en C. Brisa Rodope Alarcón Sánchez, M en C. Alexia Montes Aparicio, M en C. Victoria González Islas, M en C. Armando Cruz Rangel y M en C. Sergio Hernández Fuentes, por brindarme su amistad, por escucharme y su apoyo incondicional.

Al Técnico laboratorista Ricardo Nava Monrroy, por su apoyo, eficiencia y su amplia experiencia en el campo de la histología.

Índice

Abreviatura	1
Resumen	3
Abstract	5
Introducción	7
Marco Teórico	9
1. Carcinogénesis	9
1.1. Rasgos del cáncer	9
1.2. Rasgos emergentes del cáncer	12
1.3. Teorías de carcinogénesis	13
2. Función y anatomía del hígado	14
2.1. Células hepáticas	14
2.2. Estructura funcional hepática	15
3. Carcinoma hepatocelular	17
3.1. Epidemiología	17
3.2. Hepatocarcinogénesis	18
3.3. Estrés oxidativo en la hepatocarcinogénesis	19
4. Estructura y función de NRF2-KEAP1	20
4.1. Elementos de respuesta antioxidante	21
4.2. Activación de la vía NRF2-KEAP1	22
4.3. Respuesta antioxidante mediada por la activación de NRF2	23
4.4. NRF2-KEAP1 en el CHC	22
4.5. Genes regulados por NRF2 en el CHC	24
5. Modelos experimentales de CHC en rata	25
Hipótesis	29
Objetivos	29
6. Metodología	30
Modelos animales	29
Western blot	31
Extracción de ARN	33
RTqPCR tiempo real	33
Mapeo del ARE de genes potenciales blanco de NRF2	34
Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	34
PCR punto final	35
Inmunofluorescencia	36
Análisis estadísticos	37

7. Resultados	38
La expresión de genes blanco de NRF2 aumenta durante la progresión del CHC	38
Las proteínas blanco de NRF2 como PTGR1, NQO1 y HMOX1 se localizan en nódulos durante la progresión del CHC	40
PTGR1 y NQO1, co-localizan diferencialmente con NRF2 en los nódulos de CHC	41
La localización subcelular de NRF2, MAF y KEAP1 aumenta en las células de los nódulos de CHC	43
Análisis del peso molecular de NRF2 en tejido hepático de rata	44
Los niveles de las proteínas NRF2, KEAP1 y MAF aumentan durante la progresión del CHC	45
Las células del CHC denotan alteración en la interacción de KEAP1 con el citoesqueleto de actina	46
NRF2 se localiza predominantemente en núcleos de las células nodulares	48
Genes potencialmente regulados por NRF2 en el CHC <i>in vivo</i>	50
La expresión de ANXA1 y ANXA5 incrementa en núcleo y citosol durante la progresión del CHC	56
La Anxa1 y Anxa5 contienen el ARE que son reconocidos por NRF2	57
La Anxa1 y Anxa5 co-expresan con genes regulados por NRF2 en el CHC	58
8. Discusión	58
9. Conclusiones	63
Perspectivas	64
Referencias	65

Abreviaturas

2-AAF, 2-acetilaminofluoreno
ABCA8B, Miembro 8 de la subfamilia A del casete de unión a ATP
ABCC4, Miembro 4 de la subfamilia C de casete de unión a ATP
ABCB1, Miembro 1 de la subfamilia B del casete de unión a ATP
ABCC3, Miembro 3 de la subfamilia C del casete de unión a ATP
ARE, Elemento de respuesta antioxidante
AKT, Serina / Treonina cinasa 1
AKR1C1-3, aldo-ceto reductasa familia 1, miembro C1
ANXA1, Anexina A1
ANXA2, Anexina A2
ANXA5, Anexina A5
AXIN1, Axina 1
AFP, Alfafetoproteína
BACH1, Dominio BTB y homólogo CNC 1
BTB, Broad complex, Tramtrack y Bric-a-brac
Braf, Protooncogén B-Raf, serina/treonina cinasa
CHD6, Helicasa con cromodominio de unión a ADN 6
CREBP, Proteína de unión al elemento de respuesta cAMP
CCA, Colangiocarcinoma
CHC, Carcinoma hepatocelular
CUL3-E3, Culina 3
CRM1, Exportina de mantenimiento de la región cromosómica 1
CCND1, Ciclina D1
CDKN2A, Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2A
CTNNB1, Beta catenina 1
ChIP-Seq, Inmunoprecipitación de cromatina acoplada a secuenciación
DEN, Dietilnitrosamina
DRG, Dominio de repetición d doble glicina
ERK, Proteína cinasa 1 regulada por señales extracelulares
EGFR, Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGF, Factor de crecimiento epidérmico
EH-1, Epóxido hidrolasa 1
FGF3, Factor de crecimiento de fibroblastos 3
FGF4, Factor de crecimiento de fibroblastos 4
FGF19, Factor de crecimiento de fibroblastos 19
GCL, Glutamato—cisteína ligasa
GSS, Glutación sintetasa
GSR, Glutación reductasa
GPX-1, Glutación peroxidasa 1
GCLC, Subunidad catalítica de glutamato-cisteína ligasa
4-HNE, 4-Hidroxinonal
HMOX-1, Hemoxigenasa 1
IVR, Región intermedia
KEAP1, Proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch
KRas, Protooncogén KRAS, GTPasa

KRT-19, Citoqueratina 19
MYC, Protooncogén MYC
MT, Metalotioneína
MTF-1, Factor de transcripción regulador de metales 1
MT-1A, Metalotioneína-1A
MT-2A, Metalotioneína-2A
MMP-9, metaloproteínasa de la matriz extracelular 9
MTHFD1L, metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1
MDA, Malondialdehído
mTOR, Diana de rapamicina en células de mamífero
MAPK, Proteína cinasa activada por mitógeno1
MAF F, G y K, Proteínas pequeñas de fibrosarcoma musculo aponeurótico
NQO-1, NADPH quinona oxidoreductasa 1
NADPH, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- κ B, Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NRF2, Factor relacionado al factor nuclear eritroide-2
NST, Tejido circundante al tumor
NES, Secuencia de exportación nuclear
8-OH-dG, 8-hidroxi-20-desoxiguanosina
PTGR1, Prostaglandina reductasa 1
PI3K, Fosfatidil inositol 3 cinasa
PTEN, Fosfatasa y homólogo de tensina
PKD, Proteína cinasa D
PTP1B, Proteína tirosina fosfatasa 1B
P53, Proteína tumoral P53
PRDX-1, Peroxiredoxina 1
PH, Hepatectomía parcial
ROS, Especies reactivas de oxígeno
RNS, Especies reactivas de nitrógeno
RAC3, Familia RacGTPasa pequeña 3
RXR α , Receptor retinoide X
SASP, Fenotipo secretor asociado a la senescencia
SLC7A11, Portador de soluto familia 7 miembro 11
SLC1A4, Portador de soluto familia 1 miembro 4
SLS25A4, Portador de soluto familia 25 miembro 4
SLC22A23, Portador de soluto familia 22 miembro 23
SLC19A2, Portador de soluto familia 19 miembro 2
SQSTM1, Secuestroma 1
SOD-1, superóxido dismutasa
TERT, Transcriptasa inversa de telomerasa
TGF β , Factor de crecimiento transformante beta 1
TME, Microambiente tumoral
TXN, Tiorredoxina
TXNRD-1, Tiorredoxina reductasa-1

Resumen

La vía NRF2-KEAP1 (Factor 2 relacionado con el factor nuclear Eritroide 2 - Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch) regula la expresión de diversas enzimas de citoprotección y tiene un papel importante en el equilibrio oxidoreducción intracelular. Hasta este punto se consideraría que tiene un papel positivo en la defensa contra el estrés oxidativo; sin embargo, en diferentes tipos de cáncer incluido el carcinoma hepatocelular (CHC), se ha descrito que la actividad de la vía NRF2-KEAP1 es persistente lo cual permite el incremento de la capacidad antioxidante y de detoxificación de las células cancerosas, así como la resistencia a los tratamientos farmacológicos antitumorales, de tal forma que la actividad transcripcional exacerbada de NRF2 proporciona ventajas para la sobrevivencia y proliferación de las células cancerosas.

El objetivo de este estudio se enfocó en caracterizar la localización subcelular de NRF2 y KEAP1 en función del tiempo de progresión del CHC en un modelo experimental en la rata. Este modelo tiene la ventaja de recapitular los eventos patológicos de la hepatocarcinogénesis asociados al daño hepático crónico, en tan solo 22 semanas. Así, en el análisis de la actividad de la vía NRF2 desde un contexto del microambiente tumoral *in vivo*, se observó que dicha vía se activó gradualmente junto con el aumento de la expresión de sus genes blanco como *Nqo1*, *Hmox1*, *Gclc* y *Ptgr1*, en función del tiempo de desarrollo del CHC. De manera similar, las fracciones de proteína nuclear y citosólica corroboraron el aumento de NRF2, MAF y KEAP1 durante la progresión del CHC. Asimismo, la co-localización de NRF2 y MAF fue mayor en los núcleos celulares de los nódulos neoplásicos que en las células circundantes. Cuando se investigó la localización de KEAP1 en el contexto histológico mediante análisis de inmunofluorescencia, ésta se encontró tanto en el núcleo como en el citoesqueleto de actina cortical de los hepatocitos normales; sin embargo, la localización de KEAP1 disminuyó drásticamente en el núcleo y en el citoesqueleto de actina cortical de las células nodulares. Esta disminución en las células neoplásicas, la cual está asociada a una mayor translocación nuclear de NRF2, está en concordancia con la expresión elevada de sus genes blanco.

Adicionalmente, analizamos la secuencia promotora de un listado de genes diferencialmente expresados en la hepatocarcinogénesis e identificamos 70 genes con secuencias ARE. Entre ellos, los genes *Anxa1* y *Anxa5* mostraron interacción con NRF2 a través de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y además, incrementaron el nivel de expresión el cual fue determinado en extractos nucleares y citosólicos del modelo de CHC *in vivo*. Esto sugiere que NRF2 podría tener un papel relevante en la regulación de la expresión de los genes *Anxa1* y *Anxa5* y así contribuir en la progresión del CHC.

En conclusión, la alta expresión de los genes clásicamente regulados por NRF2 como *Nqo-1*, *Hmox-1*, *Gclc* y *Ptgr1*, indican que la vía NRF2-KEAP1 se activa continuamente durante la progresión del CHC. Además, las células neoplásicas exhiben una pérdida de la interacción entre KEAP1 y el citoesqueleto de actina cortical, lo cual podría afectar la actividad represora de KEAP1 sobre NRF2 y como consecuencia, permitir una mayor localización nuclear de NRF2. Lo que sugiere un nuevo mecanismo de regulación por el cual NRF2 ejerce su actividad como factor transcripcional. De manera novedosa, encontramos que los genes *Anxa1* y *Anxa5* contienen el ARE que son reconocidos por NRF2, y proponemos que podrían tener un papel relevante en la progresión del CHC.

Abstract

The NRF2-KEAP1 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 - Kelch-like ECH-Associated Protein 1) pathway regulates the expression of various cytoprotective enzymes and plays an essential role in intracellular oxidation-reduction balance. Up to this point, it would be considered to have a positive role in the defense against oxidative stress; however, in different types of cancer, including hepatocellular carcinoma (HCC), it has been described that the activity of the NRF2-KEAP1 pathway is persistent, which allows an increase in the antioxidant capacity and detoxification of cancer cells, as well as resistance to antitumor pharmacological treatments, in such a way that the exacerbated transcriptional activity of NRF2 provides advantages for the survival and proliferation of cancer cells.

The aim of this study focused on characterizing the subcellular localization of NRF2 and KEAP1 as a molecular mechanism during HCC progression in an experimental rat model. This model has the advantage of recapitulating the pathological events of hepatocarcinogenesis associated with chronic liver damage in just 22 weeks. Thus, the analysis of NRF2 activity pathway *in vivo*, from a tumor microenvironment context, we observed that this pathway was gradually activated alongside the increased expression of its target genes, such as *Nqo1*, *Hmox1*, *Gclc* and *Ptgr1*, which is associated with HCC progression. Similarly, nuclear and cytosolic protein fractions corroborated the increase of NRF2, MAF, and KEAP1 during HCC progression. Likewise, colocalization of NRF2 and MAF was increased in cell nuclei of neoplastic nodules as compared with surrounding cells. When the localization of KEAP1 was histologically investigated by immunofluorescence analysis, we found that this protein was localized in both the nucleus and the cortical actin cytoskeleton in normal hepatocytes; however, KEAP1 was dramatically decreased in the nucleus and cortical actin cytoskeleton of neoplastic nodule cells. The decrease of KEAP1 that was closely associated with an increased nuclear translocation of NRF2 within neoplastic cells was consistent with the elevated expression of its target genes.

Additionally, we analyzed the promoter sequence of several differentially expressed genes in hepatocarcinogenesis and identified 70 genes with ARE sequences. Among them, *Anxa1* and *Anxa5* genes interacted with NRF2 as shown using chromatin immunoprecipitation assays. Also, they increased the expression level, which was determined in nuclear and cytosolic extracts of the *in vivo* HCC model. This suggests that NRF2 could play a relevant role in regulating *Anxa1* and *Anxa5* gene expression and thus contribute to HCC progression.

In conclusion, the high expression of genes classically regulated by NRF2, such as *Nqo-1*, *Hmox-1*, *Gclc*, and *Ptgr1*, indicate that the NRF2-KEAP1 pathway is continuously activated during HCC progression. In addition, neoplastic cells exhibit a loss of interaction between KEAP1 and the cortical actin cytoskeleton, which could

affect the repressive activity of KEAP1 on NRF2 and, consequently, allow a more significant nuclear localization of NRF2. This suggests a new regulatory mechanism by which NRF2 exerts its activity as a transcriptional factor. In a novel way, we found that the Anxa1 and Anxa5 genes contain ARE that NRF2 recognizes, and we propose that they could play a relevant role in HCC progression.

Introducción

El CHC es uno de los tipos de cáncer más agresivos y está clasificado como el cuarto cáncer causante de mayor mortalidad en todo el mundo [1]. El CHC surge del daño hepático crónico causado por varios factores de riesgo, como la infección por el virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC, respectivamente), el consumo excesivo de alcohol y la esteatohepatitis no alcohólica [2]. El daño hepático crónico induce un microambiente oxidativo que promueve la fibrosis, la cirrosis y el CHC [3]. De manera similar, la dietilnitrosamina (DEN), un carcinógeno ampliamente utilizado para inducir CHC en modelos animales, causa daño hepático crónico y genera CHC multinodular asociado con cirrosis en ratas en tan solo 18 semanas [4].

La vía de señalización del factor nuclear NRF2-KEAP1 es el principal regulador de la respuesta antioxidante al estrés oxidativo. Se ha descrito que los factores estresantes, como las moléculas endógenas derivadas de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los agentes quimiopreventivos del cáncer, como los fitoquímicos (por ejemplo, ditioletonas, isotiocianatos y triterpenoides), pueden activar esta vía para proteger las células contra el daño [5]. No obstante, aunque se ha demostrado que estas sustancias tienen efectos protectores en estudios preclínicos, aún deben ser validados experimentalmente antes de usarlas en seres humanos [6]. Además, la activación continua de NRF2 se ha observado en varios tipos de cáncer y provoca una mayor respuesta antioxidante, un metabolismo de fármacos exacerbado y una resistencia a los tratamientos farmacológicos anti-tumorales [7–9]. La relevancia de la NRF2 en el CHC se ha determinado a través de la inhibición de su expresión en ratones, lo cual demostró que proporciona resistencia a la inducción de CHC; por el contrario, tanto la translocación nuclear como la actividad transcripcional de NRF2 aumentan y promueven la formación de tumores hepáticos en ratones de tipo salvaje [10]. Además, se ha descrito que el aumento de los niveles de NRF2 correlaciona con el grado de diferenciación tumoral en pacientes con CHC, la metástasis y el tamaño del tumor, lo que confirma el papel oncogénico de NRF2. Por lo tanto, el aumento de la expresión de este factor de transcripción se ha asociado con un mal pronóstico en pacientes con CHC [11].

La regulación de la vía NRF2-KEAP1 podría ocurrir bajo dos condiciones opuestas; en el primer caso, ocurre en un microambiente celular de homeostasis redox en donde NRF2 se encuentra unido a KEAP1, el cual está anclado al citoesqueleto de actina cortical en el citoplasma, reprimiendo la translocación nuclear de NRF2, a través de su poliubiquitinación mediante el complejo de ligasas de ubiquitina CUL3-E3 y finalmente enviado a degradación en el proteasoma [12]; en el segundo caso, ocurre bajo una condición de estrés oxidativo, en donde la oxidación de los residuos de cisteína de KEAP1 fomentan un cambio conformacional que impide la ubiquitinación y su degradación [13]; posteriormente, NRF2 sintetizado de *novo* se transloca al núcleo para formar un heterodímero con los miembros de la familia MAF

como F, G y K [14]. Por lo tanto, el heterodímero NRF2-MAF interactúa con el ADN y reconoce las secuencias del ARE, lo que induce la transcripción de genes de respuesta antioxidante, como *Nqo1*, *Hmox1* y *Gclc* [15]. Por lo que la activación de la vía NRF2-KEAP1 es fundamental para la progresión del CHC. Así, surgen las preguntas: ¿En qué momento de la progresión del CHC ocurre la activación de la vía NRF2? y ¿Cuál es la relevancia de los productos génicos inducidos por NRF2 para la progresión del cáncer?. Sin embargo, en los avances en donde se han empleado líneas celulares del cáncer, aún no se ha estudiado la localización subcelular progresiva de las principales proteínas de la vía NRF2-KEAP1, así como su activación, de manera curso temporal, durante la carcinogénesis hepática *in vivo*. El objetivo de esta investigación fue analizar la localización subcelular de NRF2, KEAP1 y MAF, así como el estado de expresión de sus genes blanco durante la progresión del CHC inducido por DEN en un modelo bien caracterizado de hepatocarcinogénesis en la rata [4]. Adicionalmente, la actividad de NRF2 favorece la transcripción de aquellos genes blanco con ARE, por lo que la búsqueda y caracterización de genes novedosos inducidos por NRF2, proporciona un mejor entendimiento del papel oncogénico de NRF2 en el CHC. En ese sentido, los genes *Anxa1* y *Anxa5*, fueron de interés debido a que contienen el ARE en su región promotora y también, sus productos proteicos se encuentran altamente expresados en extractos nucleares y citosólicos del modelo de CHC *in vivo*, lo cual sugiere que los ejes NRF2-*Anxa1* y/o NRF2-*Anxa5* podrían desempeñar un papel relevante durante la progresión del CHC.

Marco Teórico

1. Carcinogénesis

La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas por el cual se produce cáncer, es decir, incluye las etapas por las que las células de un tejido u órgano se transforman en cancerosas. El cáncer se refiere al conjunto de enfermedades heterogéneas causadas por la expansión clonal de células cancerosas [16]. Las células cancerosas, se caracterizan por la acumulación de mutaciones en el genoma, que afectan las diversas funciones a nivel molecular, celular, tisular y sistémico, con la consecuente muerte del paciente. Estas características hacen del cáncer una enfermedad multifactorial, con una fisiopatología a nivel molecular que hace indispensable el conocimiento de la biología celular y molecular.

1.1 Rasgos del cáncer

Hanahan y Weinberg describieron los “hallmarks”, o rasgos del cáncer, como las capacidades que va adquiriendo la célula cancerosa durante el desarrollo y progresión de un cáncer [17, 18]. Los principales rasgos del cáncer son:

Inestabilidad genómica

Las células cancerosas presentan una tasa incrementada de proliferación, por lo que tienden a acumular cambios genómicos y mutaciones. Estas modificaciones a su vez podrían afectar la división celular y alterar genes supresores de tumores. Esta inestabilidad promueve más alteraciones genéticas en las células cancerosas. Los cambios pueden surgir a través de mutaciones directas del ADN o mediante modificaciones epigenéticas que pueden cambiar la expresión de los genes, la síntesis de proteínas y afectar la integridad genómica [17].

Inmortalidad replicativa

Las células cancerosas pueden alcanzar un potencial replicativo ilimitado debido a la reactivación o sobreexpresión de la enzima transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT), lo cual evita el acortamiento de los telómeros y evita la senescencia y la apoptosis. Sin embargo, se ha demostrado que muchas células cancerosas poseen telómeros cortos [17] y aun así logran mantener capacidades de proliferación exacerbadas.

Evasión de las señales supresoras del crecimiento

Para superar la inhibición del crecimiento, las células cancerosas carecen de respuesta a las señales externas inhibitorias del crecimiento. Además, las células cancerosas son resistentes a la autofagia y al control de la apoptosis. Ambos procesos permiten un control estricto sobre la muerte y el crecimiento celular. La

apoptosis permite la eliminación de las células que experimentan alteraciones en la integridad del genoma irreparables, así previene una proliferación excesiva para limitar el número de células y eliminar las células dañadas. La autofagia es un sistema de reciclaje celular que elimina a las proteínas anormales y el contenido citoplasmático de células dañadas [17].

Muerte celular

Las células cancerosas son resistentes a la señalización pro-apoptótica, evitando la muerte celular y la autofagia, para aumentar el crecimiento y superar las condiciones que limitan la disponibilidad de nutrientes. [17].

Reprogramación del metabolismo energético

Debido a su crecimiento celular excesivo, las células cancerosas requieren de altos niveles de energía y de nutrientes que les permitan sobrevivir en ambientes hipóxicos, ya que no están completamente vascularizadas en un tumor en formación. Para satisfacer estas necesidades, muchas de las vías metabólicas energéticas se adaptan o reprograman. El efecto Warburg se refiere al metabolismo glucolítico exacerbado que se produce en las células cancerosas, donde el piruvato se desvía del ciclo de Krebs a la producción de lactato en condiciones de oxígeno o sin oxígeno. También se sabe que las células cancerosas aumentan el metabolismo de la glutamina para promover la proliferación celular [19].

Angiogénesis

El crecimiento de la red vascular es importante para el reabastecimiento de nutrientes de metabolitos que favorezcan la progresión tumoral, ya que las células cancerosas requieren un suministro suficiente de nutrientes y oxígeno, así como un medio de eliminación de desechos. Esto se logra mediante la angiogénesis y la linfangiogénesis, respectivamente [17].

Evasión de la detección inmunológica

El sistema inmunológico humano protege contra patógenos y enfermedades extrañas, pero también juega un papel muy importante en la limpieza de las células dañadas del propio cuerpo. Como tal, el sistema inmunológico también es capaz de reconocer y eliminar a las células cancerosas. Los linfocitos T reconocen y eliminan de forma selectiva patógenos o células dañadas mediante la orquestación de una respuesta inmunitaria coordinada que abarca la respuesta innata y adaptativa. Sin embargo, las células cancerosas evaden el sistema inmunológico por la secreción del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β), además de reclutar a otros tipos de células del sistema inmune que favorecen el desarrollo tumoral [17].

Inflamación promotora de tumores

La señalización dentro del microambiente tumoral (TME) condiciona a las células inmunes para promover la supervivencia del tumor. Las células inmunes en el TME secretan factores que permiten el crecimiento y la metástasis, en lugar de reconocer y destruir a las células cancerosas [17]. Los mecanismos inflamatorios importantes que son dañados por las células tumorales incluyen la activación de factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), la señalización de puntos de control inmunológico y la señalización del inflamasoma [17].

Señalización proliferativa sostenida

Las células normales dependen de la señalización de crecimiento de un ciclo celular estrictamente regulado para proliferar y mantener la homeostasis del tejido. Esta regulación del ciclo celular se interrumpe en el cáncer. Las células cancerosas liberan y responden a sus propios factores de crecimiento para estimular el crecimiento, prescindiendo de la necesidad de factores de crecimiento externos, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Esta autosuficiencia en la proliferación celular se impulsa a través de tres vías de señalización principales como: la AKT Serina / Treonina cinasa 1 (AKT), la proteína cinasa activada por mitógeno1 (MAPK), la proteína cinasa regulada por señales extracelulares 1 (ERK) y la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) [17].

Activación de la invasión y la metástasis

La invasión es el proceso que permite la migración de las células tumorales hacia los tejidos cercanos. La metástasis es el proceso por el cual las células cancerosas migran desde el sitio del tumor primario a una nueva ubicación distante y establecen tumores secundarios. La transición epitelio a mesénquima es un proceso clave en estos mecanismos, que permite una división celular desinhibida y adaptaciones metabólicas que permiten la supervivencia celular en condiciones de estrés y limitación de nutrientes. Tanto la invasión como la metástasis, implican cambios extensos en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Así mismo se requiere una transformación celular para permitir la invasión y la migración celular [17].

1.2 Rasgos emergentes del cáncer

Desbloqueo de la plasticidad fenotípica

Durante la organogénesis, el desarrollo, la determinación y la organización de las células en los tejidos, se da una diferenciación celular terminal. En este proceso las células progenitoras, a veces de forma irreversible, para asumir sus funciones homeostáticas dejan de crecer tras la culminación de estos procesos. Como tal, el proceso de diferenciación celular es en la mayoría de los casos antiproliferativo y constituye una clara barrera para la expansión celular, necesaria para la neoplasia. Por ejemplo, las células cancerosas originadas a partir de una célula normal que avanza a un estado completamente diferenciado, pueden revertir su curso al desdiferenciarse de nuevo a estados celulares similares a los progenitores. Por el contrario, las células neoplásicas que surgen de una célula progenitora que está destinada a seguir una vía que conduce a la diferenciación en etapa final, pueden interrumpir el proceso, por lo que las células neoplásicas mantienen su expansión en un estado similar al progenitor parcialmente diferenciado. Alternativamente, la trans-diferenciación, en la que las células que inicialmente se comprometieron en una vía de diferenciación, cambian a un programa de desarrollo en linajes celulares completamente diferentes [20]. Así durante la neoplasia, son evidentes diferentes comportamientos fenotípicos que dan evidencia de procesos de diferenciación en varios sentidos y que denotan una elevada plasticidad fenotípica celular.

Reprogramación epigenética no mutacional

La inestabilidad y mutación del ADN son componentes fundamentales de la formación y patogénesis del cáncer. Sin embargo, la regulación epigenética (no mutacional) de la expresión génica está bien establecida, como el mecanismo central que determina el desarrollo embrionario, la diferenciación y la organogénesis. En ese sentido las alteraciones epigenéticas pueden contribuir a la adquisición de capacidades distintivas durante el desarrollo del tumor y la progresión maligna [20].

Microbiomas polimórficos

Los ecosistemas creados por las bacterias y los hongos residentes (los microbiomas) tienen un impacto profundo en la salud y la enfermedad de los seres humanos. En el cáncer, la variabilidad polimórfica en los microbiomas entre los individuos de una población puede tener un impacto en los fenotipos relacionados al cáncer [20].

Senescencia celular

La senescencia celular es una forma típicamente irreversible de detención proliferativa, que probablemente evolucionó como un mecanismo protector para mantener la homeostasis tisular, también como un mecanismo complementario a la muerte celular programada que sirve para inactivar, y en su momento, eliminar células dañadas, disfuncionales o innecesarias. La senescencia celular se ha visto durante mucho tiempo como un mecanismo de protección contra la neoplasia. Sin embargo, existe evidencia de que, en ciertos contextos, las células senescentes estimulan de diversas formas el desarrollo tumoral y la progresión maligna. Se considera que el principal mecanismo por el cual las células senescentes promueven los fenotipos tumorales es a través de la activación de un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP), que es capaz de transmitir señales de manera paracrina a las células cancerosas viables en las proximidades, así como a otras células en el microambiente tumoral [20].

1.3 Teorías de la carcinogénesis

Las etapas por las cuales se desarrolla el cáncer son al menos tres etapas: la iniciación, la promoción y la progresión. En la iniciación, el ADN es la principal biomolécula blanco de los carcinógenos (mutágenos químicos, virus y radiaciones ionizantes). Las células iniciadas presentan mutaciones permanentes y heredables, además de una inestabilidad genética que las hace susceptibles para adquirir aberraciones cromosómicas. La promoción implica la aparición de lesiones pre-tumorales o nódulos, a través de la proliferación de las células iniciadas. La progresión determina el desarrollo del cáncer a partir de lesiones pre-tumorales. Durante esta etapa, las células pre-tumorales sufren cambios estructurales en la cromatina, acumulan mutaciones, modifican el perfil de expresión genético y el metabolismo celular. Así, el cáncer es el resultante de un proceso de selección de células aberrantes que lograron sobrevivir adquiriendo un control autónomo para expandirse [21–27].

Se han propuesto al menos cinco teorías de carcinogénesis, las cuales se describen a continuación:

El *modelo 1* se centra en las mutaciones causadas por sustancias químicas, la radiación y las infecciones crónicas causadas por virus [16].

El *modelo 2* se enfoca en la inestabilidad del genoma.

El *modelo 3* se basa en mecanismos no genotóxicos, como la expansión clonal y la epigenética.

El *modelo 4* puede abarcar los tres anteriores y está basado en el concepto de una selección celular "darwiniana", el cual atribuye un papel más importante a la expansión clonal o a la selección de células que a las mutaciones, pero hace hincapié en el papel del entorno en la selección de células que tienen alguna ventaja adquirida [16].

Por último, el *modelo 5* está basado en el concepto de "organización de tejidos", el cual se enfoca en el entorno local o (microambiente celular) que rodea a las células pre-cancerosas [16].

Una vía común en la historia natural de la enfermedad es la aparición de lesiones proliferativas focales que actúan como precursoras del desarrollo del cáncer. Cada vez es más evidente que la aparición de tales lesiones no es un fenómeno autónomo de las células, sino que depende en gran medida de las señales del microambiente derivadas del tejido circundante. La arquitectura del tejido alterada resultante se traduce en la aparición de un microambiente tumoral único dentro de estas lesiones, asociado con vasos sanguíneos alterados y / o a un suministro de sangre que a su vez puede desencadenar cambios bioquímicos y metabólicos que alimentan la progresión del tumor [16, 28].

2. Función y anatomía del hígado

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo, se encuentra debajo de las costillas del lado derecho justo bajo el pulmón derecho, tiene forma de pirámide y se divide en dos lóbulos: el derecho y el izquierdo, a su vez estos se subdividen en segmentos [29]. El hígado realiza varias funciones importantes como: el almacenamiento de muchos de los nutrientes que el intestino absorbe, por ejemplo, almacena una cantidad importante de vitaminas A, D, E, K y B12, así como hierro, cobre, y captura el exceso de glucosa del torrente sanguíneo y lo almacena como glucógeno. El hígado también segrega bilis al intestino, como mecanismo de eliminación del metabolismo de xenobióticos y para la emulsión de la grasa y ayudar a absorber los nutrientes, especialmente los ácidos grasos. Finalmente, filtra y descompone desechos tóxicos en la sangre, los cuales luego se remueven del cuerpo [30].

2.1 Células hepáticas

El hígado se compone de varios tipos de células diferentes, incluyendo a los *hepatocitos*, los *colangiocitos*, las *células estrelladas*, las *células de Kupffer* y las *células endoteliales sinusoidales*. Cada uno de estos tipos de células poseen características únicas que regulan cooperativamente la función hepática a múltiples niveles. Los *hepatocitos*, constituyen la mayor parte del volumen del hígado y

realizan muchas de las funciones atribuidas al hígado. Los *colangiocitos* es el segundo epitelio más abundante del hígado y tienen la función de recubrir el lumen de los conductos biliares. Las *células estrelladas* representan una población celular dinámica que puede existir en un estado inactivo o activado. En una condición fisiológica hepática normal, las células estrelladas almacenan vitamina A en gotitas de lípidos; sin embargo, en condiciones de daño hepático, ocurre la activación de las células estrelladas, lo cual induce la pérdida progresiva de las reservas de vitamina A [30]. Por ejemplo, en la hepatitis crónica o cirrosis, tanto en seres humanos como en animales de experimentación, las células estrelladas ricas en vitamina A se diferencian en miofibroblastos carentes de vitamina A, que además de proliferar, inducen fibrosis por la producción de varios componentes de matriz extracelular, en donde predomina el colágeno [31].

Adicionalmente, las *células de Kupffer* son la población residente de macrófagos del hígado, estas células reconocen patógenos introducidos a través de la circulación portal y pueden tener roles pro- o anti-inflamatorios en la cicatrización de heridas hepáticas. Finalmente, las *células endoteliales sinusoidales* del hígado son una población endotelial especializada con características únicas, que forman placas de tamiz fenestradas en el lumen sinusoidal. Esta estructura crea poros que varían en tamaño de 50 a 180 nm en humanos o 50–280 nm en ratones y ratas. Esta organización es fundamental para el intercambio de proteínas y partículas entre el plasma y los distintos tipos de células del hígado, mientras se mantienen ciertas funciones de barrera [30].

2.2 Estructura funcional hepática

Las células del hígado se organizan alrededor de la unidad funcional del hígado: *el lóbulo hepático*, el cual consiste en hileras de hepatocitos organizados en una forma típicamente hexagonal alrededor de la vena central (**Figura 1**). En los vértices de este hexágono se encuentran las tríadas portales que consisten en ramas estrechamente agrupadas de la arteria hepática, la vena portal y los conductos biliares (**Figura 1**). A diferencia de la mayoría de los demás órganos, el hígado obtiene su suministro de sangre de dos fuentes: la arteria hepática supe al hígado con sangre rica en oxígeno desde el corazón y la vena portal transporta sangre rica en nutrientes desde los intestinos. La sangre rica en oxígeno de la arteria hepática se mezcla con la sangre rica en nutrientes de la circulación portal en el sinusoide antes de fluir sobre las células del lóbulo y drenar hacia la vena central. Esta organización hace que la composición de la sangre que sale del lóbulo tenga características diferentes a las de la sangre que ingresa al lóbulo [9]. A medida que la sangre avanza por el lóbulo, las células utilizan el oxígeno, procesan los nutrientes y van generando metabolitos y productos de desecho [32]. Esto crea gradientes de oxígeno, nutrientes y desechos que se presentan a las células del

hígado en función de su ubicación lobular. Estos y otros gradientes formados a través de los sinusoides del lóbulo, dan como resultado una división de funciones basada en la localización, como un aumento del metabolismo oxidativo en áreas con mayor contenido de oxígeno en la sangre. Esta división de funciones se ha denominado "*zonación metabólica*" [33] y, por lo general, divide al lóbulo en tres "*zonas*" distintas. Cada zona posee hepatocitos con expresión y funcionalidad de genes metabólicos diferenciales [30].

Los hepatocitos de la *zona 1* reciben la sangre con el contenido más alto de oxígeno, de nutrientes y de ciertas hormonas intestinales y del páncreas, por lo cual están adaptados a una alta actividad metabólica y oxidativa. Entre sus múltiples actividades, se destacan la gluconeogénesis, la β -oxidación de ácidos grasos, la síntesis de urea y de colesterol, la secreción biliar y el catabolismo de aminoácidos. Por el contrario, los hepatocitos de la *zona 3* reciben la sangre con la menor concentración de oxígeno y tienen una alta concentración de muchos sistemas enzimáticos de biotransformación tales como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y citocromo P450, por lo que son el lugar de detoxificación y biotransformación de muchos medicamentos y xenobióticos mediante mono-oxidación seguida de conjugación con glutatión, ácido glucurónico o sulfonato. Por lo anterior, la *zona 3* está predispuesta a lesiones por radicales libres y hepatotóxicas. Estos hepatocitos sintetizan glutamina, remueven amonio y también incrementan la glicólisis y la lipogénesis. Mientras que, los hepatocitos de la *zona 2* son responsables de la regeneración de los hepatocitos de la zona 1 y 3 [30, 32, 33].

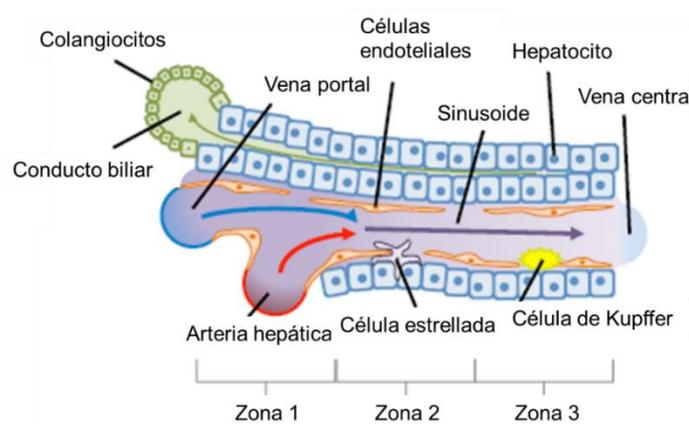


Figura 1. Estructura del lobulillo hepático. Se representa el área de la triada hepática, cada triada contiene, la arteria hepática, la vena portal, el conducto biliar y el sinusoide hepático. La sangre oxigenada de la arteria hepática se mezcla con la sangre rica en nutrientes de la circulación portal drenada del intestino y fluye a través del lóbulo por medio de una red sinusoidal. Esta organización conduce a la formación de una serie de gradientes que incluyen oxígeno, hormonas, nutrientes y productos de desecho.

3. Carcinoma hepatocelular

3.1 Epidemiología

El cáncer hepático primario puede corresponder a varios tipos de tumor como el hepatoblastoma, el CHC y el angiosarcoma o colangiocarcinoma (CCA). El más común de ellos es el CHC, que representa casi el 80 % de todos los casos de cáncer de hígado [34]. El CHC es uno de los tipos de cáncer más agresivos y representa la cuarta causa de muerte relacionada al cáncer en todo el mundo. De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud, el índice de mortalidad es casi igual a la incidencia anual, lo que refleja una elevada letalidad en hombres y en mujeres [35]. El CHC, normalmente, se desarrolla como consecuencia de una enfermedad hepática subyacente y se asocia con mayor frecuencia a la cirrosis. En la actualidad menos del 30% de los pacientes con CHC son diagnosticados en etapas tempranas, cuando se pueden emplear tratamientos potencialmente curativos como: resección quirúrgica, trasplante de hígado y la ablación focal [36].

Los criterios histopatológicos para el diagnóstico del CHC avanzado están bien establecidos y son conocidos [37, 38]; sin embargo, las lesiones pequeñas y tempranas pueden ser mucho más difíciles de detectar que el CHC avanzado.

Además de los criterios histopatológicos, se han empleado diferentes marcadores de diagnóstico. La alfa-fetoproteína (AFP) es el marcador serológico que más se ha utilizado; sin embargo, presenta una baja especificidad y rara vez se encuentra en niveles elevados en etapas tempranas del CHC. Adicionalmente, la AFP no es útil como marcador tisular debido a su baja sensibilidad, aún en el CHC moderadamente diferenciado [39]. Otro marcador que ha sido descrito para la detección temprana del CHC, es el glipicano 3 que ha mostrado buenos resultados; sin embargo, no es útil para diferenciar nódulos benignos de los que tienen potencial maligno debido a que se eleva en ambos casos. Adicionalmente, este marcador es poco sensible para detectar el CHC bien diferenciado [40].

Dado que el CHC suele ser diagnosticado en una etapa avanzada en la mayoría de los casos, es decir cuando se presenta la pérdida de la función hepática, los tumores son muy grandes o múltiples, y cuando la resección quirúrgica y el trasplante de hígado no son opciones de tratamiento. La recurrencia o metástasis es bastante común en pacientes que han tenido una resección quirúrgica y su tasa de supervivencia es del 30 al 40 % a los 5 años después de la cirugía [41].

Las opciones de tratamiento para el CHC avanzado son limitadas y paliativas, por ejemplo, se ha descrito que la tasa de respuesta a un fármaco inhibidor multikinasa como el Sorafenib, es extremadamente baja, aproximadamente el 2% de los pacientes responden al tratamiento [2, 36]. En ese sentido, es de gran importancia

dilucidar los mecanismos de resistencia celular a los fármacos antitumorales y así mismo identificar biomarcadores de diagnóstico temprano y nuevos tratamientos farmacológicos.

3.2 Hepatocarcinogénesis

La incidencia del CHC está correlacionada con la inflamación del hígado inducida por la exposición a uno o varios factores etiológicos, como: las infecciones causadas por el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC), el consumo crónico de alcohol, el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas, la obesidad, las enfermedades metabólicas hereditarias y la diabetes tipo 2 [2, 36, 42].

La hepatocarcinogénesis se considera un proceso de múltiples pasos que involucra mutaciones de genes que controlan la proliferación y/o la apoptosis en los hepatocitos. Ante los causantes de daño crónico, el hígado es sometido a continuos estímulos inflamatorios y regenerativos, comenzando desde las fases iniciales de hepatitis crónica, luego los procesos de fibrogénesis que producen tejido de cicatrización hasta la cirrosis hepática [43].

Después del daño hepático y la consecuente necrosis inducida por alguno de los factores etiológicos, se lleva a cabo un proceso de regeneración celular que implica la proliferación de hepatocitos. Los ciclos continuos de este proceso destructivo-regenerativo fomentan la enfermedad hepática crónica que culmina en cirrosis hepática. La cirrosis se caracteriza por la formación de nódulos de hepatocitos alterados circundados por septos de fibra de varias proteínas como laminina, fibronectina y donde predomina el colágeno. Posteriormente se observan nódulos hiperplásicos, que progresan en nódulos displásicos y, en última instancia CHC, el cual puede clasificarse en tumores bien diferenciados, moderadamente diferenciados y poco diferenciados, el último de los cuales representa la forma más maligna del CHC primario [2]. A causa del constante recambio celular, el acortamiento de los telómeros es una característica de la enfermedad hepática crónica y de la cirrosis [44–46]. La reactivación de la telomerasa en las células neoplásicas se ha asociado con la hepatocarcinogénesis. La pérdida y / o mutación de la proteína tumoral p53 (p53) y la inestabilidad genómica también caracterizan la hepatocarcinogénesis. Se ha demostrado que la pérdida y / o mutación de p53 ocurre durante la progresión del CHC; sin embargo, existe evidencia de que la pérdida y mutación de p53 también podría ocurrir en las etapas iniciales de la hepatocarcinogénesis [47].

Diferentes vías de señalización se han involucrado en la hepatocarcinogénesis, por ejemplo, en un análisis de secuenciación del exoma de 243 tumores hepáticos se identificaron firmas mutacionales asociadas con factores de riesgo específicos,

principalmente con el consumo combinado de alcohol y tabaco y con la exposición a la aflatoxina B1 [48]. Se identificaron 161 genes conductores putativos asociados con 11 vías alteradas recurrentemente. Las asociaciones de mutaciones definieron 3 grupos de genes relacionados con factores de riesgo y se centraron en el gen *CTNNB1* que codifica para la proteína β -catenina 1, en el grupo de consumo crónico de alcohol. La P53 es codificada por un gen supresor de tumores, y Axina-1 (AXIN-1) es una proteína que está codificada por el gen *AXIN1* y se encuentran en el grupo de infección causada por el virus de la hepatitis B. Adicionalmente, los análisis según la progresión del estadio del tumor identificaron la mutación del promotor de TERT como un evento temprano, mientras que el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF3, FGF4, FGF19), o la Ciclina D1 (CCND1) y las alteraciones de P53 y del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2A (CDKN2A) aparecieron en estadios más avanzados en tumores agresivos [48, 49].

3.3 Estrés oxidativo en la hepatocarcinogénesis

El estrés oxidativo es inducido comúnmente en todas las formas de daño hepático crónico y desempeña un papel crucial en la fibrogénesis hepática y en el desarrollo del cáncer [50]. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno pueden generar diferentes metabolitos al reaccionar con distintas biomoléculas, por ejemplo, la reacción entre especies reactivas de oxígeno (ROS) y los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares pueden producir metabolitos reactivos con una capacidad mutagénica, como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE), que pueden servir como marcadores de estrés oxidativo [51]. También los metabolitos provenientes de la reacción de ROS con las bases nitrogenadas del ADN conducen a la acumulación de la 8-hidroxi-20-desoxiguanosina (8-OH-dG) y finalmente, la 3-nitrotirosina se forma por la reacción de especies reactivas de nitrógeno (RNS) con las proteínas [4]. El incremento de especies reactivas intracelulares es frecuente en un estado pre-tumorogénico y además induce el incremento de la proliferación y el crecimiento celular. El incremento de las ROS conduce a adaptaciones metabólicas que favorecen la sobrevivencia de células tumorales y el desarrollo de cáncer, a través de la regulación de una variedad de proteínas implicadas en distintas vías de señalización, como: la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK o ERK1/2), fosfatidil inositol 3 cinasa (AKT/PI3K), la proteína cinasa D (PKD), la fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) y NF- κ B, así como las mutaciones en factores de transcripción y supresores tumorales, incluyendo p53 y NRF2 [52]. NRF2, ha cobrado gran relevancia en la investigación del cáncer, ya que es un factor transcripcional clave en la expresión de diversas enzimas de citoprotección y tiene un papel importante en las

adaptaciones metabólicas que permiten el equilibrio oxido-reducción intracelular y la quimioresistencia a fármacos en el cáncer [53].

4. Estructura y función de NRF2-KEAP1

El sistema NRF2-KEAP1 es un importante mecanismo de defensa contra el desequilibrio oxido-reducción, NRF2 es un potente activador transcripcional que pertenece a la subfamilia de CNC (del inglés *cap " n " collar*) de factores de transcripción de cremallera de leucina de región básica (bZIP). Contiene siete dominios de homología NRF2-ECH (Neh1–7) (Figura 2), cada uno de los cuales cumple funciones distintas. Por ejemplo, el dominio Neh1 comprende la región CNC-bZIP que es necesaria para la unión al ADN y para la asociación con las. El dominio Neh2 contiene dos motivos DLG y ETGE que median la interacción con el regulador negativo de NRF2 conocido como KEAP1 (proteína asociada a ECH de tipo Kelch 1) [12]. El extremo C-terminal del dominio Neh3 es un sitio de transactivación y funciona en conjunto con los dominios Neh4 y Neh5 para activar la transcripción de genes blanco de NRF2, a través de la interacción con la helicasa con cromodominio de unión a ADN 6 (CHD6). El dominio Neh4 y Neh5 proporcionan un sitio de unión para la proteína de la familia Rac GTPasa pequeña 3 (RAC3) y para la proteína de unión a la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (CREBP), lo cual promueve la activación de la vía NRF2-KEAP1, mediante la acetilación de NRF2 [12, 54]. El dominio Neh6 es rico en residuos de serina y está involucrado en la regulación negativa de la estabilidad de NRF2 independiente de KEAP1. El dominio Neh7 está involucrado en la represión de la actividad transcripcional de NRF2 por el receptor retinoide X (RXR α), a través de una asociación física de las dos proteínas **Figura 2** [12, 55–57].

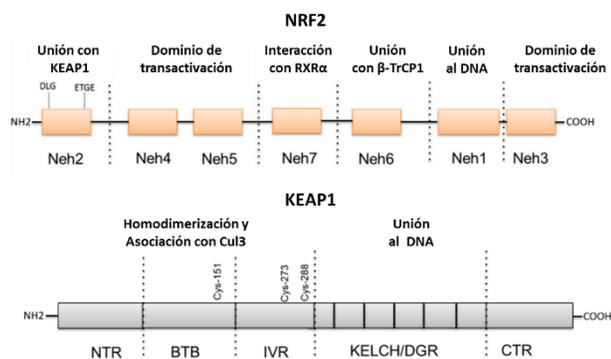


Figura 2. Estructura de NRF2 y KEAP1.

Por otro lado, KEAP1 se compone de tres dominios principales, un dominio N-terminal Broad complex, Tramtrack y Bric-a-brac (BTB), una región central intermedia (IVR) y una serie de repeticiones kelch C-terminales **Figura 2** [58]. Los dominios IVR y BTB, son necesarios para reconocer a los cambios oxido-reducción

intracelulares debido a una serie de residuos de cisteínas reactivas presentes en estos dos dominios. Curiosamente, los inductores de NRF2 comparten una propiedad química común: tienen una fuerte reactividad con los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína [59]. Se ha demostrado que se requieren tres cisteínas específicas para la regulación de NRF2, una en la región BTB (C151) y dos en el IVR (C273, C288). Las cisteínas C273 y C288 son necesarias para la ubiquitinación de NRF2 mediada por KEAP1, mientras que C151 es necesaria para liberar NRF2 [60].

Las repeticiones Kelch de KEAP1 se unen directamente al dominio Neh2 de NRF2, las cuales ejercen regulación negativa de NRF2. Dicha regulación negativa de KEAP1 sobre NRF2 se comprobó mediante la sobreexpresión de KEAP1, lo cual dio como resultado la represión de la acumulación nuclear de NRF2 y la pérdida de actividad transcripcional, mientras que la adición de inductores de las enzimas de fase II causó el efecto contrario [61].

4.1 Elemento de respuesta antioxidante

Cuando NRF2 está activo y ha sido translocado al núcleo celular, reconoce el ARE, también denominado elemento de respuesta electrófilo. Es un elemento regulador *cis* o secuencia potenciadora, que se encuentra en la región promotora de varios genes que codifican a enzimas de la desintoxicación y a proteínas citoprotectoras. La secuencia central del ARE incluye 5'-TGACNNNGC-3' y responde principalmente a inductores de estrés oxidativo. Se ha descrito que la proteína BTB y CNC homólogo1 (BACH1) es un represor transcripcional del ARE, es decir, en condiciones fisiológicas normales, BACH1 forma un dímero con la proteína MAF y evita que NRF2 se una al ARE. También BACH1 sufre una rápida exportación nuclear y degradación proteasomal en respuesta a los inductores NRF2/ARE [62, 63].

De manera interesante, el mapeo global de los sitios de unión de NRF2-ADN determinó que estos sitios estaban enriquecidos en las regiones promotoras proximales y distales. Además, los sitios de unión de NRF2 distales podrían ubicarse en los potenciadores. Los potenciadores al ser dominios genómicos que regulan la transcripción pueden funcionar como plataformas de unión para factores de transcripción [15, 64].

4.2 Activación de la vía NRF2-KEAP1

NRF2 es el principal regulador de la respuesta antioxidante al estrés oxidativo, es bien sabido que los factores estresantes, como las moléculas endógenas derivadas de las especies reactivas de oxígeno (ROS), y los agentes quimiopreventivos del cáncer, como los fitoquímicos (p. ej., ditioleínas,

isotiocianatos y triterpenoides), pueden activar esta vía para proteger a las células contra el daño [65].

Adicionalmente, también se han descrito múltiples mecanismos que promueven la activación aberrante de NRF2, como las mutaciones somáticas en KEAP1 y NFE2L2 [66], la pérdida recurrente del exón 2 de NFE2L2 [67], la metilación del promotor de KEAP1 [68], y la acumulación de la proteína secuestroma 1 (SQSTM1) [69], además de las vías oncogénicas, como Protooncogén KRAS, GTPasa (KRas), B-Raf, serina/treonina cinasa (Braf) y Protooncogén MYC (Myc), inducen la actividad de la vía NRF2-KEAP1 [7].

La vía NRF2-KEAP1 tiene un papel dual, por ejemplo, en condiciones de homeostasis oxido-reducción intracelular, NRF2 está unido a su represor KEAP1 en el citosol en una conformación abierta y por tanto, NRF2 es poliubiquitinado por Cul3-E3 en los residuos de lisina y degradado en el proteasoma [70]. Sin embargo, en condiciones de desequilibrio oxido-reducción, los residuos de cisteína de su co-represor KEAP1 se oxidan, lo cual promueve un cambio conformacional que induce la interacción KEAP1-NRF2 en una conformación cerrada que impide la ubiquitinación de NRF2, lo cual impide su degradación. Este fenómeno disminuye los niveles de KEAP1 capaces de secuestrar a NRF2 sintetizado de *novo*, el cual se transloca al núcleo en donde forma un heterodímero con algún miembro de la familia de proteínas MAF [15, 71]. El heterodímero NRF2-MAF, se une al ARE de los genes blanco que guían la citoprotección celular **Figura 3** [72].

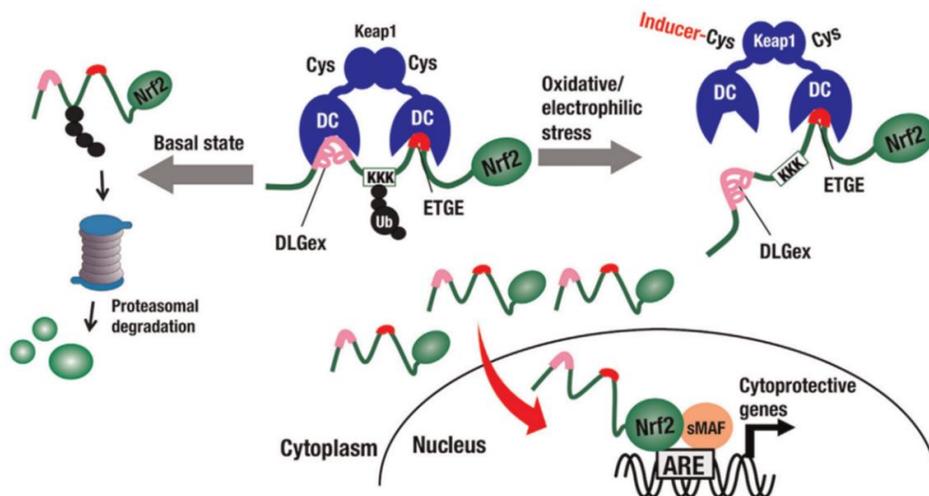


Figura 3. Activación de NRF2. En condiciones de homeostasis oxido-reducción, KEAP1, se une a NRF2 a través de dos sitios de unión distintos, es decir, los motivos DLG y ETGE dentro del dominio Neh2 de NRF2. Ambos motivos se unen individualmente al dominio de repetición de doble glicina (DRG) y c-terminal de KEAP1, que facilita el posicionamiento óptimo de los residuos de lisina entre los dos motivos para su poliubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma. En respuesta al estrés oxidativo y electrofilico, los residuos de cisteína de KEAP1 se oxidan lo cual permite un cambio conformacional que libera a NRF2, como consecuencia NRF2 se transloca al núcleo y forma el heterodímero NRF2-MAF induce la expresión de enzimas citoprotectoras.

4.3 Respuesta antioxidante mediada por la activación de NRF2

La homeostasis redox regulada por NRF2 incluye el sistema del glutatión, que es sintetizado por las enzimas glutamato-cisteína ligasa, las subunidades modificadoras y catalíticas (GCLC), la glutatión sintetasa (GSS) y por otras enzimas del metabolismo del glutatión, como la glutatión reductasa (GSR) y glutatión peroxidasa 1 (GPX-1), así como por otras enzimas antioxidantes, tales como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD-1) y la hemoxygenasa 1 (HMOX-1), que en conjunto contribuyen en mantener el equilibrio redox celular [73]. Las enzimas NAD(P)H-quinona oxidoreductasa 1 (NQO-1), la peroxiredoxina-1 (PRDX-1) [74], la tiorredoxina (TXN), la tiorredoxina reductasa-1 (TXNRD-1) y la epóxido hidrolasa 1 (EH-1) juegan un papel importante en los sistemas de desintoxicación celular y también están bajo la regulación de NRF2 [75].

Adicionalmente, la activación de NRF2 induce directamente una serie de enzimas metabolizadoras de fármacos de fase II, así como actividades metabólicas relacionados al receptor de hidrocarburos de arilo [76]. La proteína metalotioneína (MT) no enzimática rica en grupos tiol y sus reguladores como: el factor de transcripción regulador de metales 1 (MTF-1), la metalotioneína-1A (MT-1A) y la metalotioneína-2A (MT-2A) juegan un papel importante en la desintoxicación de metales pesados y también están bajo la influencia de NRF2 [77, 78]. Por lo tanto, la señalización de NRF2/ARE se considera un sistema de defensa primario contra las agresiones de xenobióticos [79].

4.4 NRF2-KEAP1 en el CHC

Se ha descrito que en diferentes tipos de cáncer como el colorrectal [80], el de pulmón [81], el de cabeza y cuello [82], de cuello uterino [83] y el CHC, exhiben una activación persistente de la vía NRF2 que promueve la transcripción exacerbada de varios genes citoprotectores, lo cual proporciona beneficios de supervivencia y capacidad de expansión clonal a las células cancerosas [72, 84, 85]. No obstante, recientes estudios *in vitro* e *in vivo* han revelado que la supresión de *Nrf2* confiere sensibilidad a la quimioterapia y la radioterapia [86, 87]; también se ha reportado que ratones deficientes de *Nrf2* resisten a la hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en contraste con los ratones normales que desarrollan múltiples tumores [88]. Adicionalmente, la alta expresión de *Nrf2* se correlaciona con el grado de diferenciación tumoral, la metástasis y el tamaño del tumor en pacientes con CHC, lo que ha confirmado el papel oncogénico de *Nrf2*. Por tanto, el aumento de la expresión de este factor de transcripción se ha asociado con un mal pronóstico para los pacientes de CHC [89]. En conjunto, los datos anteriores muestran claramente que la activación de la vía NRF2-KEAP1 es fundamental para la progresión del CHC.

4.5 Genes regulados por NRF2 en el CHC

Existe evidencia de que la actividad transcripcional excesiva de NRF2, promueve el desarrollo de cáncer de hígado al regular la expresión de varios genes [90]. Durante el estrés oxidativo, las células neoplásicas inician una respuesta adaptativa que aumenta la expresión de una gran variedad de genes citoprotectores. La batería de genes comúnmente regulada por NRF2, incluye, sin ser los únicos genes, al de la glutamato-cisteína ligasa (GCL), de la NQO-1 [90] y de la HMOX-1 [91]. También, se ha descrito que la expresión de la prostaglandina reductasa 1 (PTGR1) es regulada por NRF2 y que la sobreexpresión de PTGR1 en CHC aumenta la proliferación celular y desarrolla resistencia a la muerte celular inducida por ROS [4].

Adicionalmente, la metaloproteinasa de la matriz extracelular 9 (MMP-9) es una proteína implicada en la descomposición de la matriz extracelular tanto en procesos fisiológicos como en el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación de tejidos, así como en procesos patológicos, como son la invasión y la progresión del CHC. Además, se ha reportado que la transcripción de MMP-9 es regulada a través de la unión de NRF2 al ARE en la región promotora del gen de MMP-9 [92]. Este mecanismo contribuye a la supresión del estrés oxidativo excesivo en condiciones de inanición de glucosa y protege contra la muerte en las células cancerosas [92]. Se ha sugerido que MMP-9 es un biomarcador pronóstico para predecir la invasividad y la recurrencia del tumor en pacientes con CHC [93, 94].

La PRDX-1 actúa como un sensor del estrés oxidativo y el incremento de su expresión está asociado con la angiogénesis tumoral y la progresión en el CHC, también se ha reportado como un gen regulado por NRF2 [95]. Otro ejemplo es la metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1 (MTHFD1L) que es una enzima involucrada en el ciclo del folato. Durante la proliferación de las células cancerosas del CHC, el ciclo del folato proporciona nutrición a las células mediante el suministro de metabolitos para la síntesis de NADPH y ADN. El promotor del gen de MTHFD1L tiene tres elementos de secuencia ARE y está regulado transcripcionalmente por NRF2 [96].

Además de la activación de la respuesta antioxidante mediada por NRF2, este factor de transcripción contribuye en la adaptación metabólica de los tumores, en donde las células cancerosas demandan la producción de energía para su crecimiento y proliferación. Es este sentido, tanto las principales vías anabólicas que proveen a las células cancerosas de energía como los sustratos para la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos pueden ser indirecta o directamente reguladas por NRF2; como por ejemplo, la vía de las pentosas fosfato (PPP) [97], así como también la lipogénesis de *novo* [98] y la reprogramación metabólica [99]. Por ejemplo, en el CHC inducido en modelos experimentales en ratas y en muestras

clínicas de CHC, se describió que los nódulos preneoplásicos positivos a citoqueratina 19 (*Krt-19*) muestran la activación de la vía NRF2-KEAP1 y exhiben genes desregulados que participan en la reprogramación metabólica, lo que sugiere que NRF2 contribuye al inicio del efecto Warburg durante las etapas tempranas de la hepatocarcinogénesis [79].

Adicionalmente, los análisis derivados de la inmunoprecipitación de cromatina asociado a secuenciación (ChIP-Seq) y de microarreglos de expresión realizados en modelos de líneas celulares o en modelos de hepatocarcinogénesis en rata, han coincidido en la identificación de los genes regulados por NRF2 relacionados a los miembros de la familia de transportadores de aminoácidos, iones, vitaminas y bombas de resistencia a multidroga como son: el portador de soluto familia 7 miembro 11 (SLC7A11), el portador de soluto familia 1 miembro 4 (SLC1A4), el portador de soluto familia 25 miembro 4 (SLC25A4), el portador de soluto familia 22 miembro 23 (SLC22A23), el portador de soluto familia 19 miembro 2 (SLC19A2), el miembro 8 de la subfamilia A del casete de unión a ATP (ABCA8B), el miembro 4 de la subfamilia C de casete de unión a ATP (ABCC4), el miembro 1 de la subfamilia B del casete de unión a ATP (ABCB1) y el miembro 3 de la subfamilia C del casete de unión a ATP (ABCC3), respectivamente [15, 90]. Sin duda, existen otros genes potenciales de tener una regulación transcripcional por NRF2 que aún no han sido descritos y que pueden ser utilizados como posibles blancos terapéuticos o biomarcadores para la detección temprana del CHC.

5. Modelos experimentales de CHC en rata

Los modelos de hepatocarcinogénesis química, han contribuido a estudiar la progresión del CHC. La DEN es un agente genotóxico que ha sido utilizado desde 1960 como inductor del CHC en roedores, se sabe que la biotransformación de la DEN, (**Figura 4**), está mediada por las enzimas del citocromo P450, incluida la CYP2E1 [100]. Debido a las propiedades cancerígenas de las nitrosaminas, la aplicación de estas sustancias, y en particular la DEN, se ha vuelto muy atractivo para inducir la tumorigénesis hepática en roedores como modelo experimental de hepatocarcinogénesis [101].

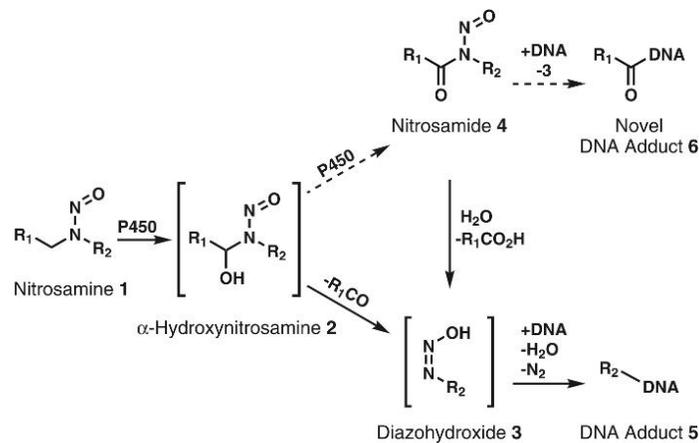


Figura 4. Metabolismo de la DEN. Las nitrosaminas (1) son oxidadas por enzimas del citocromo P450 a α hidroxinitrosaminas (2) que se descomponen espontáneamente en alquildiazohidróxidos (3). Estos compuestos pueden unirse al ADN para formar aductos de ADN. Se plantea la hipótesis de que 2 se oxidan aún más por el citocromo P450 a nitrosamidas 4. Estas pueden unirse directamente al ADN para formar nuevos aductos de ADN o hidrolizarse a 3 para formar aductos de ADN conocidos. R1 y R2 representan cualquier grupo alquilo.

Otro carcinógeno genotóxico es el 2-acetilaminofluoreno (AAF), el cual induce tumores en una variedad de especies y tejidos [102]. Se creía ampliamente que la interacción covalente de los derivados metabólicos de 2-AAF con el ADN es un paso crítico en el inicio de la tumorigénesis; sin embargo, también se ha sugerido que aunque la presencia de los aductos de ADN per se son un requisito previo, necesario para la iniciación del tumor, no son suficientes y se requiere de alteraciones mucho más amplias en la homeostasis celular, principalmente de la incapacidad de las células para mantener y controlar adecuadamente la expresión de la información genética.

Además, se ha descrito que el 2-AAF inhibe la proliferación específica de hepatocitos *in vivo*, y en combinación con una hepatectomía parcial es un inductor de las células progenitoras hepáticas [103], lo cual es un aspecto importante en el mecanismo de promoción tumoral [26]. Por ejemplo, en el modelo del hepatocito resistente para la carcinogénesis de hígado de rata, en donde se requiere de la iniciación con DEN y la promoción tumoral se realiza mediante el tratamiento dietético con 2-AAF combinado con una hepatectomía parcial (PH), se da la ventaja de crecimiento selectivo de los focos preneoplásicos debido a la inhibición de la proliferación de los hepatocitos que rodean a las lesiones, combinada con la resistencia focal a la inhibición inducida por 2-AAF. Esto hace que los focos preneoplásicos, a diferencia del tejido circundante, sean capaces de responder al estímulo proliferativo proporcionado por la PH [27].

La activación metabólica de 2-AAF implica al menos dos pasos, el primero es la N-hidroxilación dependiente del citocromo P-450 que da como resultado la formación de N-hidroxi-AAF (N-OH-AAF) (**Figura 5**). Se considera que esta última molécula química es el metabolito carcinogenopróximo de 2-AAF. El sistema del citocromo P-

450 también puede hidroxilar al 2-AAF en las posiciones 1, 3, 5, 7 y 9 del sistema de anillos de fluoreno. En el segundo paso de la activación metabólica, el N-OH-AAF se metaboliza a través de varias vías para formar intermediarios electrofílicos que pueden reaccionar covalentemente con macromoléculas celulares. En el hígado de rata, estas vías incluyen: (i) la sulfatación del grupo N-hidroxi por la sulfotransferasa citosólica que conduce a la formación de un éster de sulfato altamente reactivo de N-OH-AAF y (ii) la transferencia de N-acetilo por la acetiltransferasa citosólica, que produce el N-acetoxi-2 aminofluoreno reactivo [25–27].

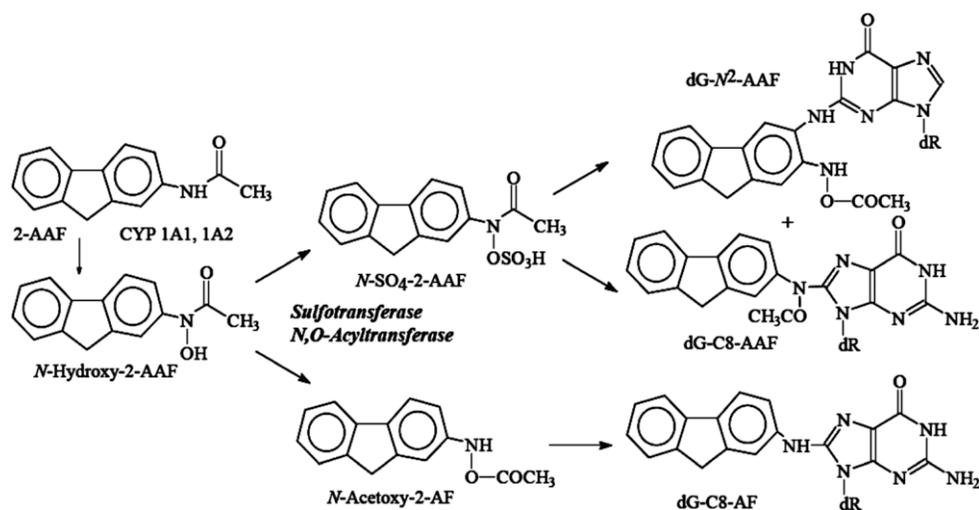


Figura 5. Metabolismo del 2-AFF. La bioactivación del 2-AFF por el CYP450 principalmente por CYP1A1 y CYP2A2 genera ROS, además de un intermediario hidroxilacetilaminofluoreno capaz de reaccionar con el DNA, principalmente formando N-Deoxiguanosina-8-il-2-aminofluoreno.

El modelo conocido como del hepatocito resistente en la rata, tiene como ventaja poder separar operacionalmente las 3 etapas de la carcinogénesis. Con la administración de DEN es posible estudiar la iniciación de las células hepáticas. Con la administración del 2-acetilaminofluoreno y con una hepatectomía parcial se induce la promoción selectiva de las células iniciadas para formar focos de hepatocitos alterados o nódulos pretumorales. Las células de los nódulos tienen el daño genético suficiente que les permite conducirse autónomamente hacia una progresión tumoral [104]. Sin embargo, este protocolo no induce fibrogénesis ni cirrosis. En contraste, el modelo de Schiffer, consiste en la inducción de daño hepático crónico con el uso del carcinógeno DEN (50mg/kg) una vez por semana durante 16 semanas, esto permite generar un daño crónico del hígado y recapitular el proceso patológico similar al del ser humano, ya que de 12 a 16 semanas del tratamiento se produce la cirrosis, mientras que desde la semana 16 se presenta el CHC multinodular [105].

En ese sentido, la comprensión de los mecanismos y características de la historia natural del desarrollo neoplásico durante la carcinogénesis en mamíferos inferiores ha sido esencial para la caracterización del comportamiento de las células tumorales, la identificación de marcadores tumorales tempranos y la experimentación farmacológica de posibles terapias [22, 23].

Antecedente directo

Nuestro grupo de investigación ha descrito que la translocación de NRF2 al núcleo celular aumenta durante la carcinogénesis inducida con el carcinógeno DEN en el modelo de Schiffer [106]; adicionalmente los genes blanco de NRF2 comúnmente reportados como: *Nqo-1*, *Gclc* y *Gstp* también se observaron incrementados, lo cual sugirió que la vía NRF2-KEAP1 se encuentra activa en el modelo de hepatocarcinogénesis química [4]. Adicionalmente, se encontró que el gen de la *Ptgr1*, una oxidorreductasa que está involucrada en el catabolismo de los eicosanoides y la reducción de productos de la peroxidación lipídica como el 4-hidroxinonenal (4-HNE), se sobreexpresa en muestras clínicas y experimentales de CHC [28]. De manera interesante, el gen de la *Ptgr1* contiene un ARE en su región promotora, que es reconocido por el factor de transcripción NRF2. Estos hallazgos sugieren que los genes blanco de NRF2 son potenciales blancos para diseñar métodos de diagnóstico temprano o terapias dirigidas para el CHC. Lo anterior nos conduce a preguntarnos: ¿Cuándo inicia la actividad persistente de NRF2 durante la hepatocarcinogénesis?, ¿Cómo cambia la expresión y localización molecular de este factor de transcripción y sus genes blanco durante la etapa de progresión de la hepatocarcinogénesis? ¿Cuáles otros genes, adicionales a los clásicamente descritos, podrían ser inducidos por NRF2 en la hepatocarcinogénesis?

Justificación

A pesar del reciente avance en la investigación molecular del CHC, este tipo de cáncer se caracteriza por un pronóstico precario, aún con un diagnóstico tardío y tratamientos no curativos para la etapa avanzada de la enfermedad. La activación de la vía de NRF2 sobresale como un mecanismo oncogénico, en donde la localización subcelular de la vía de NRF2 ha sido descrita mediante el uso de modelos de cultivo celular 2D [72, 88, 89]. Aunque estos modelos han dilucidado mecanismos relevantes regulados por esta vía de señalización, la falta de estudios del microambiente tumoral, así como de la matriz extracelular del entorno y de la respuesta de las células inmunitarias, limita el conocimiento sobre la interacción que ocurre entre todos los componentes celulares que contribuyen a la actividad de NRF2. Por lo que en la presente tesis abordará detalladamente a las principales proteínas que participan en la activación de la vía NRF2 como NRF2, KEAP1, MAF

y genes blanco como: *Ptgr1*, *Hmox-1*, *Nqo-1* y *Gclc* en un modelo *in vivo* de hepatocarcinogénesis química que induce daño hepático crónico, fibrosis, nódulos displásicos y CHC multinodular; el cual se asemeja a las secuencias patológicas observadas en la hepatocarcinogénesis clínica en humanos. Adicionalmente, se realizará una búsqueda de genes con secuencias ARE potencialmente regulados por la vía de NRF2, con la finalidad de proporcionar un conocimiento sobre los blancos terapéuticos novedosos y de diagnóstico para el CHC. La identificación y caracterización de los genes regulados por NRF2 en la hepatocarcinogénesis nos permitirá un mejor entendimiento del papel oncogénico de este factor en la transcripción de sus genes blanco y de su mecanismo adaptativo necesario para la tumorigénesis, así mismo se podrán extender las alternativas de sensibilización al tratamiento farmacológico antitumoral.

Hipótesis

La vía de NRF2 se activa de forma temprana durante la progresión del CHC, en donde la pérdida de la interacción con su represor KEAP1 inducirá la localización nuclear de NRF2 y una elevada expresión de genes blanco como *Ptgr1* y *Nqo-1* en las células de los nódulos neoplásicos.

Objetivo general:

Caracterizar la actividad de la vía NRF2-KEAP1 y la expresión de sus genes blanco a nivel histológico y molecular durante la progresión del carcinoma hepatocelular *in vivo*.

Objetivos particulares:

- 1.- Determinar la actividad de la vía NRF2-KEAP1 en la progresión del CHC a través de la expresión de sus genes blanco como *Nqo1*, *Ptgr1* y *Ho1*.
- 2.- Determinar el nivel de las proteínas NRF2, KEAP1, MAF y de sus genes blanco durante la progresión del CHC.
- 3.- Evaluar la co-expresión de los genes blanco de la vía NRF2-KEAP1 en los tumores hepáticos.
- 4.- Caracterizar la translocación *in vivo* citoplasma/núcleo de KEAP1 y NRF2 en el contexto histológico del CHC.
- 5.- Identificar nuevos ARE en los posibles genes regulados por NRF2.
- 6.- Analizar la presencia de complejos de cromatina entre NRF2 y los posibles genes blanco que contengan ARE.

6. Metodología

Modelos animales

Se obtuvieron ratas macho Fischer 344 de la unidad de producción y experimentación animal del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (UPEAL – CINVESTAV–IPN; Ciudad de México, México). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la orientación del comité y del protocolo institucional aprobado para el cuidado de los animales con el número: 0283-18.

Para el modelo de Schiffer se emplearon 25 ratas macho que pesaban entre 180 y 200 g (de 6 a 8 semanas de edad), las cuales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos por tiempo de evaluación (6, 12, 18 y 22 semanas). Los animales se sometieron a una inyección intraperitoneal semanal de DEN (20 mg/kg) durante un total de 16 semanas consecutivas. La eutanasia asistida con anestesia se realizó a las 6, 12, 18 o 22 semanas después de la primera inyección con DEN. Además, a cinco ratas se les administró solución salina como grupo control del hígado normal (NL). Los animales fueron alimentados *ad libitum* (labdiet 5008, Labdiet, EE. UU.) y tuvieron libre acceso a agua fresca y limpia en todo momento. Para la eutanasia, las ratas se desangraron de la vena cava inferior bajo anestesia con éter. Los hígados se extrajeron rápidamente y se lavaron en solución salina (por lo general, menos de 3 min en promedio). Una porción se congeló en 2-metilbutano con nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C para su posterior análisis, una porción adicional se fijó en formaldehído al 4 % y, 24 h más tarde, las muestras se incluyeron en parafina (**Figura 6A**) [93].

Para el modelo del hepatocito resistente se emplearon 20 ratas, a las cuales se les administró una dosis vía intraperitoneal de DEN (200 mg/kg). Luego, se administró por vía intragástrica el genotóxico 2AAF (25 mg/kg), los días 7, 8 y 9, subsecuentemente se realizó una hepatectomía parcial del 70 % en el día 10 (**Figura 6B**). Además, a cinco ratas se les administró solución salina como grupo control del hígado normal (NL). La eutanasia se llevó a cabo a los 4, 9 y 17 meses, cuando los hígados contenían nódulos de hepatocitos y tumores. Las ratas se desangraron de la vena cava inferior bajo anestesia con éter. Los hígados se extrajeron rápidamente y se lavaron en solución salina (por lo general, menos de 3 min en promedio). Una porción se congeló en 2-metilbutano con nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C para su posterior análisis, una porción adicional se fijó en formaldehído al 4 % y, 24 h más tarde, las muestras se incluyeron en parafina [89, 94]

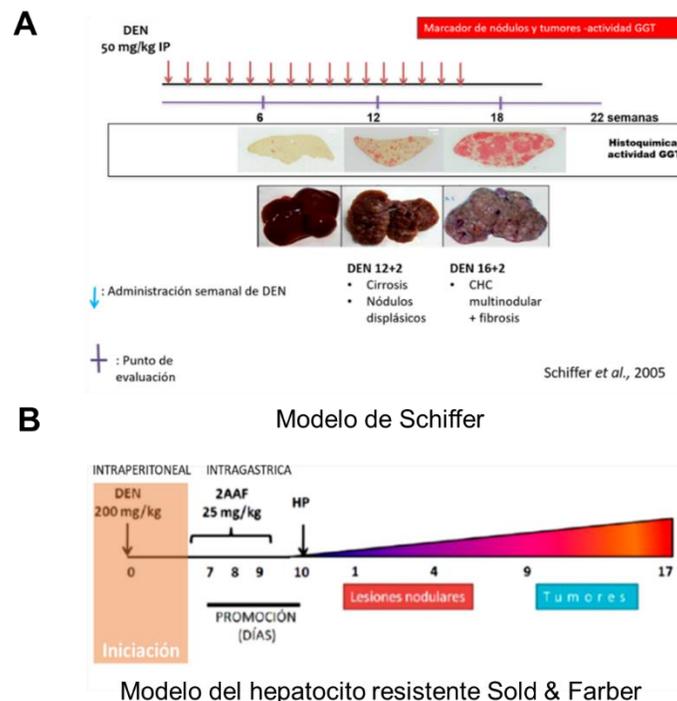


Figura 6. Modelos de hepatocarcinogénesis química. (A) Modelo de Schiffer. Se administró cada semana DEN 50 mg/Kg vía intraperitoneal durante 16 semanas. La eutanasia se llevó a cabo a la semana 6, 12 y 18, dejando un periodo de lavado (libre de cancerígeno) de dos semanas antes de la eutanasia. de la semana 12 y 18, mientras que en la semana 22 se dejó un periodo de lavado de 6 semanas. El seguimiento de la progresión del CHC, se llevó a cabo mediante el uso del marcador tumoral gamma glutamil transferasa (GGT), en donde se puede observar una coloración roja que indica la presencia de focos de hepatocitos alterados en la semana 6 hasta tumores contundentes en la semana 22. **(B) Modelo del hepatocito resistente Sold & Farber.** Para la iniciación del daño hepático, se administró DEN a una dosis de 200 mg/Kg vía intraperitoneal. Para la promoción de hepatocitos alterados, se administró 2-acetilaminofluoreno (2AAF) 25 mg/Kg vía intragástrica a los días 7,8 y 9, seguida de una hepatectomía parcial (HP) del 70 % del hígado al día 10. La eutanasia se llevó a cabo al cuarto mes cuando aparecen lesiones nodulares y al noveno mes cuando los tumores son contundentes.

Western blot

Los extractos de proteínas totales se prepararon en amortiguador de lisis (Tris HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Glicerol 10 %, NP-401%. Na_3VO_4 2 mM, PMSF 1 mM, EDTA 2 mM e inhibidores de proteasas). Los lisados se incubaron en agitación durante 30 min, se centrifugaron a 16000 g durante 10 min a 4°C y se almacenaron a -70°C para análisis posteriores. Las fracciones de proteínas del citosol y núcleo se obtuvieron en amortiguador de lisis A (HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, NP-40 0.15 % e inhibidores de proteasas). Primero se homogeneizaron tejidos hepáticos congelados (~100 mg) en 1.0 ml de amortiguador de lisis A, a 4°C. Las muestras lisadas se incubaron en hielo durante 15 min con mezcla ocasional. Luego, se agregaron 30 μl de solución de NP-40 al 10 %, se agitó vigorosamente durante 15 s, se centrifugó durante 30 s a 16000 g y el sobrenadante se almacenó a -70°C como la fracción de proteína citosólica. Los sedimentos que contenían núcleos intactos se lavaron dos veces en el amortiguador de lisis A, después se re-suspendieron en amortiguador de lisis B (HEPES 20 mM, NaCl 0.4 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 Mm, NP-40 0.5 % e inhibidores de proteasas), se agitaron durante 15 min a 4°C. A continuación, el extracto se centrifugó en una microcentrífuga durante 30 min a 16 000 g y el sobrenadante se almacenó a -70°C como fracción de proteína nuclear para análisis posteriores. Todos los procedimientos se realizaron a 4°C para evitar la degradación de las proteínas [91].

Análisis de Western blot

Después de la cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico, se separaron cantidades iguales de los extractos de proteína desnaturalizada en amortiguador de Laemmli a través de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas se incubaron con los anticuerpos contra PTGR1 (Genetex) (1:1000, GTX118527), KEAP1 (Genetex) (1:1000, GTX54329), Anti-NRF2 (Novus) (NBP1-32822). Los anticuerpos contra HMOX-1 (Abcam) (1:2000, ab13243), Lamin B (Abcam) (1:1000, ab16048), GCLC (Abcam) (1:1000, ab53179), ANXA1 (Novus) (NBP1-90162), ANXA5 (Novus) (NBP2-38248) Anti-MAF F, G y K (Santa cruz) (1:1000, H-100 SC-22831); anti-NQO-1 (Sigma) (1:2000, N5288) o anti-GAPDH (Proteintech) (1:1000, 60004-1-Ig). La carga de proteínas se normalizó con anti-GAPDH o anti-Lamin B para las fracciones citosólica y nuclear, respectivamente. Los análisis densitométricos se llevaron a cabo utilizando el software ImageJ 1.5.

Extracción de ARN

El ARN total se obtuvo a partir de 30 mg de tejido utilizando el reactivo Trizol (15596018; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.). La síntesis de ADNc se preparó a partir de 750 ng de ARN total utilizando un kit de transcripción inversa de ADNc (4368814; Applied Biosystems, Lincoln Center Drive Foster City, CA, EE. UU), utilizando el master mix que se indica en la **Figura 7A**, y las condiciones de reacción en **Figura 7B**.

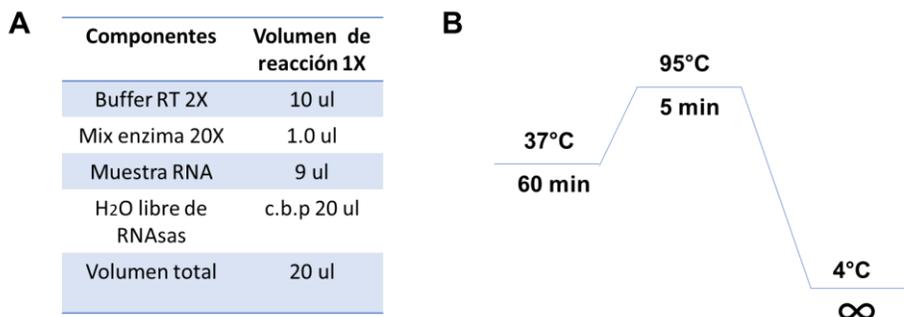


Figura 7. Máster mix para la síntesis del ADNc y condiciones de reacción de la retrotranscripción.

RTqPCR tiempo real

La PCR cuantitativa se llevó a cabo utilizando los ensayos de expresión génica TaqMan en el sistema de PCR en tiempo real y las siguientes sondas de rata marcadas con colorante FAM (límite exón-exón) para los genes *Nrf2* (Rn 00582415-m1), *Hmox-1* (Rn00561387_m1), *Nqo-1* (Rn00566528_m1), *Keap1* (Rn00589292_m1), *Maf k* (Rn00595506_m1), *Maf g* (Rn07296919_m1), *Maf f* (Rn01505733_m1) y *Hprt1* (Rn01527840_m1). Los datos de expresión génica se normalizaron con el gen *Hprt1* utilizando el método comparativo $\Delta\Delta CT$. El master mix se preparó de acuerdo con las especificaciones de la **figura 8A**, y se emplearon las condiciones de PCR descritas en la **figura 8B**:

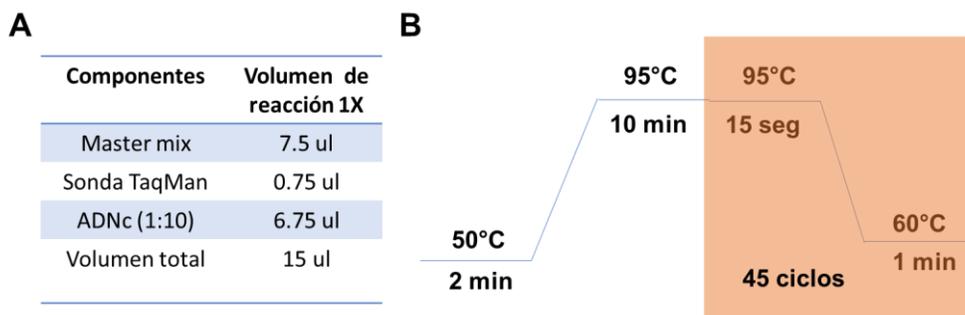


Figura 8. Máster mix para PCR tiempo real y condiciones de PCR

Mapeo de ARE de genes potenciales blanco de NRF2

Para identificar genes con los ARE que reconoce NRF2 se empleó un listado de genes obtenido de un análisis de expresión de genes en un modelo de hepatocarcinogénesis, en donde se utilizaron microarreglos (Rat Gene 1.0 ST, Affymetrix) [107]. De los genes diferencialmente expresados se hicieron análisis empleando los siguientes programas bioinformáticos: El EPD Eukaryotic Promoter Data Base lo empleamos para obtener la región promotora en donde se encuentran secuencias potenciales de ARE (<https://epd.epfl.ch//index.php>) En JASPAR, obtuvimos las matrices de puntuación, la cual nos da la puntuación de la existencia de cada nucleótido en cada posición (<https://jaspar.genereg.net/>), y por último utilizamos el QUICK, que nos brinda un análisis completo sobre las secuencias específicas y la distancia en pares de bases a las que se une NRF2 (http://rsat.sb-roscoff.fr/matrix-scan-quick_form.cgi). Posteriormente, para identificar las vías de señalización en las que participan los posibles blancos transcripcionales de NRF2 empleamos un análisis en REACTOME (<https://reactome.org/PathwayBrowser/>). Finalmente, para establecer una correlación entre los genes comúnmente descritos como blancos de regulación transcripcional de NRF2 y las ANXAs empleamos un análisis de asociación de co-expresión en cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>).

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Para corroborar el análisis *in silico* de los genes blanco de NRF2 se llevaron a cabo ensayos de ChIP-PCR, para ello se realizó el entrecruzamiento y fragmentación de cromatina. Se utilizaron 100 mg de tejido hepático congelado que se cortó en trozos pequeños y se pasaron a tubos eppendorff. Se adicionaron 1.5 ml de la solución mix (formaldehído al 1 %/ PBS1X) a los tubos y se dejaron en agitación moderada a temperatura ambiente durante 10 min. Para detener el entrecruzamiento, se adicionó glicina 125 mM y se incubó en agitación moderada durante 10 min a temperatura ambiente. Después, los tubos fueron centrifugados durante 5 min a 5000 rpm a 4°C, después se retiró el sobrenadante y se lavó una vez el pellet agregando 1.5 ml PBS 1X frío con inhibidores de proteasas y posteriormente se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se agregó a cada tubo 800 µl-1000 µl de amortiguador de lisis y se incubó de 3-5 min en hielo, posteriormente, el tejido se homogenizó perfectamente. De este homogenado, la cromatina fue fragmentada por sonicación durante 10 min en el Covaris S220, utilizando los siguientes parámetros: temperatura: 4°C, duty cycle: 5 %, peak power: 140 watts y cycle burst: 200.

Para la inmunoprecipitación, se transfirió un equivalente de 50 µl de perlas magnéticas “Dynabeads” por muestra (proteína A o G dependiendo del anticuerpo usado). Se utilizó el concentrador magnético, para capturar las dynabeads y retirar

el sobrenadante, posteriormente se adiciono 1 ml de solución de bloqueo y se re-suspendieron las perlas. Los tubos con perlas se dejaron incubando 1 h en agitación suave a 4°C con la misma solución de bloqueo. Después del bloqueo, las perlas se dejaron incubando en solución de bloqueo con el anticuerpo de 3-5 h a 4°C en agitación suave. Después de la unión de las perlas y el anticuerpo, se lavó el complejo perla-anticuerpo una vez con una solución 9:1 amortiguador de dilución: amortiguador de lisis. Se tomaron entre 10 µg a 15 µg de cromatina por cada reacción de inmunoprecipitación y se adicionó hasta un volumen de 100 µl con amortiguador de lisis y se centrifugó 5 min a 13,200 rpm para eliminar los restos celulares. Se diluyeron los 100 µl de la cromatina con 900 µl de amortiguador de dilución, y esta solución se adicionó a las perlas acopladas al anticuerpo y se dejaron en agitación suave a 4°C toda la noche. Para la purificación del ADN inmunoprecipitado, se lavaron las perlas 4 veces con amortiguador de lavado y una vez con amortiguador de lavado final. Se eluyó el complejo perla-anticuerpo-proteína-ADN, por la adición de 100 µl de amortiguador de elución y posteriormente, se incubó con RNasa A y proteinasa K (500 µg/ml) a 37°C 1 h; para revertir el entrecruzamiento se incubo a 65°C durante 6 h. Finalmente, para extraer el ADN se utilizaron las columnas quiaquick, el ADN se eluyó en 30 µl de agua estéril y este fue utilizado para reacciones de PCR.

PCR punto final

Para evaluar la secuencia del ARE de los genes que reconoció NRF2, se llevó a cabo un diseño de primers que flanquean la secuencia ARE para los genes de interés (**Tabla 1A**) y una PCR de punto final empleando el ADN inmunoprecipitado (**Figura 9**).

Diseño de primers		Componentes		Volumen de reacción 1X	
Anxa1		H ₂ O		c.b.p	20 ul
5'-TCC TCC CAG GAA TGG TAC AG-3' (R)		Buffer 5X			4 ul
5'-CCC CTC TCC CTT TTC TTT GT-3' (F)		dNTP's			0.16 ul
Anxa5		Primer F			1 ul
5'-GGC AGT ACT CTC CGT GCA AC-3' (R)		Primer R			1 ul
5'-TCA CTC AGC GAA AGT TTG GT-3' (F)		ADN			1 ul
Gclc		Volumen total			20 ul
5'-CGT AGT TGT GGT AGC GCT GG-3' (R)					
5'-ACG ACG CAC ACA TCT GAA AC-3' (F)					
Ptgr1					
5'- GAG GCG ATG GCA TCT CTA AA-3' (R)					
5'- GGC CAG GGA AAT CCT TCA TA-3' (F)					

Tabla1. Diseño de primers y Máster mix para PCR punto final

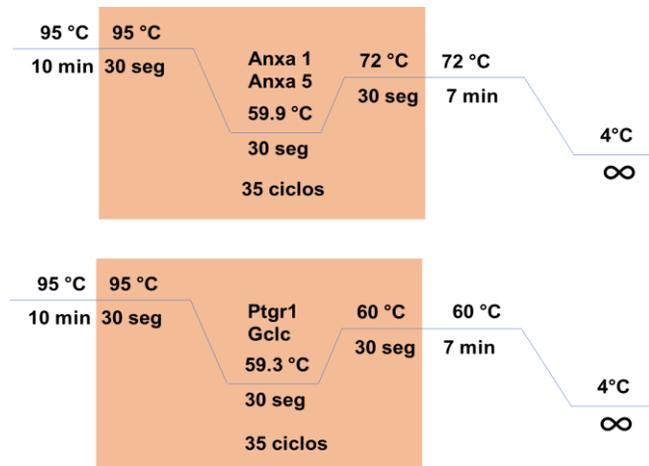


Figura 9. Condiciones de PCR punto final

Inmunofluorescencia (IF)

La técnica IF se utilizó tanto en tejidos incluidos en parafina como en tejidos congelados. Se obtuvieron secciones de hígado congeladas de 7 μm de espesor en un criostato a -19°C , se enjuagaron dos veces en PBS helado, se fijaron con formaldehído 4 % en PBS (pH 7.4) a 4°C durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron y se incubaron durante 1 h en solución de lavado [Triton X -100 0.25 % PBS (PBST)]. Las secciones se bloquearon con BSA 1 % en PBST durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, anti-NRF2 (1:25; GTX103322-N2C2) y anti-KEAP1 (1:25; GTX 60660); se incubaron toda la noche a 4°C en solución de bloqueo. Después del lavado, las secciones se incubaron en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 594 (anti-conejo generado en burro) o Alexa Fluor 488 (anti-ratón generado en burro) (1:300, ab150064 y ab150105). Mientras que el citoesqueleto de actina se tiñó con Phalloidin-iFluor 647 (1:1000, ab176759), el ADN nuclear se tiñó con DAPI (1:1000, 62247) durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, los tejidos se enjuagaron, drenaron y fijaron utilizando Fluoroshield Mounting Medium (ab104137). Las imágenes se capturaron con microscopía ZEISS Axio-A1. Los tejidos incluidos en parafina tienen la ventaja de preservar la arquitectura del tejido hepático. Los tejidos fueron embebidos en parafina: las muestras de tejido se fijaron en formalina 4 % y luego se incluyeron en parafina. Los bloques se cortaron en secciones de 5 μm de espesor, se desparafinaron y se rehidrataron gradualmente. Después de la rehidratación del tejido, los antígenos se desenmascararon y procesaron de acuerdo con el kit Mouse on-Mouse HRP-Polymer Bundle (MM510; BioCare Medical, Concord, CA). Las secciones se bloquearon con BSA 1 % en PBST durante 30 min a temperatura ambiente.

Luego, las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C en solución de bloqueo con los anticuerpos anti-MAF F, G y K (1:25, H-100 SC-22831). Los anticuerpos anti-NRF2 (1:25; GTX103322-N2C2), anti-KEAP1 (1:25, GTX 60660) y anti-PTGR1 (1:100; GTX118527), anti-NQO-1 (3 µg/µl; N5288), y anti-HMOX-1 (5 µg/µl, ab13243), anti-ANXA1 (NBP1-90162) y anti-ANXA5 (NBP2-38248).

Después del lavado, las secciones se incubaron en una solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad y posteriormente con los anticuerpos anti-conejo de burro con marca Alexa Fluor 594 1:300 o Alexa Fluor 488 anti-ratón de burro (1:300, ab150064 o ab150105). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (1:1000, 62247) durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, los tejidos se enjuagaron, drenaron y fijaron utilizando Fluoroshield Mounting Medium (ab104137). Las imágenes se capturaron con un microscopio ZEISS Axio-A1.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media ± SEM. Se aplicó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba post hoc de Tukey para todos los cálculos. La significancia se definió como un valor de $p < 0.05$.

7. Resultados

La expresión de genes blanco de NRF2 aumenta durante la progresión del CHC

La inyección intraperitoneal semanal de DEN induce focos de hepatocitos alterados en el hígado en la semana 6 (W6), fibrosis y nódulos preneoplásicos en la semana 12 (W12) y CHC multinodular en la semana 18 (W18) después de la primera inyección [108]. Para determinar si la activación de la vía NRF2-KEAP1 era independiente del carcinógeno, incluimos un grupo adicional, que se sometió a 16 inyecciones semanales de DEN y las siguientes seis semanas estuvo libre de carcinógenos hasta la eutanasia en la semana 22 (W22). Usando RT-qPCR, medimos los niveles de los ARNm de NRF2 (*Nfe2l2*), *Keap1*, *Maff*, *Mafg* y *Mafk*, y de ARNm producto de los genes regulados por NRF2 que contienen ARE, como *Nqo1*, *Hmox1*, *Gclc* y *Ptgr1* en muestras de hígado obtenidas a las W12, W18 y W22 después del inicio de inducción de hepatocarcinogénesis por DEN. A continuación, se comparó la expresión de estos genes con la del hígado normal (NL) (**Figura 10**). La expresión del gen *Nfe2l2* disminuyó un 30 % en la W22 ($p < 0.05$) (**Figura 10A**). Mientras que la expresión de *Maff* aumentó más de 10 veces en la W22 ($p < 0.05$), las de *Mafg*, *Mafk* y *Keap1* no mostraron un incremento significativo. En cuanto a la expresión de los genes regulados por NRF2 aumentaron en las muestras de la W12, W18 y W22 en comparación con el NL. Como se muestra en la **figura 10A**, *Ptgr1* y *Nqo1* aumentaron significativamente ($p < 0.001$), 3 y 10 veces respectivamente, desde la W12, mostrando su mayor incremento (> 6 y 20 veces, $p < 0.001$, respectivamente) entre la W18 a W22. La expresión de *Hmox1* aumentó significativamente (1.5 veces, $p < 0.002$) solo en la W22 (**Figura 10A**). La expresión de *Gclc* mostró una tendencia de incremento no significativa. Cuando se comparó el nivel de la proteína NRF2 en los extractos de proteína total, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (**Figura 10B**). Similarmente al aumento de ARNm, se observó un incremento en los niveles de las proteínas NQO-1, HMOX1, PTGR1 y GCLC. La **figura 10B** muestra que el nivel de estas proteínas aumentó de 2 a 3 veces, de la W12 a la W18 ($p < 0.05$). Así, el aumento gradual de la expresión de *Nqo1*, *Hmox1*, *Ptgr1* y *Gclc*, así como el incremento de los niveles de sus proteínas, indican que la vía NRF2-KEAP1 está activa durante la progresión de la hepatocarcinogénesis.

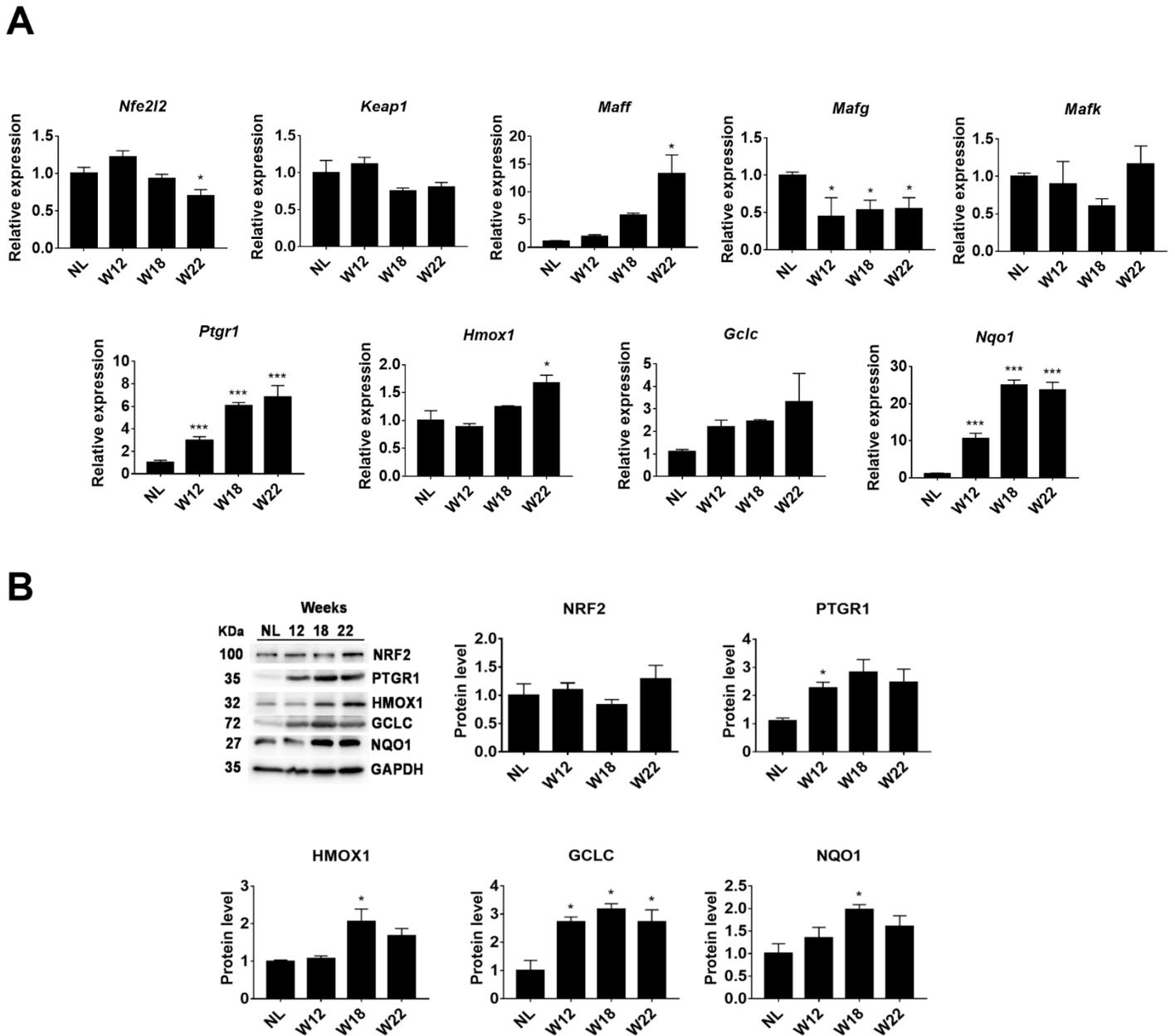


Figura 10. Expresión de genes regulados por NRF2. (A) Expresión de los genes NRF2 (*Nfe2l2*), *Keap1*, *Ptgr1*, *Hmox1* y *Nqo1* durante la hepatocarcinogénesis. La expresión génica se midió en la W12, W18 y W22 después de la inducción de CHC. Se incluyeron muestras de hígado normal (NL) como controles. Los datos se obtuvieron utilizando el método 2- $\Delta\Delta$ CT considerando la expresión de *Hprt1* como referencia constitutiva. (B) Imágenes representativas de los niveles de proteína NRF2, PTGR1, HMOX1, GCLC y NQO1. Las proteínas se detectaron mediante análisis de transferencia Western. Los gráficos indican el promedio \pm SEM obtenido a partir de la densitometría semicuantitativa de las bandas de proteínas. Se usó el nivel de GAPDH doméstico para normalizar los niveles de proteína de interés. n = 3 animales por grupo. *p < 0.05, ***p < 0.001 estadísticamente diferente del grupo NL.

Las proteínas blanco de NRF2 como PTGR1, NQO1 y HMOX1 se localizan en los nódulos durante la progresión del CHC

NRF2 regula la expresión de PTGR1 en hepatocarcinogénesis y promueve la proliferación celular y la resistencia al estrés oxidativo [28]. La **figura 11A**, muestra un aumento gradual de PTGR1 en focos de hepatocitos alterados desde la W6, en nódulos de hepatocitos en la W12 y finalmente en nódulos tipo CHC más grandes en la W18 y W22. Dado que los niveles de proteína total de HMOX-1 y NQO-1 aumentaron significativamente en la W18 (**Figura 10B**), determinamos su localización celular (**Figura 11B**). El análisis de inmunofluorescencia mostró que estas proteínas se localizaron principalmente dentro de los nódulos de CHC y poco en el tejido circundante nodular (NST), donde apenas se observó su presencia. Además, HMOX-1 se detectó en células no parenquimatosas del tejido circundante, las cuáles podrían corresponder a macrófagos M2, como se ha reportado anteriormente [96].

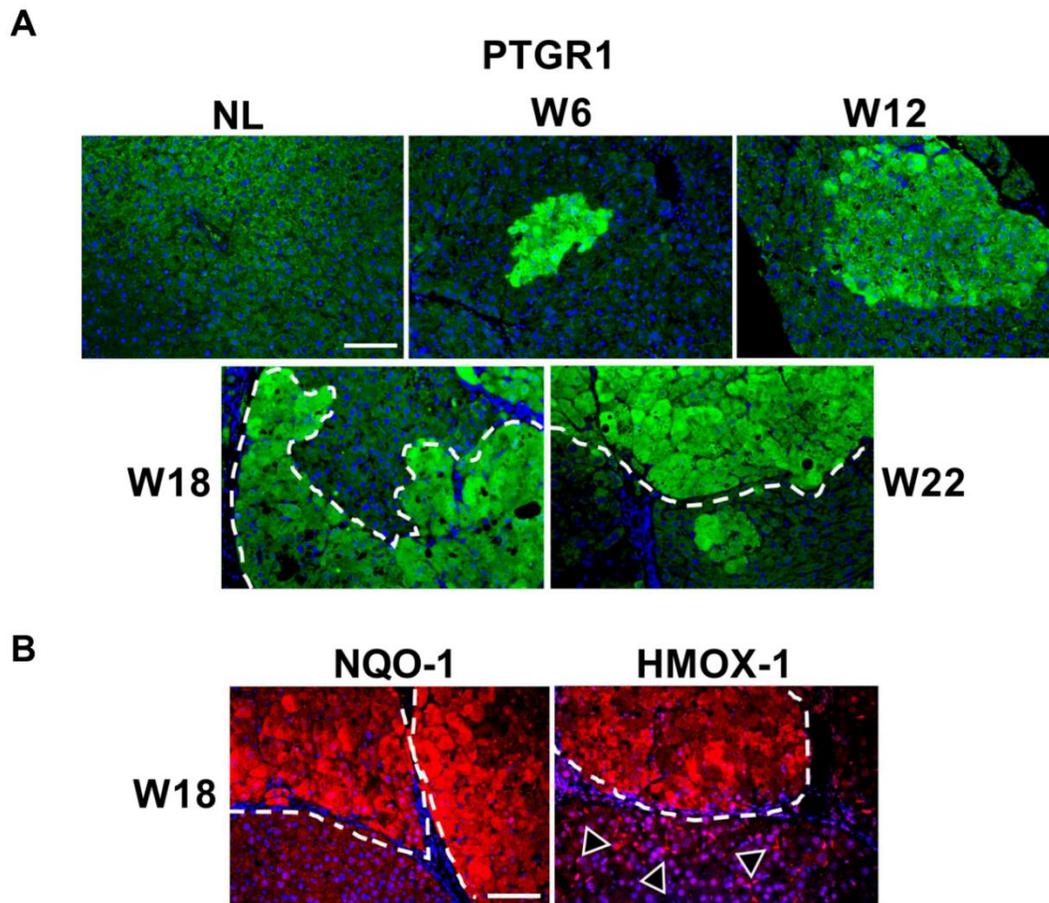


Figura 11. Expresión de PTGR1, NQO1 y HO-1 en nódulos durante la progresión del CHC. (A) La inmunofluorescencia de PTGR1 se marcó en verde (Alexa 488) en los grupos NL, W6, W12, W18 y W22. Las líneas punteadas blancas delimitan los nódulos de CHC. La barra de escala indica 50 μ m. La ampliación de la imagen es 10X. (B) HMOX-1 y NQO-1 se etiquetaron en rojo (Alexa 594) en secciones en serie del grupo W18. La barra de escala indica 100 μ m. La ampliación de la imagen es 20X. Puntas de flecha negras indican células no parenquimatosas.

PTGR1 y NQO1 co-localizan diferencialmente con NRF2 en los nódulos de CHC

Considerando que tanto PTGR1 como NQO1 son regulados por el mismo factor de transcripción NRF2, analizamos la co-expresión de estas proteínas; para esta determinación se seleccionaron tejidos hepáticos con múltiples nódulos de CHC a partir de la W18 (**Figura 12**). La mayoría de los nódulos de CHC (alrededor del 50 %) fueron doblemente positivos para PTGR1+/NRF2+ o NQO1+/NRF2+ (**Figura12 C**). De hecho, las secciones de hígado en serie muestran que los nódulos positivos para PTGR1 también fueron positivos para NQO1. Interesantemente, identificamos que el 20 % de los nódulos expresan el fenotipo PTGR1+/NRF2- o NQO1+/NRF2-. La ausencia de NRF2 sugiere que la proteína de NRF2 podría tener un tiempo de vida media menor que las proteínas blanco. Además, se observó una proporción mínima (menos del 10 %) de nódulos que expresaban exclusivamente NRF2, es decir, PTGR1- /NRF2+ o NQO1- /NRF2+. Este análisis de co-expresión denota una elevada heterogeneidad inter-nodular, en donde el aumento de la expresión de PTGR1, NQO-1 y HMOX-1 en las células de los nódulos del CHC indica que la respuesta antioxidante mediada por NRF2 se activa de forma heterogénea y clonal en el CHC multi-nodular inducido con DEN.

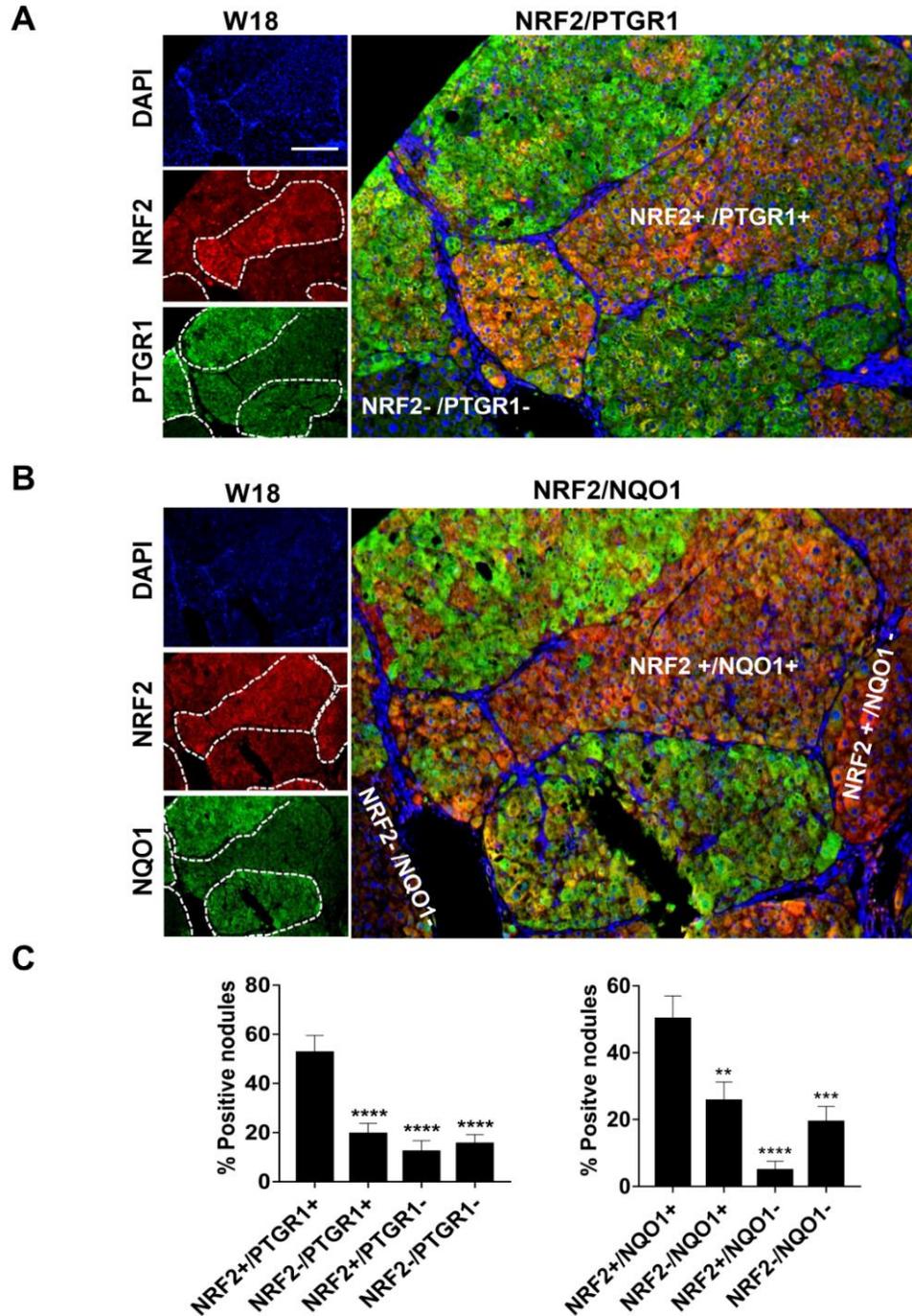


Figura 12. Co-localización nodular heterogénea de NRF2 con PTGR1 y NQO1. Inmunofluorescencia doble en secciones seriadas de tejidos de W18. Las secciones seriales representativas muestran la co-localización de (A) PTGR1 con NRF2 y la de (B) NQO1 con NRF2. La heterogeneidad inter-nodular se muestra como nódulos doblemente negativos (oscuro), nódulos doblemente positivos (naranja) y nódulos positivos para PTGR1 o NQO1 (verde fluorescente). Las líneas punteadas delimitan los nódulos de CHC. La barra de escala blanca representa 50 μ m. La ampliación de la imagen es de 10x. (C) Los gráficos muestran el porcentaje de nódulos que expresan los fenotipos indicados. Las etiquetas positivas se cuantificaron a partir de 5 campos de 10x seleccionados al azar por muestra individual. n = 3 animales por grupo. **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 estadísticamente diferente del fenotipo doble positivo.

La localización subcelular de NRF2, MAF y KEAP1 aumenta en las células de los nódulos de CHC

La alta expresión de NRF2 se ha correlacionado con la diferenciación tardía del tumor, el tamaño y la metástasis, y se asocia con un mal pronóstico clínico [69]. Nuestros análisis de IF y microscopía revelaron que las células en los nódulos de CHC expresaron altos niveles de NRF2, de W12 a W22 post-tratamiento (**Figura 13A**). El análisis de la compartimentalización de NRF2 mostró que el porcentaje de núcleos positivos tiende a aumentar en un 20 % a las W12 y W18 en comparación con NL (**Figura 13B**). Así mismo, observamos que del 60 al 80 % de las células dentro de los nódulos fueron positivas para la proteína MAF desde la W12 a la W22 ($p < 0.01$) (**Figura 13 B**). Además, el nivel de KEAP1 no fue significativamente diferente dentro de las células de los nódulos en comparación con las que los rodean.

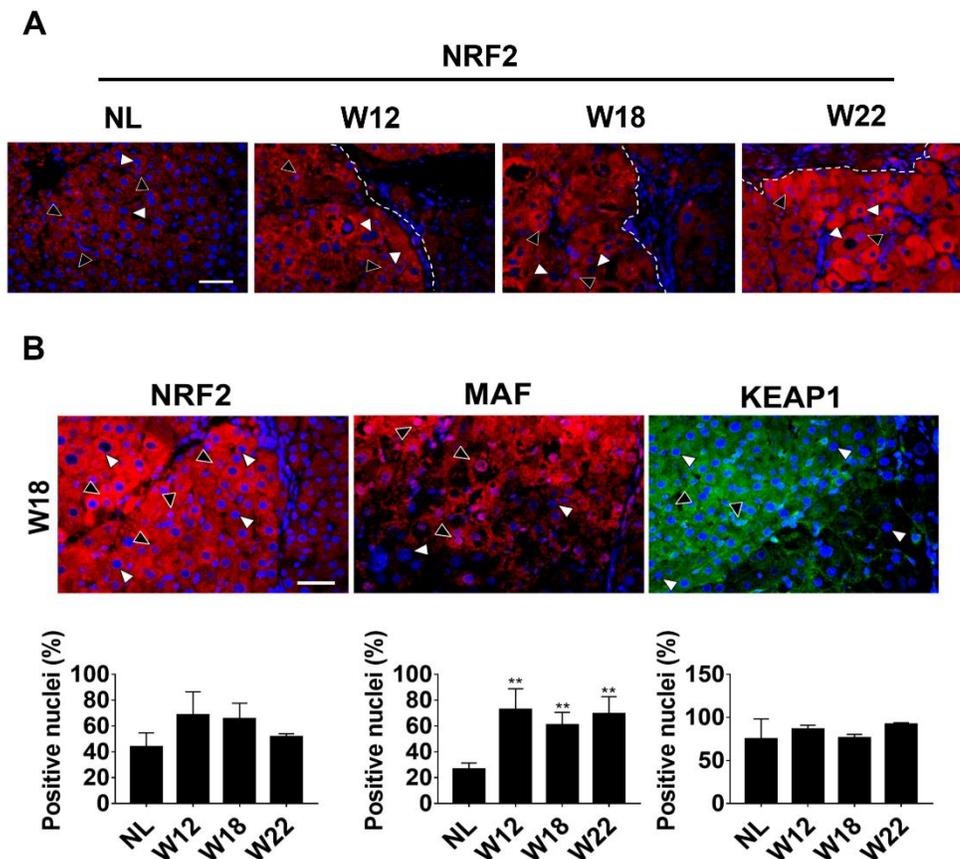


Figura 13. Localización de NRF2, MAF y KEAP1 en los nódulos de CHC. (A) Inmunofluorescencia de NRF2 en sección incluida en parafina de tejidos NL, W12, W18 y W22. (B) Inmunofluorescencia de NRF2 y MAF (F, G y K) en rojo (Alexa 594), KEAP1 en verde (Alexa 488) detectada en tejidos de 18 semanas. La barra de escala representa 200 μ m. La ampliación de la imagen es de 40x. Las puntas de flecha blancas y negras indican núcleos negativos (teñidos de azul) y positivos (teñidos de púrpura), respectivamente. Los gráficos muestran el porcentaje de núcleos positivos para NRF2, MAF y KEAP1. $n = 3$ animales por grupo. ** $p < 0.01$ estadísticamente diferente del grupo NL.

Análisis del peso molecular de NRF2 en tejido hepático de rata

De acuerdo al marco de lectura del gen *Nfe2l2*, la proteína NRF2 debería tener un peso molecular de 55-56 kDa [109]. Sin embargo, el patrón migratorio de NRF2 en geles SDS-PAGE ha causado confusión, ya que a menudo aparecen bandas de diferente tamaño y un estudio afirma que el tamaño biológicamente relevante es de alrededor de 95-110 kDa [110]. En ese sentido, se ha descrito que los diferentes pesos moleculares de NRF2 están dados en función de sus modificaciones postraduccionales [106, 111]. En este trabajo evaluamos las bandas de proteína predominante en extractos de hígado de rata mediante Western Blot utilizando varios anticuerpos. En primera instancia el anticuerpo D1Z9C detectó la proteína de 100 kDa en las líneas celulares de origen humano, HepG2 y A549; sin embargo, en el extracto hepático W18 de rata detectó una banda superior a 50 kDa (**Figura 14 A**). Aunque la proteína de 50 kDa podría corresponder al NRF2 no ubiquitinado [112], evaluamos la expresión de NRF2 utilizando el anticuerpo de Novus (NBP1-32822) (**Figura 14 B**) Como prueba de la activación de NRF2, la línea celular C9 (una línea epitelial obtenida de hígado de rata) se trató con t-butil-hidroquinona (TBHQ), un inductor bien conocido de la vía NRF2. Como se muestra en la **figura 14 B**, TBHQ aumenta la cantidad de proteína NRF2 de 100 kDa en el cultivo celular; además, se detectó una migración de una banda similar en los extractos de hígado de rata en la W18. Así, aunque podrían existir varias especies de NRF2, se analizaron los cambios de la proteína de 100 kDa en las muestras hepáticas

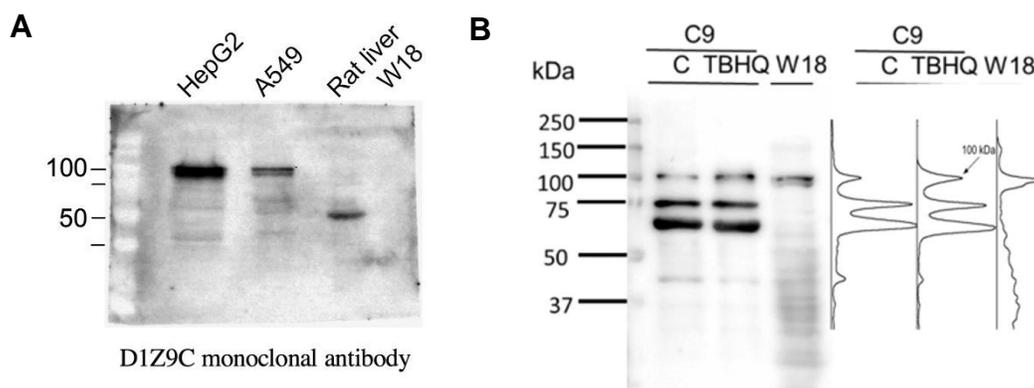


Figura 14. Peso molecular de NRF2. (A) El anticuerpo D1Z9C detectó la proteína de 100 kDa en las líneas celulares de origen humano, HpeG2 y A549 y en el extracto hepático W18 de rata detectó una banda superior a 50 kDa. (B) El anti-NRF2 NBP1-32822 de Novus Biologicals detecta predominantemente una banda de alrededor de 100 kDa en la proteína total tanto del grupo W18 como de la línea celular C9. En esta línea celular, se detectaron tres bandas, pero la banda de 100 kDa aumentó cuando las células se trataron con 50 μ M de t-butilhidroquinona (TBHQ), un inductor bien conocido de la vía NRF2.

Los niveles de las proteínas NRF2, KEAP1 y MAF aumentan durante la progresión del CHC

Para confirmar la localización subcelular de las proteínas NRF2, KEAP1 y MAF durante la progresión de la hepatocarcinogénesis, detectamos sus niveles en las fracciones celulares citosólicas y nucleares para NRF2 y KEAP1, y la localización nuclear para MAF (F, G, K) a la W12, W18 y W22 después de la inducción del CHC experimental. Los niveles de NRF2 citosólico aumentaron significativamente en un 100 % a la W22 ($p < 0.01$), mientras que los niveles de KEAP1 aumentaron de la W12 a la W22 ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente) (**Figura 15A**). Congruentemente la actividad de NRF2 y el nivel de NRF2 nuclear aumentó gradualmente desde la W12 a la W22 ($p < 0.05$) (**Fig. 15B**). De manera similar, los niveles de MAF ($p < 0.05$) y KEAP1 ($p < 0.01$) aumentaron significativamente en la fracción nuclear a la W18. En conjunto, estos datos indican que las proteínas NRF2, MAF y KEAP1 aumentan su localización nuclear y corroboran que la vía NRF2-KEAP1 se activa durante la progresión del CHC.

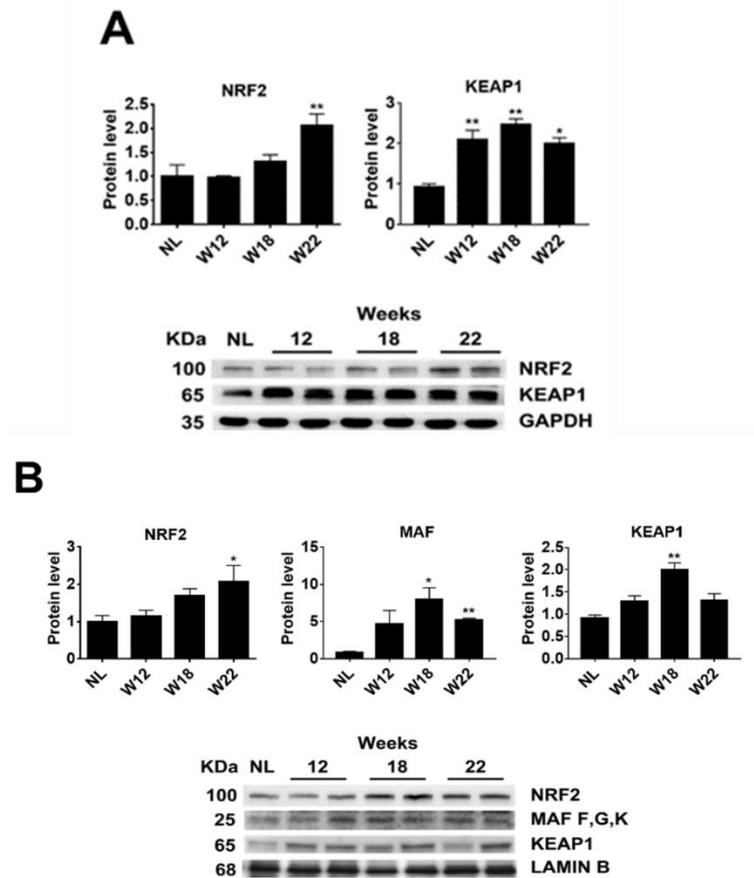


Figura 15. Localización citosólica y nuclear de NRF2, KEAP1 y MAF durante la hepatocarcinogénesis. (A) Localización citosólica de las proteínas NRF2 y KEAP1; (B) localización nuclear de NRF2, KEAP1 y MAF de proteína hepática extraída de tejidos NL, W12, W18 y W22. Las proteínas se detectaron mediante análisis de transferencia Western. Los gráficos indican el promedio \pm SEM obtenido a partir de la densitometría semicuantitativa de las bandas de proteínas. Los niveles de limpieza de GAPDH y Lamina B se usaron para normalizar los niveles de proteína citosólica y nuclear de interés, respectivamente. $n = 3$ animales por grupo. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ estadísticamente diferente del grupo NL.

Las células del CHC denotan alteración en la interacción de KEAP1 con el citoesqueleto de actina cortical

KEAP1 regula la actividad transcripcional de NRF2 a través de su dominio de doble repetición de glicina [37] y se asocia con el citoesqueleto de actina cortical [113] , que proporciona un andamiaje para cumplir su función represora. Para determinar el estado de asociación de KEAP1 con el citoesqueleto de actina cortical, marcamos a KEAP1 en verde (Alexa 488) y a la actina filamentosa (F-actina) con faloidina en rojo (iFluor 647). La **figura 16A** muestra que KEAP1 co-localiza homogéneamente con el citoesqueleto de actina, el cual está estructurado de forma cortical dando forma a los hepatocitos en el grupo NL. De manera similar, en las células del tejido circundante al nódulo (NST) de los hígados de la W18, estas proteínas co-localizaron (**Figura 16B**). Contrariamente a la co-localización homogénea observada en los hepatocitos normales, las células del CHC de la W18 mostraron una distribución alterada y una reducción significativa en la co-localización entre KEAP1 y el citoesqueleto de actina cortical (**Figura 16C**). Además, las células de NL y NST mostraron una localización nuclear de KEAP1 más elevada que la observada dentro de las células neoplásicas (**Figura 16C**). Estos datos sugieren que la disrupción del citoesqueleto de actina cortical en las células de los nódulos puede estar alterando el andamio KEAP1-F-actina y ser un mecanismo adicional por el cual NRF2 se libera de su represor y se transloca al núcleo de manera persistente.

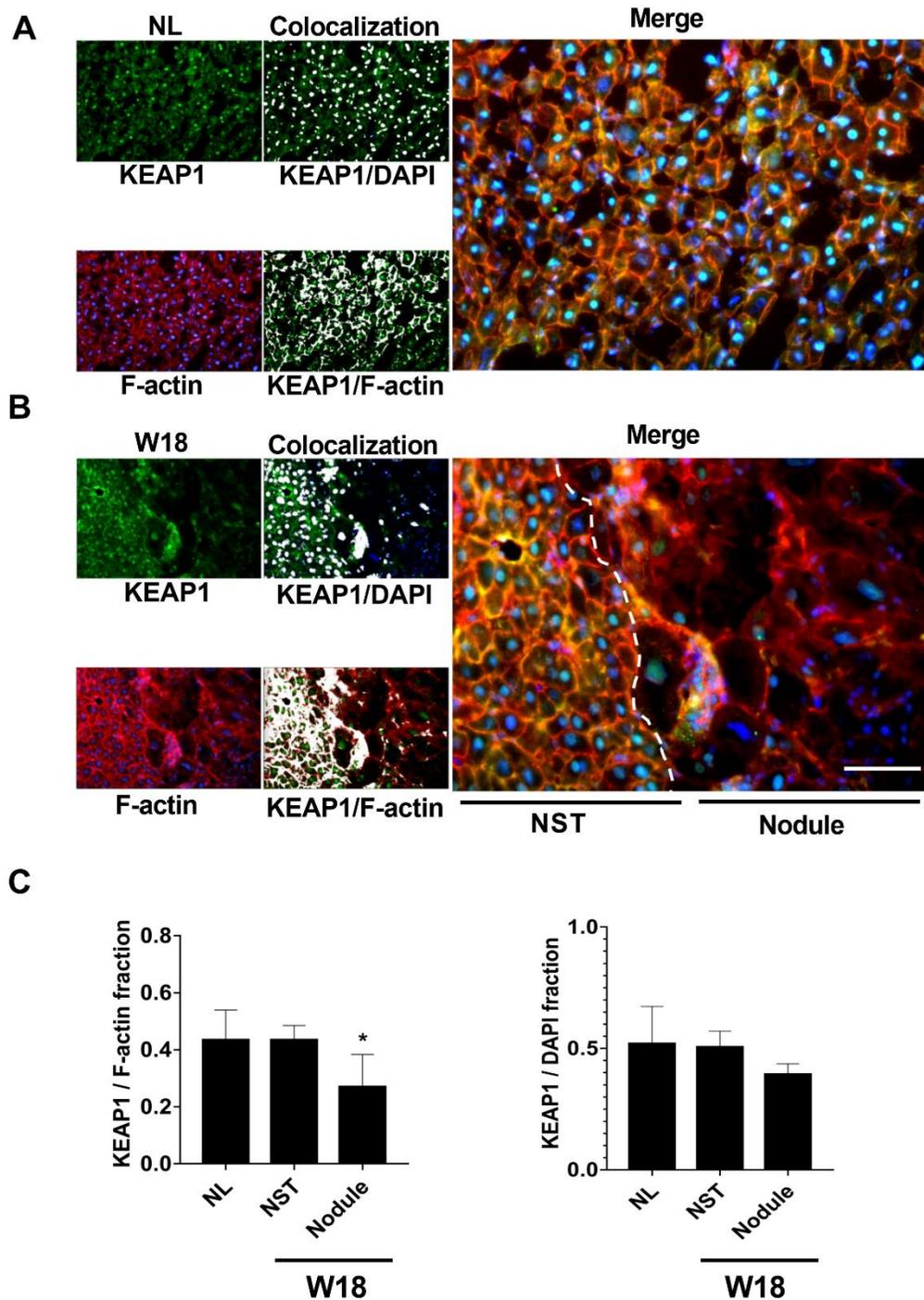


Figura 16. Interacción de KEAP1 con F-actina en nódulos de CHC. Co-localización de KEAP1 con F-actina de muestras de hígado seccionadas recién congeladas de los grupos NL (A) y W18 (B). KEAP1 se marcó en verde (Alexa 488) y F-actina en rojo (Phalloidin-iFluor 647). Los núcleos se marcaron con DAPI. Las líneas punteadas blancas muestran el límite entre los nódulos y el tejido circundante nodular (NST). El color blanco indica la co-localización nuclear de KEAP1 y KEAP1/F-actina. La imagen combinada también ilustra la co-localización de KEAP1 con F-actina (amarillo-naranja). Las barras de escala indican 200 μ m. La ampliación es de 400 \times . (C) La relación de co-localización de KEAP1 en comparación con la tinción de F-actina o DAPI se cuantificó a partir de 3 campos de 10 \times seleccionados al azar por muestra individual. La co-localización de KEAP1 también se cuantificó por separado tanto en nódulos como en tejido circundante nodular (NST). n = 3 animales por grupo. *p < 0.05 estadísticamente diferente del área NL y NST.

NRF2 se localiza predominantemente en núcleos de las células nodulares

Para investigar si la disminución de KEAP1 asociada al citoesqueleto de actina en el CHC afecta la interacción entre KEAP1 y NRF2, determinamos la co-localización de NRF2-KEAP1 mediante análisis por IF. Para ello, comparamos el estado de este complejo en los nódulos de CHC y en el NST. Aunque las células en el NST mostraron un co-marcaje equilibrado de estas proteínas, del 73 al 75 % de las células dentro de los nódulos de CHC mostraron una mayor intensidad para NRF2 nuclear a las W12 y W18, respectivamente (**Figura 17A**). El análisis por IF denota una mayor intensidad de NRF2 que de KEAP1 en los núcleos de las células dentro de los nódulos, por lo que sugiere que hay una mayor actividad de NRF2 (**Figura 17A**) y está en concordancia con el elevado nivel de expresión de sus genes blanco como PTGR1 y NQO1 (**Figura 12**).

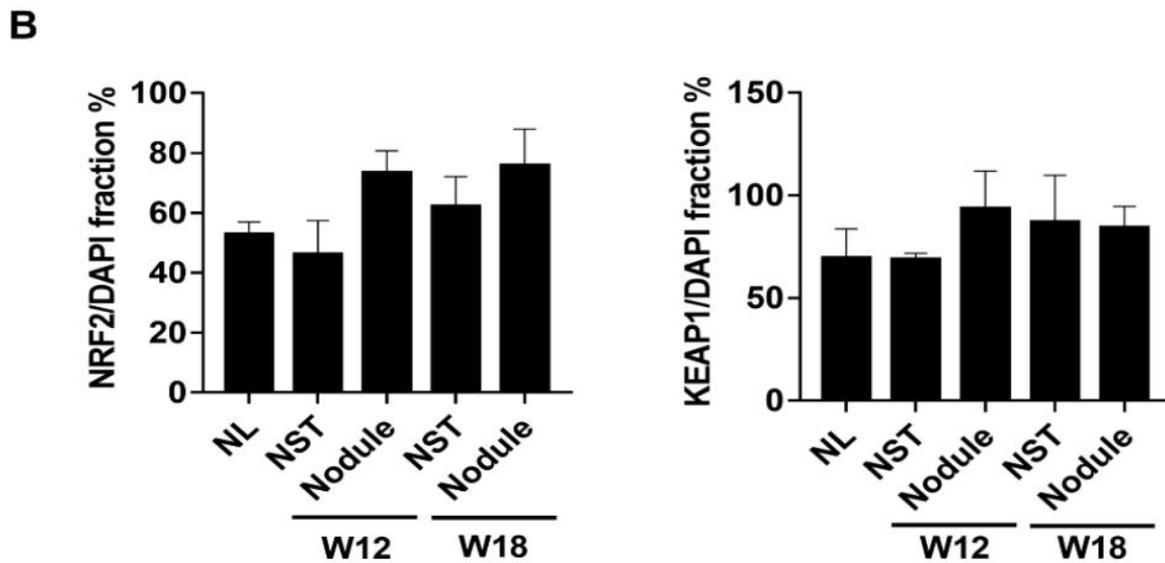
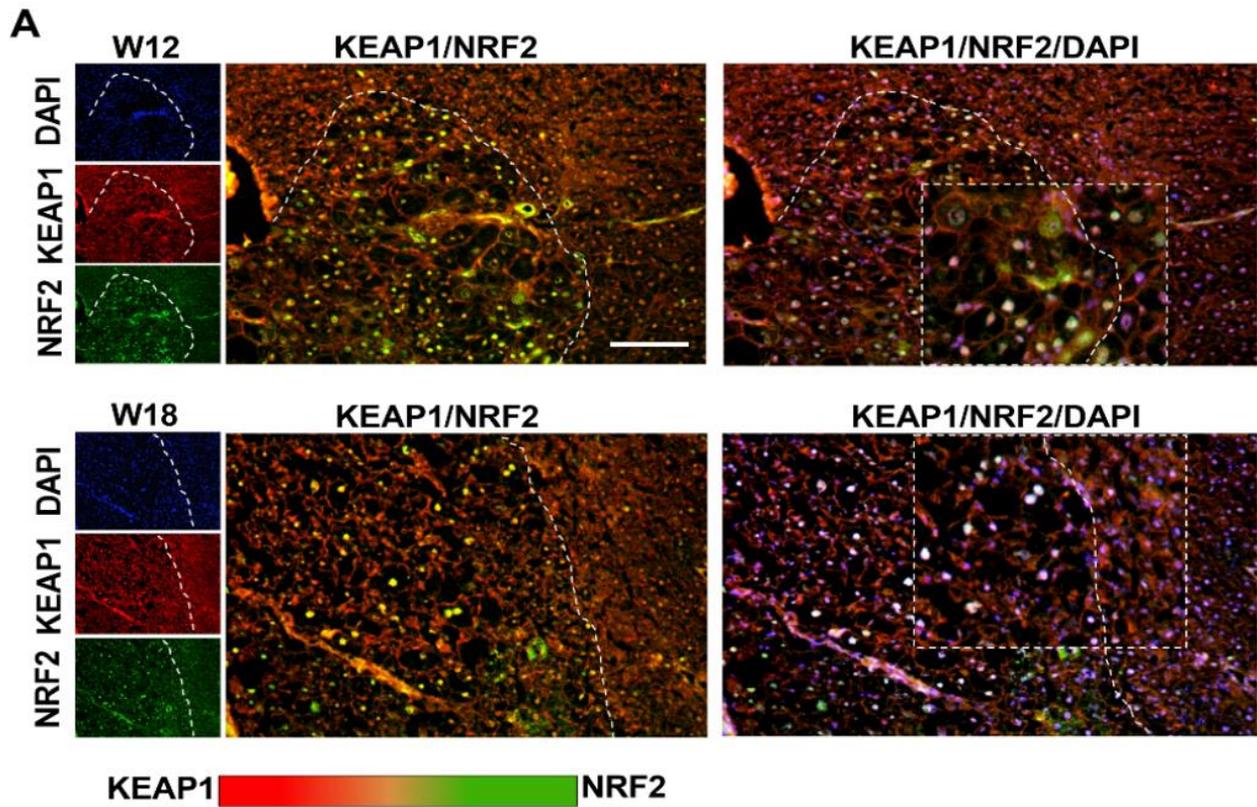


Figura 17. Interacción de NRF2 con KEAP1 en nódulos de CHC. (A) Co-inmunofluorescencia de NRF2 (verde Alexa 488) y KEAP1 (rojo Alexa 598) de muestras de hígado en fresco de los grupos W12 y W18. Las líneas blancas delimitan el borde entre los nódulos y el tejido circundante nodular (NST). Las imágenes combinadas muestran la co-localización KEAP1/NRF2 (ampliación 100x) para comparar la proporción de rojo y verde. La barra de escala blanca indica 100 μ m. La combinación de imágenes triples, KEAP1/NRF2/ DAPI, se resalta en un cuadro rectangular que se muestra con un aumento mayor (200x). (B) Los gráficos muestran el porcentaje de núcleos NRF2 y KEAP1 positivos en comparación con los núcleos teñidos con DAPI. Análisis de 5 campos de 10 \times seleccionados al azar por muestra individual. n = 3 animales por grupo.

Genes potencialmente regulados por NRF2 en el CHC *in vivo*

Considerando que los modelos de hepatocarcinogénesis se caracterizan por la actividad de NRF2, investigamos 447 genes diferencialmente expresados en el CHC que al contener secuencias ARE podrían ser regulados por NRF2. Las muestras empleadas en dichos microarreglos fueron del modelo del hepatocito resistente (Sold & Farber) [107] y [114], de las que se obtuvo el siguiente listado de 70 genes potencialmente regulados por NRF2 (**Tabla 2**).

Gen	Inicio	Fin	ARE	Pval
Krt18	-580	-565	CTATGGAGCCACAGCA	2.70E-03
Cd36	-820	-805	TCTCTATGACACAGGC	2.60E-04
Ctsz	-59	-44	TGTGCGTGATCCAGGA	2.60E-04
Abcb1b	-336	-321	CTCTGATGACTCGGGG	1.30E-03
Agfg1	-773	-758	AGAGGGTGACTCGGCC	8.60E-04
Akr1b1	-761	-746	ATCCGGAGATCAAGCT	5.20E-03
Akr1cl	-319	-304	AGACTGTCAGTTAGCT	3.20E-03
Aqp1	-1432	-1417	TGATTATTACAGGTCC	4.60E-03
Axl	-486	-471	TCCCGGTTACCCTGCC	1.20E-04
Ccnb1	-452	-437	TATGCGTGCTCCAGAA	6.20E-03
Cd36	-105	-90	GATCAGTGACTCTGTA	1.70E-03
Cenpf	-700	-685	CTGAGATGACTGAGAG	8.30E-03
Cd63	-452	-437	ACACTTTGCCTCAGTT	9.50E-03
Clec7a	-506	-491	TGGCCATTATCGAGTA	1.40E-03
Clic1	-157	-142	GGTCGGTGAGTCAGCT	2.90E-04
Clic2	-784	-769	CAGGAATGACATGGAA	8.30E-04
Ctla2a	-991	-976	TCTCAATTATCAAACA	4.80E-03
Ctse	-885	-870	CCAGCCTGACTTATCT	6.70E-04
Ctsl	-508	-493	GAGAGGTGACTCTGCC	1.20E-03
Ddit4	-819	-804	TAAGGACAACCTCGCA	6.20E-03
Ddr1	-971	-956	AAAGTATGACCTATGG	1.30E-03
Dpysl2	-1009	-994	TCTCCATGACTCAGTT	5.80E-05
Ect2	-1422	-1407	CCAAGCTTAAACTGCA	1.10E-02
Ednrb	-621	-606	ACACAGTGATGGAGCC	4.00E-04
Ehd4	-1016	-1001	ACACCCTTTCAGTCA	2.00E-03
Ehf	-280	-265	AACGTGTGAGTTGGCC	4.30E-04
Ephx1	-785	-770	ACAGGCTGATACACCC	8.60E-04
Ermp1	-936	-921	GCTGCGTGACTCAGTA	2.10E-05
Fbln1	-316	-301	CAAACCTGACTTGTA	3.20E-03
Fcer1g	-735	-720	ACTCGTTGACTTAGCT	1.40E-04
Gpnmb	-192	-177	TTCGGAAGCAACAGCC	1.40E-03
Grn	-550	-535	CAGGCGTGAAAAGGCA	5.40E-04
Htatip2	-990	-975	AGACAGTGACAGTGTA	1.20E-03
Ifi47	-736	-721	ACTCATTGAGAAAAGCA	4.90E-04
Krt8	-19	-4	TCAGGGTGACTCAGAA	1.20E-05
Lcp1	-1003	-988	ACCGTCTGACCTGGGA	2.00E-03
L3mbt2	-536	-521	AAAGGCTCATGACGCA	1.90E-03
Lgmn	-465	-450	CCAACATAATACGACA	6.20E-03
Ndrp1	-941	-926	TCCAGAGACTCTGAC	6.40E-03
Pcyox1	-109	-94	CCGCGTGAGTTTGCA	8.10E-04
Prtfdc1	-846	-831	TGAGGGAGACCAAGGA	1.50E-03
S100a10	-638	-623	GCTGTATGAGAATGCC	1.60E-03
Scpep1	-965	-950	CCTGAGGGAGACAGAA	4.00E-03
Serpinh1	-618	-603	GACCCCTGACTAAGGA	1.30E-03
Slc25a4	-847	-832	ACAGGCTGAGTTAACA	4.00E-04
Snx10	-831	-816	CATGGGTGCCTGGGCA	2.00E-03
Tubb6	-813	-798	CCCGGCTGACCGTGCG	1.00E-03
Ugdh	-354	-339	AGCCCGTGAGTTGGCT	7.50E-04
Zdhhc7	-363	-348	GAACGGCGACGCAGCA	2.20E-04
Anxa2	-435	-420	CCTCCATTACCTCGCC	1.50E-03
Anxa1	-597	-584	AGGTCCAATAAATTC	5.20E-03
Anxa5	-189	-45	AGTGATAGCGTCGCTG	1.00E-04
Apoc2	-347	-332	TCCTCCTGCCTCAGCC	1.50E-03
Azgp1	-261	-246	ACTCCATGACCAAACC	1.10E-03
Dio1	-584	-569	ATCCCGTGTCTCAGCC	2.20E-03
Fabp1	-1012	-997	ACCGGGAACACAACCT	1.60E-03
Gis2	-222	-207	CCTGACTGTCCCAGCC	2.60E-03
Rup2	-664	-649	TCATTGTTATATATCA	1.10E-03
Srr	-1406	-1391	GCTGGGTACACAGTA	7.00E-04
Stxbp5	-219	-204	TCCGGGTGTCGGGGCC	5.20E-04
Tymp	-523	-508	CCCCATGATACGGTA	3.40E-04
Ugt2b	-508	-493	ACCCAAAGACTATACA	5.60E-03

Tabla 2. Posibles Genes blanco de NRF2. Se describe la posición del ARE para aquellos genes Sobre-expresados (ROJO) y Sub-expresados (Verde).

La actividad transcripcional exacerbada de NRF2 se ve reflejada en la sobreexpresión o subexpresión de aquellos genes que contienen secuencias ARE (**Tabla 2**), de acuerdo con el análisis *in silico* (<https://epd.epfl.ch/index.php>) (http://rsat.sbroscoff.fr/matrix-scan-quick_form.cgi). Debido a que NRF2 es un elemento regulador en “*cis*”, se seleccionaron los primeros 1000 pares de bases cercanos al sitio de inicio de la transcripción para realizar la búsqueda de ARE [115, 116].

De acuerdo con el análisis del listado de genes sobreexpresados en REACTOME (<https://reactome.org/PathwayBrowser/>) y con la descripción de las anotaciones del Gene Ontology se encontraron algunas de las vías de señalización muy conocidas, relacionadas al metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos, al sistema inmunológico adaptativo e innato y a las vías de señalización como: Notch, Wnt, mTOR y AMPK. En cuanto a los genes subexpresados, algunas de las vías de señalización están relacionadas con la glucuronidación, el metabolismo de aminoácidos y sus derivados, la remodelación de lipoproteínas de alta densidad (HDL), el catabolismo de triglicéridos y el metabolismo de vitaminas y cofactores, como se muestra en la **tabla 3**.

De manera interesante, se encontró que algunos miembros de la familia de las anexinas (ANXA1, ANXA2 y ANXA5) contienen un ARE que podría ser reconocido por NRF2, lo cual se considera un hallazgo novedoso ya que anteriormente no se habían descrito como genes blanco de dicho factor de transcripción, por lo que se seleccionaron como objeto de estudio.

Pathway identifier	Pathway name	Entities pValue	Submitted entities found
R-HSA-156711	Polo-like kinase mediated events	8.07E-06	Ccnb1,Cenpf
R-HSA-8950505	Gene and protein expression by JAK-STAT signaling after Interleukin-12 stimulation	6.69E-04	Anxa2,Lcp1
R-HSA-9020591	Interleukin-12 signaling	0.00121521	Anxa2,Lcp1
R-HSA-447115	Interleukin-12 family signaling	0.001823094	Anxa2,Lcp1
R-HSA-75205	Dissolution of Fibrin Clot	0.002638421	Anxa2,S100a10
R-HSA-1679131	Trafficking and processing of endosomal TLR	0.003422351	Ctsl1,Lgmn
R-HSA-6798695	Neutrophil degranulation	0.004198503	Cd63,Grn;Fcer1g;Ctsz;Krt8;Anxa2;Cd36;S100a10
R-HSA-69275	G2/M Transition	0.005717851	Tubb6,Ccnb1,Cenpf
R-HSA-453274	Mitotic G2-G2/M phases	0.005943599	Tubb6,Ccnb1,Cenpf
R-HSA-2132295	MHC class II antigen presentation	0.008556245	Ctsl1,Tubb6;Ctse;Lgmn
R-HSA-6803205	TP53 regulates transcription of several additional cell death genes whose specific roles in p53-dependent apoptosis remain uncertain	0.010056094	Ndrp1
R-HSA-8963889	Assembly of active LPL and LIPC lipase complexes	0.011464864	Apoc2
R-HSA-210500	Glutamate Neurotransmitter Release Cycle	0.012955134	Gls2
R-HSA-1989781	PPARA activates gene expression	0.014679985	Fabp1;Cd36
R-HSA-400206	Regulation of lipid metabolism by PPARalpha	0.015241054	Fabp1;Cd36
R-HSA-180897	Vpr-mediated induction of apoptosis by mitochondrial outer membrane permeabilization	0.021172903	Slc25a4
R-HSA-8964539	Glutamate and glutamine metabolism	0.021552246	Gls2
R-HSA-5628897	TP53 Regulates Metabolic Genes	0.030415089	Gls2
R-HSA-8955332	Carboxyterminal post-translational modifications of tubulin	0.035376925	Tubb6,Agtppb1
R-HSA-437239	Recycling pathway of LI	0.035376925	Dpysl2,Tubb6
R-HSA-2500257	Resolution of Sister Chromatid Cohesion	0.035502494	Tubb6,Ccnb1,Cenpf
R-HSA-8963899	Plasma lipoprotein remodeling	0.036550508	Apoc2
R-HSA-69478	G2/M DNA replication checkpoint	0.036761442	Ccnb1
R-HSA-6809371	Formation of the cornified envelope	0.038201026	Krt18;Krt8
R-HSA-156588	Glucuronidation	0.038942203	Ugt2b1;Ugdh
R-HSA-114608	Platelet degranulation	0.040292052	Cd63;Anxa5;Cd36
R-HSA-176417	Phosphorylation of Emi1	0.041902933	Ccnb1
R-HSA-76005	Response to elevated platelet cytosolic Ca2+	0.045392592	Cd63;Anxa5;Cd36
R-HSA-3700989	Transcriptional Regulation by TP53	0.045398113	Ccnb1;Gls2;Ndrp1
R-HSA-8857538	PTK6 promotes HIF1A stabilization	0.047017318	Gnmb
R-HSA-113507	E2F-enabled inhibition of pre-replication complex formation	0.047017318	Ccnb1
R-HSA-350864	Regulation of thyroid hormone activity	0.047017318	Dio1
R-HSA-434313	Intracellular metabolism of fatty acids regulates insulin secretion	0.047017318	Cd36
R-HSA-2980767	Activation of NIMA Kinases NEK7, NEK6, NEK7	0.047017318	Ccnb1
R-HSA-9029569	NR1H3 & NR1H2 regulate gene expression linked to cholesterol transport and efflux	0.049075615	Apoc2
R-HSA-5652227	Fructose biosynthesis	0.057165332	Akr1b1
R-HSA-8939242	RUNX1 regulates transcription of genes involved in differentiation of keratinocytes	0.057165332	Ctsl1
R-HSA-196071	Metabolism of steroid hormones	0.057230685	Akr1b1
R-HSA-2465910	MASTL Facilitates Mitotic Progression	0.06219924	Ccnb1
R-HSA-109582	Hemostasis	0.065338497	Cd63;Grn;Tubb6;Fcer1g;Anxa5;Anxa2;Cd36;S100a10
R-HSA-1236973	Cross-formation of particulate exogenous antigens (phagosomes)	0.067206602	Cd36
R-HSA-173599	Formation of the active cofactor, UDP-glucuronate	0.067206602	Ugdh
R-HSA-6799990	Metal sequestration by antimicrobial proteins	0.067206602	S100a10
R-HSA-8963888	Chylomicron assembly	0.072187556	Apoc2
R-HSA-76002	Platelet activation, signaling and aggregation	0.072497997	Cd63;Fcer1g;Anxa5;Cd36
R-HSA-8852276	The role of G1/S in G2/M progression after G2 checkpoint	0.07285779	Tubb6;Ccnb1
R-HSA-5633008	TP53 Regulates Transcription of Cell Death Genes	0.07285779	Ndrp1
R-HSA-9024446	NR1H2 and NR1H3-mediated signaling	0.076345282	Apoc2
R-HSA-2514853	Condensation of Prometaphase Chromosomes	0.077142239	Ccnb1
R-HSA-75035	Chk1/Chk2(Cds1) mediated inactivation of Cyclin B:Cdk1 complex	0.077142239	Ccnb1
R-HSA-2995410	Nuclear Envelope (NE) Reassembly	0.081009447	Tubb6;Ccnb1
R-HSA-75892	Platelet Adhesion to exposed collagen	0.082070788	Fcer1g
R-HSA-1247673	Erythrocytes take up oxygen and release carbon dioxide	0.082070788	Aqp1
R-HSA-8963901	Chylomicron remodeling	0.086973339	Apoc2
R-HSA-162658	Golgi Cisternae Pericentriolar Stack Reorganization	0.086973339	Ccnb1
R-HSA-399956	CRMPs in Sema3A signaling	0.091850027	Dpysl2
R-HSA-193144	Estrogen biosynthesis	0.091850027	Akr1b1
R-HSA-417957	P2Y receptors	0.091850027	Serpinh1
R-HSA-168898	Toll-like Receptor Cascades	0.094471285	Ctsl1;Lgmn;Cd36
R-HSA-1474244	Extracellular matrix organization	0.099385616	Ctsl1;Serpinh1;Fbln1;Ddr1
R-HSA-112310	Neurotransmitter release cycle	0.100491965	Gls2
R-HSA-176412	Phosphorylation of the APC/C	0.101526356	Ccnb1
R-HSA-9678110	Attachment and Entry	0.101526356	Ctsl1
R-HSA-168249	Innate Immune System	0.102825482	Ctsl1;Cd63;Grn;Fcer1g;Clec7a;Lgmn;Ctsz;Krt8;Anxa2;Cd36;S100a10
R-HSA-174824	Plasma lipoprotein assembly, remodeling, and clearance	0.103856604	Apoc2
R-HSA-68877	Mitotic Prometaphase	0.104165527	Tubb6;Ccnb1,Cenpf
R-HSA-3000471	Scavenging by Class B Receptors	0.106326263	Cd36
R-HSA-432047	Passive transport by Aquaporins	0.106326263	Aqp1
R-HSA-6804114	TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G2 Cell Cycle Arrest	0.106326263	Ccnb1
R-HSA-1474290	Collagen formation	0.107252012	Ctsl1;Serpinh1
R-HSA-190840	Microtubule-dependent trafficking of connexons from Golgi to the plasma membrane	0.111100842	Tubb6
R-HSA-4419969	Depolymerisation of the Nuclear Lamina	0.115850226	Ccnb1
R-HSA-190872	Transport of connexons to the plasma membrane	0.115850226	Tubb6
R-HSA-418038	Nucleotide-like (purinergic) receptors	0.115850226	Serpinh1
R-HSA-196791	Vitamin D (calciferol) metabolism	0.115850226	Lgmn
R-HSA-381340	Transcriptional regulation of white adipocyte differentiation	0.115868531	Cd36
R-HSA-174048	APC/C-Cdc20 mediated degradation of Cyclin B	0.120574546	Ccnb1
R-HSA-113510	E2F mediated regulation of DNA replication	0.120574546	Ccnb1
R-HSA-1480926	O2/CO2 exchange in erythrocytes	0.120574546	Aqp1
R-HSA-1237044	Erythrocytes take up carbon dioxide and release oxygen	0.120574546	Aqp1
R-HSA-8964058	HDL remodeling	0.120574546	Apoc2
R-HSA-6805567	Keratization	0.12115298	Krt18;Krt8
R-HSA-389977	Post-chaperonin tubulin folding pathway	0.125273932	Tubb6
R-HSA-977347	Serine biosynthesis	0.125273932	Srr
R-HSA-5602498	MyD88 deficiency (TLR2/4)	0.129948514	Cd36
R-HSA-5603041	IRAK4 deficiency (TLR2/4)	0.134598422	Cd36
R-HSA-9694614	Attachment and Entry	0.134598422	Ctsl1
R-HSA-2995383	Initiation of Nuclear Envelope (NE) Reformation	0.134598422	Ccnb1
R-HSA-5652084	Fructose metabolism	0.134598422	Akr1b1
R-HSA-196108	Pregnenolone biosynthesis	0.134598422	Akr1b1
R-HSA-2022377	Metabolism of Angiotensinogen to Angiotensins	0.134598422	Ctsz
R-HSA-9648025	EML4 and NUDC in mitotic spindle formation	0.13721642	Tubb6;Cenpf
R-HSA-400451	Free fatty acids regulate insulin secretion	0.139223784	Cd36
R-HSA-449147	Signaling by Interleukins	0.140586504	Anxa2;Cd36;Lcp1
R-HSA-389957	Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC	0.143824728	Tubb6
R-HSA-209968	Thyroxine biosynthesis	0.143824728	Dio1
R-HSA-389960	Formation of tubulin folding intermediates by CCT/TriC	0.148401381	Tubb6
R-HSA-8963898	Plasma lipoprotein assembly	0.148401381	Apoc2
R-HSA-68882	Mitotic Anaphase	0.149007598	Tubb6;Ccnb1,Cenpf

Tabla 3. Vías de señalización de posibles Genes blanco de NRF2.

R-HSA-255396	Mitotic Metaphase and Anaphase	0.150263465	Tubb6;Ccnb1;Cenpf
R-HSA-373760	LICAM interactions	0.153753725	Dpysl2;Tubb6
R-HSA-69273	Cyclin A/B1/B2 associated events during G2/M transition	0.157482323	Ccnb1
R-HSA-83936	Transport of nucleosides and free purine and pyrimidine bases across the plasma membrane	0.161986862	Slc25a4
R-HSA-9619483	Activation of AMPK downstream of NMDARs	0.166467613	Tubb6
R-HSA-73614	Pyrimidine salvage	0.166467613	Tymp
R-HSA-5626467	RHO GTPases activate IQGAPs	0.175358248	Tubb6
R-HSA-5686938	Regulation of TLR by endogenous ligand	0.175358248	Cd36
R-HSA-5223345	Miscellaneous transport and binding events	0.175358248	Azgp1
R-HSA-389958	Cooperation of Prefoldin and Tric/CCT in actin and tubulin folding	0.179768378	Tubb6
R-HSA-2129379	Molecules associated with elastic fibres	0.179768378	Fbn1
R-HSA-5694530	Cargo concentration in the ER	0.179768378	Ctsz
R-HSA-9668328	Sealing of the nuclear envelope (NE) by ESCRT-III	0.188518872	Tubb6
R-HSA-5663220	RHO GTPases Activate Formins	0.18978444	Tubb6;Cenpf
R-HSA-189483	Heme degradation	0.192859479	Fabp1
R-HSA-190861	Gap junction assembly	0.197177153	Tubb6
R-HSA-3301854	Nuclear Pore Complex (NPC) Disassembly	0.201472015	Ccnb1
R-HSA-5602358	Diseases associated with the TLR signaling cascade	0.201472015	Cd36
R-HSA-5260271	Diseases of Immune System	0.201472015	Cd36
R-HSA-163560	Triglyceride catabolism	0.201472015	Fabp1
R-HSA-432720	Lysosome Vesicle Biogenesis	0.205744182	Ctsz
R-HSA-114604	GPVI-mediated activation cascade	0.205744182	Fcer1g
R-HSA-3371511	HSF1 activation	0.205744182	Serpinh1
R-HSA-1566948	Elastic fibre formation	0.214220907	Fbn1
R-HSA-69278	Cell Cycle, Mitotic	0.214342595	Tubb6;Ccnb1;Cenpf
R-HSA-8953750	Transcriptional Regulation by E2F6	0.218425701	L3mbt12
R-HSA-199977	ER to Golgi Anterograde Transport	0.218972362	Tubb6;Ctsz
R-HSA-3371568	Attenuation phase	0.22260827	Serpinh1
R-HSA-9646399	Aggrephagy	0.22260827	Tubb6
R-HSA-176033	Interactions of Vpr with host cellular proteins	0.22260827	Slc25a4
R-HSA-9609736	Assembly and cell surface presentation of NMDA receptors	0.230907199	Tubb6
R-HSA-73621	Pyrimidine catabolism	0.239118617	Tymp
R-HSA-190828	Gap junction trafficking	0.243191795	Tubb6
R-HSA-432040	Vasopressin regulates renal water homeostasis via Aquaporins	0.247243435	Aqp1
R-HSA-2299718	Condensation of Prophase Chromosomes	0.255282554	Ccnb1
R-HSA-5620924	Intraflagellar transport	0.259270256	Tubb6
R-HSA-8957322	Metabolism of steroids	0.26083729	Lgmn;Akr1b1
R-HSA-157858	Gap junction trafficking and regulation	0.263236868	Tubb6
R-HSA-209776	Metabolism of amine-derived hormones	0.267182499	Dio1
R-HSA-168256	Immune System	0.267620703	Cd36;Ctsl1;Grn;Ctse;Tubb6;Clec7a;Krt8;Fcer1g;Lgmn;Ctsz;Anxa2;Cd36;Lcp1;S100a10
R-HSA-3371571	HSF1-dependent transactivation	0.271107259	Serpinh1
R-HSA-983231	Factors involved in megakaryocyte development and platelet production	0.278219701	Grn;Tubb6
R-HSA-445355	Smooth Muscle Contraction	0.278894603	Anxa2
R-HSA-3000171	Non-integrin membrane-ECM interactions	0.278894603	Ddr1
R-HSA-112315	Transmission across Chemical Synapses	0.279651197	Tubb6;Gls2
R-HSA-2467813	Separation of Sister Chromatids	0.280199258	Tubb6;Cenpf
R-HSA-1236975	Antigen processing-Cross presentation	0.280199258	Ctsl1;Cd36
R-HSA-4551638	SUMOylation of chromatin organization proteins	0.282757403	L3mbt12
R-HSA-6811436	COPI-independent Golgi-to-ER retrograde traffic	0.286599765	Tubb6
R-HSA-193648	NRAGE signals death through JNK	0.290421795	Ect2
R-HSA-5578775	Ion homeostasis	0.290421795	Clic2
R-HSA-5621480	Dectin-2 family	0.294223601	Fcer1g
R-HSA-2980766	Nuclear Envelope Breakdown	0.294223601	Ccnb1
R-HSA-6791312	TP53 Regulates Transcription of Cell Cycle Genes	0.294223601	Ccnb1
R-HSA-5621481	C-type lectin receptors (CLRs)	0.296020181	Fcer1g;Clec7a
R-HSA-8979227	Triglyceride metabolism	0.298005287	Fabp1
R-HSA-9772572	Early SARS-CoV-2 Infection Events	0.298005287	Ctsl1
R-HSA-2022090	Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	0.301766959	Ctsl1
R-HSA-983189	Kinesins	0.305508722	Tubb6
R-HSA-1268020	Mitochondrial protein import	0.309230679	Slc25a4
R-HSA-445717	Aquaporin-mediated transport	0.309230679	Aqp1
R-HSA-1442490	Collagen degradation	0.309230679	Ctsl1
R-HSA-8956321	Nucleotide salvage	0.309230679	Tymp
R-HSA-6785807	Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling	0.311795512	Cd36
R-HSA-8848021	Signaling by PTK6	0.31661559	Gnmb
R-HSA-9006927	Signaling by Non-Receptor Tyrosine Kinases	0.31661559	Gnmb
R-HSA-9616222	Transcriptional regulation of granulopoiesis	0.31661559	Grn
R-HSA-373755	Semaphorin interactions	0.31661559	Dpysl2
R-HSA-948021	Transport to the Golgi and subsequent modification	0.327501525	Tubb6;Ctsz
R-HSA-9013026	RHO GTPase cycle	0.331152266	Ect2
R-HSA-176409	APC/C-Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins	0.334738453	Ccnb1
R-HSA-189445	Metabolism of porphyrins	0.334738453	Fabp1
R-HSA-3371497	HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR) in the presence of ligand	0.334738453	Tubb6
R-HSA-1650814	Collagen biosynthesis and modifying enzymes	0.334738453	Serpinh1
R-HSA-204005	COPII-mediated vesicle transport	0.338305649	Ctsz
R-HSA-176814	Activation of APC/C and APC/C-Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins	0.338305649	Ccnb1
R-HSA-9006931	Signaling by Nuclear Receptors	0.342550231	Apoc2;Zdhhc7
R-HSA-975634	Retinoid metabolism and transport	0.345383461	Apoc2
R-HSA-199992	trans-Golgi Network Vesicle Budding	0.348894274	Ctsz
R-HSA-69473	G2/M DNA damage checkpoint	0.348894274	Ccnb1
R-HSA-9749641	Aspirin ADME	0.348894274	Ugt2b1
R-HSA-1445148	Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the plasma membrane	0.352386489	Tubb6
R-HSA-204998	Cell death signalling via NRAGE, NRIF and NADE	0.352386489	Ect2
R-HSA-397014	Muscle contraction	0.352820785	Anxa2;Clic2
R-HSA-1236977	Endosomal/Vacuolar pathway	0.355860204	Ctsl1
R-HSA-1640170	Cell Cycle	0.356390878	Tubb6;Ccnb1;Cenpf
R-HSA-176408	Regulation of APC/C activators between G1/S and early anaphase	0.359315515	Ccnb1
R-HSA-416482	G alpha (12/13) signalling events	0.369571987	Ect2
R-HSA-1266738	Developmental Biology	0.372422664	Dpysl2;Grn;Krt18;Tubb6;Krt8;Cd36
R-HSA-6806667	Metabolism of fat-soluble vitamins	0.379666261	Apoc2
R-HSA-9663891	Selective autophagy	0.379666261	Tubb6
R-HSA-68886	M Phase	0.38490073	Tubb6;Ccnb1;Cenpf
R-HSA-9707564	Cytoprotection by HMOX1	0.386306921	Fabp1
R-HSA-453276	Regulation of mitotic cell cycle	0.389600872	Ccnb1
R-HSA-174143	APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins	0.389600872	Ccnb1
R-HSA-2565942	Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition	0.389600872	Ccnb1
R-HSA-141444	Amplification of signal from unattached kinetochores via a MAO2 inhibitory signal	0.396136477	Cenpf
R-HSA-141424	Amplification of signal from the kinetochores	0.396136477	Cenpf
R-HSA-390466	Chaperonin-mediated protein folding	0.402602096	Tubb6
R-HSA-438064	Post NMDA receptor activation events	0.402602096	Tubb6

Tabla 3. Vías de señalización de posibles Genes blanco de NRF2.

R-HSA-9678108	SARS-CoV-1 Infection	0.40260296	Ctsl1
R-HSA-380320	Recruitment of NuMA to mitotic centrosomes	0.405810506	Tubb6
R-HSA-8878171	Transcriptional regulation by RUNX1	0.408036994	Ctsl1;Grn
R-HSA-156580	Phase II - Conjugation of compounds	0.411766869	Ugt2b1;Ugdh
R-HSA-382551	Transport of small molecules	0.419160171	Azgp1;Apoc2;Slc25a4;Clc2;Aqp1
R-HSA-391251	Protein folding	0.421594856	Tubb6
R-HSA-8939236	RUNX1 regulates transcription of genes involved in differentiation of HSCs	0.433923546	Grn
R-HSA-2730905	Role of LAT2/NTAL/LAB on calcium mobilization	0.436964942	Fcer1g
R-HSA-6811434	COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic	0.436964942	Tubb6
R-HSA-6807878	COPI-mediated anterograde transport	0.436964942	Tubb6
R-HSA-425397	Transport of vitamins, nucleosides, and related molecules	0.439990198	Slc25a4
R-HSA-422356	Regulation of insulin secretion	0.439990198	Cd36
R-HSA-69620	Cell Cycle Checkpoints	0.441186881	Ccnb1;Cenpf
R-HSA-193704	p75 NTR receptor-mediated signalling	0.445992627	Ect2
R-HSA-69618	Mitotic Spindle Checkpoint	0.448969968	Cenpf
R-HSA-9009391	Extra-nuclear estrogen signaling	0.448969968	Zdhhc7
R-HSA-416476	G alpha (q) signalling events	0.450219563	Ednrb;Serpinh1
R-HSA-3371453	Regulation of HSF1-mediated heat shock response	0.454877321	Serpinh1
R-HSA-442755	Activation of NMDA receptors and postsynaptic events	0.454877321	Tubb6
R-HSA-212436	Generic Transcription Pathway	0.455679702	Ctsl1;L3mbtl2;Grn;Ccnb1;Gls2;Ndrig1
R-HSA-8856825	Cargo recognition for clathrin-mediated endocytosis	0.460722117	Agfg1
R-HSA-5607764	CLECT7A (Dectin-1) signaling	0.475064699	Clec7a
R-HSA-2672351	Stimuli-sensing channels	0.477887674	Clic2
R-HSA-71291	Metabolism of amino acids and derivatives	0.47992991	Srr;Gls2;Dio1
R-HSA-6803157	Antimicrobial peptides	0.483488719	S100a10
R-HSA-2871796	FCER1 mediated MAPK activation	0.486266946	Fcer1g
R-HSA-5610787	Hedgehog 'off' state	0.486266946	Tubb6
R-HSA-112316	Neuronal System	0.489427432	Tubb6;Gls2
R-HSA-2871809	FCER1 mediated Ca2 mobilization	0.49993822	Fcer1g
R-HSA-4420097	VEGFA-VEGFR2 Pathway	0.49993822	Axl
R-HSA-2980736	Peptide hormone metabolism	0.502629039	Ctsz
R-HSA-168188	Toll Like Receptor TLR6:TLR2 Cascade	0.510615989	Cd36
R-HSA-166058	MyD88:MAL(TIRAP) cascade initiated on plasma membrane	0.510615989	Cd36
R-HSA-68875	Mitotic Prophase	0.515870111	Ccnb1
R-HSA-3371556	Cellular response to heat stress	0.515870111	Serpinh1
R-HSA-181438	Toll Like Receptor 2 (TLR2) Cascade	0.51847624	Cd36
R-HSA-168179	Toll Like Receptor TLR1:TLR2 Cascade	0.51847624	Cd36
R-HSA-195258	RHO GTPase Effectors	0.522730132	Tubb6;Cenpf
R-HSA-194138	Signaling by VEGF	0.528762914	Axl
R-HSA-8956319	Nucleotide catabolism	0.538832492	Tymp
R-HSA-5576891	Cardiac conduction	0.546244933	Clic2
R-HSA-163685	Integration of energy metabolism	0.546244933	Cd36
R-HSA-8878166	Transcriptional regulation by RUNX2	0.546244933	Ccnb1
R-HSA-1280215	Cytokine Signaling in Immune system	0.547382866	Anxa2;Cd36;Lcp1
R-HSA-8856688	Golgi-to-ER retrograde transport	0.5486895	Tubb6
R-HSA-1474228	Degradation of the extracellular matrix	0.5486895	Ctsl1
R-HSA-1632852	Macroautophagy	0.553539679	Tubb6
R-HSA-69206	G1/S Transition	0.553539679	Ccnb1
R-HSA-162909	Host Interactions of HIV factors	0.555945426	Slc25a4
R-HSA-69481	G2/M Checkpoints	0.560718577	Ccnb1
R-HSA-8980692	RHOA GTPase cycle	0.563086113	Ect2
R-HSA-73857	RNA Polymerase II Transcription	0.56448161	Ctsl1;L3mbtl2;Grn;Ccnb1;Gls2;Ndrig1
R-HSA-211859	Biological oxidations	0.567708016	Ugt2b1;Ephx1;Ugdh
R-HSA-9013148	CDC42 GTPase cycle	0.574736067	Ect2
R-HSA-73887	Death Receptor Signalling	0.574736067	Ect2
R-HSA-8856828	Clathrin-mediated endocytosis	0.579309664	Agfg1
R-HSA-166016	Toll Like Receptor 4 (TLR4) Cascade	0.588311607	Cd36
R-HSA-9612973	Autophagy	0.590532202	Tubb6
R-HSA-2173782	Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	0.594937963	Cd36
R-HSA-5358351	Signaling by Hedgehog	0.594937963	Tubb6
R-HSA-2187338	Visual phototransduction	0.597123253	Apoc2
R-HSA-9609507	Protein localization	0.599296898	Slc25a4
R-HSA-1236974	ER-Phagosome pathway	0.605748577	Cd36
R-HSA-453279	Mitotic G1 phase and G1/S transition	0.607876253	Ccnb1
R-HSA-2871837	FCER1 mediated NF-kB activation	0.609992587	Fcer1g
R-HSA-3108232	SUMO E3 ligases SUMOylate target proteins	0.626522067	L3mbtl2
R-HSA-1280218	Adaptive Immune System	0.636676063	Ctsl1;Tubb6;Ctse;Lgmn;Cd36
R-HSA-9013149	RAC1 GTPase cycle	0.642359272	Ect2
R-HSA-2990846	SUMOylation	0.644291686	L3mbtl2
R-HSA-5653656	Vesicle-mediated transport	0.652580811	Tubb6;Ctsz;Cd36;Agfg1
R-HSA-373076	Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)	0.653051699	Ednrb;Serpinh1
R-HSA-9748784	Drug ADME	0.657532847	Ugt2b1
R-HSA-446203	Asparagine N-linked glycosylation	0.662123495	Tubb6;Ctsz
R-HSA-556833	Metabolism of lipids	0.664615954	Fabp1;Lgmn;Cd36;Akr1b1
R-HSA-375276	Peptide ligand-binding receptors	0.664879405	Ednrb
R-HSA-983712	Ion channel transport	0.675608338	Clic2
R-HSA-5617833	Cilium Assembly	0.677363207	Tubb6
R-HSA-74160	Gene expression (Transcription)	0.677442871	Ctsl1;L3mbtl2;Grn;Ccnb1;Gls2;Ndrig1
R-HSA-9609690	HCMV Early Events	0.685997888	Tubb6
R-HSA-6811442	Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic	0.692740961	Tubb6
R-HSA-199991	Membrane Trafficking	0.698863702	Tubb6;Ctsz;Agfg1
R-HSA-112314	Neurotransmitter receptors and postsynaptic signal transmission	0.713683399	Tubb6
R-HSA-2454202	Fc epsilon receptor (FCER1) signaling	0.718312368	Fcer1g
R-HSA-983169	Class I MHC mediated antigen processing & presentation	0.730207807	Ctsl1;Cd36
R-HSA-194315	Signaling by Rho GTPases	0.736870944	Tubb6;Ect2;Cenpf
R-HSA-15869	Metabolism of nucleotides	0.748709195	Tymp
R-HSA-202733	Cell surface interactions at the vascular wall	0.75007289	Fcer1g
R-HSA-8939211	ESR-mediated signaling	0.75007289	Zdhhc7
R-HSA-9716542	Signaling by Rho GTPases, Miro GTPases and RHOBTB3	0.75065998	Tubb6;Ect2;Cenpf
R-HSA-162906	HIV Infection	0.754120271	Slc25a4
R-HSA-9711123	Cellular response to chemical stress	0.765878001	Fabp1
R-HSA-9609646	HCMV Infection	0.767149632	Tubb6
R-HSA-211945	Phase I - Functionalization of compounds	0.802282997	Ephx1
R-HSA-388396	GPCR downstream signalling	0.80370617	Ednrb;Serpinh1;Ect2
R-HSA-422475	Axon guidance	0.82505836	Dpysl2;Tubb6
R-HSA-1852241	Organelle biogenesis and maintenance	0.839356706	Tubb6
R-HSA-500792	GPCR ligand binding	0.841266712	Ednrb;Serpinh1
R-HSA-9675108	Nervous system development	0.849823537	Dpysl2;Tubb6
R-HSA-1430728	Metabolism	0.850003119	Fabp1;Tymp;Srr;Ugt2b1;Gls2;Ephx1;Dio1;Apoc2;Lgmn;Akr1b1;Cd36;Ugdh
R-HSA-372790	Signaling by GPCR	0.853751053	Ednrb;Serpinh1;Ect2

Tabla 3. Vías de señalización de posibles Genes blanco de NRF2.

R-HSA-196854	Metabolism of vitamins and cofactors	0.873772969	Apoc2
R-HSA-425407	SLC-mediated transmembrane transport	0.897560065	Slc25a4
R-HSA-9694516	SARS-CoV-2 Infection	0.898681204	Ctsl1
R-HSA-2262752	Cellular responses to stress	0.911219098	Fabp1;Tubb6;Serpinh1
R-HSA-71387	Metabolism of carbohydrates	0.915987706	Akr1b1
R-HSA-8953897	Cellular responses to stimuli	0.917343047	Fabp1;Tubb6;Serpinh1
R-HSA-9012999	RHO GTPase cycle	0.917821122	Ect2
R-HSA-9679506	SARS-CoV Infections	0.9613288	Ctsl1
R-HSA-9006934	Signaling by Receptor Tyrosine Kinases	0.966170277	Axl
R-HSA-162582	Signal Transduction	0.973611749	Tubb6;Axl;Ednrb;Serpinh1;Apoc2;Gpnm;Zdhhc7;Ect2;Cenpf
R-HSA-597592	Post-translational protein modification	0.977212017	L3mbtl2;Tubb6;Ctsz;Agttbp1
R-HSA-5663205	Infectious disease	0.992804976	Ctsl1;Tubb6;Slc25a4
R-HSA-392499	Metabolism of proteins	0.998519769	L3mbtl2;Tubb6;Ctsz;Agttbp1
R-HSA-9709957	Sensory Perception	0.999131631	Apoc2
R-HSA-1643685	Disease	0.99983806	Ctsl1;Tubb6;Slc25a4;Cd36

Tabla 3. Vías de señalización de posibles Genes blanco de NRF2.

La expresión de ANXA1 y ANXA5 incrementa en núcleo y citosol durante la progresión del CHC

Para describir el estatus de expresión de la ANXA1 y 5 durante la progresión del CHC, se determinó su abundancia mediante ensayos de Western-Blot en la fracción citosólica y nuclear. El nivel de ANXA1 aumentó significativamente a la W22, a nivel nuclear ($p < 0.01$) y citosólico ($p < 0.05$) (**Figura 18A**). De manera similar, los niveles de ANXA5 ($p < 0.05$) aumentaron significativamente en la fracción nuclear a la W22; mientras que se detectó una tendencia de incremento en la fracción citosólica durante la progresión del CHC. En conjunto, estos datos indican que el aumento nuclear de las proteínas ANXA1 y ANXA 5, podrían tener un papel relevante durante la progresión del CHC (**Figura 18B**).

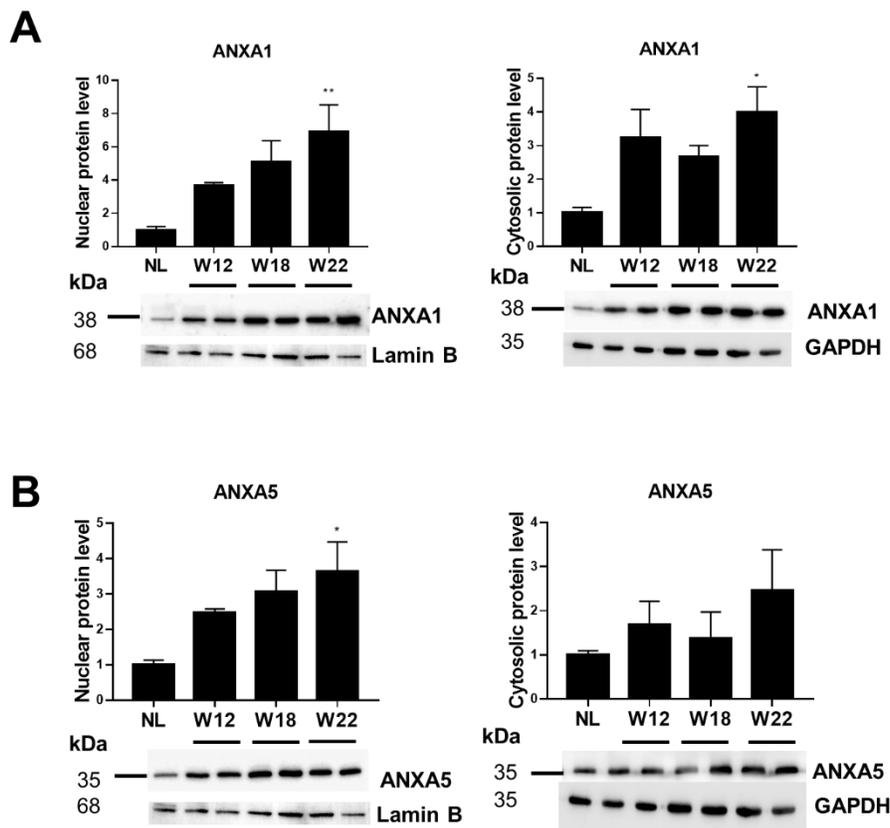


Figura 18. Localización nuclear y citosólica de ANXA1 y ANXA5 durante la progresión del CHC. (A) Localización nuclear y citosólica de ANXA 1, (B) localización nuclear y citosólica de ANXA5 de proteína hepática extraída de tejidos NL, W12, W18 y W22. Las proteínas se detectaron mediante análisis de transferencia Western. Los gráficos indican el promedio \pm SEM obtenido a partir de la densitometría semicuantitativa de las bandas de proteínas. Los niveles de GAPDH y Lamina B se usaron para normalizar los niveles de proteína citosólica y nuclear de interés, respectivamente. $n = 3$ animales por grupo. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ estadísticamente diferente del grupo NL.

Los genes de *Anxa1* y *Anxa5* contienen ARE que son reconocidos por NRF2

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), se basa en la detección de complejos de cromatina entre una proteína con una región del ADN mediante el uso de anticuerpos específicos. Para corroborar dicha unión de NRF2 a los ARE predichos por los análisis *in silico* en la base de datos de secuencias promotoras (<https://epd.epfl.ch//index.php>) (http://rsat.sb-roscoff.fr/matrix-scan-quick_form.cgi) se analizó la interacción entre los complejos de NRF2 con la cromatina de la W18 a través del ensayo de ChIP-PCR de punto final (**Figura 19A**), analizando los productos de PCR de 195 pb y de 187 pb de la región promotora de la *Anxa1* y de *Anxa5*, respectivamente, que contienen el ARE como se indica en el esquema de la **figura 19A**. La presencia de productos de amplificación denota que fueron acarreados por la inmunoprecipitación de cromatina con el anticuerpo anti-NRF2. Adicionalmente, como control positivo de ChIP, se inmunoprecipitó a *Gclc* y a *Ptgr1*, ya que éstos son genes comúnmente conocidos como blancos de regulación transcripcional de NRF2 (**Figura 19B**). En conjunto, estos resultados sugieren que los genes ANXA1 y ANXA5 contienen en su región promotora un ARE que reconoce NRF2 en el CHC experimental, lo cual es relevante ya que es un mecanismo de regulación que describimos novedosamente. Para corroborar esta interacción se sugieren experimentos adicionales como el ensayo de retardamiento EMSA o bien los análisis de gen reportero.

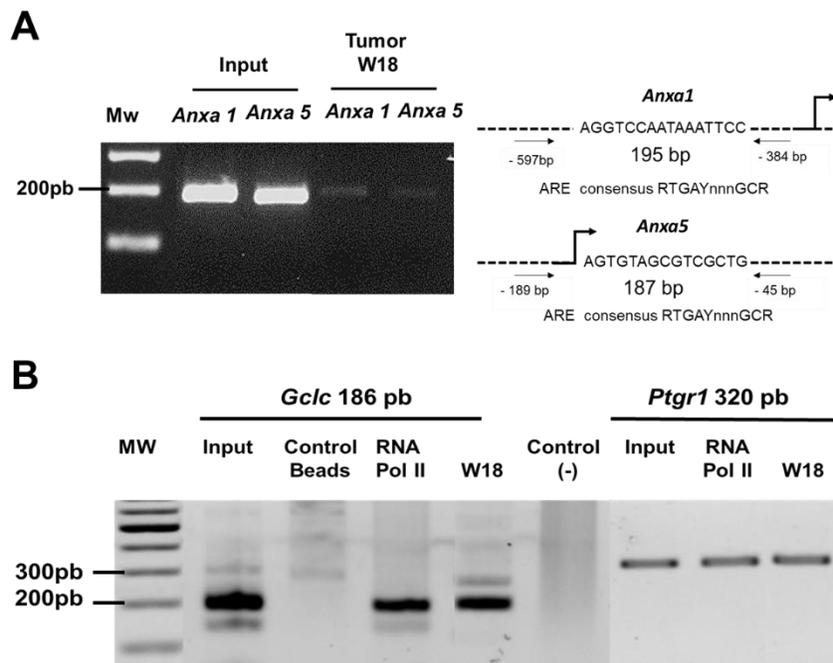


Figura 19. *Anxa1* y *Anxa5* contienen un ARE que reconoce NRF2. (A) Se muestran los productos de amplificación de PCR que indican la unión de NRF2 a los ARE en la región promotora de las *Anxa* 1 y 5, (B) se muestran los productos de PCR de *Gclc* y *Ptgr1* comúnmente reportados como genes blanco de regulación transcripcional por NRF2. Como control positivo de ChIP se empleó ADN total que se indica como Input y la ARN polimerasa II. Como control negativo de inmunoprecipitación, se utilizaron las perlas no unidas al DNA (control de perlas) y un control negativo (-) de reacción de PCR.

Anxa1 y Anxa5 co-expresan con genes regulados por NRF2 en el CHC

Una manera de corroborar la regulación transcripcional de NRF2 sobre los genes de *Anexina* fue a través de un análisis de asociación de co-expresión con los genes regulados por NRF2 como *Ptgr1* o *Nqo1* y la *Anxa1* y *Anxa5*, en bancos de muestras clínicas de diferentes tipos de cáncer como el colorrectal [117], pulmón [81], cabeza y cuello [82], cáncer de cuello uterino [83] y el CHC. A través del análisis en cBIOportal (<https://www.cbiportal.org/>) se determinó que hay una co-expresión significativa entre la *Anxa1* y *Ptgr1* ($p < 0.001$) (**Tabla 4 A**), de manera interesante se encontró una co-expresión significativa entre la *Anxa5* con *Ptgr1* o *Nqo1* ($p < 0.001$) (**Tabla 4 B**). En conjunto, estos datos pueden establecer una correlación de regulación transcripcional de las *Anxas 1y Anxa5* con los genes *Ptgr1*, *Nqo1* como blancos de NRF2.

A	B	p-Value	q-Value \blacktriangle	Tendency
PTGR1	ANXA1	<0.001	<0.001	Co-occurrence
ANXA5	ANXA1	<0.001	<0.001	Co-occurrence
PTGR1	ANXA5	<0.001	<0.001	Co-occurrence
NQO1	ANXA5	0.002	0.002	Co-occurrence
PTGR1	NQO1	0.002	0.002	Co-occurrence
NQO1	ANXA1	0.005	0.005	Co-occurrence

Tabla 4. La *Anxa1* y *Anxa5* se co-expresan con *Ptgr1* o *Nqo1* en cáncer.

8. Discusión

Se ha descrito la localización subcelular de la vía NRF2-KEAP1 mediante el uso de modelos de cultivo celular 2D de líneas celulares [72, 88, 89]. Aunque estos modelos han proporcionado mecanismos relevantes regulados por esta vía de señalización, la falta del microambiente tumoral, como la presencia de matriz extracelular y la respuesta de las células inmunitarias, limita la captura de la interacción que ocurre entre todos los componentes celulares que contribuyen a la actividad de NRF2 bajo una condición dada. Recientemente, hemos descrito que NRF2 regula la expresión del gen que codifica a la enzima PTGR1 en un modelo de CHC de rata inducido por DEN [4]. Este modelo se basa en la administración de DEN que provoca daño hepático crónico, fibrosis, nódulos displásicos y CHC multinodular; asemejándose a las secuencias patológicas observadas en la hepatocarcinogénesis clínica tales como la cirrosis y la progresión del cáncer por daño hepático crónico. Aquí hemos descrito mediante el uso de enfoques histológicos y moleculares la localización subcelular de las proteínas NRF2 y KEAP1, así como el estado de los genes regulados por la vía NRF2-KEAP1 como *Ptgr1*, *Hmox-1*, *Gclc* y *Nqo-1*, lo que corrobora que la vía NRF2-KEAP1 es activa durante la progresión del CHC. NRF2 es un factor de transcripción que regula la expresión de varias enzimas citoprotectoras y juega un papel esencial en el

equilibrio redox intracelular. Curiosamente, varios tipos de cáncer como el colorrectal [117], pulmón [81], cabeza y cuello [82], cáncer de cuello uterino [83] y CHC también muestran una activación persistente de este factor de transcripción, que promueve la transcripción de varios genes citoprotectores y proporciona beneficios de supervivencia y capacidad de expansión clonal a las células cancerosas [72, 84, 85]. Aunque detectamos un aumento de la proteína NRF2 en el citosol y en la fracción nuclear asociada con la progresión de la hepatocarcinogénesis, la expresión de *Nfe2l2* no solo no aumentó, sino que incluso disminuyó en la W22 (**Figura 1**), lo que sugiere que la actividad de NRF2 no depende del nivel del ARNm, sino de la estabilidad de la proteína. De manera similar, la mangiferina, un antioxidante xantonóide, induce la estabilidad de la proteína NRF2 pero no afecta el estado de ARNm [118]. Además, la estabilidad de la proteína se asoció con la inhibición de la ubiquitinación de NRF2; además, la inhibición de la degradación de NRF2 también mejora su traducción en condiciones oxidativas [119]. Curiosamente, se ha reportado que para este fin, un sitio de entrada ribosómico interno (IRES) en el 5'-UTR del ARNm de NRF2 proporciona la estabilidad en la traducción [120].

La heterogeneidad nodular en nuestro modelo de hepatocarcinogénesis es un resultado relevante, ya que es una característica frecuente en el CHC en humanos [37, 121]. Aunque detectamos que el 50 % de los nódulos eran simultáneamente positivos para NRF2 y para algunos de sus genes blanco, tales como PTGR1 y NQO1, varios nódulos mostraron que la mayoría de las células eran positivas para PTGR1 o NQO1, pero NRF2 apenas se expresaba. Es bien sabido que el CHC frecuentemente muestra patrones de crecimiento celular heterogéneos dentro del mismo tumor que refleja la heterogeneidad genética intratumoral, lo que ha representado un obstáculo para el tratamiento farmacológico curativo del CHC [121–123]. Además, varias publicaciones han indicado que la activación de NRF2 desempeña un papel fundamental en la heterogeneidad tumoral y la resistencia al tratamiento farmacológico [124, 125]. Nuestros resultados sugieren que la co-localización diferencial de NRF2 y PTGR1 o NQO1 denota que la heterogeneidad internodular podría estar asociada con la regulación diferencial de sus genes blanco dependiente de NRF2. También, se ha descrito que en cultivo de astrocitos los genes blanco de NRF2 pueden expresarse mediante una actividad neuronal sin NRF2 [126]. Múltiples mecanismos promueven la activación exacerbada de NRF2, como mutaciones somáticas en KEAP1 y NFE2L2 [66], la pérdida recurrente del exón 2 de *Nfe2l2* [67], la metilación del promotor de KEAP1 [68], la acumulación de P62 (SQSTM1) [69], además de las vías oncogénicas, como KRas, Braf y Myc, inducen la actividad de la vía NRF2-KEAP1 [7]. El mecanismo molecular que describe la actividad de la vía NRF2-KEAP1 consiste en el cambio conformacional del complejo NRF2-KEAP1/CUL3-E3 [84] y la posterior inhibición de la ubiquitinación de NRF2. Luego, NRF2 se transloca al núcleo, formando un heterodímero con algún miembro de la familia de proteínas MAF [127]. El

heterodímero se une al ARE en la secuencia promotora de los genes regulados por NRF2.

En ese sentido nuestros datos muestran que NRF2 aumentó tanto en el citosol como en el núcleo durante la progresión del CHC. Por lo tanto, NRF2 se transporta activamente desde el citosol al núcleo de las células neoplásicas. Además, la translocación nuclear de NRF2 de la W12 a la W22 después de la inducción del CHC indica que su activación fue continua, lo que sugiere que la actividad de NRF2 juega un papel esencial en la carcinogénesis hepática. Del mismo modo, mostramos que el nivel de la proteína MAF aumentó constantemente, lo que coincidió con un incremento de NRF2 en los núcleos celulares de los nódulos de CHC.

Nuestros resultados sugieren que la acumulación nuclear de NRF2 y MAF podría conducir a la formación de heterodímeros dentro de las células de los nódulos de CHC. Además, detectamos una expresión diferencial de proteínas pequeñas que se asoció con la progresión de la hepatocarcinogénesis donde el aumento de *Maff* contrastó con la disminución de *Mafg* (**Figura 10**). Los genes *Maf*, a saber, *Maff*, *Mafg* y *Mafk*, se han implicado en la respuesta al estrés mediada por el elemento de respuesta electrófilo (EpRE) [128]. Similar a nuestro resultado, *Maff* fue el gen inducible más significativo por activadores químicos de EpRE en líneas celulares humanas [129]. Sin embargo, la drástica disminución de *Mafg* sugiere un mecanismo regulador adicional en la carcinogénesis hepática inducida por DEN es atractiva de investigar.

El análisis del balance de co-localización reveló una mayor localización de NRF2 en los núcleos que excedía la localización de KEAP1 dentro de las células de los nódulos de CHC de W12 y W18, en comparación con su distribución homogénea en los núcleos de las células NST (**Figura 17**). El KEAP1 puede trasladarse desde el citoplasma al núcleo mediante la unión de la doble repetición de glicina (DRG) en el dominio KEAP1 [58, 130, 131]. Además, se ha descrito que KEAP1 es un represor posterior a la inducción de NRF2, ya que KEAP1 se traslada al núcleo para disociar NRF2 del ARE, después el complejo NRF2-KEAP1 sale del núcleo utilizando la secuencia de exportación nuclear (NES) presente en KEAP1 la cual es reconocida por un mecanismo de exportación nuclear dependiente de la exportina de mantenimiento de la región cromosómica 1 (Crm1) y subsecuentemente NRF2 es degradado vía proteasomal en el citosol [58, 59, 132]. Sin embargo, en nuestro estudio observamos un predominio de NRF2 en el núcleo de las células de los nódulos del CHC lo que sugiere un desequilibrio en el mecanismo de represión ejercido por KEAP1, lo que favorece la expresión de los genes blanco de NRF2. Nuestros resultados también muestran que KEAP1 se localiza en el núcleo y co-localiza con el citoesqueleto de actina cortical tanto en las células hepáticas normales como en las células NST; de manera contraria, se observó una disminución en la co-localización de KEAP1 con el citoesqueleto de actina cortical y en el núcleo de las células neoplásicas (**Figura 17**). Por lo tanto, la translocación nuclear de KEAP1 puede verse afectada debido a la alteración del citoesqueleto de

actina cortical durante la progresión del CHC. En ese sentido, se ha reportado que KEAP1 contribuye a estabilizar el citoesqueleto de actina cortical al inhibir el recambio de adhesión focal en el cáncer de pulmón de células no pequeñas [133]. Por lo tanto, la reestructuración del citoesqueleto de actina dentro de las células de los CHC podría afectar negativamente el anclaje de KEAP1. Estudios previos han demostrado que KEAP1 estabiliza el citoesqueleto de actina a través del aumento de la actividad de RhoA, que inhibe el recambio de adhesión focal, lo que resulta en la restricción de la migración y la invasión del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) [133]. Es de destacar que la supresión de *Nrf2* después del tratamiento con brusatol en células de CPCNP inhibe la migración y la invasión celular al bloquear la vía RhoA-ROCK1; por el contrario, la sobreexpresión de *Nrf2* muestra resultados opuestos. Por lo tanto, la vía NRF2/KEAP1 afecta la motilidad celular al desregular la vía de señalización RhoA-ROCK1 en CPCNP [134]. Nuestro estudio describe la localización de las principales proteínas de la vía de señalización NRF2-KEAP1 en un modelo *in vivo* de CHC a través de ensayos histológicos. Por lo tanto, aún se necesitan estudios adicionales para aclarar el papel de KEAP1 asociado a la reestructuración del citoesqueleto de actina cortical dentro de las células de los nódulos del CHC y su impacto en la actividad de NRF2.

La translocación exacerbada de NRF2 y la pérdida de la actividad represora de KEAP1 se refleja en la transcripción abundante de genes blanco de NRF2, por lo que la búsqueda y caracterización de genes novedosos, proporciona un mejor entendimiento del papel oncogénico de NRF2 en el CHC.

El CHC es uno de los tipos de cáncer en donde la actividad exacerbada de NRF2 promueve la supervivencia de las células tumorales en respuesta a los agentes quimioterapéuticos incluidos el cisplatino, la doxorrubicina y el etopósido. Para prevenir este fenómeno de resistencia, se han abordado distintas estrategias para sensibilizar a las células tumorales; por ejemplo, se ha reportado que el silenciamiento de NRF2 o la sobreexpresión de su represor KEAP1 tiene un efecto positivo en la inhibición de la respuesta antioxidante y en el metabolismo de fármacos, esto causa en consecuencia, la sensibilización de las células cancerosas frente a dichos agentes quimioterapéuticos [135]. Adicionalmente, se ha descrito que compuestos naturales como el Brusatol, sensibiliza a las células cancerosas de pulmón frente al tratamiento con cisplatino, mediante la ubiquitinación y la degradación proteasomal de NRF2. En consecuencia, se reduce la expresión de los genes citoprotectores y que son regulados por NRF2 [136].

De manera interesante, otras estrategias implementadas para la sensibilización de células tumorales son a través de los genes blanco de NRF2. La metformina inhibe la proliferación celular y sensibiliza a las células cancerosas *in vitro* mediante de la inhibición de *HMOX-1* al modular la señalización de Raf-ERK-Nrf2 y los mecanismos independientes de AMPK. Por lo que, la metformina podría ser una terapia eficaz para la sensibilización de células al tratamiento del cáncer [137]. En otro estudio se reportó que en las células de pacientes con leucemia resistentes a la terapia

sobreexpresan las enzimas aldo-ceto reductasa familia 1, miembro C1 (AKR1C1-3). Dichas enzimas, reguladas por NRF2, desempeñan un papel de resistencia en la respuesta al tratamiento con vincristina (VCR). Así la inhibición de los niveles de AKR1C1-3 es suficiente para sensibilizar las células neoplásicas a la VCR [138]. En conjunto, estos experimentos ofrecen evidencia de que la búsqueda de genes novedosos regulados por NRF2 podría ser relevante como una estrategia de sensibilización de células tumorales a través de la vía NRF2-KEAP1.

En ese sentido, los genes *Anxa1* y *Anxa5*, se volvieron de interés de estudio debido a su elevada expresión en los tumores generados en el modelo de CHC *in vivo* [139]. La superfamilia de ANXAs consta de 13 proteínas de unión de calcio y fosfolípidos. A pesar de su alta homología biológica y estructural (40-60%), las anexinas tienen diversas funciones celulares, incluidas la regulación del tráfico de vesículas, la división celular, la apoptosis, la señalización de calcio y la regulación del crecimiento [140]. En determinadas condiciones clínicas, los niveles de expresión de las anexinas o su localización cambian notablemente, lo que sugiere que las anexinas pueden contribuir al desarrollo de enfermedades graves como el cáncer [141].

Se ha descrito que la *Anxa1* desempeña un papel oncogénico al facilitar el crecimiento celular, la migración y la invasión de células tumorales [142, 143]. Por ejemplo, la supresión de la expresión de la *Anxa1* inhibió significativamente la proliferación, migración e invasión de las células de glioma [144]. En concordancia, en otro estudio en donde se utilizaron células de cáncer de páncreas, a las cuales se les inhibió la expresión de *Anxa1*, se observó que también éstas tienen una menor capacidad de migración e invasión [145]. Sin embargo, el eje NRF2-*Anxa1* en el CHC aún no ha sido explorado.

En el análisis de REACTOME (<https://reactome.org/PathwayBrowser/>) se encontró que las vías de señalización en las que participa la ANXA2 son: en la señalización de citocinas en el sistema inmunológico, la contracción muscular, el sistema inmune, el sistema inmune innato, la señalización por interleucinas, la degranulación de neutrófilos, la disolución del coágulo de fibrina, la señalización de la familia interleucina-12, la señalización de interleucina-12, la expresión de genes y proteínas por señalización JAK-STAT después de la estimulación con interleucina-12 y 5.

La ANXA2 es una de las ANXAs más abundantes y ha sido descrita en diferentes tipos de cáncer como el de riñón, el de cerebro, el de páncreas, el linfoma, la leucemia y el de hígado [146]. En el CHC la expresión de la ANXA2 tanto en proteína como a nivel de ARNm está elevada y se asocia con un mal pronóstico [147, 148]; incluso, se ha descrito que cuando eliminan la expresión de la ANXA2 en células de cáncer de hígado se suprime eficazmente la migración e invasión [149]. En ese sentido, la ANXA2 ha sido estudiada ampliamente; sin embargo, el papel que tienen la ANXA1 y la ANXA5 en el CHC aún no está claro, por lo que se necesitan más estudios que las analicen durante la progresión del CHC.

Mientras que la ANXA5 participa en: la desgranulación plaquetaria, la activación, la señalización y la agregación de plaquetas, la hemostasis, y la respuesta al Ca^{+2} citosólico plaquetario. Este hallazgo es relevante, ya que se ha descrito que las plaquetas promueven la proliferación e invasión de células de CHC, pero su participación va más allá del efecto directo sobre las células tumorales, ya que se sabe que desempeñan un papel en la señalización profibrinogénica y la respuesta inmunitaria hepática, así como en la mediación de interacciones entre estos factores en el estroma [150].

De manera interesante, el ChIP-PCR corroboró la presencia de ARE presentes en la región promotora de la *Anxa1* y la *Anxa5*, lo cual sugiere que dichos genes son blanco de regulación transcripcional de NRF2 en el CHC. Además, los análisis de co-expresión en diferentes tipos de cáncer incluyendo el CHC, permitieron establecer una correlación entre la regulación transcripcional de genes novedosos como las *Anxa1*, *Anxa5* y los genes blanco de NRF2 conocidos tales como *Ptgr1* y *Nqo-1*.

9. Conclusiones

- 1.- El aumento gradual de los niveles de ARNm y de proteína de PTGR1, HMOX-1, GCLC y NQO-1 denotan la actividad de NRF2 asociada a la progresión del CHC.
- 2.- Los nódulos hepatocelulares expresaron abundante las proteínas NRF2, PTGR1, NQO1 y HMOX-1 con una localización citosólica.
- 3.- Los análisis de co-marcaje de NRF2-NQO-1 y NRF2-PTGR1 en el CHC multinodular revelaron una co-expresión del 50% y una heterogeneidad internodular e intranodular que caracteriza al CHC.
- 4.- Las células de los nódulos del CHC denotaron una disminución en la interacción de KEAP1 con el citoesqueleto de actina cortical y de la localización nuclear.
5. NRF2 se mostró con un predominio nuclear respecto de KEAP1 en las células del CHC.
- 6.- Las *Anxa1* y *Anxa5* contienen ARE que son reconocidos por NRF2. Así mismo estos genes incrementaron el nivel de proteína citosólica y nuclear conforme la progresión del CHC.

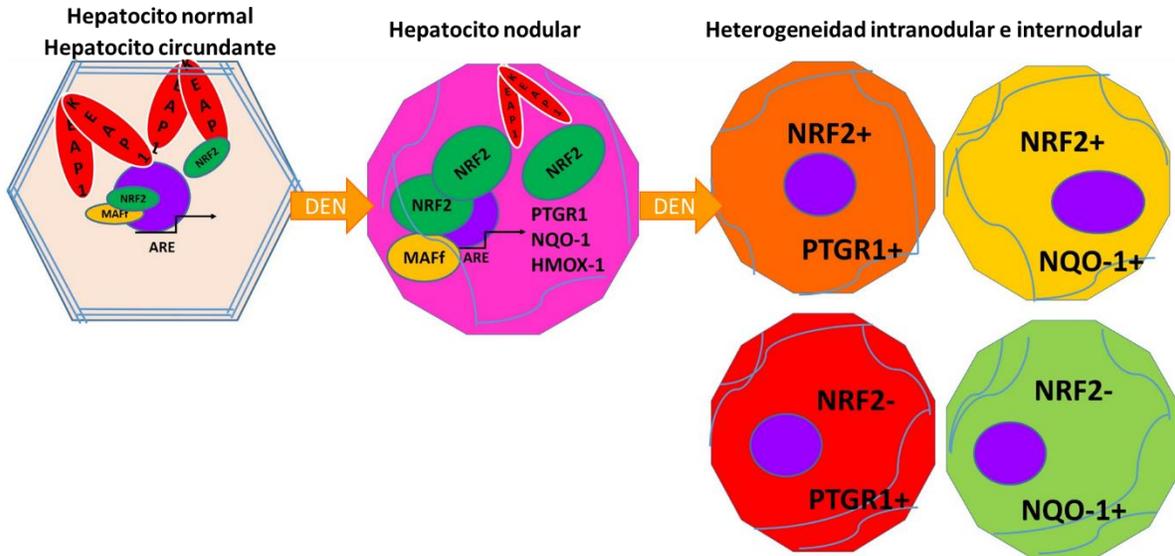


Figura 20. Caracterización de la vía NRF2-KEAP1 y genes blanco durante la progresión del CHC. Los hallazgos histológicos nos permitieron determinar que los hepatocitos normales y los hepatocitos circundantes al nódulo tienen una arquitectura cortical de citoesqueleto de actina y que se asocia a una actividad mínima basal de la vía de NRF2-KEAP1. Mientras que las células tumorales presentan una alteración del citoesqueleto de actina, lo cual se ve reflejado en una pérdida de la arquitectura cortical. Esta alteración repercutió en una disminución notoria en la unión de KEAP1 a los filamentos de actina. De manera interesante, la activación exacerbada de NRF2 denota una abundante expresión de proteínas PTGR1, NQO-1 y HMOX-1. Por otro lado, los experimentos de co-marcaje de los genes blanco de NRF2 y el mismo factor de transcripción, demostraron que hay una heterogeneidad en las etapas avanzadas del CHC experimental, de tal forma que hay células con un fenotipo doble positivo y otro grupo de células que son interesantes de estudiar ya que expresan el gen blanco, pero sin la expresión de NRF2, lo que pudiera indicar algún otro mecanismo de regulación génica.

Perspectivas

- 1.-Determinar si la pérdida de la actividad represora de KEAP1 influye en la migración e invasión de células cancerosas en el CHC.
- 2.-Mediante ensayos de gen reportero es importante corroborar si la actividad transcripcional de las *Anxa1* y *Anxa5* es regulada por NRF2 en un modelo *in vitro*.
- 3.-Determinar el papel del eje *Anxa1*-NRF2 o *Anxa5*-NRF2 en la progresión del CHC.

Referencias

1. Yang, J.D., Hainaut, P., Gores, G.J., Amadou, A., Plymoth, A., Roberts, L.R.: A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 589–604 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y>
2. Farazi, P.A., DePinho, R.A.: Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer.* 6, 674–87 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrc1934>
3. Jadeja, R.N., Devkar, R.V., Nammi, S.: Oxidative Stress in Liver Diseases: Pathogenesis, Prevention, and Therapeutics. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 1–2 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/8341286>
4. Sanchez-Rodriguez, R., Torres-Mena, J.E., Quintanar-Jurado, V., Chagoya-Hazas, V., Rojas Del Castillo, E., Del Pozo Yauner, L., Villa-Trevino, S., Perez-Carreón, J.I.: Ptgr1 expression is regulated by NRF2 in rat hepatocarcinogenesis and promotes cell proliferation and resistance to oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 102, 87–99 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.027>
5. Kwak, M.-K., Itoh, K., Yamamoto, M., Kensler, T.W.: Enhanced Expression of the Transcription Factor Nrf2 by Cancer Chemopreventive Agents: Role of Antioxidant Response Element-Like Sequences in the *nrf2* Promoter. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2883–2892 (2002). <https://doi.org/10.1128/MCB.22.9.2883-2892.2002>
6. Kwak, M.-K., Kensler, T.W.: Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244, 66–76 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.028>
7. DeNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K.H., Yeo, C.J., Calhoun, E.S., Scrimieri, F., Winter, J.M., Hruban, R.H., Iacobuzio-Donahue, C., Kern, S.E., Blair, I.A., Tuveson, D.A.: Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature.* 475, 106–9 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature10189>
8. Ma-On, C., Sanpavat, A., Whongsiri, P., Suwannasin, S., Hirankarn, N., Tangkijvanich, P., Boonla, C.: Oxidative stress indicated by elevated expression of Nrf2 and 8-OHdG promotes hepatocellular carcinoma progression. *Med Oncol.* 34, 57 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12032-017-0914-5>
9. Rojo de la Vega, M., Chapman, E., Zhang, D.D.: NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell.* 34, 21–43 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.022>

10. Ngo, H.K.C., Kim, D.-H., Cha, Y.-N., Na, H.-K., Surh, Y.-J.: Nrf2 Mutagenic Activation Drives Hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 77, 4797–4808 (2017). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3538>
11. Zhou, S., Ye, W., Shao, Q., Zhang, M., Liang, J.: Nrf2 is a potential therapeutic target in radioresistance in human cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 88, 706–15 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.09.001>
12. Silva-Islas, C.A., Maldonado, P.D.: Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol Res.* 134, 92–99 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.013>
13. Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H., Yamamoto, M.: Physiological Significance of Reactive Cysteine Residues of Keap1 in Determining Nrf2 Activity. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2758–2770 (2008). <https://doi.org/10.1128/MCB.01704-07>
14. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y.: An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313–322 (1997). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943>
15. Hirotsu, Y., Katsuoka, F., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Nakayama, K., Engel, J.D., Yamamoto, M.: Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* 40, 10228–39 (2012). <https://doi.org/10.1093/nar/gks827>
16. Sonnenschein, C., Soto, A.M.: Theories of carcinogenesis: An emerging perspective. *Semin. Cancer Biol.* 18, 372–377 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.012>
17. Hanahan, D., Weinberg, R.A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144, 646–74 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
18. Horne, S.D., Pollick, S.A., Heng, H.H.: Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer. *Int J Cancer.* 136, 2012–21 (2015). <https://doi.org/10.1002/ijc.29031>
19. Chang, C.W., Chen, Y.S., Tsay, Y.G., Han, C.L., Chen, Y.J., Yang, C.C., Hung, K.F., Lin, C.H., Huang, T.Y., Kao, S.Y., Lee, T.C., Lo, J.F.: ROS-independent ER stress-mediated NRF2 activation promotes warburg effect to maintain stemness-associated properties of cancer-initiating cells. *Cell Death Dis.* 9, 194 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0250-x>
20. Hanahan, D.: Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12, 31–46 (2022). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

21. Li, Y., Tang, Z.Y., Hou, J.X.: Hepatocellular carcinoma: insight from animal models. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 9, 32–43 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.196>
22. Szpirer, C.: Cancer research in rat models. *Methods Mol Biol.* 597, 445–58 (2010). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-389-3_30
23. Goldsworthy, T.L., Hanigan, M.H., Pitot, H.C.: Models of hepatocarcinogenesis in the rat--contrasts and comparisons. *Crit Rev Toxicol.* 17, 61–89 (1986). <https://doi.org/10.3109/10408448609037071>
24. Leenders, M.W., Nijkamp, M.W., Borel Rinkes, I.H.: Mouse models in liver cancer research: a review of current literature. *World J Gastroenterol.* 14, 6915–23 (2008). <https://doi.org/10.3748/wjg.14.6915>
25. Bagnyukova, T.V., Tryndyak, V.P., Montgomery, B., Churchwell, M.I., Karpf, A.R., James, S.R., Muskhelishvili, L., Beland, F.A., Pogribny, I.P.: Genetic and epigenetic changes in rat preneoplastic liver tissue induced by 2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis.* 29, 638–46 (2008). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm303>
26. Steward, A.R., Elmarakby, S.A., Stuart, K.G., Kumar, S., Sikka, H.C.: Metabolism of 2-acetylaminofluorene by hepatocytes isolated from rainbow trout. *Toxicol Appl Pharmacol.* 130, 188–96 (1995). <https://doi.org/10.1006/taap.1995.1024>
27. Ohlson, L.C., Koroxenidou, L., Hallstrom, I.P.: Inhibition of in vivo rat liver regeneration by 2-acetylaminofluorene affects the regulation of cell cycle-related proteins. *Hepatology.* 27, 691–6 (1998). <https://doi.org/10.1002/hep.510270309>
28. Vineis, P., Schatzkin, A., Potter, J.D.: Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis.* 31, 1703–1709 (2010). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq087>
29. Muriel, P. ed: *Liver pathophysiology: therapies and antioxidants.* Academic Press, an imprint of Elsevier, London, United Kingdom (2017)
30. Trefts, E., Gannon, M., Wasserman, D.H.: The liver. *Curr. Biol.* 27, R1147–R1151 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
31. Senoo, H., Kojima, N., Sato, M.: Vitamin A-Storing Cells (Stellate Cells). In: *Vitamins & Hormones.* pp. 131–159. Elsevier (2007)
32. Kietzmann, T.: Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol.* 11, 622–630 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.012>
33. Jungermann, K.: Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochem. Cell Biol.* 103, 81–91 (1995). <https://doi.org/10.1007/BF01454004>

34. Aravalli, R.N., Cressman, E.N.K., Steer, C.J.: Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Arch. Toxicol.* 87, 227–247 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0931-2>
35. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F.: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71, 209–249 (2021). <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
36. El-Serag, H.B., Rudolph, K.L.: Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 132, 2557–76 (2007). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.061>
37. Calderaro, J., Couchy, G., Imbeaud, S., Amaddeo, G., Letouzé, E., Blanc, J.-F., Laurent, C., Hajji, Y., Azoulay, D., Bioulac-Sage, P., Nault, J.-C., Zucman-Rossi, J.: Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J. Hepatol.* 67, 727–738 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.014>
38. Paradis, V.: Histopathology of Hepatocellular Carcinoma. In: Vauthey, J.-N. and Brouquet, A. (eds.) *Multidisciplinary Treatment of Hepatocellular Carcinoma.* pp. 21–32. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg (2013)
39. Wang, T., Zhang, K.H.: New Blood Biomarkers for the Diagnosis of AFP-Negative Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol.* 10, 1316 (2020). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01316>
40. Uthamalingam, P., Das, A., Behra, A., Kalra, N., Chawla, Y.: Diagnostic Value of Glypican3, Heat Shock Protein 70 and Glutamine Synthetase in Hepatocellular Carcinoma Arising in Cirrhotic and Non-Cirrhotic Livers. *J Clin Exp Hepatol.* 8, 173–180 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2017.09.005>
41. Aravalli, R.N., Steer, C.J., Cressman, E.N.K.: Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 48, 2047–2063 (2008). <https://doi.org/10.1002/hep.22580>
42. Llovet, J.M., Kelley, R.K., Villanueva, A., Singal, A.G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., Finn, R.S.: Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primer.* 7, 6 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
43. Marra, M., Sordelli, I.M., Lombardi, A., Lamberti, M., Tarantino, L., Giudice, A., Stiuso, P., Abbruzzese, A., Sperlongano, R., Accardo, M., Agresti, M., Caraglia, M., Sperlongano, P.: Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview. *J. Transl. Med.* 9, 171 (2011). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-171>
44. Urabe, Y., Nouse, K., Higashi, T., Nakatsukasa, H., Hino, N., Ashida, K., Kinugasa, N., Yoshida, K., Uematsu, S., Tsuji, T.: Telomere length in human liver

diseases. *Liver*. 16, 293–297 (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1996.tb00748.x>

45. Kitada, T., Seki, S., Kawakita, N., Kuroki, T., Monna, T.: Telomere Shortening in Chronic Liver Diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 33–39 (1995). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1774>

46. Lechel, A., Manns, M.P., Rudolph, K.L.: Telomeres and telomerase: new targets for the treatment of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 41, 491–7 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.06.010>

47. Ueda, H., Ullrich, S.J., Gangemi, J.D., Kappel, C.A., Ngo, L., Feitelson, M.A., Jay, G.: Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nat. Genet.* 9, 41–47 (1995). <https://doi.org/10.1038/ng0195-41>

48. Schulze, K., Imbeaud, S., Letouze, E., Alexandrov, L.B., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., Meiller, C., Shinde, J., Soysouvanh, F., Calatayud, A.L., Pinyol, R., Pelletier, L., Balabaud, C., Laurent, A., Blanc, J.F., Mazzaferro, V., Calvo, F., Villanueva, A., Nault, J.C., Bioulac-Sage, P., Stratton, M.R., Llovet, J.M., Zucman-Rossi, J.: Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet.* 47, 505–511 (2015). <https://doi.org/10.1038/ng.3252>

49. Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.C., Llovet, J.M.: Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 149, 1226-1239 e4 (2015). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.061>

50. Urtasun, R., Berasain, C., Avila, M.A.: Oxidative Stress Mechanisms in Hepatocarcinogenesis. 449–477 (2015). https://doi.org/10.1007/978-3-319-15539-5_20

51. Fu, Y., Chung, F.-L.: Oxidative stress and hepatocarcinogenesis. *Hepatoma Res.* 4, 39 (2018). <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2018.29>

52. Moreira, A.J., Rodrigues, G., Bona, S., Cerski, C.T., Marroni, C.A., Mauriz, J.L., Gonzalez-Gallego, J., Marroni, N.P.: Oxidative stress and cell damage in a model of precancerous lesions and advanced hepatocellular carcinoma in rats. *Toxicol Rep.* 2, 333–340 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.11.015>

53. Sporn, M.B., Liby, K.T.: NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer.* 12, 564–71 (2012). <https://doi.org/10.1038/nrc3278>

54. Satta, S., Mahmoud, A.M., Wilkinson, F.L., Yvonne Alexander, M., White, S.J.: The Role of Nrf2 in Cardiovascular Function and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, e9237263 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/9237263>

55. Suzuki, T., Yamamoto, M.: Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med.* 88, 93–100 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006>
56. Zenkov, N.K., Kozhin, P.M., Chechushkov, A.V., Martinovich, G.G., Kandalintseva, N.V., Menshchikova, E.B.: Mazes of Nrf2 Regulation. *Biochem. Mosc.* 82, 556–564 (2017). <https://doi.org/10.1134/S0006297917050030>
57. Baird, L., Yamamoto, M.: The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 40, e00099-20 (2020). <https://doi.org/10.1128/MCB.00099-20>
58. Velichkova, M., Hasson, T.: Keap1 Regulates the Oxidation-Sensitive Shuttling of Nrf2 into and out of the Nucleus via a Crm1-Dependent Nuclear Export Mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4501–4513 (2005). <https://doi.org/10.1128/MCB.25.11.4501-4513.2005>
59. Sun, Z., Zhang, S., Chan, J.Y., Zhang, D.D.: Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 27, 6334–49 (2007). <https://doi.org/10.1128/MCB.00630-07>
60. Zhang, D.D., Hannink, M.: Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-Dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8137–8151 (2003). <https://doi.org/10.1128/MCB.23.22.8137-8151.2003>
61. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., Yamamoto, M.: Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76–86 (1999). <https://doi.org/10.1101/gad.13.1.76>
62. Raghunath, A., Sundarraj, K., Nagarajan, R., Arfuso, F., Bian, J., Kumar, A.P., Sethi, G., Perumal, E.: Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. *Redox Biol.* 17, 297–314 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.05.002>
63. Tonelli, C., Chio, I.I.C., Tuveson, D.A.: Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal.* 29, 1727–1745 (2018). <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>
64. Chorley, B.N., Campbell, M.R., Wang, X., Karaca, M., Sambandan, D., Bangura, F., Xue, P., Pi, J., Kleeberger, S.R., Bell, D.A.: Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Res.* 40, 7416–29 (2012). <https://doi.org/10.1093/nar/gks409>
65. Kwak, M.-K., Itoh, K., Yamamoto, M., Kensler, T.W.: Enhanced Expression of the Transcription Factor Nrf2 by Cancer Chemopreventive Agents: Role of

Antioxidant Response Element-Like Sequences in the *nrf2* Promoter. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2883–2892 (2002). <https://doi.org/10.1128/MCB.22.9.2883-2892.2002>

66. Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., Hirohashi, S.: Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci U A.* 105, 13568–73 (2008). <https://doi.org/10.1073/pnas.0806268105>

67. Goldstein, L.D., Lee, J., Gnad, F., Klijn, C., Schaub, A., Reeder, J., Daemen, A., Bakalarski, C.E., Holcomb, T., Shames, D.S., Hartmaier, R.J., Chmielecki, J., Seshagiri, S., Gentleman, R., Stokoe, D.: Recurrent Loss of NFE2L2 Exon 2 Is a Mechanism for Nrf2 Pathway Activation in Human Cancers. *Cell Rep.* 16, 2605–2617 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.010>

68. Fabrizio, F.P., Costantini, M., Copetti, M., la Torre, A., Sparaneo, A., Fontana, A., Poeta, L., Gallucci, M., Sentinelli, S., Graziano, P., Parente, P., Pompeo, V., Salvo, L.D., Simone, G., Papalia, R., Picardo, F., Balsamo, T., Flammia, G.P., Trombetta, D., Pantalone, A., Kok, K., Paranita, F., Muscarella, L.A., Fazio, V.M.: Keap1/Nrf2 pathway in kidney cancer: frequent methylation of KEAP1 gene promoter in clear renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 8, 11187–11198 (2017). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14492>

69. Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., Yamamoto, M.: The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12, 213–223 (2010). <https://doi.org/10.1038/ncb2021>

70. Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M.: Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7130–7139 (2004). <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7130-7139.2004>

71. Egger, A.L., Liu, G., Pezzuto, J.M., van Breemen, R.B., Mesecar, A.D.: Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 10070–10075 (2005). <https://doi.org/10.1073/pnas.0502402102>

72. Li, C., Cheng, L., Wu, H., He, P., Zhang, Y., Yang, Y., Chen, J., Chen, M.: Activation of the KEAP1- NRF2- ARE signaling pathway reduces oxidative stress in Hep2 cells. *Mol. Med. Rep.* (2018). <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9288>

73. Truong, V.-L., Jun, M., Jeong, W.-S.: Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress: Cellular defense systems against oxidative stress. *BioFactors.* 44, 36–49 (2018). <https://doi.org/10.1002/biof.1399>

74. Kobayashi, M., Yamamoto, M.: Nrf2–Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme Regul.* 46, 113–140 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2006.01.007>
75. Cornejo, P., Vargas, R., Videla, L.A.: Nrf2-regulated phase-II detoxification enzymes and phase-III transporters are induced by thyroid hormone in rat liver: T₃-induced liver phase-II enzymes and phase-III transporters. *BioFactors.* 39, 514–521 (2013). <https://doi.org/10.1002/biof.1094>
76. Yeager, R.L., Reisman, S.A., Aleksunes, L.M., Klaassen, C.D.: Introducing the “TCDD-Inducible AhR-Nrf2 Gene Battery.” *Toxicol. Sci.* 111, 238–246 (2009). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp115>
77. Gu, J., Cheng, Y., Wu, H., Kong, L., Wang, S., Xu, Z., Zhang, Z., Tan, Y., Keller, B.B., Zhou, H., Wang, Y., Xu, Z., Cai, L.: Metallothionein Is Downstream of Nrf2 and Partially Mediates Sulforaphane Prevention of Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes.* 66, 529–542 (2017). <https://doi.org/10.2337/db15-1274>
78. Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S.: METALLOTHIONEIN: An Intracellular Protein to Protect Against Cadmium Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267–294 (1999). <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.267>
79. Liu, J., Cui, J.Y., Lu, Y.-F., Corton, J.C., Klaassen, C.D.: Sex-, Age-, and Race/Ethnicity-Dependent Variations in Drug-Processing and NRF2-Regulated Genes in Human Livers. *Drug Metab. Dispos.* 49, 111–119 (2021). <https://doi.org/10.1124/dmd.120.000181>
80. Lee, O.H., Jain, A.K., Papusha, V., Jaiswal, A.K.: An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J Biol Chem.* 282, 36412–20 (2007). <https://doi.org/10.1074/jbc.M706517200>
81. Homma, S., Ishii, Y., Morishima, Y., Yamadori, T., Matsuno, Y., Haraguchi, N., Kikuchi, N., Satoh, H., Sakamoto, T., Hizawa, N., Itoh, K., Yamamoto, M.: Nrf2 Enhances Cell Proliferation and Resistance to Anticancer Drugs in Human Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* 15, 3423–3432 (2009). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2822>
82. Namani, A., Matiur Rahaman, Md., Chen, M., Tang, X.: Gene-expression signature regulated by the KEAP1-NRF2-CUL3 axis is associated with a poor prognosis in head and neck squamous cell cancer. *BMC Cancer.* 18, 46 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3907-z>
83. Peng, L., Hu, C., Zhang, C., Lu, Y., Man, S., Ma, L.: Anti-cancer activity of *Conyza blinii* saponin against cervical carcinoma through MAPK/TGF- β /Nrf2 signaling pathways. *J. Ethnopharmacol.* 251, 112503 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112503>

84. Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P.: Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11908–11913 (2002). <https://doi.org/10.1073/pnas.172398899>
85. Yang, Y., Zheng, J., Wang, M., Zhang, J., Tian, T., Wang, Z., Yuan, S., Liu, L., Zhu, P., Gu, F., Fu, S., Shan, Y., Pan, Z., Zhou, W.: NQO1 promotes an aggressive phenotype in hepatocellular carcinoma *via* amplifying ERK-NRF2 signaling. *Cancer Sci.* 112, 641–654 (2021). <https://doi.org/10.1111/cas.14744>
86. Wang, X.J., Sun, Z., Villeneuve, N.F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., Wondrak, G.T., Wong, P.K., Zhang, D.D.: Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis.* 29, 1235–43 (2008). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn095>
87. Zavattari, P., Perra, A., Menegon, S., Kowalik, M.A., Petrelli, A., Angioni, M.M., Follenzi, A., Quagliata, L., Ledda-Columbano, G.M., Terracciano, L., Giordano, S., Columbano, A.: Nrf2, but not beta-catenin, mutation represents an early event in rat hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 62, 851–62 (2015). <https://doi.org/10.1002/hep.27790>
88. Ngo, H.K.C., Kim, D.-H., Cha, Y.-N., Na, H.-K., Surh, Y.-J.: Nrf2 Mutagenic Activation Drives Hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 77, 4797–4808 (2017). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3538>
89. Zhang, M., Zhang, C., Zhang, L., Yang, Q., Zhou, S., Wen, Q., Wang, J.: Nrf2 is a potential prognostic marker and promotes proliferation and invasion in human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 15, 531 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1541-1>
90. Petrelli, A., Perra, A., Cora, D., Sulas, P., Menegon, S., Manca, C., Migliore, C., Kowalik, M.A., Ledda-Columbano, G.M., Giordano, S., Columbano, A.: MicroRNA/gene profiling unveils early molecular changes and nuclear factor erythroid related factor 2 (NRF2) activation in a rat model recapitulating human hepatocellular carcinoma (HCC). *Hepatology.* 59, 228–41 (2014). <https://doi.org/10.1002/hep.26616>
91. Gan, N., Sun, X., Song, L.: Activation of Nrf2 by Microcystin-LR Provides Advantages for Liver Cancer Cell Growth. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 1477–1484 (2010). <https://doi.org/10.1021/tx1001628>
92. Endo, H., Owada, S., Inagaki, Y., Shida, Y., Tatemichi, M.: Glucose starvation induces LKB1-AMPK-mediated MMP-9 expression in cancer cells. *Sci. Rep.* 8, 10122 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28074-w>

93. Zhang, Q., Chen, X., Zhou, J., Zhang, L., Zhao, Q., Chen, G., Xu, J., Feng, Q., Chen, Z.: CD147, MMP-2, MMP-9 and MVD-CD34 are significant predictors of recurrence after liver transplantation in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Biol. Ther.* 5, 808–814 (2006). <https://doi.org/10.4161/cbt.5.7.2754>
94. Nart, D., Yaman, B., Yılmaz, F., Zeytunlu, M., Karasu, Z., Kılıç, M.: Expression of matrix metalloproteinase-9 in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: Expression of MMP-9 in Hepatocellular Carcinoma. *Liver Transpl.* 16, 621–630 (2010). <https://doi.org/10.1002/lt.22028>
95. Sun, Q.-K., Zhu, J.-Y., Wang, W., Lv, Y., Zhou, H.-C., Yu, J.-H., Xu, G.-L., Ma, J.-L., Zhong, W., Jia, W.-D.: Diagnostic and prognostic significance of peroxiredoxin 1 expression in human hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol.* 31, 786 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0786-2>
96. Lee, D., Xu, I.M.-J., Chiu, D.K.-C., Lai, R.K.-H., Tse, A.P.-W., Lan Li, L., Law, C.-T., Tsang, F.H.-C., Wei, L.L., Chan, C.Y.-K., Wong, C.-M., Ng, I.O.-L., Wong, C.C.-L.: Folate cycle enzyme MTHFD1L confers metabolic advantages in hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Invest.* 127, 1856–1872 (2017). <https://doi.org/10.1172/JCI90253>
97. Heiss, E.H., Schachner, D., Zimmermann, K., Dirsch, V.M.: Glucose availability is a decisive factor for Nrf2-mediated gene expression. *Redox Biol.* 1, 359–365 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.06.001>
98. Chowdhry, S., Nazmy, M.H., Meakin, P.J., Dinkova-Kostova, A.T., Walsh, S.V., Tsujita, T., Dillon, J.F., Ashford, M.L.J., Hayes, J.D.: Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 357–371 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.007>
99. Kowalik, M.A., Guzzo, G., Morandi, A., Perra, A., Menegon, S., Masgras, I., Trevisan, E., Angioni, M.M., Fornari, F., Quagliata, L., Ledda-Columbano, G.M., Gramantieri, L., Terracciano, L., Giordano, S., Chiarugi, P., Rasola, A., Columbano, A.: Metabolic reprogramming identifies the most aggressive lesions at early phases of hepatic carcinogenesis. *Oncotarget.* 7, 32375–32393 (2016). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8632>
100. Carlson, E.S., Upadhyaya, P., Hecht, S.S.: A General Method for Detecting Nitrosamide Formation in the In Vitro Metabolism of Nitrosamines by Cytochrome P450s. *J Vis Exp.* (2017). <https://doi.org/10.3791/56312>
101. Tolba, R., Kraus, T., Liedtke, C., Schwarz, M., Weiskirchen, R.: Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Lab Anim.* 49, 59–69 (2015). <https://doi.org/10.1177/0023677215570086>
102. Syed, I.: Acetylaminofluorene. In: Wexler, P. (ed.) *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition). pp. 46–48. Academic Press, Oxford (2014)

103. Castro-Gil, M.P., Sánchez-Rodríguez, R., Torres-Mena, J.E., López-Torres, C.D., Quintanar-Jurado, V., Gabiño-López, N.B., Villa-Treviño, S., del-Pozo-Jauner, L., Arellanes-Robledo, J., Pérez-Carreón, J.I.: Enrichment of progenitor cells by 2-acetylaminofluorene accelerates liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in vivo. *Mol. Carcinog.* 60, 377–390 (2021). <https://doi.org/10.1002/mc.23298>
104. Solt, D.B., Cayama, E., Tsuda, H., Enomoto, K., Lee, G., Farber, E.: Promotion of liver cancer development by brief exposure to dietary 2-acetylaminofluorene plus partial hepatectomy or carbon tetrachloride. *Cancer Res.* 43, 188–91 (1983)
105. Schiffer, E., Housset, C., Cacheux, W., Wendum, D., Desbois-Mouthon, C., Rey, C., Clergue, F., Poupon, R., Barbu, V., Rosmorduc, O.: Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology.* 41, 307–14 (2005). <https://doi.org/10.1002/hep.20538>
106. Guerrero-Escalera, D., Alarcon-Sanchez, B.R., Arellanes-Robledo, J., Cruz-Rangel, A., Del Pozo-Yauner, L., Chagoya de Sanchez, V., Resendis-Antonio, O., Villa-Trevino, S., Torres-Mena, J.E., Perez-Carreon, J.I.: Comparative subcellular localization of NRF2 and KEAP1 during the hepatocellular carcinoma development in vivo. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1869, 119222 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119222>
107. Julia Esperanza Torres Mena: “LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GENÉTICA CONTRIBUYEN A LA IDENTIFICACIÓN DE LAS LESIONES NODULARES CON POTENCIAL PRENEOPLÁSICO EN LA HEPATOCARCINOGENÉISIS EXPERIMENTAL”
108. Castro-Gil, M.P., Sánchez-Rodríguez, R., Torres-Mena, J.E., López-Torres, C.D., Quintanar-Jurado, V., Gabiño-López, N.B., Villa-Treviño, S., del-Pozo-Jauner, L., Arellanes-Robledo, J., Pérez-Carreón, J.I.: Enrichment of progenitor cells by 2-acetylaminofluorene accelerates liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in vivo. *Mol. Carcinog.* 60, 377–390 (2021). <https://doi.org/10.1002/mc.23298>
109. Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., Kan, Y.W.: Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 9926–9930 (1994). <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9926>
110. Lau, A., Tian, W., Whitman, S.A., Zhang, D.D.: The Predicted Molecular Weight of Nrf2: It Is What It Is Not. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 91–93 (2013). <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4754>
111. Tamir, T.Y., Mulvaney, K.M., Major, M.B.: Dissecting the Keap1/Nrf2 pathway through proteomics. *Curr. Opin. Toxicol.* 1, 118–124 (2016)

112. Zhao, J., Zhang, B., Li, S., Zeng, L., Chen, Y., Fang, J.: Mangiferin increases Nrf2 protein stability by inhibiting its ubiquitination and degradation in human HL60 myeloid leukemia cells. *Int. J. Mol. Med.* 33, 1348–1354 (2014). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1696>
113. Velichkova, M., Hasson, T.: Keap1 in adhesion complexes. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 56, 109–119 (2003). <https://doi.org/10.1002/cm.10138>
114. Torres-Mena, J.E., Salazar-Villegas, K.N., Sánchez-Rodríguez, R., López-Gabiño, B., Del Pozo-Yauner, L., Arellanes-Robledo, J., Villa-Treviño, S., Gutiérrez-Nava, M.A., Pérez-Carreón, J.I.: Aldo-Keto Reductases as Early Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma: A Comparison Between Animal Models and Human HCC. *Dig. Dis. Sci.* 63, 934–944 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10620-018-4943-5>
115. Otsuki, A., Yamamoto, M.: Cis-element architecture of Nrf2–sMaf heterodimer binding sites and its relation to diseases. *Arch. Pharm. Res.* 43, 275–285 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01193-2>
116. Schmid, C.D.: EPD in its twentieth year: towards complete promoter coverage of selected model organisms. *Nucleic Acids Res.* 34, D82–D85 (2006). <https://doi.org/10.1093/nar/gkj146>
117. Lee, Y.J., Kim, W.I., Bae, J.H., Cho, M.K., Lee, S.H., Nam, H.S., Choi, I.H., Cho, S.W.: Overexpression of Nrf2 promotes colon cancer progression via ERK and AKT signaling pathways. *Ann. Surg. Treat. Res.* 98, 159 (2020). <https://doi.org/10.4174/astr.2020.98.4.159>
118. Zhao, J., Zhang, B., Li, S., Zeng, L., Chen, Y., Fang, J.: Mangiferin increases Nrf2 protein stability by inhibiting its ubiquitination and degradation in human HL60 myeloid leukemia cells. *Int. J. Mol. Med.* 33, 1348–1354 (2014). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1696>
119. Purdom-Dickinson, S.E., Sheveleva, E.V., Sun, H., Chen, Q.M.: Translational Control of Nrf2 Protein in Activation of Antioxidant Response by Oxidants. *Mol. Pharmacol.* 72, 1074–1081 (2007). <https://doi.org/10.1124/mol.107.035360>
120. Li, W., Thakor, N., Xu, E.Y., Huang, Y., Chen, C., Yu, R., Holcik, M., Kong, A.-N.: An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2. *Nucleic Acids Res.* 38, 778–788 (2010). <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1048>
121. Friemel, J., Rechsteiner, M., Frick, L., Böhm, F., Struckmann, K., Egger, M., Moch, H., Heikenwalder, M., Weber, A.: Intratumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 21, 1951–1961 (2015). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0122>
122. An, F.-Q., Matsuda, M., Fujii, H., Tang, R.-F., Amemiya, H., Dai, Y.-M., Matsumoto, Y.: Tumor heterogeneity in small hepatocellular carcinoma: Analysis of

tumor cell proliferation, expression and mutation of p53 AND β -catenin. *Int. J. Cancer*. 93, 468–474 (2001). <https://doi.org/10.1002/ijc.1367>

123. Kenmochi, K., Sugihara, S., Kojiro, M.: Relationship of histologic grade of hepatocellular carcinoma (HCC) to tumor size, and demonstration of tumor cells of multiple different grades in single small HCC. *Liver*. 7, 18–26 (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1987.tb00310.x>

124. Zhang, H., Chen, Y., Xu, R., He, Q.: Nrf2 mediates the resistance of human A549 and HepG2 cancer cells to boningmycin, a new antitumor antibiotic, in vitro through regulation of glutathione levels. *Acta Pharmacol. Sin*. 39, 1661–1669 (2018). <https://doi.org/10.1038/aps.2018.21>

125. Oshimori, N., Oristian, D., Fuchs, E.: TGF- β Promotes Heterogeneity and Drug Resistance in Squamous Cell Carcinoma. *Cell*. 160, 963–976 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.043>

126. Deighton, R.F., Márkus, N.M., Al-Mubarak, B., Bell, K.F.S., Papadia, S., Meakin, P.J., Chowdhry, S., Hayes, J.D., Hardingham, G.E.: Nrf2 target genes can be controlled by neuronal activity in the absence of Nrf2 and astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 111, (2014). <https://doi.org/10.1073/pnas.1402097111>

127. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y.: An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 236, 313–322 (1997). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943>

128. Moran, J.A., Dahl, E.L., Mulcahy, R.T.: Differential induction of mafF, mafG and mafK expression by electrophile-response-element activators. *Biochem. J*. 361, 371–377 (2002). <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3610371>

129. Moran, J.A., Dahl, E.L., Mulcahy, R.T.: Differential induction of mafF, mafG and mafK expression by electrophile-response-element activators. *Biochem. J*. 361, 371–377 (2002). <https://doi.org/10.1042/bj3610371>

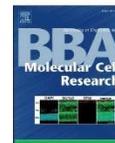
130. Velichkova, M., Hasson, T.: Keap1 in adhesion complexes. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 56, 109–119 (2003). <https://doi.org/10.1002/cm.10138>

131. Zhang, D.D.: Mechanistic Studies of the Nrf2-Keap1 Signaling Pathway. *Drug Metab. Rev*. 38, 769–789 (2006). <https://doi.org/10.1080/03602530600971974>

132. Kang, M.-I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.-G., Yamamoto, M.: Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 101, 2046–2051 (2004). <https://doi.org/10.1073/pnas.0308347100>

133. Wu, B., Yang, S., Sun, H., Sun, T., Ji, F., Wang, Y., Xu, L., Zhou, D.: Keap1 Inhibits Metastatic Properties of NSCLC Cells by Stabilizing Architectures of F-Actin and Focal Adhesions. *Mol Cancer Res.* 16, 508–516 (2018). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0544>
134. Ko, E., Kim, D., Min, D.W., Kwon, S.-H., Lee, J.-Y.: Nrf2 regulates cell motility through RhoA–ROCK1 signalling in non-small-cell lung cancer cells. *Sci. Rep.* 11, 1247 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81021-0>
135. Wang, X.-J., Sun, Z., Villeneuve, N.F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., Wondrak, G.T., Wong, P.K., Zhang, D.D.: Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis.* 29, 1235–1243 (2008). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn095>
136. Ren, D., Villeneuve, N.F., Jiang, T., Wu, T., Lau, A., Toppin, H.A., Zhang, D.D.: Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 1433–1438 (2011). <https://doi.org/10.1073/pnas.1014275108>
137. Do, M.T., Kim, H.G., Khanal, T., Choi, J.H., Kim, D.H., Jeong, T.C., Jeong, H.G.: Metformin inhibits heme oxygenase-1 expression in cancer cells through inactivation of Raf-ERK-Nrf2 signaling and AMPK-independent pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 271, 229–238 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.010>
138. Bortolozzi, R., Bresolin, S., Rampazzo, E., Paganin, M., Maule, F., Mariotto, E., Boso, D., Minuzzo, S., Agnusdei, V., Viola, G., te Kronnie, G., Cazzaniga, G., Basso, G., Persano, L.: AKR1C enzymes sustain therapy resistance in paediatric T-ALL. *Br. J. Cancer.* 118, 985–994 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0014-0>
139. EMA ELVIRA HERRERA LÓPEZ: Análisis de la expresión y localización de anexinas en la hepatocarcinogénesis en rata
140. Gerke, V., Moss, S.E.: Annexins: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* 82, 331–371 (2002). <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2001>
141. Gao, Y., Chen, Y., Xu, D., Wang, J., Yu, G.: Differential expression of ANXA1 in benign human gastrointestinal tissues and cancers. *BMC Cancer.* 14, 520 (2014). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-520>
142. Biaoxue, R., Xiguang, C., Shuanying, Y.: Annexin A1 in Malignant Tumors: Current Opinions and Controversies. *Int. J. Biol. Markers.* 29, e8–e20 (2014). <https://doi.org/10.5301/jbm.5000046>
143. Hayes, M.J., Moss, S.E.: Annexins and disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1166–1170 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.124>

144. Wei, L., Li, L., Liu, L., Yu, R., Li, X., Luo, Z.: Knockdown of Annexin-A1 Inhibits Growth, Migration and Invasion of Glioma Cells by Suppressing the PI3K/Akt Signaling Pathway. *ASN Neuro.* 13, 175909142110012 (2021). <https://doi.org/10.1177/17590914211001218>
145. Belvedere, R., Bizzarro, V., Forte, G., Dal Piaz, F., Parente, L., Petrella, A.: Annexin A1 contributes to pancreatic cancer cell phenotype, behaviour and metastatic potential independently of Formyl Peptide Receptor pathway. *Sci. Rep.* 6, 29660 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep29660>
146. Zhuang, C., Wang, P., Sun, T., Zheng, L., Ming, L.: Expression levels and prognostic values of annexins in liver cancer. *Oncol. Lett.* 18, 6657–6669 (2019). <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11025>
147. Chen, X.F., Li, C.F., Lu, L., Mei, Z.C.: Expression and clinical significance of aquaglyceroporins in human hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* 13, 5283–9 (2016). <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5184>
148. Qiu, L.-W., Liu, Y.-F., Cao, X.-Q., Wang, Y., Cui, X.-H., Ye, X., Huang, S.-W., Xie, H.-J., Zhang, H.-J.: Annexin A2 promotion of hepatocellular carcinoma tumorigenesis *via* the immune microenvironment. *World J. Gastroenterol.* 26, 2126–2137 (2020). <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i18.2126>
149. Zhang, W., Zhao, P., Xu, X.-L., Cai, L., Song, Z.-S., Cao, D.-Y., Tao, K.-S., Zhou, W.-P., Chen, Z.-N., Dou, K.-F.: Annexin A2 Promotes the Migration and Invasion of Human Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro by Regulating the Shedding of CD147-Harboring Microvesicles from Tumor Cells. *PLOS ONE.* 8, e67268 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067268>
150. Pavlovic, N., Rani, B., Gerwins, P., Heindryckx, F.: Platelets as Key Factors in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers.* 11, 1022 (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11071022>



Comparative subcellular localization of NRF2 and KEAP1 during the hepatocellular carcinoma development *in vivo*

Dafne Guerrero-Escalera^a, Brisa Rodope Alarcón-Sánchez^{a,e}, Jaime Arellanes-Robledo^{a,c}, Armando Cruz-Rangel^a, Luis del Pozo-Yauner^b, Victoria Chagoya de Sánchez^d, Osbaldo Resendis-Antonio^a, Saul Villa-Treviño^e, Julia Esperanza Torres-Mena^a, Julio Isael Pérez-Carreón^{a,*}

^a Laboratory of Liver Diseases, National Institute of Genomic Medicine, CDMX, Mexico

^b Department of Pathology, College of Medicine, University of South Alabama, AL, USA

^c Directorate of Cátedras, National Council of Science and Technology, CDMX, Mexico

^d Institute of Cellular Physiology, National Autonomous University of Mexico, CDMX, Mexico

^e Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, CDMX, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Actin cytoskeleton
Neoplastic nodules
Inter-nodular heterogeneity
Antioxidant response
NRF2 activation

ABSTRACT

The activation of Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2 – Kelch Like ECH Associated Protein 1 (NRF2-KEAP1) signaling pathway plays a critical dual role by either protecting or promoting the carcinogenesis process. However, its activation or nuclear translocation during hepatocellular carcinoma (HCC) progression has not been addressed yet. This study characterizes the subcellular localization of both NRF2 and KEAP1 during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in the rat. NRF2-KEAP1 pathway was continuously activated along with the increased expression of its target genes, namely *Nqo1*, *Hmox1*, *Gclc*, and *Ptgr1*. Similarly, the nuclear translocation of NRF2, MAF, and KEAP1 increased in HCC cells from weeks 12 to 22 during HCC progression. Likewise, colocalization of NRF2 with KEAP1 was higher in the cell nuclei of HCC neoplastic nodules than in surrounding cells. Moreover, immunofluorescence analyses revealed that the interaction of KEAP1 with filamentous Actin was disrupted in HCC cells. This disruption may be contributing to the release and nuclear translocation of NRF2 since the cortical actin cytoskeleton serves as anchoring of KEAP1. In conclusion, this evidence indicates that NRF2 is progressively activated and promotes the progression of experimental HCC.

1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most aggressive cancers, and it is ranked as the fourth deadliest cancer worldwide [1]. It arises from chronic liver damage caused by various risk factors, such as hepatitis B and C virus infection (HBV and HCV, respectively), excessive alcohol consumption, and non-alcoholic steatohepatitis [2]. Chronic liver damage induces an oxidative microenvironment that promotes fibrosis, cirrhosis, and HCC [3]. Similarly, diethylnitrosamine (DEN), a widely used carcinogen for inducing HCC in animal models, causes chronic liver damage, generating multinodular HCC associated with cirrhosis in the rat in as little as 18 weeks [4].

The Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2 – Kelch Like ECH Associated

Protein 1 (NRF2-KEAP1) signaling pathway is the master regulator of the antioxidant response to oxidative stress. It is well-known that stressors such as endogenous molecules derived from both reactive oxygen species (ROS) and cancer chemopreventive agents, such as the phytochemicals (*e.g.*, dithiolethiones, isothiocyanates, and triterpenoids), may activate this pathway for protecting cells against damage [5]. Nonetheless, although these substances have been shown to have protective effects in preclinical studies, rigorous experimental validation still is needed before using them in humans [6]. In addition, the continuous activation of NRF2 has been observed in several types of cancer and evokes an increased antioxidant response, exacerbated drug metabolism, and resistance to pharmacological treatments [7–9]. NRF2 deficiency provides resistance to HCC induction in mice; in contrast,

* Corresponding author at: Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepcapan, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México C.P. 14610, Mexico.

E-mail address: jiperez@inmegen.gob.mx (J.I. Pérez-Carreón).

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119222>

Received 7 June 2021; Received in revised form 10 December 2021; Accepted 19 January 2022

Available online 29 January 2022

0167-4889/© 2022 Published by Elsevier B.V.

both the nuclear translocation and transcriptional activity of NRF2 are increased and promote liver tumors formation in wild-type mice [10]. Additionally, increased NRF2 levels correlate with tumor differentiation degree, metastasis, and tumor size in HCC patients, which have confirmed the oncogenic role of NRF2. Thus, the increased expression of this transcription factor has been associated with a poor prognosis in patients bearing HCC [11].

The regulation of the NRF2-KEAP1 pathway might occur under two opposite conditions in cell cultures. While the first one occurs in a redox homeostasis cellular microenvironment where KEAP1, anchored to actin-cytoskeleton in the cytoplasm, represses NRF2, which is poly-ubiquitinated and degraded by the proteasome [12]; the second one occurs under an oxidative stress condition where the oxidation of cysteine residues of KEAP1 induces a conformational change that releases NRF2 [13]; then, it translocated into the nucleus to form a heterodimer with musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family small proteins (MAF family members such as F, G, and K) [14]. Thus, NRF2-MAF heterodimer interacts with DNA and recognizes the antioxidant response element (ARE) sequences, which induces the transcription of antioxidant response genes, such as *Nqo1*, *Hmox1*, and *Gclc* [15]. Together, the above data clearly show that the activation of the NRF2-KEAP1 pathway is critical for HCC progression. Therefore, the question about at what point in the development of HCC the components of this pathway become relevant for its progression is intriguing; however, their progressive subcellular localization and activation during the liver carcinogenesis have not been addressed yet. This study aimed to analyze the subcellular localization of NRF2, KEAP1, and MAF, as well as, the expression status of some of their downstream targeted genes during the HCC development induced by DEN in a well-characterized rat model [4].

2. Materials and methods

2.1. Animal procedures

The cirrhosis-HCC model, described by Schiffer and collaborators [16], which uses DEN as a chemical carcinogen, was used to induce hepatocarcinogenesis in Fischer 344 rats. Male rats were obtained from the animal production and experimentation unit of the Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (UPEAL - CINVESTAV-IPN; Mexico City, Mexico). All experiments were according to the committee guidance and the institutional-approved protocol for animal care under the number: 0283-18. Twenty male rats weighing 180–200 g (6 to 8 weeks old) were randomly divided into 4 groups per evaluation time (6, 12, 18, and 22 weeks). Animals were subjected to a weekly intraperitoneal injection of DEN (50 mg/kg) for a total of 16 consecutive weeks and euthanized at 6, 12, 18, or 22 weeks after the first injection. Additionally, five animals were administrated with saline solution as the normal liver group (NL). Animals were fed *ad libitum* (labdiet 5008, Labdiet, USA) and had free access to fresh, clean water at all times. For euthanasia, animals were exsanguinated from inferior vena cava under ether anesthesia. Livers were rapidly removed and washed in saline solution (usually, less than 3 min on average). A portion was frozen in 2-methyl butane with liquid nitrogen and stored at -70°C for further analysis. An additional portion was fixed in 4% formaldehyde, and 24 h later, samples were embedded in paraffin as previously described [17].

2.2. Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was obtained from 30 mg of tissue using Trizol reagent (15,596,018; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). cDNA synthesis was prepared from 750 ng of total RNA using a cDNA reverse transcription kit (4,368,814; Applied Biosystems, Lincoln Centre Drive Foster City, CA USA). Quantitative PCR was carried out using the TaqMan gene expression assays in the 7900HT Fast Real-Time PCR system

and the following FAM dye-labeled rat probes (exon-exon boundary): NRF2 gene (*Nfe2l2*) (Rn 00582415-m1), *Hmox-1* (Rn00561387-m1), *Nqo-1* (Rn00566528-m1), *Keap1* (Rn00589292-m1), *Maf k* (Rn00595506-m1), *Maf g* (Rn07296919-m1), *Maf f* (Rn01505733-m1) and *Hprt1* (Rn01527840-m1), all from Applied Biosystems, Beverly, MA, USA. Gene expression data were normalized with *Hprt1* gene using the comparative $\Delta\Delta\text{C}_T$ method [18,19].

2.3. Protein isolation

Total protein extracts were prepared in lysis buffer as previously reported [20]. Lysates were incubated on rocking for 30 min, centrifuged at 16000g for 10 min at 4°C , and stored at -75°C for further analyses. Cytosolic and nuclear protein fractions were obtained in lysis buffer as previously described [20]. Frozen hepatic tissues (~ 100 mg) were first homogenized in 1.0 ml of ice-cold lysis buffer A. Lysed samples were incubated on ice for 15 min with occasional mixing. Then, 30 μl of 10% NP-40 solution was added, vortexed vigorously for 15 s, centrifuged for 30 s at 16000g, and the supernatant was stored at -75°C as the cytosolic protein fraction. Pellets containing intact nuclei were washed twice in buffer A, suspended in ice-cold buffer B, rocked in a shaking platform for 15 min at 4°C . The extract was then centrifuged in a microcentrifuge for 30 min at 16,000g, and the supernatant was stored at -75°C as the nuclear protein fraction for further analyses. All procedures were performed at 4°C to avoid protein degradation.

2.4. Western blot analysis

After protein quantification by the bicinchoninic acid method, equal amounts of boiled protein extracts in Laemmli's buffer were analyzed through SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. Antibodies against PTGR1 (1:1000, GTX118527), and KEAP1 (1:1000, GTX54329), were from GeneTex Irvine, CA; USA. Anti-NRF2 (NBP1-32822) was from Novus Biologicals (Supplementary Table). Antibodies against HMOX-1 (1:2000, ab13243), Lamin B (1: 1000, ab16048) and GCLC (1:1000, ab53179) were from Abcam; Cambridge, UK. Anti-MAF F, G, and K (1:1000, H-100 SC-22831) were from Santa Cruz Biotechnologies; Dallas, TX; USA; anti-NQO-1 (1:2000, N5288) was from Sigma-Aldrich; St. Louis, MO; USA; and anti-GAPDH (1:1000, 60004-1-Ig) was from Proteintech; Rosemont, IL; USA. Protein loading was confirmed by reprobating the blots with either anti-GAPDH or anti-Lamin B for cytosolic and nuclear fractions, respectively. Densitometric analyses were carried out using ImageJ 1.5 software.

2.5. Immunofluorescence (IF) analysis

The immunofluorescence technique was used in either paraffin-embedded tissues or frozen tissue. Paraffin-embedded tissues have the advantage of preserving the liver parenchyma. Since the paraffin-embedding process interferes with the phalloidin signal, we use frozen rat liver tissues to detect the colocalization of KEAP1 and filamentous Actin. Frozen 7- μm -thick liver sections were rinsed twice in ice-cold PBS, fixed with 4% formaldehyde in PBS (pH 7.4) for 10 min at room temperature, washed, and incubated for 1 h in washing solution [0.25% Triton X-100 in PBS (PBST)]. Sections were blocked with 1% BSA in PBST for 30 min at room temperature. Then, NRF2 (1:25; GTX103322-N2C2) and KEAP1 (1:25; GTX 60660) (Supplementary Table) were from GeneTex. Irvine, CA; USA; were incubated overnight at 4°C in blocking solution. After washing, sections were incubated for 1 h at room temperature in the dark with either Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit or Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse (1:300, ab150064 and ab150105; Abcam, Cambridge; UK), respectively, in blocking solution. While the Actin cytoskeleton was stained with Phalloidin-iFluor 647 (1:1000, ab176759; Abcam, Cambridge; UK), nuclear DNA was stained with DAPI (1:1000, 62,247; Thermo Scientific, Rockford, IL; USA) for 5 min at room temperature. Finally, tissues were rinsed, drained, and fixed using

Fluoroshield Mounting Medium (ab104137, Abcam, Cambridge; UK). Pictures were captured using ZEISS Axio-A1 microscopy.

For embedding tissue in paraffin, liver tissues were fixed in 4% formalin, embedded in paraffin, cut into 5- μ m-thick, deparaffinized, and gradually rehydrated. After tissue rehydration, antigens were unmasked and processed according to Mouse on-Mouse HRP-Polymer Bundle kit (MM510; BioCare Medical, Concord, CA). Sections were blocked with 1% BSA in PBST for 30 min at room temperature. Then, antibodies against MAF F, G, and K (1:25, H-100 SC-22831) were from Santa Cruz Biotechnology; Dallas, Texas; USA). Antibodies against NRF2 (1:25; GTX103322-N2C2), KEAP1 (1:25, GTX 60660) and PTGR1 (1:100; GTX118527) were from GeneTex, Irvine, CA; USA; anti-NQO-1 (3 μ g/ μ l; N5288) was from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; USA), and anti-HMOX-1 (5 μ g/ μ l, ab13243) was from Abcam, Cambridge; UK (Supplementary Table). Antibodies were incubated overnight at 4 °C in blocking solution. After washing, sections were incubated in a blocking solution for 1 h at room temperature in the dark with either Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit 1:300 or Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse (1:300, ab150064 or ab150105; respectively, Abcam, Cambridge, UK). Nuclear DNA was stained with DAPI (1:1000, 62,247; Thermo Scientific,

Rockford, IL; USA) for 5 min at room temperature. Finally, tissues were rinsed, drained, and fixed using Fluoroshield Mounting Medium (ab104137, Abcam, Cambridge; UK). Pictures were captured using ZEISS Axio-A1 microscopy.

2.6. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) with *post hoc* Tukey test was applied for all calculations. Significance was defined as a *p*-value <0.05.

3. Results

3.1. Expression of NRF2-targeted genes increases during the HCC development

It is well known that the weekly intraperitoneally injection of DEN induces altered hepatocyte foci in the liver at week 6, fibrosis and neoplastic nodules at week 12, and multinodular HCC phenotype at week 18 after the first injection [17]. To confirm that the activation of

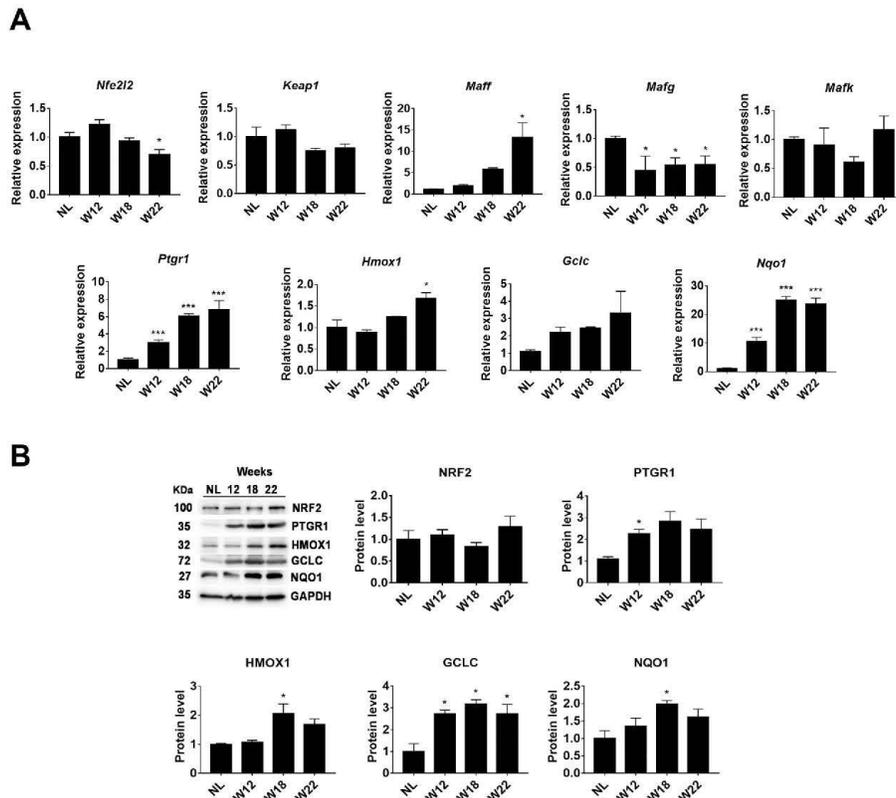


Fig. 1. Expression of NRF2-regulated genes. (A) Expression of NRF2 (*Nfe2l2*), *Keap1*, *Ptgr1*, *Hmox1*, and *Nqo1* genes during hepatocarcinogenesis. Gene expression was measured at week 12 (W12), 18 (W18), and 22 (W22) after the HCC induction. Samples from normal liver (NL) were included as controls. Data were obtained by using the 2- $\Delta\Delta$ CT method considering *Hprt1* expression as the constitutive reference. (B) Representative images of NRF2, PTGR1, HMOX1, GCLC, and NQO1 protein levels. Proteins were detected by western blot analysis. Plots indicate the average \pm SEM obtained from semi-quantitative densitometry of protein bands. Level of the housekeeping GAPDH was used to normalize the levels of protein of interest. *n* = 3 animals per group. **p* < 0.05, ****p* < 0.001 statistically different from NL group.

the NRF2-KEAP1 pathway was carcinogen-independent, we included an additional group, which underwent 16 weekly injections of DEN and the following six weeks was carcinogen-free until euthanasia at week 22. Using RT-qPCR and western blot analyses, we measured the mRNA expression of NRF2 gene (*Nfe2l2*), *Keap1*, *Maff*, *Mafk*, and *Mafk*, and that of ARE-containing genes regulated by NRF2, such as *Nqo1*, *Hmox1*, *Gclc*, and *Ptgr1* in liver samples obtained at 12, 18, and 22 weeks after HCC induced by DEN. The mRNA expression of these genes then was compared with those in normal liver (NL) (Fig. 1). While *Maff* mRNA expression increased >10 fold at week 22 ($p < 0.05$), those of *Mafk*, *Mafk*, and *Keap1* did not show a significant increment. *Nfe2l2* expression gene decreased 30% at week 22 ($p < 0.05$) (Fig. 1A).

Furthermore, since NRF2 has been detected at different molecular weights based on its post-translational modifications [21], we first evaluated the predominant protein band in rat liver extracts by Western blot analysis. As evidence of NRF2 activation, the C9 cell line was treated with t-butyl hydroquinone (TBHQ), a well-known inducer of NRF2 pathway. As shown in Supplementary Fig. 1, TBHQ increases the NRF2 protein band of 100 kDa in cell culture; also, a similar size was detected in rat liver extracts at week 18. Thus, when compared among our experimental groups, NRF2 protein levels from total protein extracts showed no significant differences (Fig. 1B).

On the other hand, the expression of NRF2-regulated genes increased as compared to NL. As shown in Fig. 1A, *Ptgr1* and *Nqo1* significantly ($p < 0.001$) increased 3- and 10-fold respectively, from week 12, showing their highest increment (> 6- and 20-fold, $p < 0.001$, respectively) between week 18 to 22. *Hmox1* mRNA expression was significantly (1.5-fold, $p < 0.002$) increased only at week 22 (Fig. 1A). Expression of *Gclc* mRNA showed a non-significant trend of increment. A similar increment of NQO1, HMOX1, PTGR1, and GCLC protein levels was observed. Fig. 1B shows that level of these proteins increased ($p < 0.05$) 2- to 3-fold from weeks 12 to 18. Thus, the gradual increase of *Nqo1*, *Hmox1*, *Ptgr1*, and *Gclc* expression, as well as, that of their protein levels indicate that the NRF2-KEAP1 pathway was activated during hepatocarcinogenesis progression.

3.2. Enzymes regulated by NRF2-KEAP1 pathway differentially co-localize with NRF2 within HCC nodules

NRF2 regulates the expression of PTGR1 in hepatocarcinogenesis and promotes cell proliferation and resistance to oxidative stress [4]. Supplementary Fig. 2A shows a gradual increase of PTGR1 in altered hepatocyte foci at week 6 and in larger HCC nodules at week 22. Then, we analyzed both the nodular heterogeneity and whether PTGR1 and NQO1 co-localize with NRF2; for this ending, we selected liver tissues with multiple HCC nodules from week 18 (Fig. 2). Most HCC nodules (around 50%) were double-positive for PTGR1⁺/NRF2⁺ or NQO1⁺/NRF2⁺ (Fig. 2C). Indeed, serial liver sections show that those nodules positive for PTGR1 were also positive for NQO1. Interestingly, we identified that 20% of nodules express either the phenotype PTGR1⁺/NRF2⁻ or NQO1⁺/NRF2⁻. This evidence strongly suggests that NRF2 is less expressed than its target genes. Also, a minimal nodules ratio exclusively expressing NRF2, i.e., PTGR1⁻/NRF2⁺ or NQO1⁻/NRF2⁺, was observed. Since total levels of HMOX-1 and NQO-1 were significantly increased at week 18 (Fig. 1B), we then determined their cellular localization. Immunofluorescence analysis showed that these proteins were mainly localized within HCC nodules than nodular surrounding tissue (NST), where their presence was barely observed (Supplementary Fig. 2B). Also, HMOX-1 was detected in non-parenchymal cells of surrounding tissue which might be M2 macrophages, as previously reported [22]. Thus, the increased expression of PTGR1, NQO-1, and HMOX-1 into cells of neoplastic HCC nodules indicates that the antioxidant response mediated by NRF2 is heterogeneously activated when induced with DEN.

3.3. NRF2 and MAF levels are differentially localized within cells of HCC nodules

NRF2 high expression correlates with late tumor differentiation, size, and metastasis, and it is associated with a poor clinical prognosis [23]. Our results from IF analysis revealed that cells into HCC nodules expressed high levels of NRF2 from 12 to 22 weeks (Fig. 3A). Analysis of NRF2 compartmentalization showed that the percentage of positive nuclei tend to increase by 20% at 12 and 18 weeks as compared to NL (Fig. 3B). Likewise, we observed that 60 to 80% of cells within nodules were positive for MAF protein from weeks 12 to 22 ($p < 0.01$) (Fig. 3B). Moreover, levels of KEAP1 were not significantly different within cells of nodules as compared to those surrounding them.

3.4. NRF2, KEAP1, and MAF protein levels increase during HCC development

To confirm the subcellular localization of NRF2, KEAP1, and MAF proteins during the hepatocarcinogenesis progression, we detected their levels in both the cytosolic and nuclear cell fractions for NRF2 and KEAP1, and the nuclear localization for MAF (F, G, K) at 12, 18, and 22 weeks after the HCC experimental induction. The cytosolic NRF2 level was significantly increased by 100% at 22 weeks ($p < 0.01$), while that of KEAP1 was increased from week 12 to 22 ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) (Fig. 4A). Interestingly, nuclear NRF2 gradually increased from week 12 to 22 ($p < 0.05$) (Fig. 4B). Similarly, MAF ($p < 0.05$) and KEAP1 ($p < 0.01$) levels significantly increased in the nuclear fraction at 18 weeks. Together, these data indicate that NRF2, MAF, and KEAP1 proteins increase their nuclear localization and corroborate that the NRF2-KEAP1 pathway is activated during HCC development.

3.5. Interaction of KEAP1 with actin cytoskeleton is disrupted within HCC nodules

KEAP1 regulates the transcriptional activity of NRF2 through its double glycine repeat domain [24] and interacts with the actin cytoskeleton, which provides a scaffolding to accomplish its repressor function [25]. To determine the interaction status of KEAP1 with actin cytoskeleton, we labeled KEAP1 in green (Alexa 488) and the filamentous actin (F-actin) with phalloidin in red (iFluor 647). Fig. 5A shows that KEAP1 homogeneously co-localizes with the cortical actin cytoskeleton in NL group; similarly, in cells from nodule-surrounding tissue (NST) of week 18 livers these proteins co-localized (Fig. 5B). Contrary to the homogeneous co-localization observed in normal hepatocytes, HCC nodules of week 18 showed an altered distribution and significant reduction of the co-localization ratio between KEAP1 and cortical actin cytoskeleton (Fig. 5C). Additionally, cells from NL and NST showed higher nuclear KEAP1 localization than that observed within neoplastic cells (Fig. 5C). These data suggest that the disruption of the actin cytoskeleton in HCC nodules may be altering KEAP1-F-actin scaffold.

3.6. NRF2 is predominantly localized into cell nuclei of neoplastic nodules

To investigate whether the decrease of KEAP1 associated with actin cytoskeleton disruption affects the interaction between KEAP1 and NRF2, we determined NRF2-KEAP1 co-localization by IF analysis. To this end, we compared the status of this complex in HCC nodules and NST. Although cells in NST showed similar co-labeling of these proteins, 73 to 75% of cells within HCC nodules showed an increased intensity of nuclear NRF2 at 12 and 18 weeks, respectively (Fig. 6). IF analysis denotes a higher intensity of NRF2 than that of KEAP1 in cells within HCC nodules.

4. Discussion

Several reports have described the subcellular localization of NRF2-

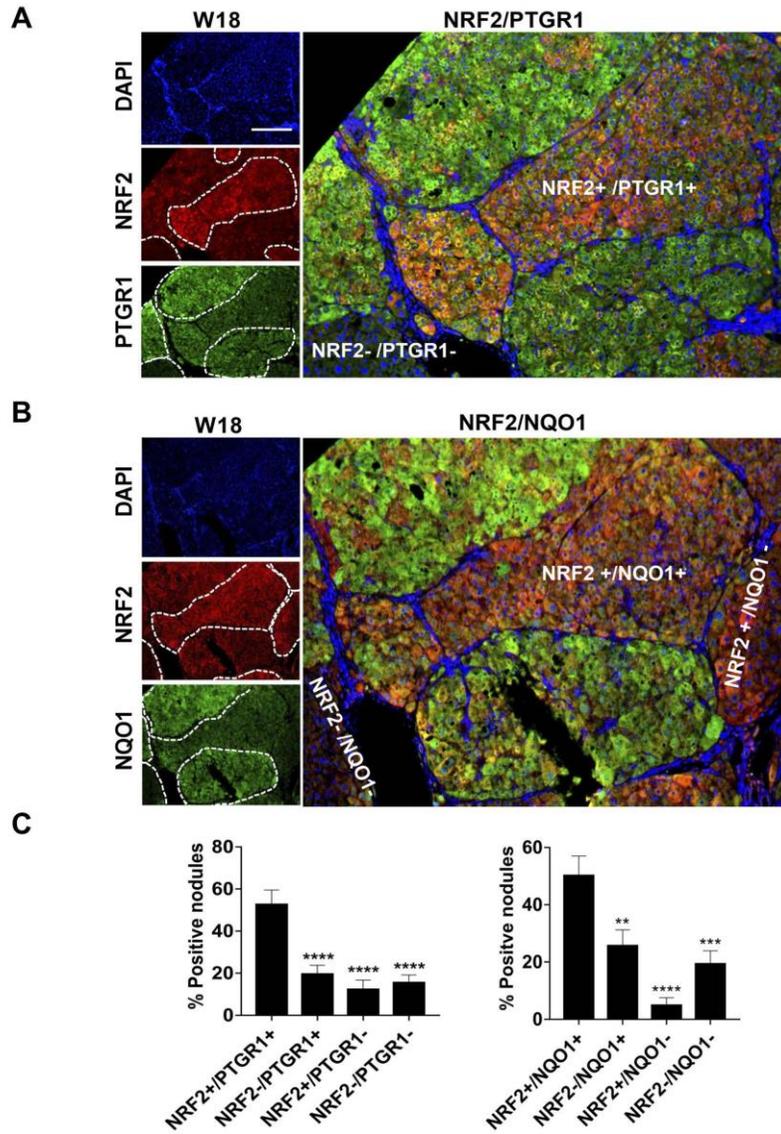


Fig. 2. Nodular heterogeneous colocalization of NRF2 with PTGR1 and NQO1. Double immunofluorescence in paraffin-embedded section of 18-week tissues. Representative serial sections show the colocalization of (A) PTGR1 with NRF2 and that of (B) NQO1 with NRF2. The inter-nodular heterogeneity is shown as double-negative nodules (dark), double-positive nodules (orange), and PTGR1 or NQO1 positive nodules (fluorescent green). Dotted lines delimit HCC nodules. White scale bar depicts 50 μ m. Picture magnification is 10 \times . (C) Plots show the percentage of nodules expressing indicated phenotypes. Positive labels were quantified from 5 randomly selected 10 \times -field per individual sample. $n = 3$ animals per group. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$ statistically different from double-positive phenotype.

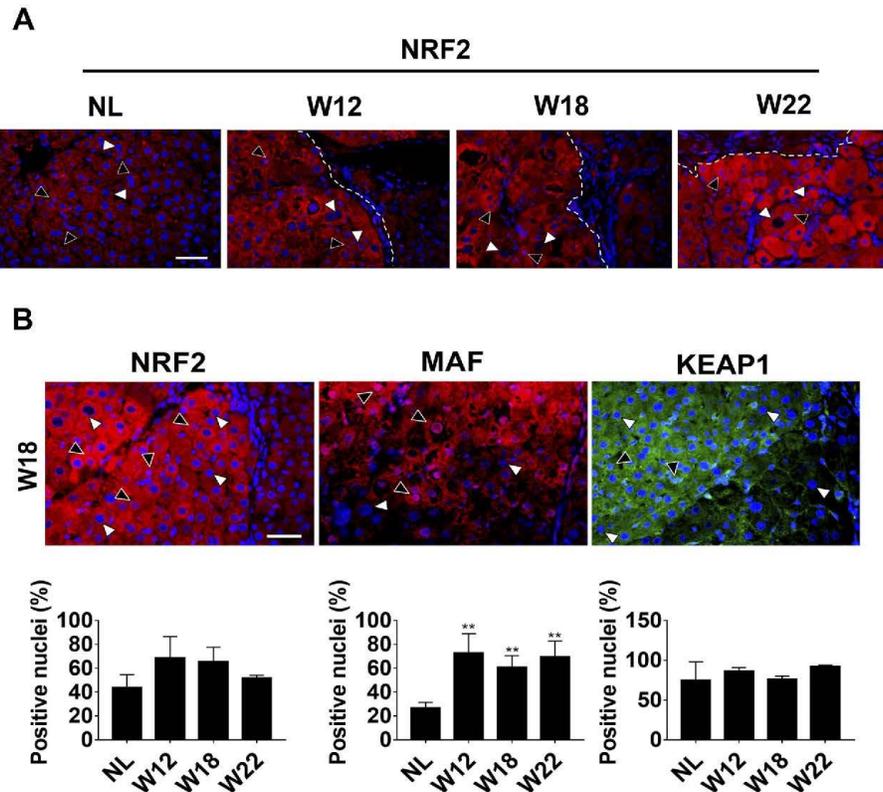


Fig. 3. NRF2, MAF, and KEAP1 localization within cells of HCC nodules. (A) Immunofluorescence of NRF2 in paraffin-embedded section of NL, W12, W18 and W22 tissues. (B) Immunofluorescence of NRF2 and MAF (F, G, and K) in red (Alexa 594), KEAP1 in green (Alexa 488) detected in 18-week tissues. Scale bar depicts 200 μ m. Picture magnification is 40 \times . White and black arrowheads indicate negative (blue stained) and positive (purple stained) nuclei, respectively. Plots show the percentage of positive nuclei for NRF2, MAF, and KEAP1. $n = 3$ animals per group. ** $p < 0.01$ statistically different from NL group.

KEAP1 pathway by using 2D HCC cell culture models [10,23,26]. Although these models have provided relevant mechanisms regulated by this signaling pathway, the lack of the whole tumor microenvironment, such as the extracellular matrix and the response of immune cells, limits capturing the interplay that occurs among all cellular components that contribute to the NRF2 dynamics under a given condition. Recently, we have described that NRF2 regulates both mRNA and protein expression of PTGR1 enzyme in a rat HCC model induced by DEN [4]. This model is based on the weekly administration of DEN causing chronic liver damage, fibrosis, dysplastic nodules, and multinodular HCC; thus, resembling the pathological sequences observed in clinical hepatocarcinogenesis. Here we have described the subcellular localization of NRF2 and KEAP1 proteins, as well as the status of genes regulated by NRF2-KEAP1 pathway such as *Ptgr1*, *Hmox-1*, *Gclc*, and *Nqo-1*, which corroborated that the NRF2-KEAP1 pathway is activated during HCC progression by using histological and molecular approaches. NRF2 is a transcription factor that regulates various cytoprotective enzymes and plays an essential role in the intracellular redox balance. Interestingly, several cancers such as colorectal [27], lung [28], head and neck [29], cervical cancer [30], and HCC also exhibit persistent activation of this transcription factor, which promotes the transcription of various

cytoprotective genes and provides survival benefits and clonal expansion ability to cancer cells [26,31,32].

Although we detected increased NRF2 protein in cytosol and nuclear fraction associated with hepatocarcinogenesis progression, *Nfe2l2* expression was not only not increased but was even decreased at week 22 (Fig. 1), which suggests that the mRNA of NRF2 was stabilized rather than increased as occurred with its protein status. Similarly, Mangiferin, a xanthonoid antioxidant, induces NRF2 protein stability but does not affect its mRNA status [33]. Besides, the protein stability was associated with the inhibition of NRF2 ubiquitination; moreover, the inhibition of NRF2 degradation also enhances its translation under oxidative conditions [34]. Interestingly, it has been reported that for this end, an internal ribosomal entry site (IRES) in the 5'-UTR of NRF2 mRNA provides the stability of ribosomes [35].

Nodular heterogeneity in our hepatocarcinogenesis model is an exciting result since it is an often feature in human HCC [36,37]. Although we detected that 50% of the nodules were simultaneously positive for NRF2 and some of its target genes, namely PTGR1 and NQO1, a number of nodules showed that most of the cells were positive for PTGR1 or NQO1, but NRF2 was barely expressed. It is well known that HCC frequently shows heterogeneous cell growth patterns within

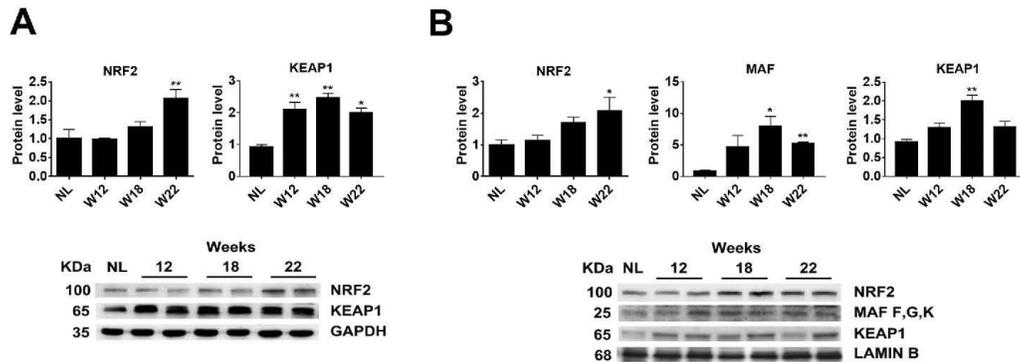


Fig. 4. Cytosolic and nuclear localization of NRF2, KEAP1, and MAF during hepatocarcinogenesis. (A) Cytosolic localization of NRF2 and KEAP1 proteins; (B) nuclear localization of NRF2, KEAP1, and MAF from liver protein extracted from NL, W12, W18, and W22 tissues. Proteins were detected by western blot analysis. Plots indicate the average \pm SEM obtained from semi-quantitative densitometry of protein bands. GAPDH and Lamina B house-keeping levels were used to normalize the cytosolic and nuclear protein levels of interest, respectively. $n = 3$ animals per group. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ statistically different from NL group.

the same tumor that reflects intra-tumor genetic heterogeneity, which represents an obstacle for effective HCC treatment [37–39]. Furthermore, reports have indicated that activation of NRF2 plays a critical role in tumor heterogeneity and resistance to pharmacological treatment [40,41]. Our results strongly suggest that the differential colocalization of NRF2 and either PTGR1 or NQO1 denotes that intermodular heterogeneity could be associated with differential NRF2-dependent regulation of their target genes. In this line, it has been described that NRF2 target genes can be expressed by neuronal activity without NRF2 [42].

Multiple mechanisms promote aberrant activation of NRF2, such as somatic mutations in *KEAP1* and *NFE2L2* [43], recurrent loss of *Nfe2l2* exon 2 [44], *KEAP1* promoter methylation [45], P62 (SQSTM1) accumulation [46], additional to oncogenic pathways, such as KRas, Braf, and Myc, induce the activity of NRF2-KEAP1 pathway [7]. The molecular mechanism describing NRF2-KEAP1 pathway activity consists of conformational change of NRF2-KEAP1/CUL3-E3 complex [31] and the later release of NRF2 from the complex. Then, NRF2 is translocated to the nucleus, forming a heterodimer with members of MAF proteins family [14]. The heterodimer binds to the antioxidant response element (ARE) in the promoter sequence of NRF2-targeted genes. Here, we found that NRF2 was decreased in the cytosol, but conversely, it increased in the cell nuclei of HCC nodules during HCC development. Thus, NRF2 was actively shuttling from the cytosol to the nucleus of neoplastic cells. Furthermore, the nuclear translocation of NRF2 from week 12 to 22 after HCC induction indicates that its activation was continuous, which suggests that NRF2 activity plays an essential role in liver carcinogenesis. Likewise, we showed that MAF protein levels were steadily increased, which coincided with an NRF2 increment in the cell nuclei of HCC nodules. Our results strongly suggest that the nuclear accumulation of both proteins might lead to the NRF2-MAF heterodimer formation within cells of HCC nodules. Additionally, MAF was increased in the nuclei of normal liver cells, an expected phenomenon since when MAF proteins form homodimers act as a negative transcriptional regulator [47]. Moreover, we detected a differential expression of small proteins which was associated with hepatocarcinogenesis progression where increased *Maff* contrasted with decreased *Mafg* (Fig. 1). *Mafg* genes namely *Maff*, *Mafg*, and *Mafk* have been implicated in electrophile response element (EpRE)-mediated stress response. Similar to our result, *Maff* was the most significant inducible gene by chemical activators of EpRE in human cell lines [48]. However, the drastic decrease of *Mafg* suggests an additional regulatory mechanism in liver carcinogenesis induced by DEN that needs to be addressed.

Colocalization analysis revealed an increased localization of NRF2 in the cell nuclei exceeding KEAP1 localization within cells of HCC nodules of 12 and 18 weeks compared with their homogeneous distribution in the cell nuclei of NST cells (Fig. 6). NRF2-KEAP1 complex can be shuttled from the cytoplasm into the nucleus by binding the double glycine repeat in the KEAP1 DRG domain [49–51]. Moreover, KEAP1 has been identified as a post-induction repressor of NRF2 since KEAP1 translocates into the nucleus to dissociate NRF2 from the ARE, and then escorts the nuclear export of NRF2 using either the nuclear export sequence (NES) of Keap1 or via a Crml-dependent nuclear export mechanism [24,25,50]. However, the predominance of nuclear NRF2 within cells of HCC modules suggests an imbalance in the KEAP1 regulatory mechanism, which favors the expression of NRF2 target genes.

Our results also show that KEAP1 is localized in the nuclei of normal liver cells and colocalizes with cortical actin cytoskeleton; contrary, colocalization of nuclear KEAP1 with F-actin decrease in neoplastic cells. Therefore, the nuclear translocation of KEAP1 may be affected due to the disruption of actin cytoskeleton during HCC development. In this line, it has been reported that KEAP1 contributes to stabilizing the actin cytoskeleton by inhibiting focal adhesion turnover in non-small cell lung cancer [52]. Thus, the disruption of actin cytoskeleton within cells of HCC nodules could negatively affect the KEAP1 anchoring. Previous studies have shown that KEAP1 stabilizes the actin cytoskeleton through increased RhoA activity, which inhibits focal adhesion turnover, resulting in the migration and invasion restriction of non-small cell lung cancer (NSCLC) [52]. Of note, *Nrf2* suppression after brusatol treatment in NSCLC cells inhibits cell migration and invasion by blocking the RhoA-ROCK1 pathway; in contrast, *Nrf2* overexpression shows opposite results. Therefore, *Nrf2*/Keap1 pathway affects cell motility by deregulating the RhoA-ROCK1 signaling pathway in NSCLC [53].

Our study describes the localization of NRF2-KEAP1 signaling pathway components in an HCC *in vivo* model through histological assays. Thus, additional studies are still needed to clarify the role of KEAP1 and actin cytoskeleton disruption within cells of HCC nodules and its impact on NRF2 activity. Thus, our results highlight the relevance of KEAP1-F-actin interaction on the altered functioning of the NRF2-KEAP1 pathway during HCC progression.

In conclusion, the high expression of NRF2-targeted genes, such as *Nqo-1*, *Hmox-1*, *Gclc*, and *Ptgr1*, along with HCC development, indicates that NRF2 is continuously activated during HCC progression. Interestingly, the differential colocalization of NRF2 and either PTGR1 or NQO1 denotes that the intermodular heterogeneity may be correlated with the

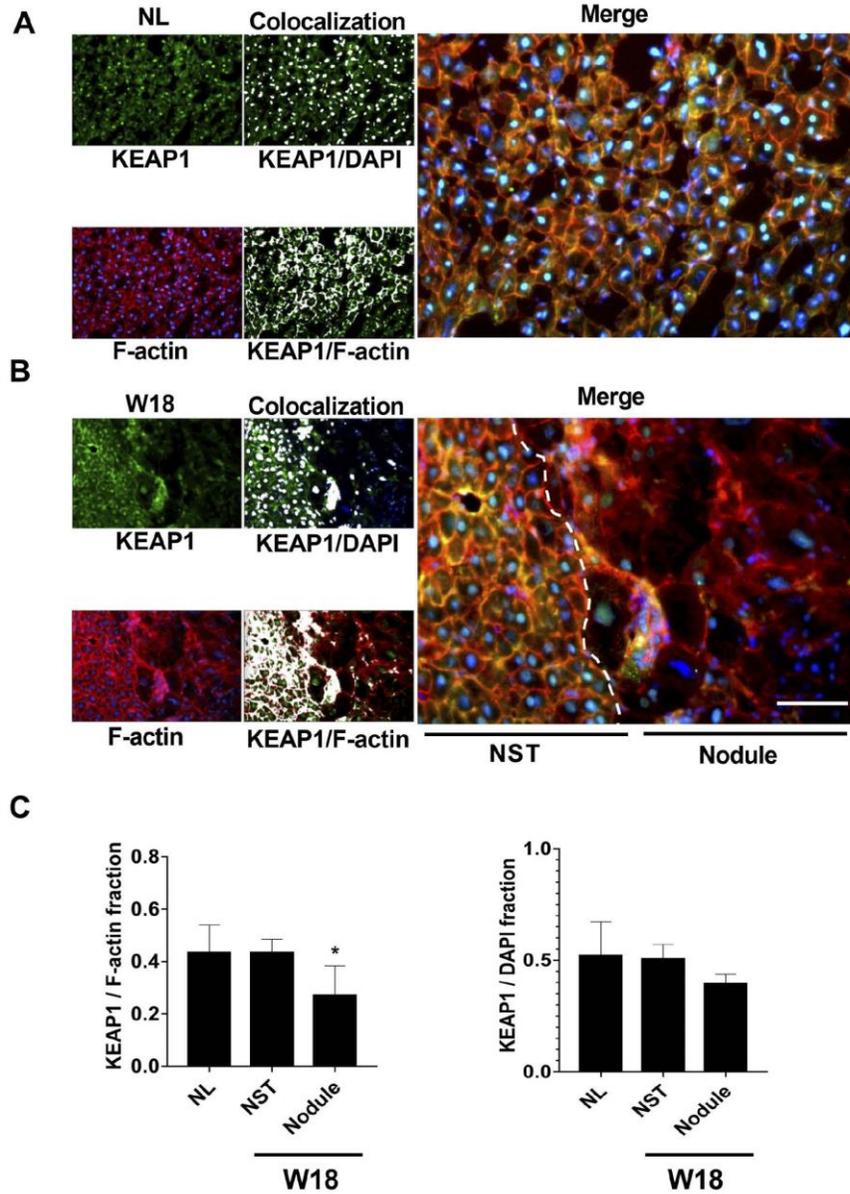


Fig. 5. Interaction of KEAP1 with F-actin in HCC nodules. Colocalization of KEAP1 with F-Actin from fresh-frozen sectioned liver samples of NL (A) and W18 (B) groups. KEAP1 was labeled in green (Alexa 488) and F-actin in red (Phalloidin-iFluor 647). Nuclei were labeled with DAPI. White dotted lines show the limit between nodules and nodular surrounding tissue (NST). White colour indicates nuclear KEAP1 and KEAP1/F-actin colocalization. The merged image also illustrates the colocalization of KEAP1 with F-actin (yellow-orange). Scale bars indicate 200 μ m. Magnification is 400 \times . (C) The colocalization ratio of KEAP1 compared to either F-actin or DAPI staining was quantified from 3 randomly selected 10 \times -field per individual sample. KEAP1 colocalization was also separately quantified in both nodules and nodular surrounding tissue (NST). $n = 3$ animals per group. * $p < 0.05$ statistically different from NL and NST area.

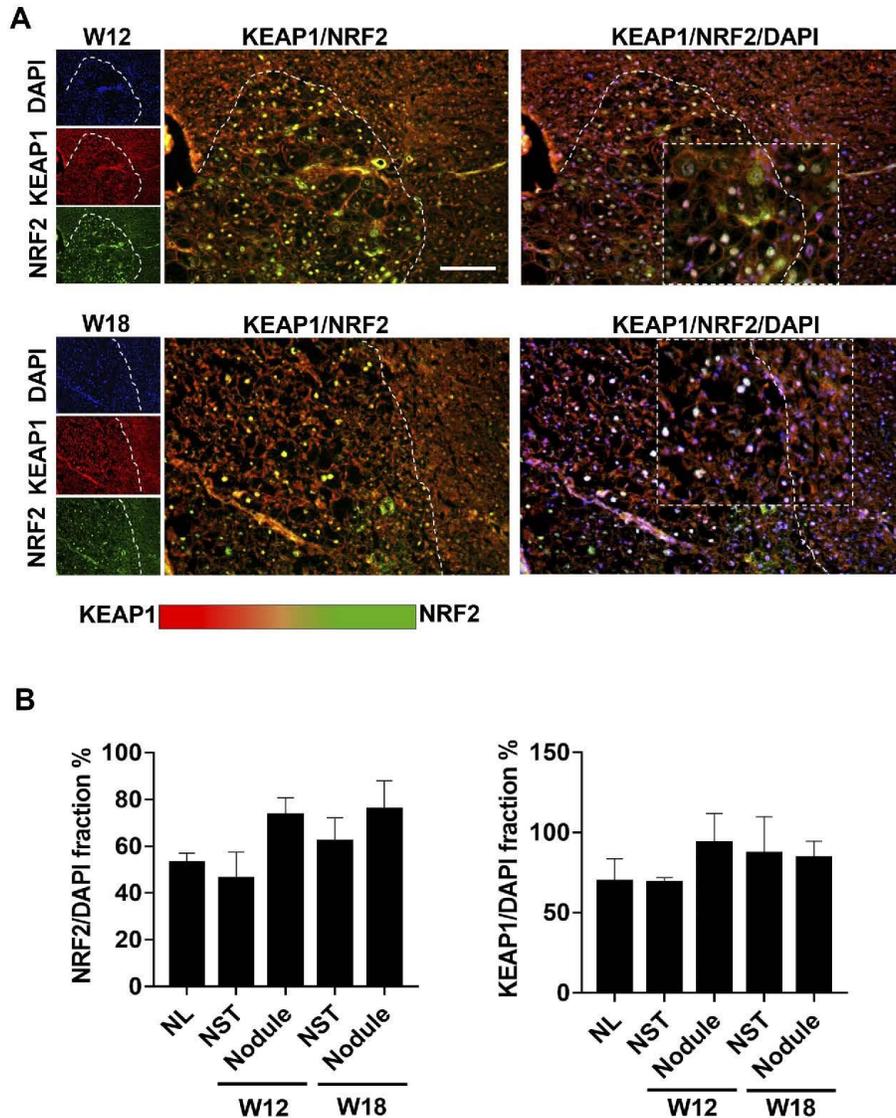


Fig. 6. Interaction of NRF2 with KEAP1 in HCC nodules. (A) Co-immunofluorescence of NRF2 (green Alexa 488) and KEAP1 (red Alexa 598) from fresh-frozen sectioned liver samples of W12 and W18 groups. White lines delimit the border between nodules and nodular surrounding tissue (NST). The merge images show KEAP1/NRF2 colocalization (Magnification 100 \times) to compare the red and green ratio. White scale bar indicates 100 μ m. The triple images merge, KEAP1/NRF2/DAPI, is highlighted in a rectangular box showed in a higher magnification (200 \times). (B) Plots show the percentage of positive NRF2 and KEAP1 nuclei compared to DAPI stained nuclei. Analysis from 5 randomly selected 10 \times -field per individual sample. $n = 3$ animals per group.

transcriptional regulation of the NRF2-KEAP1 signaling pathway. Moreover, cells within HCC nodules exhibit a loss of KEAP1 and cortical actin cytoskeleton interaction, as well as, increased nuclear localization of NRF2 and MAF, which confirm that NRF2-KEAP1 pathway is active. To our knowledge, these results provide the first *in vivo* characterization

of the subcellular localization of the NRF2-KEAP1 signaling pathway and some of its key downstream actors during experimental HCC development.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2022.119222>.

CRedit authorship contribution statement

Dafne Guerrero-Escalera, Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization.

Brisa Rodope Alarcón-Sánchez, Methodology, Validation.

Jaime Arellanes-Robledo, Supervision, Conceptualization, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing.

Armando Cruz-Rangel, Supervision, Conceptualization,

Luis del-Pozo-Yauner, Supervision, Conceptualization.

Victoria Chagoya-Hazas, Supervision, Conceptualization.

Osbaldo Resendis-Antonio, Supervision, Conceptualization.

Saul Villa-Treviño, Supervision, Conceptualization.

Julia Esperanza Torres-Mena, Methodology, Supervision, Conceptualization.

Julio Isael Pérez-Carreón, Conceptualization, Resources, Supervision, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Project administration, Funding acquisition.

Funding information

CONACYT-Mexico, Grant/Award Numbers: CB-182450, and CF-2019 - 85552. Instituto Nacional de Medicina Genómica, Grant/Award Number: #403.

Declaration of competing interest

The authors report no relationships that could be construed as a conflict of interest.

Acknowledgments

Dafne Guerrero-Escalera is a doctoral student from the Doctoral Program in Biomedical Sciences of National Autonomous University of Mexico (UNAM) and she thanks to CONACYT for the fellowship number 455803. Authors express their gratitude to N.A. López-Hernández, S. Hernández-García, E. Romo-Medina, L. Molina-García, C. Hernández-Chávez, and J.L. Cruz-Colín, for the support in administrative and lab procedures; to UPEAL-CINVESTAV-IPN staff: Dr. J. Fernández-Hernández, R. Leyva-Muñoz, R. Gaxiola-Centeno, B.E. Chávez-Álvarez, A. Rojo-García, M.A. López-López, I. Zavala-Mejía, and M.E. Zúñiga-Alcántara, for the assistance in animal breeding, care and handling; to INMEGEN Histology Unit staff: Dr. N.B. Gabiño-López and R. Nava-Monroy, for the assistance in paraffin-embedding and tissues sectioning.

References

- J.D. Yang, et al., A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16 (10) (2019) 589–604.
- P.A. Farazi, R.A. DePinho, Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment, *Nat. Rev. Cancer* 6 (9) (2006) 674–687.
- R.N. Jadeja, R.V. Devkar, S. Nammi, Oxidative stress in liver diseases: pathogenesis, prevention, and therapeutics, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2017 (2017) 8341286.
- R. Sanchez-Rodriguez, et al., Ptgfr1 expression is regulated by Nrf2 in rat hepatocarcinogenesis and promotes cell proliferation and resistance to oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 102 (2017) 87–99.
- M.K. Kwak, et al., Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter, *Mol. Cell. Biol.* 22 (9) (2002) 2883–2892.
- M.K. Kwak, T.W. Kensler, Targeting Nrf2 signaling for cancer chemoprevention, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244 (1) (2010) 66–76.
- G.M. DeNicola, et al., Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis, *Nature* 475 (7354) (2011) 106–109.
- C. Ma-On, et al., Oxidative stress indicated by elevated expression of Nrf2 and 8-OHdG promotes hepatocellular carcinoma progression, *Med. Oncol.* 34 (4) (2017) 57.
- M. Rojo de la Vega, E. Chapman, D.D. Zhang, Nrf2 and the hallmarks of cancer, *Cancer Cell* 34 (1) (2018) 21–43.
- H.K.C. Ngo, et al., Nrf2 mutagenic activation drives hepatocarcinogenesis, *Cancer Res.* 77 (18) (2017) 4797–4808.
- S. Zhou, et al., Nrf2 is a potential therapeutic target in radioresistance in human cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 88 (3) (2013) 706–715.
- C.A. Silva-Istas, P.D. Maldonado, Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation, *Pharmacol. Res.* 134 (2018) 92–99.
- T. Yamamoto, et al., Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity, *Mol. Cell. Biol.* 28 (8) (2008) 2758–2770.
- K. Itoh, et al., An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 (2) (1997) 313–322.
- Y. Hirotsu, et al., Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks, *Nucleic Acids Res.* 40 (20) (2012) 10228–10239.
- E. Schiffer, et al., Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis, *Hepatology* 41 (2) (2005) 307–314.
- M.P. Castro-Gil, et al., Enrichment of progenitor cells by 2-acetylaminofluorene accelerates liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in vivo, *Mol. Carcinog.* 60 (6) (2021) 377–390.
- S. Wang, et al., A new set of reference housekeeping genes for the normalization RT-qPCR data from the intestine of piglets during weaning, *PLoS One* 13 (9) (2018), e0204583.
- K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) method, *Methods* 25 (4) (2001) 402–408.
- N. Lei, et al., Hightless, secreted through a late endosome/lysosome pathway, binds LPS and dampens cytokine secretion, *J. Cell Sci.* 125 (Pt 18) (2012) 4288–4296.
- T.Y. Tamir, K.M. Mulvaney, M.B. Major, Dissecting the Keap1/Nrf2 pathway through proteomics, *Curr. Opin. Toxicol.* 1 (2016) 118–124.
- Y. Naito, T. Takagi, Y. Higashimura, Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages, *Arch. Biochem. Biophys.* 564 (2014) 83–88.
- M. Zhang, et al., Nrf2 is a potential prognostic marker and promotes proliferation and invasion in human hepatocellular carcinoma, *BMC Cancer* 15 (2015) 531.
- Z. Sun, et al., Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2, *Mol. Cell. Biol.* 27 (18) (2007) 6334–6349.
- M.I. Kang, et al., Seafolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (7) (2004) 2046–2051.
- C. Li, et al., Activation of the KEAP1/NRF2 signaling pathway reduces oxidative stress in Hep2 cells, *Mol. Med.* 18 (3) (2018) 2541–2550.
- Y.J. Lee, et al., Overexpression of Nrf2 promotes colon cancer progression via ERK and AKT signaling pathways, *Ann. Surg. Treat. Res.* 98 (4) (2020) 159–167.
- S. Homma, et al., Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 15 (10) (2009) 3423–3432.
- A. Namani, et al., Gene-expression signature regulated by the KEAP1-NRF2-CUL3 axis is associated with a poor prognosis in head and neck squamous cell cancer, *BMC Cancer* 18 (1) (2018) 46.
- L. Perg, et al., Anti-cancer activity of Conyza blinii saponin against cervical carcinoma through MAPK/TGF-beta/Nrf2 signaling pathways, *J. Ethnopharmacol.* 251 (2020), 112503.
- A.T. Dinkova-Kostova, et al., Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (18) (2002) 11908–11913.
- Y. Yang, et al., NQO1 promotes an aggressive phenotype in hepatocellular carcinoma via amplifying ERK-NRF2 signaling, *Cancer Sci.* 112 (2) (2021) 641–654.
- J. Zhao, et al., Mangiferin increases Nrf2 protein stability by inhibiting its ubiquitination and degradation in human HL60 myeloid leukemia cells, *Int. J. Mol. Med.* 33 (5) (2014) 1348–1354.
- S.E. Purdon-Dickinson, et al., Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants, *Mol. Pharmacol.* 72 (4) (2007) 1074–1081.
- W. Li, et al., An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2, *Nucleic Acids Res.* 38 (3) (2010) 778–788.
- J. Calderaro, et al., Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification, *J. Hepatol.* 67 (4) (2017) 727–738.
- J. Friemel, et al., Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma, *Clin. Cancer Res.* 21 (8) (2015) 1951–1961.
- F.Q. An, et al., Tumor heterogeneity in small hepatocellular carcinoma: analysis of tumor cell proliferation, expression and mutation of p53 AND beta-catenin, *Int. J. Cancer* 93 (4) (2001) 468–474.
- K. Kenmochi, S. Sugihara, M. Kojiro, Relationship of histologic grade of hepatocellular carcinoma (HCC) to tumor size, and demonstration of tumor cells of multiple different grades in single small HCC, *Liver* 7 (1) (1987) 18–26.
- H.X. Zhang, et al., Nrf2 mediates the resistance of human A549 and HepG2 cancer cells to bongingmycin, a new antitumor antibiotic, in vitro through regulation of glutathione levels, *Acta Pharmacol. Sin.* 39 (10) (2018) 1661–1669.
- H. Oshimori, D. Oristian, E. Fuchs, TGF-beta promotes heterogeneity and drug resistance in squamous cell carcinoma, *Cell* 160 (5) (2015) 963–976.
- R.F. Deighton, et al., Nrf2 target genes can be controlled by neuronal activity in the absence of Nrf2 and astrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (18) (2014) E1818–E1820.
- T. Shibata, et al., Cancer related mutations in Nrf2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (36) (2008) 13568–13573.

- [44] L.D. Goldstein, et al., Recurrent loss of NFE2L2 exon 2 is a mechanism for Nr2f2 pathway activation in human cancers, *Cel. Rep.* 16 (10) (2016) 2605–2617.
- [45] F.P. Fabrizio, et al., Keap1/Nrf2 pathway in kidney cancer: frequent methylation of KEAP1 gene promoter in clear renal cell carcinoma, *Oncotarget* 8 (7) (2017) 11187–11198.
- [46] M. Komatsu, et al., The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1, *Nat. Cell Biol.* 12 (3) (2010) 213–223.
- [47] F. Katsuoka, et al., Nrf2 transcriptionally activates the mafG gene through an antioxidant response element, *J. Biol. Chem.* 280 (6) (2005) 4483–4490.
- [48] J.A. Moran, E.L. Dall, R.T. Mulcahy, Differential induction of mafF, mafG and mafK expression by electrophile-response-element activators, *Biochem. J.* 361 (Pt 2) (2002) 371–377.
- [49] M. Velichkova, T. Hasson, Keap1 in adhesion complexes, *Cell Motil. Cytoskeleton* 56 (2) (2003) 109–119.
- [50] M. Velichkova, T. Hasson, Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism, *Mol. Cell. Biol.* 25 (11) (2005) 4501–4513.
- [51] D.D. Zhang, Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway, *Drug Metab. Rev.* 38 (4) (2006) 769–789.
- [52] B. Wu, et al., Keap1 inhibits metastatic properties of NSCLC cells by stabilizing architectures of F-actin and focal adhesions, *Mol. Cancer Res.* 16 (3) (2018) 508–516.
- [53] E. Ko, et al., Nrf2 regulates cell motility through RhoA-ROCK1 signalling in non-small-cell lung cancer cells, *Sci. Rep.* 11 (1) (2021) 1247.