



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Regulación de la actividad de la vía antioxidante Nrf2-Keap1
durante el inicio de la apoptosis”**

T E S I S

Que presenta

LUCÍA ANGÉLICA MÉNDEZ GARCÍA

Para obtener el Grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dr. Emilio J. Córdova Alarcón

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

México, DF

AGOSTO, 2015

DIRECTOR:

Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón

Investigador en Ciencias Médicas D del Instituto Nacional de Medicina Genómica

CO-TUTOR:

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Profesor Titular del Departamento de Biomedicina Molecular

ASESORES:

Dra. Araceli Hernández Zavala

Profesor titular B de la Escuela Superior de Medicina

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Profesor titular del Departamento de Biomedicina Molecular

Dra. Rosaura Hernández Rivas

Investigador titular y Coordinador Académico del Departamento de Biomedicina Molecular

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Investigador titular y Jefe del Departamento de Biomedicina Molecular

AGRADECIMIENTO:

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me fue otorgado en estos 6 años en los que lleve a cabo mis estudios de posgrado.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), de manera muy especial a los Doctores que formaron parte de mi comité: a la Dra. Leticia Cedillo Barrón, a la Dra. Rosaura Hernández Rivas, al Dr. Leopoldo Santos Argumedo y a la Dra. Araceli Hernández Zavala de la escuela Superior de Medicina, muchas gracias por sus comentarios y críticas que de manera importante contribuyeron a mi formación como Doctora en Ciencias.

Gracias al Dr. Nicolás Villegas por fungir como co-tutor de este proyecto, por sus tantos consejos y apoyo muchas gracias doctor. De igual manera agradezco me permitiera hacer cortas pero valiosas estancias en el laboratorio que encabeza. Gracias al Biol. Raúl Bonilla que me apoyo y fue mil veces paciente conmigo con el objetivo de contribuir al desarrollo del proyecto.

A la Dra. Lorena Orozco que me permitió formar parte de su grupo y realizar la mayor parte del trabajo experimental dentro del laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas, el cual dirige, mi más sincero agradecimiento por el incomparable apoyo académico y las observaciones realizadas hacia el proyecto. También agradezco a todos los investigadores asociados que trabajan en éste laboratorio.

Al Dr. Emilio Córdova quien fungió como director de tesis de este proyecto. Gracias por el apoyo el cual contribuyó de manera fundamental a la realización del mismo.

A la M. en C. Nelly Patiño encargada de la Unidad de Citometría y a la candidata a Dr. Valeria Quintanar encargada de la Unidad de Microscopía Confocal del INMEGEN. Gracias por su infinita paciencia, por apoyarme y por festejar conmigo cada que salía un ensayo y por no enloquecer cada que no salía que era lo más frecuente.

DEDICATORIAS:

Sra. Margarita García este trabajo te lo dedico, porque simplemente eres la inspiración de mis días, porque me amas de manera incondicional y porque me enseñaste gran parte de lo que sé de la vida, principalmente que no hay problema suficientemente grande que no pueda superar y eso es lo que me define hoy como persona. Gracias por heredarme tu espíritu de guerrera y tu corazón de pollo.

A mi hermana Grisel por ser mi modelo a seguir, por cuidarme y cumplir siempre como hermana mayor, gracias por ser la mejor amiga sis.

Para Miguel Cid que siempre me apoyo sin importar que tan histérica estuviera, gracias por tus cuidados, tu cariño y por que antes de ser mi novio eres mi mejor amigo. Gracias por enseñarme que la paciencia y la tolerancia son grandes virtudes que debo poner en práctica más seguido y que el amor tiene sus bases en el respeto y en la admiración mutua. Gracias por hacerme reír a carcajadas y por todos los buenos momentos.

A la Sra. Lourdes Soto y al Sr. Miguel Cid, mis suegros, que me han hecho sentir como en casa. Muchas gracias por su apoyo, por su cariño y principalmente por hacerme sentir parte de su familia. A los hermanos, hermanas, cuñados y cuñadas de ambos también muchas gracias.

Para mis roomies Yuli, Karen y el ex roomie David Puyol que a pesar de la diferencia de edades, hemos superado nuestros problemas, gracias por estar ahí y escucharme las mil veces que lo necesité.

A mis amigos de la universidad que durante este doctorado los vi muy poco: Juan Carlos, Warrior, Faico, Tania, Saida, Ulises, Kin, Jorge, Eric, Gabo, Silvio, Josué, Kbto y Alfonso que creo ni se enteraron de que trata mi proyecto pero saben que siempre que me necesiten ahí estoy y yo sé que ustedes para mí. Charly donde estés gracias.

Para mis amigos de la generación Nonantzin y Julio, gracias por las pláticas y por compartir conmigo de todo estos últimos 6 años.

A mis compañeros del L-1 del departamento de Biomedicina Molecular: Macario, Isra, Job y Victorín por incluirme en su grupo y permitirme trabajar y reír a ratos con ustedes.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del INMEGEN: Angélica Molina, Diego, Dione, Elahe, Ernesto, Guillermo, Humberto Gtz, Honorio, Isaac, Javier, Julieta, Mayra, Monse, Nadia, Oscar, Paco, Raya y Rouse (por orden alfabético para que no haya reclamos) gracias porque aunque trabajamos cosas muy distintas siempre estuvieron ahí escuchando mis lamentos y alegrías. Por último pero no menos importante a mis amigos: candidata a Dr. Mirna Morales, Dra. Cecilia Contreras y Dr. Humberto García por sus comentarios y apoyo, mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

ABSTRACT.....	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO	4
Estrés oxidativo	4
Consecuencias celulares de niveles elevados de ROS	6
Arresto del ciclo celular mediado por ROS.....	9
Muerte celular por apoptosis	10
Vía de señalización independiente de caspasas.....	11
Vía de señalización dependiente de caspasas	13
Mecanismo antioxidante Nrf2-Keap1:	15
Gen NFE2L2	16
Proteína Nrf2.....	16
Regulación de la ruta Nrf2-Keap1	17
Papel protector de Nrf2	21
Agentes activadores de la vía de señalización.....	22
Activación constitutiva de Nrf2 en células tumorales	29
ANTECEDENTES DIRECTOS	33
Mecanismos inhibitorios de la vía de señalización Nrf2-Keap1.....	34
Translocación de Keap1 al núcleo	34

Apagado mediado por GSK3 β	35
p53 como modulador de la vía de señalización Nrf2-Keap1	37
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
JUSTIFICACIÓN.....	39
HIPÓTESIS.....	39
OBJETIVO GENERAL	39
OBJETIVOS PARTICULARES	40
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	41
METODOLOGÍA	42
RESULTADOS	50
DISCUSIÓN.....	61
RESUMEN DE RESULTADOS.....	68
CONCLUSIÓN.....	69
PERSPECTIVAS	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70

ABSTRACT

Nrf2 mediates a cell survival response by being a master regulator of the cellular antioxidant defense. Under mild reactive stress Nrf2 is activated to suppress environmental insults and protects cells from damage, but when cells are exposed to highly toxic doses, the upregulation of Nrf2-target genes suppresses reactive oxygen species which accumulation is needed in order to trigger cellular death; as a result, it has been proposed that Nrf2 signaling pathway must be turned off to allow apoptosis process. In this study we used curcumin, an indirect pro-oxidant compound, to activate Nrf2 pathway signaling and induce apoptosis in EBV immortalized lymphoblastoid cells. We found that curcumin can activate the Nrf2 signaling and can kill the cells depending on the time of exposition. We evaluated the effect of curcumin in Nrf2 pathway when cells are engaged to die. In this model in conditions where p53 is inactivated, an alternative mechanism may be produced to turn off the Nrf2 pathway when cells have been damaged. In addition, the role of Keap1, an inactivating mechanism during the redox state recovering was investigated. We can conclude that Nrf2 is inactivated during early apoptosis and we found that is unlikely the participation of Keap1 and p53 during the inactivation of Nrf2 in EBV immortalized lymphocytes. It is possible that a redundant mechanism is involved in turn off the Nrf2 pathway when cells are exposed to high levels of ROS.

RESUMEN

Nrf2 es el regulador maestro de la respuesta antioxidante que se activa como mecanismo de defensa y de supervivencia en células expuestas a estrés. Cuando los niveles intracelulares de estrés oxidativo son bajos, Nrf2 es activado para proteger del posible daño ocasionado por las especies reactivas de oxígeno, pero cuando los niveles de estrés oxidativo son elevados, la regulación a la alta de genes blanco de Nrf2 suprime la acumulación de estas especies, la cual, es necesaria para desencadenar la muerte celular; como resultado, se ha propuesto que la vía de señalización antioxidante debe de ser apagada para permitir el desarrollo de la apoptosis. En este estudio se utilizó al quimiopreventor curcumina para activar a Nrf2 en un modelo no tumoral, linfocitos B inmortalizados con EBV. Encontramos que la curcumina puede activar a Nrf2 y también puede matar los linfocitos dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición. Además evaluamos el efecto de la curcumina sobre la vía de señalización Nrf2-Keap1 cuando las células se comprometen a morir, si la proteína p53 está inactivada en este modelo, una ruta alterna puede responder para apagar la vía antioxidante cuando su efecto protector ha sido rebasado por el daño celular y deba iniciarse un programa de muerte. De manera adicional, evaluamos el probable papel inhibitorio de Keap1. Los resultados nos permiten concluir que Nrf2 es inactivado durante la apoptosis temprana y que la participación tanto de Keap1 como de p53 es improbable durante el apagado de Nrf2 en linfocitos inmortalizados con EBV. Es probable que un mecanismo alterno opere bajo condiciones de estrés elevado independiente de p53.

INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo es una condición biológica ocasionada por una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a causa de un aumento en la presencia de factores exógenos y endógenos que producen la generación de ROS o la disminución de moléculas antioxidantes. La presencia del estrés oxidativo es capaz de dañar distintas macromoléculas celulares como el DNA, los lípidos y las proteínas. Con la finalidad de evitar los efectos tóxicos del estrés oxidativo, las células han desarrollado diferentes sistemas antioxidantes y desintoxicantes. El tipo de mecanismo celular que responde al estrés oxidativo depende tanto de la intensidad del estrés como del periodo de exposición. De esta forma, la presencia del estrés oxidativo produce la activación de la transcripción de cientos de genes antioxidantes y desintoxicantes, a través del factor activador de la transcripción Nrf2 (de sus siglas en inglés: Nuclear Factor-erythroid 2-related Factor 2). Sin embargo, ante un incremento en los niveles de estrés oxidativo capaz de ocasionar daños irreversibles a macromoléculas celulares se produce una segunda respuesta celular, caracterizada por la inducción de la apoptosis. Diversos estudios han demostrado que la acumulación de ROS es un evento necesario para el correcto desarrollo de la apoptosis. De esta forma, la inhibición de la vía antioxidante de Nrf2 previo al inicio de la apoptosis parece ser un proceso necesario. Hasta la fecha, tres moléculas han sido señaladas como las responsables de apagar la vía de señalización antioxidante regulada por Nrf2. Los niveles de estrés oxidativo intracelulares parecen regular la respuesta a través del cual Nrf2 será inhibido. Cuando el estado redox de la célula se restablece se ha propuesto a Keap1 como el inhibidor post-inducción de Nrf2 y a GSK3 β que de manera directa o indirecta puede regular la degradación del factor de transcripción. Sin embargo, cuando los niveles de estrés oxidativo han causado un daño severo dentro de la célula, se propone que p53 es el

encargado de inactivar a Nrf2, permitiendo la acumulación de ROS y el subsecuente desencadenamiento de la apoptosis. Sin embargo, hasta el momento se desconocen las vías de señalización a través de las cuales la apoptosis regula negativamente la activación de Nrf2.

MARCO TEÓRICO

Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) son generadas constantemente bajo condiciones normales como consecuencia del metabolismo aeróbico. Las ROS formadas en respuesta a distintas señales fisiológicas actúan como reguladores de procesos como la división celular, inflamación, funciones inmunológicas, autofagia y apoptosis. La producción no controlada de ROS resulta en estrés oxidativo que impide la funcionalidad celular y contribuye al desarrollo de patologías como el cáncer, envejecimiento, diabetes mellitus, aterosclerosis, Alzheimer, esquizofrenia y desórdenes autoinmunes como la artritis (Brieger *et al.*, 2012). En 1952 se demostró por primera vez la capacidad del estrés oxidativo para dañar a los organismos vivos, cuando Conger y Fairchild mostraron que el incremento en la presión del oxígeno puede causar aberraciones cromosómicas en granos de polen (Shakelford *et al.*, 2000).

Las ROS pueden clasificarse dentro de dos categorías: los radicales libres de oxígeno y las ROS no radicales. Los radicales libres de oxígeno se pueden definir como cualquier especie química que contenga uno o más electrones no apareados y que cuando reaccionan con ROS no radicales puede formar un radical libre nuevo. Dentro de los radicales libres de oxígeno se incluyen al anión superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo (OH) y el óxido nítrico (NO) y dentro de las ROS no radicales se encuentra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) entre otras (Ray, *et al.*, 2012). Estas especies son altamente reactivas y pueden reaccionar con el DNA,

proteínas, carbohidratos y lípidos de manera negativa. Se ha demostrado que el oxígeno y las ROS inducen muchos tipos de daño al DNA incluyendo rompimiento de cadena sencilla y doble, modificaciones de base, entrecruzamiento de proteínas con el DNA, depuración y depirimidación (Jena, 2012).

Como se muestra en la figura 1, las ROS pueden provenir tanto de fuentes endógenas como exógenas. Dentro de las fuentes endógenas más importantes de ROS se encuentra la cadena transportadora de electrones, en particular la mitocondria es la principal fuente superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Por su parte, las reacciones inflamatorias pueden ser una fuente importante de daño oxidativo, los macrófagos y neutrófilos activados liberan una gran cantidad de ROS incluyendo H_2O_2 , óxido nítrico (NO), superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH) e hipoclorito (HOCl). Finalmente, después de la exposición a radiación ionizante, se generan diferentes especies de ROS como H_2O_2 , OH, H^+ y O_2^- que pueden interactuar con el DNA y forman parte de la naturaleza mutagénica de éste tipo de radiación (Dickinson y Chang, 2011).

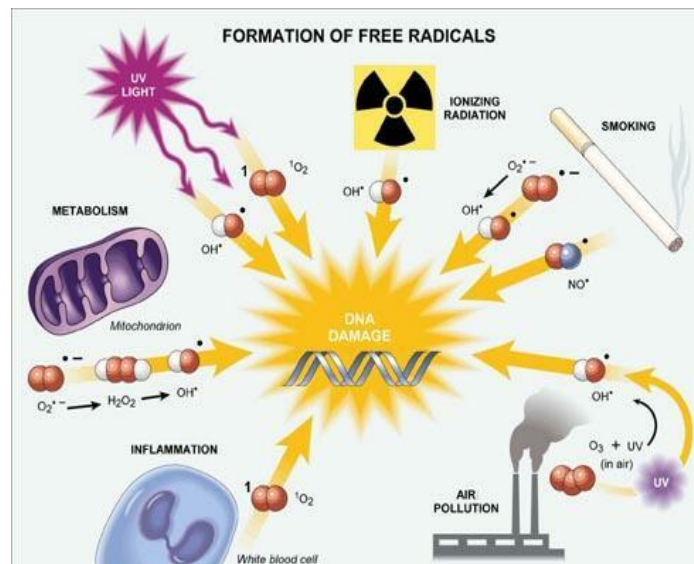


Figura 1. Fuentes endógenas y exógenas de especies reactivas de oxígeno (ROS). Tomado de onclinic.wordpress.com

Consecuencias celulares de niveles elevados de ROS

Los efectos celulares de las ROS dependen de la cantidad y del tiempo de exposición de éstas especies reactivas dentro de la célula. Uno de los efectos más importantes de las ROS es la modulación de puntos de regulación en el ciclo celular. El ciclo celular está dividido en cuatro diferentes fases: G1, S, G2 y M (mitosis), las células en fase G0, son células viables, metabólicamente activas pero que no se dividen. Las fases G1 y G2 del ciclo representan “gaps” o huecos en el ciclo celular que ocurren entre dos puntos de referencia obvios, la síntesis de DNA y la mitosis. En la fase G1, la célula se prepara para la síntesis de DNA, ya en la fase S el DNA es sintetizado y se forma un contenido aneuploide de DNA, es decir el material genético se duplica. La fase G2 es el segundo gap en el ciclo celular durante el cual la célula se prepara para la mitosis que es un proceso que ocurre en el núcleo y que procede inmediatamente a la división celular consistente en el reparto equitativo del DNA (Cooper, 2000).

En células eucariontes que crecen en medio de cultivo, la fase de mitosis dura solamente 30 minutos, mientras que la duración de las fases G1, S y G2 es de 12, 6 y 4 horas en promedio, respectivamente, aunque el tiempo de cada fase varía dependiendo del tipo celular y el organismo analizado (Cooper,2000). La progresión dentro del ciclo celular se debe a la actividad de complejos conformados por proteínas reguladoras conocidas como ciclinas y una subunidad cinasa con actividad catalítica conocida como cinasas dependientes de ciclinas (Cdks por sus siglas en inglés cyclin-dependent kinase). Los diferentes complejos ciclinas/Cdks son ensamblados y activados en diferentes puntos del ciclo celular (figura 2). La ciclina A controla la fase S en complejo con Cdk2 o Cdk1, mientras que la ciclina B unida a Cdk1 controla la fase de mitosis. Por su parte, la ciclina D controla la fase G1 del ciclo mediante su unión a Cdk4 y Cdk6 y la ciclina E unida a Cdk2 regula la transición G1-S. (Lim y Kaldis, 2013).

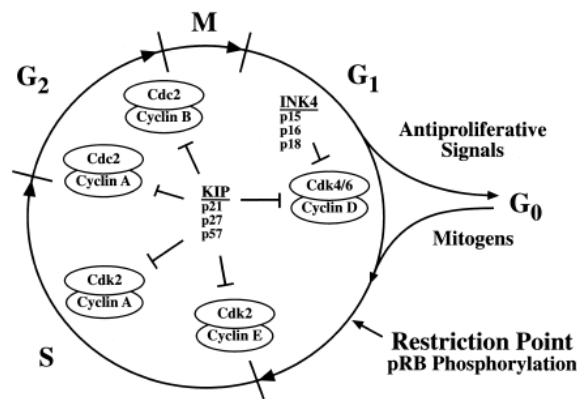


Figura 2. Complejos ciclina/cdks que regulan las distintas fases del ciclo celular (Shackelford, 2000).

La regulación de la progresión del ciclo celular se logra a través de diferentes eventos incluyendo la acumulación de ciclinas y su degradación, así como las fosforilaciones de las Cdks y de las ciclinas, la regulación de la dimerización entre ciclina/Cdk y la unión de proteínas inhibitorias a las Cdks. Bajo circunstancias normales el ciclo celular procede sin interrupciones. Sin embargo, ante la presencia de daño, particularmente en el DNA, la progresión a través del ciclo celular puede detenerse temporalmente en cualquiera de sus fases (arresto del ciclo celular) para, de ser posible, reparar el daño antes de reanudar su progresión, el cual esta monitoreado por vías de señalización denominados puntos de control (checkpoints) (Williams y Stoeber, 2012). En este tipo de daño, el factor de transcripción p53 es activado tras una serie de modificaciones postranscripcionales; dependiendo del grado de daño, p53 puede arrestar el ciclo celular a través de la activación de proteínas inhibitorias como p21, 14-3-3δ y Gadd45. La proteína p21 es un inductor del arresto del ciclo celular bien estudiado, ya que fue la primer proteína en ser descubierta como inhibidor de la familia cinasa dependiente de ciclinas. La proteína p21 pertenece a la familia de CKIs ó proteínas de CIP/KIP (CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitor Protein) la cual incluye a la proteína p27 y p57. En células con DNA dañado, p21 juega un papel determinante en el arresto del ciclo celular en la fase G₁

previniendo la replicación del DNA dañado. Durante la fase G1, la fosforilación de la proteína Rb (Retinoblastoma protein) es llevada a cabo por el complejo CiclinaE/Cdk2 lo que resulta en la liberación del factor de transcripción E2F activando genes necesarios para la fase S. La proteína Rb es un supresor de tumores que en su estado desfosforilado no libera a E2F lo que impide la progresión del ciclo celular. La proteína p21 directamente inactiva a Cdk2 lo que conlleva al bloqueo de la transición de la fase G1 a la fase S. La transición a la fase S y la replicación del DNA también puede ser inhibida por interacciones directas de p21 sobre E2F, lo que produce su inactivación (Figura 3). Adicionalmente, p21 puede influenciar el punto de control en la fase G2/M ya que interfiere con el complejo ciclinaB/Cdk1, el cual debe ser activado para la transición a la fase de mitosis. Finalmente, la regulación de p21 sobre el punto de control G2/M es a través de la regulación a la baja de Emi1 (Early mitotic inhibitor) el cual regula la mitosis mediante su unión al complejo ubiquitin ligasa APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) durante la fase S y G2 lo que permite la entrada correcta a la mitosis y previene la re-replicación. Se ha demostrado, que la represión de Emi1 resulta en una degradación dependiente de APC/C de la ciclinas A y B y el consecuente arresto en G2 (Piccolo y Crispi, 2012).

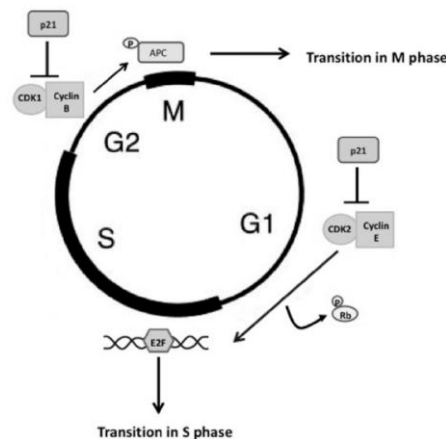


Figura 3. Efectos inhibitorios de p21 en el ciclo celular en la transición G1/S y G2/M Tomado de Piccolo y Crispi, 2012.

Arresto del ciclo celular mediado por ROS

El arresto de la célula depende del momento en que ésta se daña, por ejemplo, células que se dañan en la fase G1 temprana o media son retenidas en G1, sin embargo, células con daños en G1 tardía entran a la fase S e inician la síntesis de DNA más lentamente que las células no dañadas. De manera similar, las células que presentan algún tipo de daño en la fase G2 temprana e intermedia se arrestan en G2 pero las células dañadas en la fase G2 tardía proceden a la fase de mitosis y probablemente son arrestadas allí. El arresto debido a los puntos de chequeo está involucrado con la supresión de la actividad del complejo Ciclina/cdk que regula la fase del ciclo celular donde ocurre la mutación. Algunos estudios demuestran que la manera en que los ROS pueden activar los puntos de control es a través de la inducción del daño al DNA. De esta forma, el arresto en la fase G1 es inducido por peróxidos, específicamente H_2O_2 y tert-butil hidroperóxido, en diferentes tipos celulares de eucariontes, por ejemplo, en fibroblastos de humano, dicho arresto puede ser atenuado por medio de la aplicación de antioxidantes. Estos peróxidos suprimen la entrada a la fase S e inhiben la actividad del complejo ciclina E/Cdk2 de manera dosis dependiente. Por su parte, los datos existentes del efecto de las ROS en el punto de control de la fase S son muy escasos, sin embargo, el uso de dietil maleato el cual incrementa los niveles intracelulares de las ROS a través de la depleción del glutatión, resulta en una progresión retardada en las fases G1, S y G2. De igual manera se ha visto que este mismo compuesto y el peróxido H_2O_2 inducen la respuesta del punto de chequeo en la fase G2 (Shackelford *et al*, 2000).

Muerte celular por apoptosis

Cuando el daño por ROS es severo, los intentos por reparar el daño a través del arresto en el ciclo celular son insuficientes, lo que inicia algún tipo de muerte celular programada, particularmente el de la apoptosis. La apoptosis es un proceso esencial para el desarrollo normal y la homeostasis de todos los organismos multicelulares, éste proceso también es importante para la remoción de células dañadas, infectadas o potencialmente neoplásicas (Fulda y Debatin, 2006). De esta forma, la pérdida de la regulación de la apoptosis puede provocar el desarrollo de diferentes enfermedades. La artritis reumatoide y el cáncer son los mejores ejemplos de enfermedades asociadas con una apoptosis escasa, mientras que la cardiopatía isquémica y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson son los ejemplos de una apoptosis excesiva (Kannan y Sushil, 2000)

Las caspasas, moléculas clave en la ejecución de la apoptosis, son proteasas dependientes de cisteínas que cortan en residuos de aspartato (Shi, 2002). Las caspasas son sintetizadas como precursores con muy poca actividad catalítica, los cuales son convertidos a proteasas activas mediante su procesamiento proteolítico. Dentro de las funciones más importantes de las caspasas están: inactivar proteínas esenciales para la sobrevivencia celular, cortar el contacto célula-célula, así como la estructura del citoesqueleto, inhibir la replicación y reparación del DNA, interrumpir el corte y empalme génico o splicing, degradar el DNA, disrumpir la estructura nuclear, inducir cambios bioquímicos en la superficie celular para el reconocimiento de fagocitos y finalmente, desintegrar la célula en cuerpos vesiculares (Kumar, 2007).

En años pasados, el estudio de la apoptosis estuvo enfocado en las caspasas, pero el uso de inhibidores de estas enzimas para bloquear la apoptosis muestra que la muerte celular se lleva a cabo aun con las

caspasas inactivadas. De esta manera, otra vía de señalización independiente de caspasas fue conocida. Hasta hoy, la apoptosis se clasifica en muerte celular programada Tipo I, Tipo II y Tipo III (Hongmei, 2012). La muerte celular programada tipo I es la clásica apoptosis dependiente de caspasas; la muerte tipo II se caracteriza por que la célula apoptótica tiene apariencia vacuolar autofágica y doble membrana y la muerte celular programada tipo III es la apoptosis independiente de caspasas en la cual se ha identificado al factor inductor de apoptosis (AIF apoptosis inducing factor) una flavoproteína que se encuentra en la membrana mitocondrial que es liberada y translocada al núcleo para causar fragmentación del DNA y condensación de la cromatina (Daugas *et al*, 2000).

La apoptosis puede ser desencadenada por un gran número de factores dentro de los cuales se incluye a las señales mediadas por receptores, una amplia gama de factores de crecimiento, antineoplásicos y, como mencionamos anteriormente daño al DNA (Hongmei, 2012). Aunque las señales de inicio del programa apoptótico pueden variar, las características morfológicas y bioquímicas de la muerte celular programada son uniformemente similares, y están altamente conservadas durante la evolución (Kannan *et al*, 2000). Existen dos principales vías de apoptosis que se distinguen por la presencia o ausencia de caspasas dentro de la vía.

Vía de señalización independiente de caspasas

En la célula muchos ligandos pueden inducir el cambio de potencial de membrana mitocondrial, el daño a la mitocondria sería el primer paso para desencadenar la apoptosis, entonces la producción de ROS incrementa y éstas pueden ser los principales factores para inducir apoptosis independiente de caspasas (Hongmei, 2012). Un ejemplo es la granzima A la cual puede inducir la producción de ROS y muerte celular

sin activación de caspasas (Denis *et al*, 2005). Como se mencionó anteriormente AIF ha sido encontrado como el principal factor proapoptótico independiente de caspasas el cual es liberado de la mitocondria y translocado al núcleo para ocasionar fraccionamiento de DNA y apoptosis. Recientemente se han encontrado algunos compuestos que junto con el AIF inducen apoptosis como la estaurosporina y el cadmio (Daugas *et al*, 2000). Las ROS también participan en éste tipo de muerte celular los cuales pueden mediar la activación de la polimerasa 1 poli (ADP ribosa) o PARP-1 la cual es necesaria para la liberación del factor activador de la apoptosis AIF (Kang *et al*, 2004). De igual manera las ROS están involucradas en la muerte celular dependiente de caspasas, recientemente se ha determinado que la peroxidación de lípidos, de manera concreta, la peroxidación de la cardiolipina, parece ser crítica en eventos tempranos durante el evento apoptótico. Con el aumento de ROS la cardiolipina es oxidada lo cual conduce a la pérdida de su afinidad por el *citocromo C* con el cual se encuentra unida, conduciendo a la acumulación de *citocromo C* libre en el espacio intermembranal, el cual es subsecuentemente liberado al citosol una vez que se permeabiliza la membrana externa mitocondrial (Figura 4) (Ott *et al*, 2007).

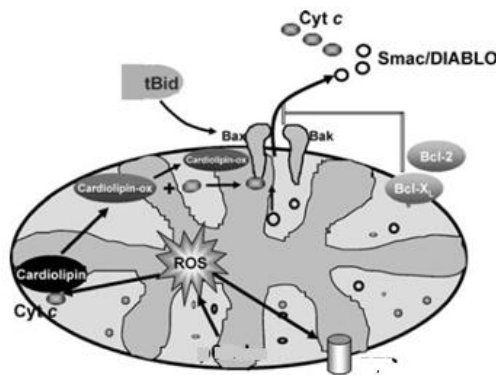


Figura 4. Papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el control mitocondrial de la muerte celular. Modificada de Ott, 2007.

Vía de señalización dependiente de caspasas

La apoptosis dependiente de caspasas se clasifica de acuerdo al mecanismo de activación en vía extrínseca o intrínseca. La vía de señalización extrínseca es activada por receptores de muerte que se encuentran en la superficie celular como α -TNF (Factor de Necrosis Tumoral) y el receptor FasL, mientras que la vía intrínseca es activada de manera intracelular por medio de la mitocondria (Fulda y Debatin, 2006). Dentro de los mediadores en la superficie celular se encuentran los receptores de muerte Fas (CD95), receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1 (TNF-R1), CAR1, DR3, DR4 y DR5. Los ligandos que activan estos receptores de muerte están estructuralmente relacionados con moléculas que pertenecen a la súper familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (Walczak y Krammer, 2000). La interacción receptor-ligando conduce a la trimerización del receptor lo cual da inicio a la señal de la muerte celular a partir de la presencia de dominios de muerte intracelulares, a través de los cuales son reclutadas moléculas adaptadoras como la llamada dominio de muerte asociada a Fas (FADD) o dominio de muerte asociada a TNF (TRADD). Estas moléculas adaptadoras contienen a su vez un dominio efector de muerte que comunica con la caspasa 8 (Wang *et al.*, 2008) lo que resulta en el procesamiento de la caspasa efectora 3 y la activación de Bid, un miembro de la familia Bcl-2 subfamilia solo BH3 el cual se transloca a la mitocondria para liberar *citocromo c* e iniciar la señalización mitocondrial (Cory y Adams, 2002).

La vía intrínseca de la apoptosis o vía mitocondrial se desencadena por una plétora de condiciones que generan estrés intracelular incluyendo el daño al DNA, estrés oxidativo, Ca^{2+} citosólico (Kumar y Sitasawad, 2012) y la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico entre otras (Walter y Ron, 2011). En el caso puntual del daño al DNA, cuando el daño es severo y no puede ser reparado

entonces p53 activa sus genes blanco que se traducen en las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 como Bax, PUMA y Noxa (Figura 5) (Yu y Zhang, 2004)

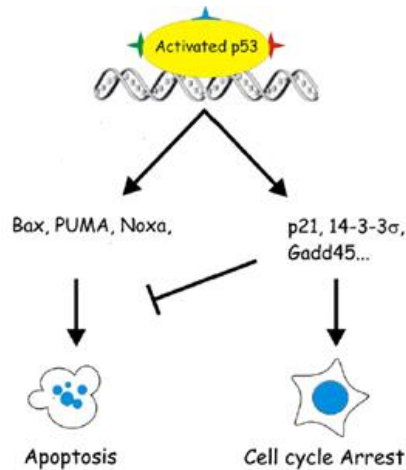


Figura 5. Modelo de los blancos transcripcionales de p53 dependientes del destino celular (Modificado de Yu y Zhang, 2005).

Al estar activadas las moléculas pro-apoptóticas Bax, PUMA y Noxa regulan el flujo bioenergético de metabolitos y componentes del poro mitocondrial. Una vez permeable la membrana externa de la mitocondria, un conjunto de proteínas que se encuentran de manera común entre el espacio de la membrana interna y externa son liberados (figura 6), incluyendo el *citocromo c*, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 y la endonucleasa G las cuales ya estando en el citosol desencadenan la ejecución de la muerte celular mediante la activación de caspasas (Yu y Zhang, 2004). La liberación de *citocromo c* en el citosol desencadena la activación de la caspasa 3 a través de la formación del apoptosoma (*citocromo c*/ Apaf-1/ caspasa 9), mientras que los complejos Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 promueven la activación de caspasas a través de la neutralización de los efectos inhibitorios de las IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis o inhibitor apoptosis proteins) (Hegde *et al*, 2002), las cuales funcionan como moduladores para evitar el inicio de una apoptosis errónea. De

todas las proteínas IAPs (XIAP, cIAP1 y cIAP2) XIAP es la única que funciona como inhibidor directo de las caspasas en un sentido bioquímico estricto. Esta IAP puede inhibir a caspasa 3, caspasa 7 y caspasa 9 (Gyrd-Hansen y Meier, 2010).

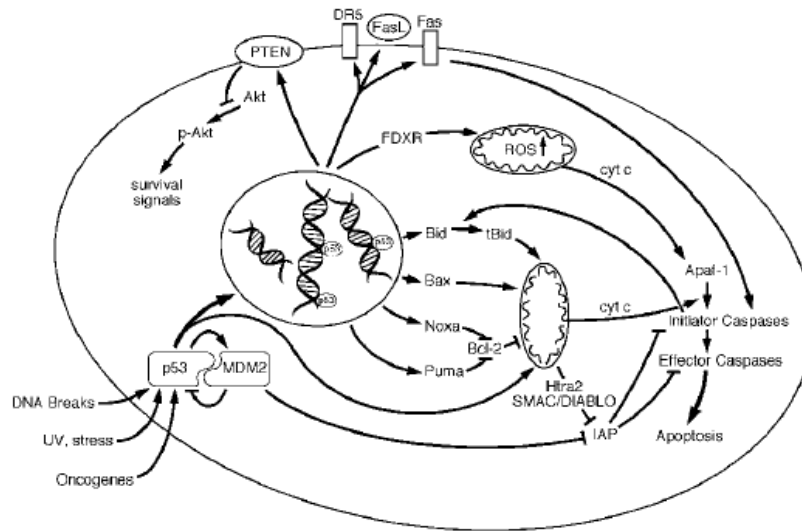


Figura 6. Modelo de la apoptosis mediada por p53 y receptores de muerte. Modificada de Fridman y Lowe, 2003.

Mecanismo antioxidante Nrf2-Keap1:

A pesar de los efectos deletéreos del estrés oxidativo, los organismos aeróbicos han desarrollado una amplia variedad de mecanismos para mantener la estabilidad genómica. Estos mecanismos incluyen antioxidantes constitutivos e inducibles, un sistema de defensa contra oxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD), enzimas de reparación del DNA, mecanismos de sobrevivencia y sistemas inducibles como la vía de señalización Nrf2-Keap1 que es una de las vías antioxidantes más importantes que responden en presencia a estrés oxidativo y electrofílico (Shackelford *et al*, 2000).

Gen NFE2L2

El gen *NFE2L2* ubicado en el cromosoma 2 (2q31) está conformado por 5 exones, de los cuales el exón 1 no es codificante. Aunque su expresión se ha detectado en la mayoría de los tejidos del organismo, ésta es más importante en órganos asociados con la desintoxicación (hígado y riñones) o con alta exposición a factores ambientales (piel, pulmón y tracto gastrointestinal) (Motohashi *et al*, 2002).

Proteína Nrf2

El gen *NFE2L2* codifica para una proteína de 66 kDa (Nrf2) la cual pertenece a la subfamilia de factores de transcripción cap'n' collar (CNC), caracterizados por un dominio básico de unión al DNA tipo cierre de leucinas en el extremo carboxilo (Moi *et al*, 1994). A través de este dominio, Nrf2 heterodimeriza con proteínas de la familia Small Maf y así es capaz de reconocer una secuencia presente en el promotor de sus genes blanco conocida como elemento de respuesta a antioxidantes (ARE). La secuencia consenso del ARE ha sido descrita como 5'gagTcACaGTgAGtCggCAaaatt-3' donde los nucleótidos esenciales se encuentran en letras mayúsculas (Nioi *et al*, 2003). Como se muestra en la figura 7, la proteína Nrf2 tiene seis dominios altamente conservados (Neh1-Neh6). El dominio Neh1 contiene la región CNC-bZIP, responsable de la dimerización con otros factores de transcripción y de la especificidad de unión al DNA (Itoh *et al*, 1999). El dominio Neh2, ubicado en el extremo amino terminal de la proteína funciona como un regulador negativo a través de su interacción con Keap1 (de sus siglas en inglés proteína 1 asociada a E3 tipo Kelch). Además, este dominio presenta siete residuos de lisina responsables de la ubiquitinación y posterior degradación de la proteína a través de la vía del proteosoma 26S (MacMahon *et al*, 2004). Neh3 es indispensable para la actividad transcripcional de Nrf2 mediante el reclutamiento de diversos co-

activadores como la helicasa cromodominio de unión al DNA CHD6. Por otro lado, Neh4 y Neh5 son dominios ricos en residuos acídicos, actúan de forma sinérgica mediante su interacción con la proteína de unión al co-activador CREB (CBP), lo que potencia la tasa de transcripción (Lin *et al*, 2006). Finalmente, el dominio Neh6 presenta numerosos residuos de serina, los cuales pueden ser fosforilados por la enzima GSK3 β (por sus siglas en inglés Glycogen Synthase Kinase 3 β) y funcionar como marca de poliubiquitilación (Cuadrado, 2015).

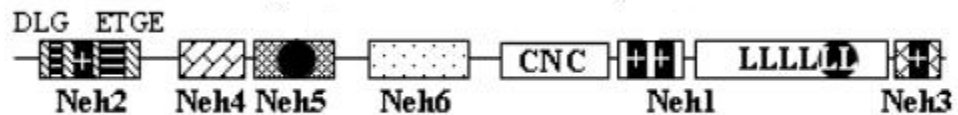


Figura 7. Dominios funcionales de Nrf2. Se muestran los seis dominios funcionales de Nrf2 con homología ECH (Neh) en la proteína Nrf2 de ratón. Modificada de (Li y Kong, 2009)

Regulación de la ruta Nrf2-Keap1

Bajo condiciones basales Nrf2 es retenido en el citoplasma mediante su unión a la proteína de anclaje a actina Keap1. Además, Keap1 permite la interacción de la proteína con función de ubiquitin ligasa Cul3 con Nrf2 para su posterior degradación proteosomal. De esta forma, en condiciones no inducidas la proteína Nrf2 presenta una vida media de entre 10 y 30 minutos (Zhang *et al*, 2004, Cullinan *et al*, 2004, Furukawa y Xiong, 2005). La proteína Keap1 comprende cinco dominios diferentes (figura 8), la región amino terminal (NTR que va de los aminoácidos 1-60), el dominio BTB (Bric-a-brac, tramtrack, Broad-complex del aminoácido 61 al 178), la región interviniente (IVR de los aminoácidos 179-321), el dominio repetido doble de glicina Kelch (DGR aminoácidos 322-608) y la región carboxilo terminal (CTR de los aminoácidos 609-625). Los dominios BTB y la región IVR participan en la unión al complejo de

ubiquitin ligasa (Dinkova *et al*, 2005, Kobayashi *et al*, 2004), mientras que el dominio DGR participa en la unión al dominio Neh2 de Nrf2 y en la interacción con el citoesqueleto (Kobayashi *et al.*, 2002).

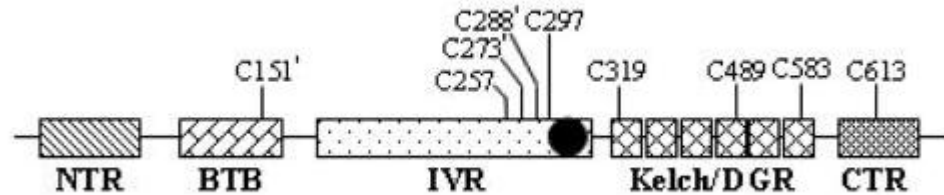


Figura 8. Dominios funcionales en Keap1. Se muestra los tres principales dominios en la proteína Keap1 de ratón. Complejo BTB, bric-a-brac/tram-track; IVR (Región Interviniente); DGR (Repetidos dobles de glicina. Se indica la posición de cada cisteína. Modificada de (Li y Kong, 2009).

Bajo la exposición a un amplio número de activadores endógenos como las ROS, así como diversos compuestos como metales pesados y agentes quimiopreventores, Nrf2 se disocia de Keap1, lo cual permite su acumulación y translocación al núcleo (figura 10b). Se ha propuesto que Nrf2 se libera de la regulación negativa de Keap1 debido a la modificación covalente de los grupos tioles presentes en un tracto de 27 cisteínas altamente conservadas en Keap1. De acuerdo a este modelo, la modificación en Keap1 permite la liberación del dominio DLG y evita la degradación de Nrf2 (Kobayashi *et al*, 2006; Zhang y Hannink, 2003). En corroboración de este modelo, ensayos de mutagénesis dirigida revelaron que los residuos de cisteína 151, 273 y 288 juegan un papel crítico en la interacción de Keap1 con Nrf2.

Keap1 interacciona con Nrf2 en forma de dímero a través de la unión de sus repetidos Kelch con dos sitios dentro del dominio Neh2 de Nrf2, denominados DLG (LxxQDxDLG) y ETGE (DxETGE). El motivo ETGE es el sitio principal de unión a Keap1 ya que su afinidad es aproximadamente de dos órdenes de magnitud mayor a la de DLG. Los

residuos de lisina presentes en el dominio Neh2 localizados a una distancia de 10-30 aminoácidos del amino terminal del motivo ETGE son el blanco de ubiquitinación de Nrf2 (McMahon *et al*, 2006). Recientemente se ha propuesto un modelo de “bisagra y cerrojo” (figura 9) basado en las diferencias en afinidades de estos dos motivos de Nrf2, para su ubiquitilación. El modelo sugiere que la alta afinidad de ETGE confiere el efecto de bisagra el cual proporciona libertad de movimiento a Nrf2 liberándolo de su represión y degradación, mientras que el motivo DLG se comporta como un cerrojo que posiciona a Nrf2 para su ubiquitilación y posterior degradación en el proteosoma (Tong *et al*, 2007).

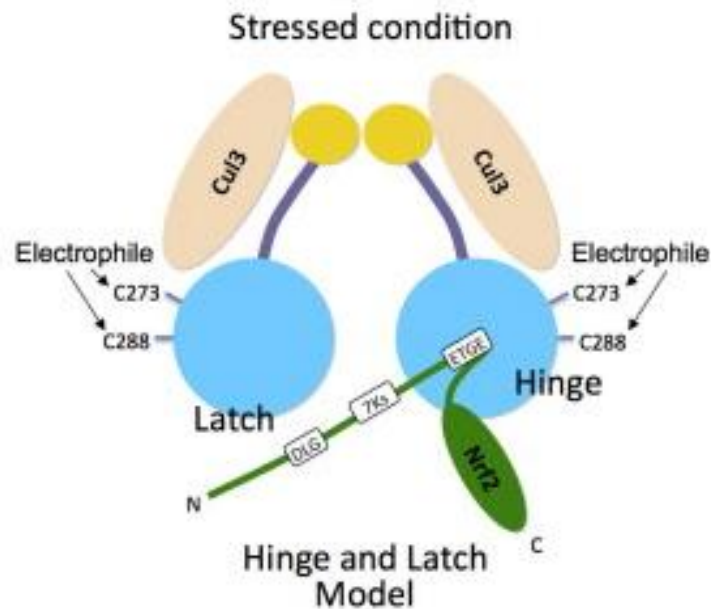


Figura 9. Propuesta de el modelo “bisagra y cerrojo” en la regulación de Nrf2. Tomado de Tong *et al*, 2007.

Por otro lado, el estado de fosforilación de Nrf2 y Keap1 también juega un papel importante en la regulación de la actividad de la vía de señalización. De esta forma, los residuos serina 104 y tirosina 141 fosforilados de Keap1 participan en la retención y liberación de Nrf2 (Zipper y Mulcahy, 2002; Jain *et al*, 2008). De manera similar, la

fosforilación de residuos de serina y treonina presentes en Nrf2 participa en la regulación de este factor de transcripción. Además, la fosforilación mediada por la proteína cinasa C (PKC) de la serina 40 localizada en el dominio Neh2 promueve la disociación de Nrf2 y Keap1 (Huang *et al*, 2002; Bloom y Jaiswal, 2003). Se ha propuesto la participación de otras cinasas en la regulación positiva de Nrf2 como la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), la cinasa localizada en el retículo endoplasmático pancreático (PERK), la cinasa caseína 2 (CK2) y las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Sin embargo, el mecanismo de acción de estas cinasas no ha sido elucidado por completo (Kang *et al*, 2001; Nakaso *et al*, 2003; Cullinan *et al*, 2003; Misra *et al*, 2002; Yu *et al.*, 2000; Balogun *et al*, 2003).

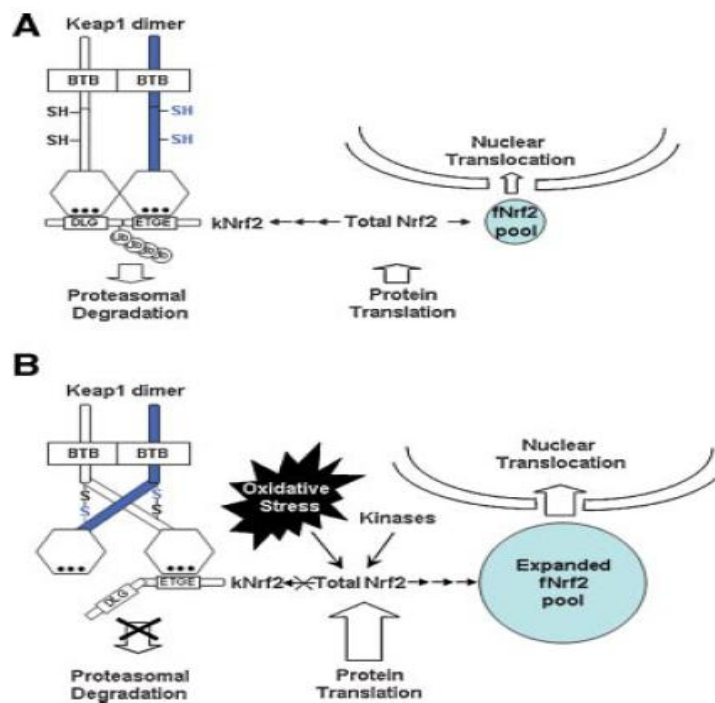


Figura 10. Regulación de la vía de señalización Nrf2-Keap1 A) bajo condiciones basales y B) bajo condiciones de estrés oxidativo o electrofílico. Tomada de (Li y Kong, 2009).

Papel protector de Nrf2

De manera consistente con el papel de Nrf2 como un regulador central de la respuesta adaptativa al estrés oxidativo, los ratones *nrf2*^{-/-} son sensibles a diversos agentes oxidantes. Los ratones *nrf2*^{-/-} expuestos a xenobioticos electrofílicos o compuestos químicos, muestran un incremento en el daño tisular, aumento en la inflamación, mayor cúmulo de daño al DNA, y un incremento en el desarrollo de tumores cancerosos en comparación con ratones silvestres expuestos a estos compuestos (Ramos-Gomez *et al*, 2001; Enamoto *et al*, 2001). De acuerdo a su papel como agente citoprotector, la delección germinal de Nrf2 en modelos murinos produce un incremento en la sensibilidad a padecer diferentes enfermedades como el asma (Rangasamy *et al*, 2005), enfisema (Rangasamy *et al*, 2004) y fibrosis pulmonar (Cho, *et al*, 2004), Parkinson (Burton *et al*, 2006), Alzheimer y Esclerosis Lateral Amiotrofica (Vargas *et al*, 2008) entre otros padecimientos.

De acuerdo con la función protectora de Nrf2, la capacidad de diversos agentes químicos para proteger contra el desarrollo de distintos tipos de neoplasias (quimiopreventores) se reduce abruptamente en modelos murinos donde el gen *nrf2* ha sido deletado. (Young-Joon, 2008) y (Yuesheng y Gordon, 2004). Células de hígado de ratón silvestre tratadas con el antioxidante 3H-1,2,-dithiole-3-thione (D3T) induce la expresión de 300 genes regulados por Nrf2, mientras que en ratones *nrf2*^{-/-} se pierde la inducción del 77% de estos genes. La activación de los genes inducibles por Nrf2 ha sido confirmado mediante el tratamiento de isotiociantatos como el sulforafan, antioxidantes fenólicos y triterpenoides sintéticos (Jung y Kwak, 2010). Estas observaciones evidencian que el efecto protector de estas sustancias es a través de la activación del factor de transcripción Nrf2.

Agentes activadores de la vía de señalización

Se han identificado una amplia gama de compuestos que estimulan la actividad transcripcional de Nrf2, provenientes de fuentes naturales, compuestos derivados de la dieta, metabolitos y sustancias sintéticas. Todos estos inductores son especies electrofílicas o moléculas metabólicamente activadas para convertirse en electrofílicas y subsecuentemente reaccionar con los residuos de cisteína de Keap1. Como se muestra en la figura 11 los compuestos inductores de la vía de señalización Nrf2-Keap1 pueden clasificarse en: isotiocianatos, aceptores de la reacción Michael, compuestos organofosforados o 1,2-ditio-3-tiones, metales pesados, peróxidos y compuestos fenólicos (Kensler *et al*, 2007).

Isotiocianatos: Los isotiocianatos (ITC's) como el benzil isotiocianato y el fenetil isotiocianato se encuentran en vegetales de la familia crucífera como el brócoli y la col. Diferentes estudios indican que el consumo de reduce el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, mama y colon (Seow, 2002). El sulforafán (SFN) se encuentra de manera abundante en el brócoli y es el ITC mejor estudiado. Ensayos hechos con espectrometría de masa indican que este compuesto tiene la capacidad de modificar directamente las cisteínas críticas de Keap1 a través de la formación de carbamoditionato cuando interacciona con los grupos tioles ocasionando un aducto y así permitir la liberación de Nrf2 (Hong, 2005) (figura 11b).

Aceptores de la reacción Michael: Son compuestos carbonilos α,β insaturados con actividad anti-inflamatoria y antioxidante, entre estos compuestos se encuentran la 15-Deoxi- Δ 12,14-prostaglandina J2 (15d-PG)₂, el zumberon, el perillaldehído y el citral. Estos dos últimos son aldehídos terpenoides insaturados que se obtienen de extractos de plantas y han mostrado la acción reguladora sobre la tioredoxina mediante la activación de Nrf2 (Masutani, 2009), a través de su

interacción con residuos de cisteínas de sus proteínas blanco (Uchida y Shibata, 2008)

Compuestos organosulfurados: Como representantes de este grupo de compuestos están el ácido lipoico, el oltipraz y el 3H-1,2-ditioil-3-tiol (D3T). El ácido lipoico (LA por lipoic acid) es producido en la mitocondria y sirve como cofactor del α -cetoglutarato dehidrogenasa, además de su producción endógena (Shay *et al*, 2009), la administración oral del LA conlleva a múltiples actividades biológicas. Sirve como anulador de ROS *in vitro* pero su actividad antioxidante parece deberse a su habilidad de inducir una gran variedad de enzimas a través de la activación de Nrf2, debido a que el LA tiene poca absorción, su acumulación intracelular está por debajo del orden milimolar (Shay *et al*, 2009). Además de su interacción directa con las cisteínas de Keap1, el LA puede activar algunas cinasas activadoras de Nrf2 como lo son Erk1/2, p38 MAPK y la vía de señalización PI3K/Akt (Ogborne *et al*, 2005). Por su parte el oltipraz es un inductor sintético y el compuesto más estudiado dentro de la clase de 1,2ditioil-3-tiones junto con el D3T (Zhang y Munday, 2008). Se ha demostrado que la administración oral del oltipraz induce la respuesta ARE en células HepG2 incrementando significativamente la expresión de genes regulados por Nrf2 como lo son GST y NQO1 (Prince *et al*, 2009). Adicionalmente el oltipraz previene la carcinogénesis mediada por aflatoxina B1 en una gran variedad de órganos incluyendo la vejiga, el colon, el hígado, el pulmón, el estómago y el páncreas (Zhang y Munday, 2008). Finalmente, la administración micromolar de D3T ocasiona un marcado incremento en la actividad de NQO1 en células de ratón Hepa1c1c7 a través de la activación de Nrf2 (Egner *et al*, 1994).

Especies de metales pesados: Los representantes más relevantes de este grupo son el arsénico y el cadmio. El arsénico es el metal pesado más estudiado debido a que es un carcinógeno ambiental,

aunque se conocen sus beneficios terapéuticos en ciertas enfermedades como la leucemia y la psoriasis. El trióxido de arsénico (ATO por arsenic trioxide) es un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la leucemia aguda promielocítica, la administración de éste fármaco resulta en la apoptosis de células leucémicas ya que induce la degradación de la proteína de fusión PML-PAR α (Platanias, 2009). Adicionalmente se ha reportado que el ATO induce la translocación de Nrf2 al núcleo permitiendo la activación de genes blanco como *NQO1* y *HO-1* (Morales *et al*, 2009). El FIAsh es un fluoróforo basado en Arsénico (arsenic-based fluorophore) que estabiliza a Nrf2 e incrementa los niveles de expresión de *HO-1* a través de su unión a Keap1 lo que provoca la emisión de una fuerte señal de fluorescencia a 508nm (He y Ma, 2009).

Compuestos fenólicos: Estos compuestos tienen una actividad antioxidante intrínseca debido a su habilidad para eliminar especies reactivas. Sin embargo, su efecto quimiopreventivo está mediado principalmente por su capacidad de formar metabolitos de quinona como resultado de la oxidación mediada por enzimas del complejo p450, los cuales reaccionan rápidamente con los grupos tioles presentes en las cisteínas de Keap1 y de esta manera permiten la respuesta de defensa dependiente de Nrf2 (Wang *et al*, 2010). Los compuestos representantes de este grupo son: el carnosol, la quercetina, el resveratrol y la curcumina.

El carnosol es un antioxidante extraído de la planta *Rosmarinus officinalis* (Rosemary), se ha visto que este compuesto puede incrementar los niveles proteicos de Nrf2 y la expresión de *HO-1*, así como reducir la peroxidación de lípidos y la generación de ROS en células PC12 (Martin *et al*, 2004).

La quercetina es un flavonoide polifenólico antioxidante que se encuentra de manera ubicua en frutas y verduras. Quercetina es capaz regular la expresión de enzimas de la fase II como *NQO1*, a través de la

activación de Nrf2, en células HepG2 con una dosis de 15 μ M. Además, la quercetina es capaz de proteger a macrófagos tratados con H₂O₂ de la apoptosis a través de la regulación de enzimas reguladas por Nrf2 como HO-1 (Chow *et al*, 2005).

El resveratrol es un compuesto encontrado en la uva que ha atraído la atención de los investigadores debido a su habilidad de retrasar problemas asociados con el envejecimiento como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes y la neurodegeneración. Se cree que su efecto protector está mediado por la activación de la vía de señalización SIRT1, pero se ha encontrado que la vía de señalización Nrf2-Keap1 también está implicada en los efectos benéficos del resveratrol ya que se ha visto que activa enzimas antioxidantes en hepatocitos, cardiocitos primarios, células endoteliales y células epiteliales (Rubiolo *et al*, 2008).

Curcumina

La curcumina es un polifenol derivado de la cúrcuma la cual se extrae del rizoma de la planta *Curcuma longa* comúnmente utilizada como especia en la India, no sólo por sus propiedades curativas sino también por sus propiedades como conservador de comida y como colorante amarillo para uso textil. La cúrcuma contiene una amplia variedad de fitoquímicos, incluyendo: curcumina, demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumin, zingibereno, curcumenol, curcumol, eugenol, tetrahidrocurcuminol, trietilcurcumin, turmerin, turmerones y tuermeronoles, pero investigaciones exhaustivas dentro de los últimos años han probado que la mayoría de las actividades terapéuticas asociadas a la cúrcuma se deben a la curcumina (Aggarwal *et al*, 2007).

La curcumina ha mostrado tener actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antiviral, antibacteriana, antimicótica y anticancerígena, como se muestra en la figura 12. Estos efectos son mediados a través de la regulación de diferentes factores de transcripción, factores de crecimiento, citocinas inflamatorias, proteínas cinasa y otras enzimas (Aggarwal *et al*, 2007).

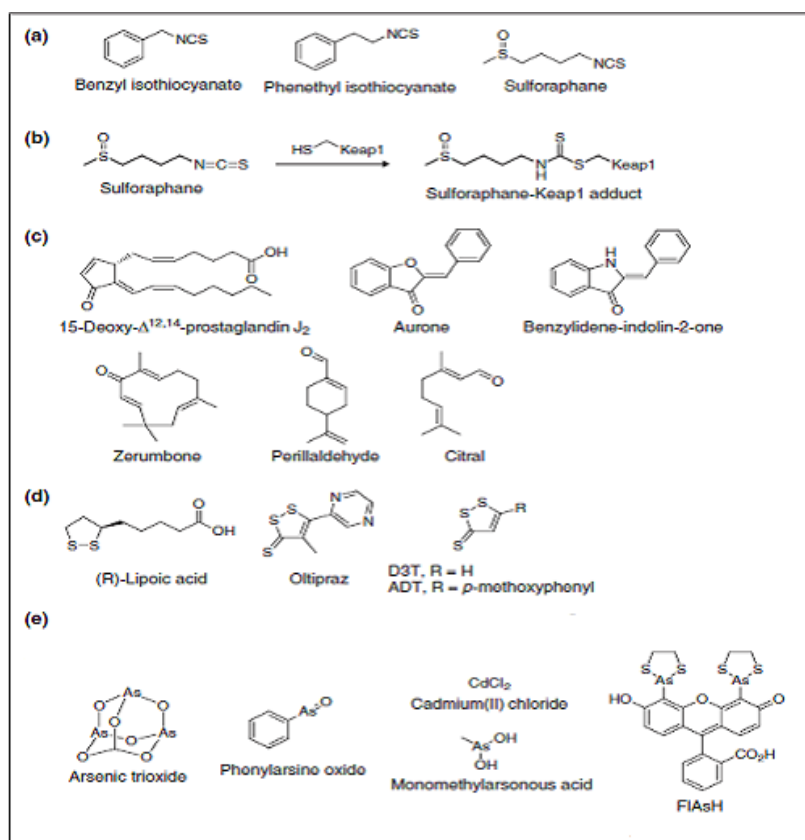


Figura 11. Clases de inductores de la ruta Nrf2-Keap1: a) Isotiocianatos, b) reacción entre sulforafan y las cisteínas de Keap1, c) aceptores de la reacción de Michael, d) compuestos organosulfurados, e) electrófilos que contienen un grupo disponible y f) especies de metales pesados. Tomado de Kensler, 2007.

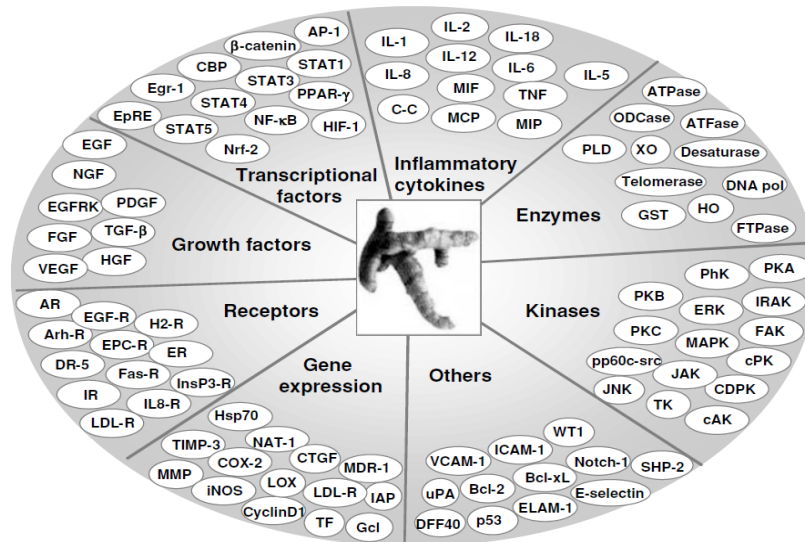


Figura 12. Blancos moleculares de la curcumina. Tomada de Aggarwal, 2007

Varias investigaciones han puntualizado el papel de la curcumina sobre la vía de señalización Nrf2-Keap1, como ejemplo se ha demostrado que este pigmento puede inducir la actividad de Nrf2 en células derivadas de hepatoma de humano HUH7 de manera p38 MAPK dependiente (MacNally *et al*, 2007). La curcumina induce un incremento en las ROS en estas células, lo cual parece ser importante para la inducción de Nrf2 ya que la activación de *HO-1* mediada por curcumina se pierde al usar un carroñero de ROS como lo es la N-acetilcisteína (NAC). El grupo químico carbonil α,β -insaturado de la curcumina parece ser necesario para la actividad del fitoquímico sobre Nrf2, ya que la tetrahydrocurcumina la cual carece de este grupo es incapaz de inducir la activación de esta proteína (Farombi *et al*, 2008). La ingesta de curcumina (0.05% en la dieta, por 15 días) induce la translocación nuclear de Nrf2 en ratones, así como su subsecuente asociación con los sitios ARE incrementando los niveles de *GST* y *NQO1*. Adicionalmente, la curcumina previene en este modelo las posibles modificaciones de DNA ocasionadas por la administración simultánea de benzo (a) pireno mediante la inhibición de enzimas de la fase I (Garg *et al*, 2008). Esto indica que la curcumina puede bloquear la

iniciación de la carcinogénesis no sólo a través de la sobre expresión de enzimas de la fase II si no también inhibiendo enzimas de la fase I. Además de su actividad como quimiopreventor, la curcumina exhibe efectos neuroprotectores en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer (AD por Alzheimer's disease). Esta patología es ocasionada por que en el cerebro de personas con AD las fibrillas ocasionadas por la agregación de la proteína β -amiloide ($A\beta$) causan una respuesta neuroinflamatoria. Las ROS y citocinas resultantes promueven la deposición de estas fibrillas ocasionando el incremento de muerte neuronal y daño al tejido. Estudios *in vitro* mostraron que la curcumina potencia la expresión de *HO-1* y *GST* mediada por Nrf2 y de ésta manera protege de la apoptosis a células PC12 y a neuronas corticales pre frontales de ratón (Qin *et al*, 2009). Adicionalmente, la curcumina presenta efectos anti-inflamatorios a través de la inhibición de la fosforilación de I κ B y la subsecuente activación de NF- κ B (Hatcher *et al*, 2008). Todos estos efectos protectores e inhibitorios requieren de concentraciones del antioxidante en un rango de 10-100 μ M (Ju-Hyung *et al*, 2003) y como lo muestra la figura 13, dependiendo del tipo celular y de la concentración utilizada, la curcumina puede tener efectos tanto antioxidantes como citostáticos y citotóxicos (Cao *et al*, 2014).

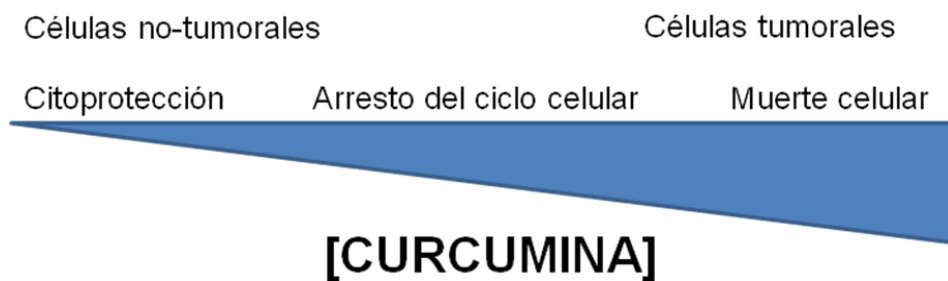


Figura 13. Efectos celulares de la curcumina dependientes de la concentración utilizada.

Activación constitutiva de Nrf2 en células tumorales

Recientemente se ha establecido que un gran número de tumores exhiben una actividad potenciada de Nrf2 la cual puede contribuir al fenotipo maligno. La amplificación de la actividad de Nrf2 está en un rango de frecuencia de 80-95% en algunos tipos de cánceres como el de pulmón, mama, ovario, endometrio, páncreas, colón y próstata (Lau *et al*, 2008; Sporn y Liby, 2012; Shelton y Jaiswal, 2013; Gañan-Gómez, 2013).

Esta desregulación en la actividad de Nrf2 se debe a mutaciones somáticas en el gen de Keap1 y de forma menos frecuente a mutaciones en el gen de Nrf2. En el caso de *KEAP1*, la mutación más común se encuentra en la región que codifica para el dominio DC de la proteína, lo cual impide su unión a Nrf2. También se han encontrado mutaciones en la región interviniente (IVR) y en el dominio BTB, en ambos casos se pierde la interacción de Keap1 con Cullin3 y por lo tanto la posterior poliubiquitilación de Nrf2 se ve impedida. Por su parte las mutaciones en el gene *NFE2L2* se presentan en la región que codifica para los motivos DLG y ETGE dentro del dominio Neh2 impidiendo su unión a Keap1, lo cual le confiere una ganancia de función. Adicionalmente, se ha descrito la hipermetilación del promotor de *KEAP1* en un número considerable de tumores que reducen la expresión de la proteína y conducen a la pérdida de inhibición de Nrf2. Además de estos efectos genéticos y epigenéticos se ha encontrado una alta succinilación de Keap1, lo cual impide su actividad inhibitoria sobre Nrf2, debido a la pérdida de función de la enzima fumarato hidratasa. Otros eventos observados que llevan a la actividad exacerbada de Nrf2 en tumores son la acumulación de proteínas disruptoras y la inducción de la transcripción de Nrf2 por vías de señalización desreguladas en cáncer como K-Ras, B-Raf y c-Myc (Kansanen *et al*, 2013) (Figura 14).

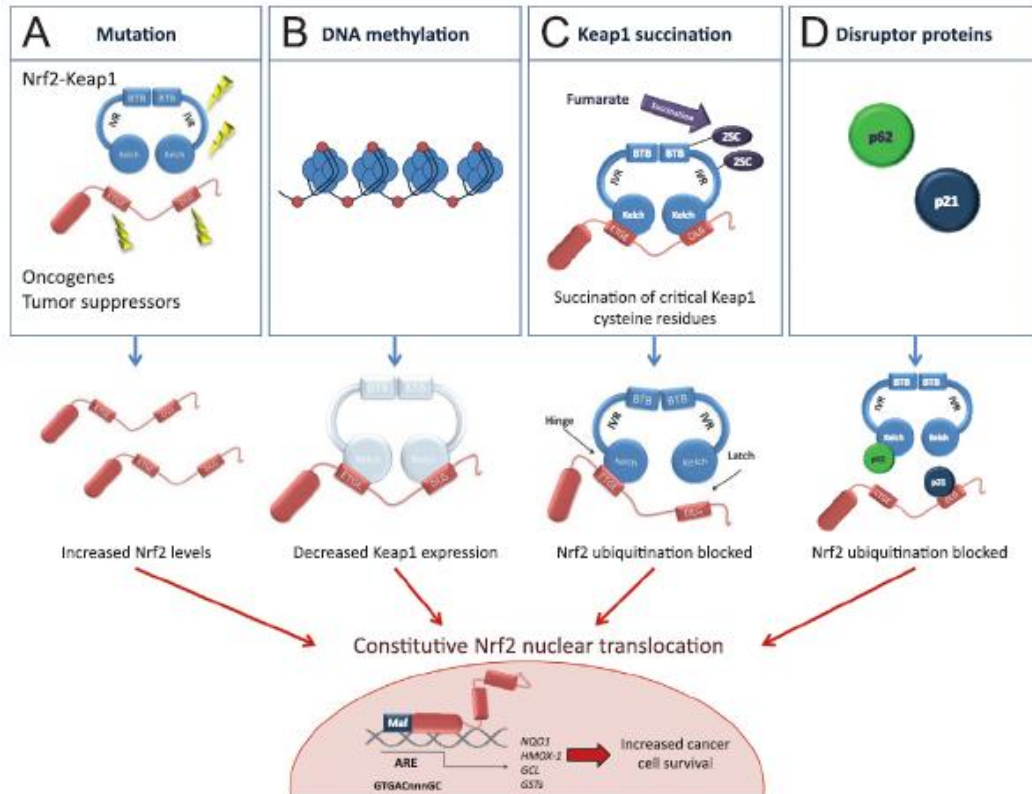


Figura 14. Mecanismos que ocasionan la acumulación nuclear constitutiva de Nrf2 en cáncer. Tienes que describir los diferentes incisos. Tomada de Kansanen, 2013.

Esta activación constitutiva de Nrf2 les confiere a las células tumorales tres mecanismos adaptativos: resistencia a fármacos, actividad proliferativa e inhibición de la apoptosis:

Mecanismo 1: La actividad constitutiva de Nrf2 en tumores se ve reflejada en la presencia de un fenotipo de resistencia a la quimioterapia llevada a cabo con agentes alquilantes como el tamoxifen, cisplatino, doxorubicina y etopósido en pacientes con cáncer de mama (Nioi y Nguyen, 2007), cuello y cabeza, ovario y endometrio (Jaramillo y Zhang, 2013). De esta forma, las células neoplásicas presentan enormes ventajas de crecimiento intrínseco y protección celular en contra de un ambiente tumoral oxidante, así como la resistencia a fármacos anti-neoplásicos. Este fenómeno se debe a que la actividad incrementada de Nrf2 en

células cancerosas contribuye a la inducción de la transcripción de genes que codifican para proteínas involucradas con bombas de flujo, tales como las proteínas de resistencia a multidroga como MRP2, MRP3 y MRP4 (Geismann *et al*,2014).

Mecanismo 2: Los niveles elevados de Nrf2 han mostrado promover la proliferación de células cancerosas mediante el mantenimiento del balance redox de la célula y la generación de antioxidantes ya que un ambiente altamente reducido es necesario para estimular la proliferación celular. De esta forma, la condición reducida en el microambiente tumoral ocasionada por la activación persistente de Nrf2 podría promover los eventos iniciales para la formación tumoral. De acuerdo con esta propuesta, diferentes estudios han demostrado que la presencia de menores niveles de ROS en células madres cancerosas comparadas con células no tumorales, les permite mantener una capacidad proliferativa alta, mientras que la diferenciación es inhibida (Hye-Kiung y Young-Joon, 2014). Además, otros ensayos revelaron que el glutatión es crítico para la proliferación celular, por lo que la actividad potenciada de Nrf2 podría contribuir a la proliferación de células tumorales mediante una acelerada síntesis de glutatión (Jaramillo y Zhang, 2013).

Mecanismo 3: Otra ventaja adaptativa de la célula tumoral promovida por la activación incrementada de Nrf2 es la alta capacidad anti-apoptótica de esta proteína, la cual puede explicarse por tres eventos. El primero de ellos es la participación de Nrf2 como modulador de la transcripción de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 la cual en ratones se encontró asociada a cardioprotección. Adicionalmente, se identificó una región ARE en el promotor del gene *Bcl-2* y al ser inducido con radiación, la región resultó esencial para la expresión de *Bcl-2* mediante la unión de Nrf2 a su promotor. Esta regulación transcripcional, también se encontró asociada con la regulación a la baja de las caspasas 3 y 7 e

importantemente con la resistencia a apoptosis inducida por etopósido y radiación, lo que señala a Nrf2 como un regulador importante de la proteína Bcl-2 en la inhibición de apoptosis, incremento a la sobrevivencia y resistencia a fármacos (Niture, 2012). El segundo evento se relaciona con la regulación de Nrf2 sobre la proteína Mdm2 (por sus siglas en inglés murine double minute 2), el principal regulador negativo de p53, esta asociación fue identificada en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) donde la delección del gen *nrf2* causa una represión en la expresión de *mdm2* lo que provoca una acumulación de p53. Adicionalmente en ensayos realizados en células A2780 derivadas de carcinoma de ovario, el uso de interferentes contra Nrf2 ocasionan un incremento en los niveles de p53 en respuesta a ROS permitiendo la muerte celular, lo que sugiere que la inhibición de Nrf2 suprime la expresión de Mdm2 en células tumorales soportando el concepto de que la inhibición de Nrf2 puede facilitar la respuesta apoptótica en condiciones de estrés ambiental (You *et al*, 2011).

El tercer evento está ligado al anterior y se asocia con la necesidad de un ambiente pro-oxidante para desencadenar la apoptosis. Al estar activado constitutivamente Nrf2 los niveles de estrés oxidativo celulares se mantienen bajos, impidiendo la acumulación de ROS necesaria para propiciar la muerte celular, por tanto, la actividad constitutiva de Nrf2 le permite a la célula tumoral evadir la muerte celular por apoptosis. A manera de compilación de las alteraciones ocasionadas por la sobre regulación de Nrf2 en células tumorales un estudio realizado por Sighn y colaboradores confirmó que la activación constitutiva de Nrf2 en células cancerosas de pulmón promueve la tumorigenicidad y contribuye a la quimioresistencia mediante la sobre regulación de enzimas desintoxicantes como el glutatión, la tioredoxina y bombas de flujo, encargadas de desechar un alto espectro de fármacos. Además, se ha demostrado que la reducción de la expresión de Nrf2 mediante RNA de

interferencia, induce la generación de especies reactivas de oxígeno, suprime el crecimiento tumorigénico e incrementa la sensibilidad a muerte celular inducida por anti-neoplásicos *in vitro e in vivo* (Sighn *et al*, 2008).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Como se describió anteriormente, distintos estudios han puntualizado la necesidad de inactivar a la vía de señalización regulada por Nrf2 para que la célula tumoral inicie un proceso de muerte, el cual se ha visto desregulado una vez que la célula tiene capacidad oncogénica. Sin embargo, recientemente se ha establecido en un modelo murino de obstrucción ureteral unilateral de riñón (UUO por unilateral ureteral obstruction), es decir, en un modelo no tumoral, donde el flujo sanguíneo renal decrece e incrementan los niveles de ROS renales, que a partir del tercer día de la obstrucción las células renales comienzan a morir, evento asociado con una reducción en la translocación nuclear de Nrf2, mientras que se incrementa su porción citosólica, se potencia la expresión y la translocación de Bax a la mitocondria y la liberación de *citocromo c* al citoplasma. Por su parte, la inducción con sulforafan en este modelo murino incrementa la translocación de Nrf2 al núcleo lo que disminuye el traslado de Bax a la mitocondria y la liberación del *citocromo c* al citosol lo que resulta en la reducción de daño renal mediante la inhibición de procesos de muerte celular (Chung *et al*, 2012).

Este trabajo realizado en el modelo murino de obstrucción ureteral unilateral (UUO) es uno de los pioneros en demostrar mediante el uso de un modelo no tumoral que el apagado de la vía de señalización regulado por Nrf2 es necesario para que se lleve a cabo la muerte celular por apoptosis. Por el contrario, la activación de esta vía de señalización impide la muerte celular aún cuando hay un daño ocasionado por la presencia de las ROS.

Por lo anterior, es de esencial importancia caracterizar los mecanismos de inactivación de la vía de señalización principalmente en células normales, ya que la vía se ha visto desregulada por diferentes mecanismos en células tumorales lo que dificulta su estudio y la interpretación de los datos. Los mecanismos de apagado de la vía podrían funcionar como blancos terapéuticos en diferentes patologías pero primordialmente en la inhibición de la carcinogénesis.

A la fecha se han propuesto tres moléculas encargadas del apagado de la ruta, las cuales son accionadas dependientemente del nivel de estrés oxidativo de la célula y el daño ocasionado por el mismo. Keap1 y GSK3 β han sido propuestos como moduladores negativos de la vía una vez que el estado redox de la célula se restablece, mientras que diversos estudios demuestran que p53 participa en el apagado de Nrf2 en modelos celulares donde el daño al DNA es severo y la célula inicia un proceso de muerte celular.

Mecanismos inhibitorios de la vía de señalización Nrf2-Keap1

Translocación de Keap1 al núcleo

Siendo Keap1 el regulador negativo de Nrf2 bajo condiciones basales se propuso como una pieza fundamental en la represión post-inducción de la vía antioxidante. Algunos estudios demostraron que la señal de exportación nuclear (NES) de Keap1 es requerida para la finalización de la vía de señalización regulada por Nrf2 escoltando a esta proteína hacia el citoplasma, una vez en este compartimento celular, Nrf2-Keap1 se asocian con la ubiquitin ligasa E3 lo que resulta en la degradación de Nrf2 y el fin de su señalización (Sun *et al*, 2007). Más tarde se propuso que la magnitud y duración de la señalización mediada por Nrf2 es delicadamente controlada por Keap1 promoviendo la degradación de Nrf2 en el citoplasma en condiciones basales y mediando su exportación del núcleo pero mediante la importina α -7 o karioferina α -6

(KPNA6) la cual interacciona con el dominio Kelch de Keap1 facilitando su importe nuclear y por tanto la atenuación de Nrf2 durante la fase de post-inducción (figura 15). Sin embargo, se ha demostrado que el traslado de Keap1 hacia el núcleo depende del tipo celular y la mayoría de estos ensayos se han realizado en líneas celulares derivadas de ratón (Sun *et al*, 2011). En aquellas células donde Keap1 es incapaz de translocarse al núcleo deben operar mecanismos alternos que permitan la inactivación de Nrf2 cuando el estrés oxidativo ha sido atenuado.

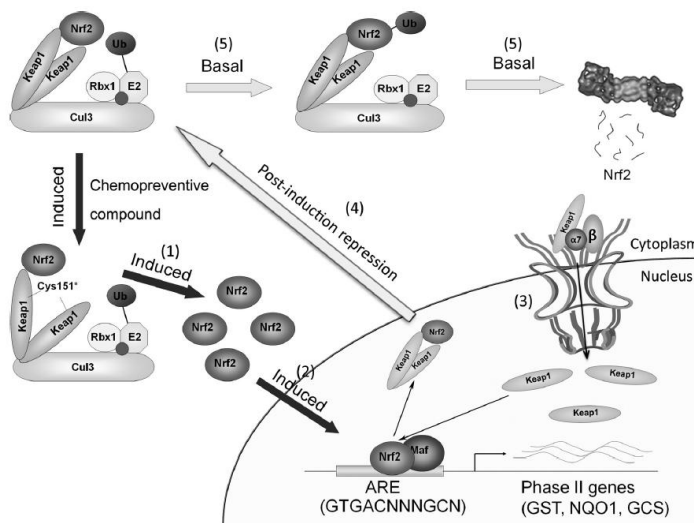


Figura 15. Modelo de la regulación de Keap1 sobre la actividad de Nrf2 de manera basal, bajo un estímulo y después del estímulo. Tomado de Sun *et al.*, 2007.

Apagado mediado por GSK3 β

La inhibición de la ruta regulada por GSK3 β una vez que el estado redox de la célula se restablece y la célula seguirá progresando en el ciclo celular, se ha propuesto por Jaiswal y colaboradores, la propuesta sustenta a la familia de proteínas Src como moduladoras del apagado de la vía de señalización antioxidante regulada por Nrf2. El papel de las Src cinasas fue investigado a través de si-RNAs inhibitorios de Fyn, Src, Yes, Fgr y Lyn en células Hepa-1, los resultados demuestran que la inhibición de éstas proteínas, excepto Lyn, conlleva a la acumulación nuclear de

Nrf2 y a la sobreexpresión de genes blanco de éste factor de transcripción. Mientras que la sobreexpresión de las proteínas de la familia Src conduce a la fosforilación de la tirosina 568 de Nrf2 que desencadena en su exportación nuclear y posterior degradación (figura 16). Además, estos investigadores demostraron que la enzima GSK-3 β se encarga de regular la señalización mediada por las proteínas de la familia Src, en una fase post-inducción o retardada, fosforila a Fyn, Src, Yes y Fgr para permitir su translocación del citoplasma al núcleo y permitir la interacción negativa de éstas proteínas con Nrf2 (Kaspar y Jaiswal, 2011) (Niture y Jaiswal, 2011).

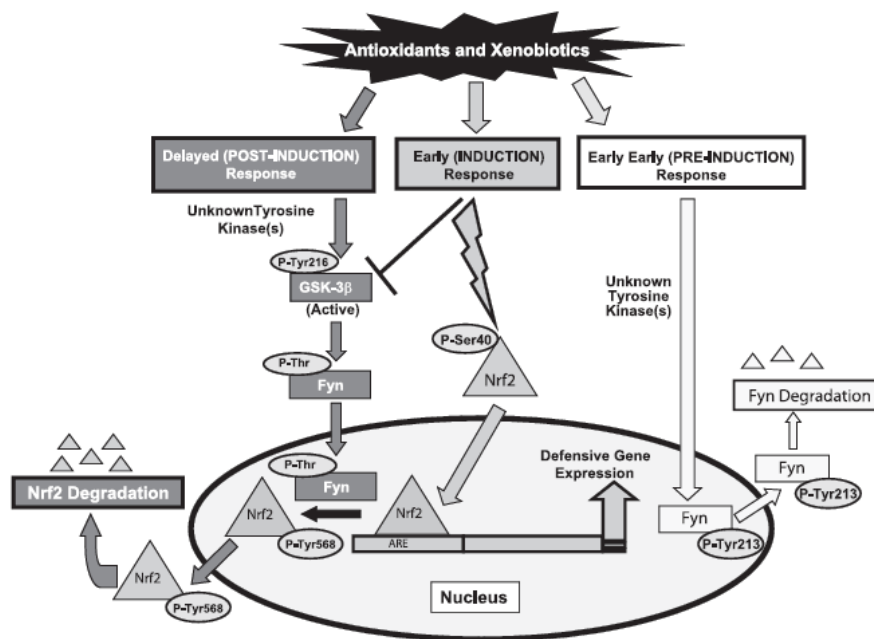


Figura 16. Modelo propuesto de la regulación de la vía de señalización antioxidante Nrf2 por miembros de la familia Src reguladas a su vez por GSK3 β . Tomado de Kaspar y Jaiswal, 2011.

Adicionalmente de la inhibición indirecta de la vía de señalización Nrf2-Keap1 recientemente se ha demostrado que GSK3 β participa en la regulación de la inactivación de la vía antioxidante a través de su actividad directa sobre el dominio Neh6 de Nrf2 murino el cual presenta

dos sitios de unión (DSGIS³³⁸ y DSAPGS³⁷⁸) para la proteína conteniente de repetidos β -transducina o β -TrCP por sus siglas en inglés (β -transducin repeat-containing protein) los cuales actúan como sustratos receptores para el complejo ubiquitin ligasa Skp1-Cul1-Rbx1/Roc1. El reconocimiento del sitio de unión DSGIS³³⁸ por la β -TrCP depende de su previa fosforilación en serina mediada por GSK3 β (figura 17), mientras que el sitio de unión DSAPGS³⁷⁸ parece no estar regulado por ésta cinasa. (Chowdhry *et al*, 2013) y (Cuadrado, 2015).

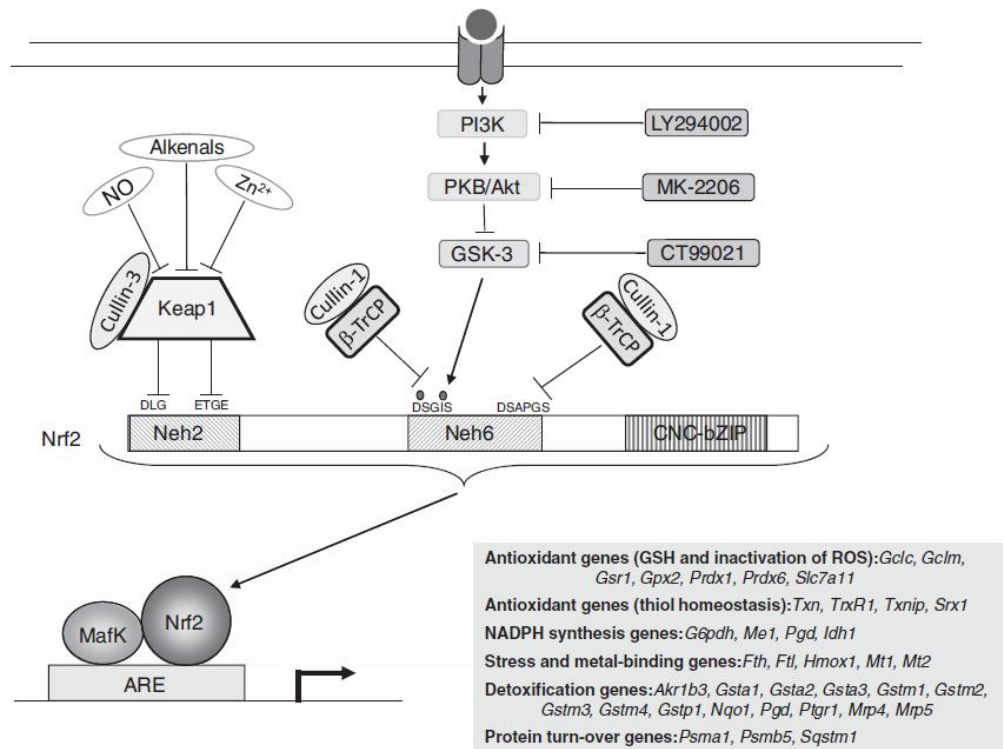


Figura 17. Regulación directa de GSK3 β mediante la fosforilación de la región DSGIS presente en el dominio Neh6 de Nrf2. Tomado de Chowdhry, 2013.

p53 como modulador de la vía de señalización Nrf2-Keap1

Cuando las células presentan altos niveles de ROS y provocan un daño severo en el DNA la célula responde mediante la activación de p53 el cual induce arresto en el ciclo celular y/o apoptosis. Faraonio y colaboradores proponen que esta respuesta y la regulada por Nrf2 están

conectadas. Utilizando células Hepa, Calu y Saos expuestas a di-etilmaleato (DEM), etoposido y cisplatino como generadores de daño demostraron que p53 contrarresta la actividad de Nrf2 a través de su interacción directa con las regiones ARE de los genes blanco x-CT, NQO1 y GST α 1 impidiendo la unión del factor de transcripción Nrf2 lo que provoca la inactivación de la vía. Este grupo propone que considerando que la muerte celular mediada por p53 requiere de un alto nivel de ROS, el probable control negativo de p53 sobre la actividad de Nrf2 parece ser necesaria para propiciar el ambiente necesario para la inducción de la apoptosis (Faraonio *et al*, 2006).

Además, se ha propuesto otro mecanismo de regulación mediada por p53 sobre la vía de señalización antioxidante Nrf2-Keap1, el cual fue propuesto por Chen y colaboradores, los cuales proponen una interacción entre ambas vías de señalización sin la interacción de p53 sobre las regiones ARE. Sus resultados demuestran una regulación bifásica de p53 sobre Nrf2 dependiendo de los niveles de ROS presentes en la célula. Cuando los niveles de estrés oxidativo son bajos se lleva a cabo la fase de inducción donde la proteína basal de p53 contribuye a la sobre expresión de genes antioxidantes a través del incremento proteico de Nrf2 de manera dependiente de p21 lo que promueve una respuesta de supervivencia. Sin embargo, la fase de represión se presenta cuando los niveles de estrés oxidativo son elevados, la proteína p53 incrementa e inhibe a Nrf2, mediante un mecanismo desconocido, resultando en la apoptosis dependiente de p53 (Chen *et al*, 2012).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los requerimientos para que se presente de manera adecuada la muerte celular programada es la presencia de niveles de estrés oxidativo elevado. Nrf2-Keap1 es una de las vías más importantes en impedir que la célula llegue a presentar estrés oxidativo, al reducir los niveles de las especies reactivas capaces de dañar macromoléculas, mediante la activación transcripcional de cientos de genes citoprotectores. Se desconoce cuál es el mecanismo a través del cual la vía de señalización Nrf2-Keap1 es inhibida una vez que el estrés oxidativo ha rebasado la capacidad citoprotectora de la vía de señalización y la célula ha enviado la señal de muerte celular programada.

JUSTIFICACIÓN

Para que se lleve a cabo la muerte celular programada se requiere la presencia de niveles elevados de estrés oxidativo. Nrf2-Keap1 es una de las vías de regulación más importantes en contender con estas especies reactivas y se ha observado una interacción entre vías de señalización relacionadas con la muerte celular programada y la vía Nrf2-Keap1, lo que lleva a la inhibición de esta última. Sin embargo, se conoce poco sobre el mecanismo a través del cual la vía de señalización Nrf2-Keap1 es inhibida para que se desencadene la muerte celular programada.

HIPÓTESIS

La vía de señalización Nrf2-Keap1 es inhibida mediante un mecanismo regulado para que la muerte celular programada se lleve a cabo.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los mecanismos de inactivación de la ruta Nrf2-Keap1 en condiciones pre-apopticas bajo la inducción de curcumina.

OBJETIVOS PARTICULARES

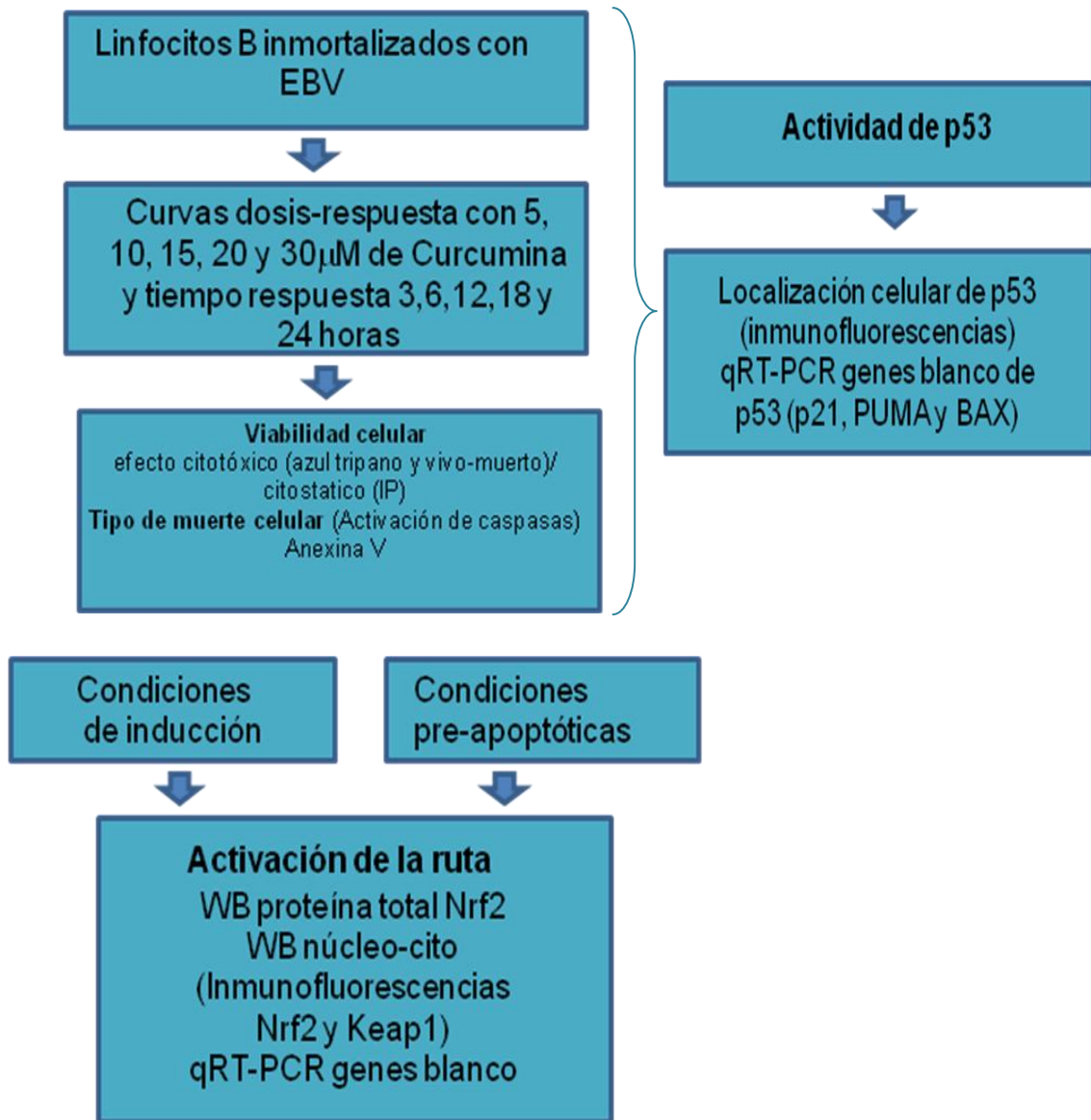
1.- Determinar si la Curcumina presenta efectos citotóxicos y citostáticos en Linfocitos B inmortalizadas con EBV.

2.- Evaluar la actividad de la ruta Nrf2-Keap1 bajo condiciones de muerte celular inducida por Curcumina.

3.- Estudiar si p53 responde a la inducción de Curcumina en linfocitos B inmortalizados con EBV.

4.- Determinar la participación de Keap1 en la inhibición de la ruta regulada por Nrf2 en células inducidas a muerte celular por Curcumina.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA

Condiciones de cultivo y línea celular: En este estudio se utilizó la línea celular NL-45 generada previamente al inmortalizar células linfoblastoides con el virus de Epstein Barr (Córdova *et al*, 2014). Esta línea celular fue mantenida en medio RPMI (Gibco, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, NY), 1% de piruvato (Gibco, NY), 1% antibiótico-antimicótico (Gibco, NY) y 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco, NY) a 37°C bajo 5% de CO₂. Las células fueron cultivadas a una densidad de 1x10⁶ células/mL en frascos de cultivo de 25mm² por 24 horas y tratadas con diferentes dosis de Curcumina (5, 10, 15, 20 y 30µM) o incubadas por diferentes periodos de tiempo con 15µM Curcumina (3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 horas).

Reactivos: La curcumina fue adquirida en Sigmal Chemical Co. (USA) y se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigman, St. Louis, USA). La concentración stock de cada reactivo fue ajustada de tal manera que la cantidad de DMSO no rebasara el 0.1% de medio de cultivo. A los cultivos control se les administró la misma cantidad de DMSO sin curcumina ni inhibidor.

Ensayos de citotoxicidad:

Porcentaje de célula vivas: Después de tratar a las células a diferentes dosis de curcumina, el porcentaje de células vivas fue evaluada con una solución de azul tripano 0.4% (Gibco, NY) en una dilución 1:1. Las células no teñidas fueron contabilizadas con un hemocitometro utilizando un microscopio (Zeizz Axiovert 40CF). Se cuantificaron cuatro cuadrantes del hemocitómetro, se obtuvo el promedio el cual se multiplicó por el factor de dilución y el volumen de la cámara.

Porcentaje de células muertas: El porcentaje de células muertas fue determinado con el kit de tinción celular LIVE/DEAD (Invitrogen,

Oregón, USA) el cual, es un colorante que se une a los grupos aminos, cuando una célula está viva se une a los grupos aminos de la membrana externa dando una fluorescencia, mientras que en una célula con membrana celular comprometida, el colorante entra al espacio citoplasmático y se une a los grupos aminos intracelulares dando una mayor fluorescencia. El análisis se realizó mediante citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células expuestas a diferentes dosis de curcumina fueron centrifugadas a 1200rpm, lavadas con PBS y empastilladas mediante su centrifugación a 1200rpm. La pastilla celular fue resuspendida en 1mL de PBS a una densidad de 1×10^6 células, esta densidad fue determinada utilizando una cámara de Neubauer. Después de esto, se añadió a la suspensión celular 1mL del compuesto comercial VIVO/MUERTO para su posterior homogenización por agitación ligera en vórtex e incubación por 30 minutos en la obscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron empastilladas y lavadas con 1mL de PBS, para después de otra centrifugación a 1200rpm ser resuspendidas en 900 μ L de PBS y 100 μ L de formaldehído al 37% e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Después se realizó un lavado con 1mL de PBS/BSA 1%, se centrifugó a 1200rpm y se resuspendió en 1mL de PBS/BSA 1% para ser analizados posteriormente en el citómetro marca FACS Arias 1 cell sorting en el canal FL-2 a 488nm. Las células con mayor fluorescencia fueron seleccionadas como la población de células muertas.

Ensayo de Anexina V: Posterior al tratamiento con 15 μ M de curcumina por diferentes tiempos, los cultivos celulares fueron lavados con PBS frío y fueron centrifugados a 1200rpm. El paquete celular resultante fue resuspendido en 1mL de amortiguador de unión a Anexina V, el cual se preparó como sigue; 10mM HEPES, 140mM NaCl y 2.5mM CaCl₂ ajustado a un pH de 7.4. El número de células fue determinado

mediante una cámara de Neubauer y se ajustó 1×10^6 células por cada $100 \mu\text{L}$ de buffer de unión a Anexina; después, se añadieron $5 \mu\text{L}$ del kit de detección de apoptosis FITC Anexina V conjugada con Ioduro de Propidio (Lifetechnologies, USA), por cada $100 \mu\text{L}$ de suspensión y se procedió a una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron $400 \mu\text{L}$ de buffer de unión a Anexina y se mezcló de manera generosa, las muestras se mantuvieron en hielo hasta su análisis mediante FACS a 496nm .

Perfil de ciclo celular mediante ioduro de propidio: Después exponer las células a diferentes concentraciones de curcumina durante 24 horas, las células fueron lavadas con 1mL de PBS 1X, centrifugadas a 1200rpm y resuspendidas en 0.3mL de PBS y 0.7mL de 70% de etanol gota a gota bajo agitación ligera en un vórtex. La suspensión celular fue almacenada a -70°C hasta su análisis. Previo a su evaluación, las células fueron lavadas con PBS frío, centrifugadas a 1200rpm y resuspendidas en 0.25mL de PBS; se añadieron $5 \mu\text{L}$ de RNAsa a una concentración de 10mg/mL para una concentración final de 0.5mg/mL . Después se realizó una incubación a 37°C por una hora, se añadieron $10 \mu\text{L}$ de una solución de ioduro de propidio a una concentración de 1mg/mL para obtener una concentración final de $2.65 \mu\text{g/mL}$ y finalmente fueron analizados por FACS a 488nm . Para evaluar el posible arresto en la fase G1, se llevó a cabo el mismo procedimiento pero utilizando células tratadas con 10 y $15 \mu\text{M}$ de curcumina durante 24 horas comparadas con células tratadas con 200nM de nocodazol como inductor del arresto en la fase G2/M por 24 horas y células tratadas tanto con nocodazol como con 10 y $15 \mu\text{M}$ de curcumina por 24 horas.

Análisis de western blot: Linfocitos inmortalizadas con EBV fueron expuestos a una curva de tiempo-respuesta, después del tratamiento se obtuvo un pellet por medio de centrifugación a 1200rpm y se hizo un

lavado con PBS. Para el caso de los extractos proteicos totales, las células fueron lisadas con 200 μ L del kit ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas, EU) el cual fue suplementado con una mezcla de 2 μ L de inhibidor de proteasas (Thermo scientific, USA), 2 μ L de inhibidor de fosfatasas (Roche, USA) y 2 μ L del quelante EDTA (Fermentas, USA) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. En el caso del fraccionamiento núcleo-citoplasma, las células se lisaron con el kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE, Meridian Rd) siguiendo el protocolo del fabricante. Los extractos proteicos fueron cuantificados usando el kit DC protein de BioRad (USA) y un espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences). Los extractos proteicos (35 μ g) fueron separados por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 8% durante 2 horas a 100 volts y transferidos a una membrana PVDF (Hybond-P Amersham Biosciences) por 1.5 horas a 100 volts. Las membranas fueron lavadas TBS-Tween (0.1%) y bloqueadas con TBS-Tween (0.1%) con 5% de leche descremada a temperatura ambiente por 1 hora. Después las membranas fueron incubadas con los anticuerpos específicos anti-Nrf2 H-300, anti-caspasa 3 H-277, anti-p53 FL-393 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA), anti-caspasa 9 9502 y anti-PARP 9542 (Cell Signaling, USA en una dilución 1:1000. Cada anticuerpo fue incubado a 4°C toda la noche. Después de la incubación, las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-Tween (0.1%) y posteriormente se añadió un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Invitrogen, USA) en una dilución 1:5000 a temperatura ambiente por 1.5 horas. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, la membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-Tween (0.1%) y dos veces con TBS, luego se determinó la quimioluminiscencia utilizando al sistema ChemiDoc MP Imagen de BioRad. Posteriormente, las membranas fueron desnudadas mediante su exposición a 50°C por 30 minutos en una solución (100mM β -

mercaptoetanol, 2%SDS y 62.5mM Tris-HCl ph 6.7) seguido de 4 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-tween 0.1%, bloqueadas con leche descremadas al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente e incubadas con un anticuerpo monoclonal anti β -actina en una dilución 1:500 como control endógeno de proteína total el cual fue donado por el Dr. JM Hernández (CINVESTAV-IPN). Para los extractos nucleares se utilizó el anticuerpo anti- hnRNP A1 N-15 (SantaCruz Biotechnology, USA) como control de carga.

Ensayos de inmunofluorecencia: Las células NL-45 (1×10^6 por mililitro) fueron cultivadas sobre cubreobjetos recubiertos con polyL-lisina e incubados a $15 \mu\text{M}$ de curcumina por diferentes tiempos y como control negativo se utilizaron células tratadas con DMSO por 24 horas, tiempo máximo de incubación con curcumina; después del periodo de la inducción las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% (SIGMA, USA), lavadas dos veces con PBS 1X, expuestas a PBS/0.01% tritón por 3 minutos y bloqueadas con PBS/BSA 2% (SIGMA,USA) por 15 minutos a temperatura ambiente e incubadas por 90 minutos con los anticuerpos primarios: anti-Nrf2, anti-Keap1 H-190 (Santa Cruz Biotechnology, CA) y anti-p53 cada uno a una dilución de 1:100 en PBS/-BSA 2% a temperatura ambiente, posteriormente la preparación fue lavada en tres ocasiones con PBS 1X y se añadió el anticuerpo secundario Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat anti-rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA) diluido en PBS/BSA 2% (1:500) por una hora a temperatura ambiente. Finalmente la preparación fue expuesta a faloidina (Life Technologies, USA), para la detección del citoesqueleto, por 20 minutos a temperatura ambiente, después de la incubación la preparación fue lavada dos veces y se tiñó el núcleo con DAPI acoplado a resina la cual sirvió para montar el cubreobjetos sobre un portaobjetos. Al menos se analizaron 40 campos

de cada preparación para detectar la localización de las proteínas Nrf2, Keap1 y p53 con la ayuda de un microscopio confocal (Zeiss LSM 510, cámara Axiovert 200M). Las imágenes fueron exportadas a partir del formato Zeiss a un formato JPEG usando el programa Zeiss LSM Image Browser.

RT-PCR tiempo real: Los niveles de expresión de los genes blanco de Nrf2: *HMOX-1*, *NQO-1*, *GCS*, *GCLM*, *GSR*, *TXN*, *SQSTM1*, así como de los genes blanco de p53: *p21*, *PUMA* y *BAX* fueron analizados. Como control endógeno para normalizar los cambios en la expresión se utilizó al gen *RNAr18S*. La expresión de estos genes fue evaluada a través de RT-PCR cuantitativa de dos pasos. La síntesis del cDNA fue hecha con el kit TaqMan (Reverse Transcription Reagents) de applied Biosystems siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una solución con 1mg de RNA, 5pM de dt-oligo y H₂O libre de nucleasas suficiente para llevarla a un volumen de 8.7μL, la reacción fue incubada por 5 minutos a 70°C para después ser colocada en hielo. Subsecuentemente, se añadieron 2μL de buffer 10X, 4.4μL de MgCl₂ a una concentración de 25mM, 4μL de dNTPs 2.5mM y 0.4μL de inhibidor de RNAsa, ésta mezcla fue incubada por 10 minutos a 25°C y puesta en hielo después de la incubación. Finalmente, se añadieron 0.5μL de una enzima MMLV y la reacción fue completada mediante la incubación a 37°C por una hora, posteriormente se guardó el cDNA a -70°C, el volumen final de la reacción fue de 20μL.

Para la reacción de PCR cuantitativa se utilizaron 7.5mL de SYBR green master mix 2X para PCR, 0.6μL del primer río arriba y 0.6μL del primer río abajo, 200ng de cDNA y H₂O suficiente para completar 15mL. Estas reacciones fueron corridas en placas de 96 pozos. El diagrama de termociclado fue: un paso de desnaturalización de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 min a 60°C y 45 segundos a

72°C para el caso de los genes blanco de p53 estos 40 ciclos se realizaron con 1 minuto a 95°C, 1 min a 62°C y 45 segundos a 72°C. Finalmente para todos los genes blancos utilizados se realizó una curva de disociación y un paso de extensión final por 10 minutos a 72°C. La reacción se llevó a cabo con el sistema Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR, usando como detector al intercalador SYBR green (Applied Biosystems, USA) y los siguientes primers específicos:

Gene	Primers
<i>HMOX-1</i>	5'-TCCCGCAGTCAGGCAGAGG-3' 5'-ACGGGGGCAGAATCTTGAC-3'
<i>NQO-1</i>	5'-ATGGTCGGCAGAAGAGCACT-3' 5'-AGTTCGCAGGGTCCTTCAGTTAC-3'
<i>GCLM</i>	5'-TGCCTCCTGCTGCTGTGTGATGCC-3' 5'-CAGTAGCCACAGCGGCACCC-3'
<i>GCS</i>	5'-GGGGCGATGAGGTGGAATACA-3' 5'-ACTCTGGTCTCCAAAGGCTAGGATG-3'
<i>GSR</i>	5'-GGTGGCACTTGCGTGAATGTT-3' 5'-GCATGGCCACGGATGATTTCTAT-3'
<i>TXN</i>	5'-GTGAAGCAGATCGAGAGCAAG-3' 5'-GCAGTGGAGTGGAGTCAGCCATCT-3'
<i>SQSTM1</i>	5'-GCC GGG TGG GAA TGT TGA GGG-3' 5'-CCT GGG AGG GGT CCA GAG AGC-3'
<i>P21</i>	5'-TGTCCGTCAGAACCCATGC-3' 5'-AAAGTCGAAGTTCCATCGCTC-3'
<i>PUMA</i>	5'-GACCTCAACGCACAGTACGAG-3' 5'-AGGAGTCCCATGATGAGATTGT-3'
<i>BAX</i>	5'-CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG-3' 5'-CCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3'
<i>RNAr18S</i>	5'-GTAACCCGTTGAACCCCA-3' 5'-CCATCCAATGGGTAGTAG-3'

Análisis de datos: Los datos presentados son el resultado del promedio de por lo menos tres experimentos independientes. Se utilizó el método de $\Delta\Delta CT$ para calcular la expresión relativa en la inducción de los genes, éste método está basado en las diferencias de los niveles de expresión entre el gen de interés y el gen endógeno, en éste caso RNAr18S. El ciclo CT es el ciclo umbral el cual es definido como el número de ciclos de amplificación requeridos para la señal fluorescente para exceder los niveles basales con el cual se calcula el ΔCT como sigue:

ΔCT del gen de interés = CT (gen de interés en una muestra no tratada) - CT (gen de interés en una muestra tratada)

ΔCT gen control = CT (gen control en una muestra no tratada) - CT (gen control en una muestra tratada)

$\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (gen de interés) - ΔCT (gen control)

Veces de cambio = $2^{\Delta\Delta CT}$

Para determinar las diferencias significativas se realizó una prueba de t y el valor de p menor a 0.05 fue considerado como significativo.

RESULTADOS

1) La curcumina decrece la viabilidad celular de linfocitos B inmortalizados con EBV dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición.

La toxicidad de la curcumina fue evaluada en la línea celular NL-45 con una suspensión de azul tripano en células expuestas a una curva dosis-respuesta por 24 horas. La exposición a curcumina reduce el número de células vivas de manera dosis-dependiente (figura 18a), el número de células vivas decrece a un porcentaje de 60%, 52%, 40% y 10% con 10, 15, 20 y 30 μ M respectivamente. Con la finalidad de evaluar el porcentaje de células muertas se utilizó el método cuantitativo VIVO/MUERTO, con el cual observamos el mismo comportamiento, la disminución de células muertas incrementa de manera dosis-dependiente a partir de 15 μ M de curcumina, como lo muestra la figura 18b el porcentaje de células muertas es de 24%, utilizando 20 y 30 μ M el porcentaje de células muertas incrementa a 69 y 97%. Estos resultados nos permitieron seleccionar la concentración de 15 μ M de curcumina debido a que a 24horas exposición el porcentaje de células muertas no excedía el 20%, lo cual significa que el resto de las células se encuentran al inicio de un proceso apoptótico. Para corroborar los datos anteriores, se analizó el perfil del ciclo celular después tratar las células NL-45 con diferentes concentraciones de curcumina como se muestra en la figura 18 pudimos observar una población de células previa a la fase G1 la cual denominamos subG1, ésta población se debe a células con DNA fragmentado lo cual sugiere el inicio de la apoptosis en estas células, al igual que en los resultados anteriores, la subG1 incrementa de manera dosis dependiente y con 15 μ M es de 17% lo cual corrobora nuestros datos anteriores. Esta concentración fue utilizada para realizar curvas tiempo-respuesta con la finalidad de determinar el momento en el cual el

porcentaje de células muertas se incrementa, para lo que se realizó una curva con 15 μ M de curcumina por diferentes tiempos, encontramos que el porcentaje de células en subG1 incrementa de manera tiempo-dependiente, los resultados muestran que el porcentaje de células muertas a 12 horas es de apenas 3% y a 18 horas de 6%, y de manera concordante con los datos anteriores a 24 horas el porcentaje de muerte es de 16% (figura 22d). Estos resultados demuestran que la curcumina tiene efectos citotóxicos dosis y tiempo dependiente en estos linfocitos inmortalizados con EBV y nos permitieron seleccionar una concentración (15 μ M) y un tiempo de exposición (24 horas) en el cual menos del 20% de las células han muerto y por lo cual el resto probablemente se encuentra en un inicio de muerte celular.

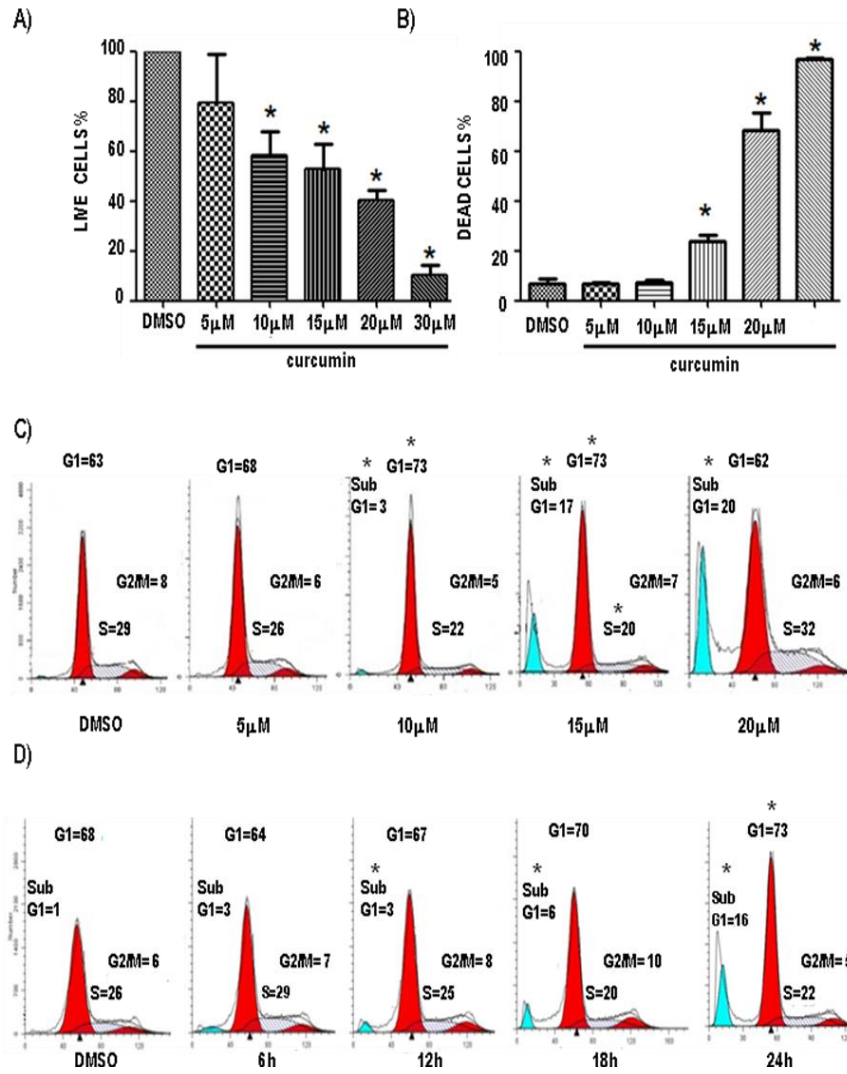


Figura 18. La curcumina reduce la viabilidad celular en linfocitos B inmortalizadas con EBV. Se muestra un ensayo representativo. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. Los datos se presentan como promedio y desviación estándar comparados con el control * $p < 0.05$.

2) Perfil de ciclo celular para el estudio del probable arresto de los linfocitos B inmortalizados con EBV en la fase G1 inducido por la curcumina.

Dos distintos ensayos fueron evaluados para determinar la citotoxicidad de la curcumina en linfocitos B inmortalizados con EBV, aunque en ambos se observó un efecto toxico de las curcumina de manera dosis dependiente, en el ensayo de exclusión de azul tripano

observamos una reducción de células vivas desde la concentración de $10\mu\text{M}$ de Curcumina, sin embargo, utilizando el kit VIVO/MUERTO encontramos un número de células muertas del 10% con la misma concentración de curcumina en el mismo periodo de exposición. Lo que sugiere que la reducción en el número de células vivas no se debe exclusivamente a células muertas, si no, a la combinación de células muertas y células que fueron arrestadas. Adicionalmente, en los perfiles de ciclo celular realizados encontramos un incremento tanto dosis como tiempo dependiente del número de células en fase G1. Para analizar el efecto citostático de la curcumina en esta línea celular, se utilizó nocodazol el cual es utilizado como antineoplásico ya que inhibe la polimerización de microtúbulos induciendo un arresto en la fase G2/M del ciclo celular. Como se muestra en la figura 19, la línea celular NL-45 fue expuesta a 10 y $15\mu\text{M}$ de curcumina por 24 horas, a nocodazol 200nM por 24 horas y a 10 y $15\mu\text{M}$ de curcumina más nocodazol. Las células tratadas solamente con el antineoplásico muestran un aumento de células en fase G2/M de 25% más células arrestadas comparadas con células tratadas con el vehículo DMSO (8%), mientras la adición de curcumina $10\mu\text{M}$ provoca una disminución en el número de células en G2/M al 13.11% y con $15\mu\text{M}$ al 9.5%, es decir, casi el mismo porcentaje de células en G2/M que las células control. Adicionalmente, el porcentaje de células en la fase G1 tratadas con solo nocodazol es de 25.31% con la adición de $10\mu\text{M}$ aumenta a 44% y con $15\mu\text{M}$ a 56.5%. Encontramos un restablecimiento discreto de la fase G2/M por acción de la curcumina, pero el perfil de ciclo celular no regresa a los porcentajes iniciales mostrados con sólo la administración de curcumina 10 y $15\mu\text{M}$ por 24 horas.

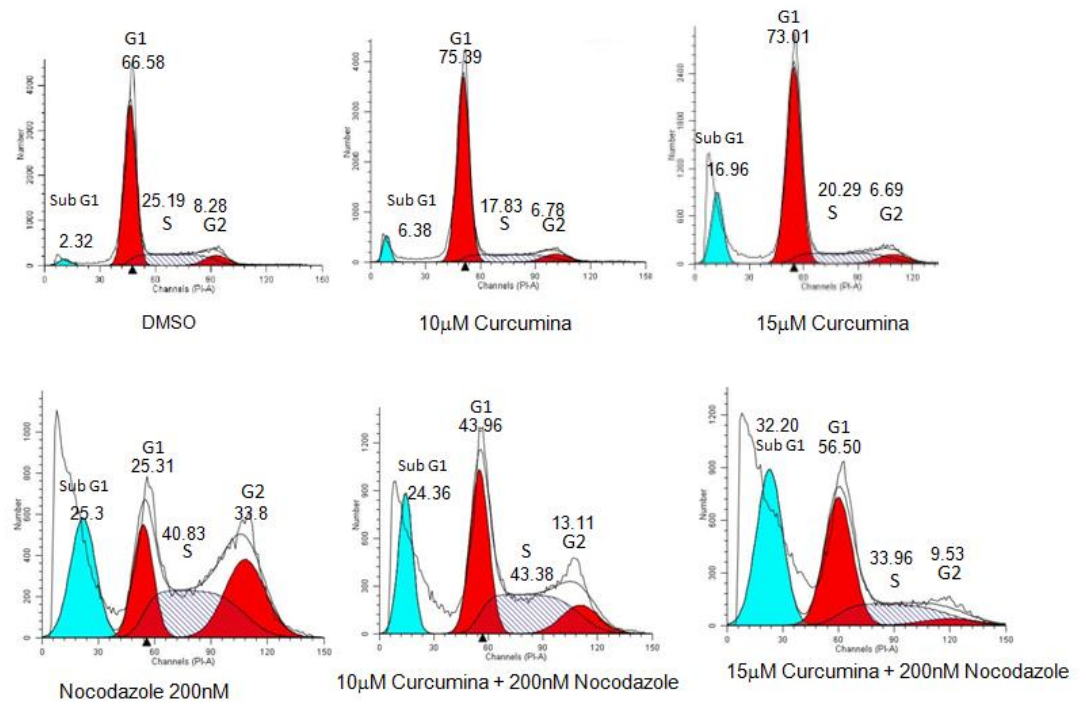


Figura 19. Curcumina provoca un arresto en la fase G1 de células linfoblastoídes inmortalizadas con EBV. Perfil del ciclo celular de células expuestas las concentraciones de curcumina indicados, nocodazol y curcumina + nocodazol. Se muestra un ensayo representativo.

3) La curcumina provoca muerte celular por apoptosis en células inmortalizadas con EBV

Se ha demostrado que la apoptosis inducida por la curcumina puede ser de manera independiente y dependiente de p53. Su capacidad antioxidante radica en su potencial de general especies reactivas, las cuales pueden activar tanto la ruta intrínseca como la extrínseca de la apoptosis dependiendo del modelo celular. Para analizar el mecanismo a través del cual la curcumina afecta en la viabilidad de los linfocitos B inmortalizados con EBV, estos fueron expuestos a 15µM de curcumina por diferentes tiempos y se evaluó un marcador de apoptosis temprana (anexina V) la cual reconoce a la fosfatidilserina (PS) que en células apoptóticas se transloca del interior de la membrana plasmática al exterior de la misma. Como se muestra en la figura 20a después de 12 horas de

tratamiento, el porcentaje de células positivas para anexina V es de 10% porcentaje que aumentó únicamente al 20% a las 24 horas de inducción. Para analizar más a fondo el proceso de inicio de la apoptosis, a través de Western blot se evaluó el procesamiento de las caspasas 9 (caspasa iniciadora) y 3 (caspasa efectora), así como de PARP (Poly ADP ribose polymerase) cuyo procesamiento es mediado por caspasa 3 y se reconoce como un marcador de apoptosis. Las células linfoblastoídes expuestas a 15 μ M de curcumina por diferentes tiempos muestran un procesamiento de la caspasa 3 y la caspasa 9 desde las 18 horas de exposición y el cual se incrementa a las 24 horas sin llegar a ser un procesamiento completo. De acuerdo a lo observado para las caspasas, el procesamiento de PARP se incrementa de manera tiempo dependiente a partir de las 6 horas hasta las 24 (figura 20b). Estos resultados indican que la curcumina podría estar induciendo apoptosis a través de la vía intrínseca de la apoptosis a través del procesamiento de la caspasa 9 y la caspasa 3. Estos ensayos nos permiten corroborar que en nuestro modelo celular, una exposición de 24 horas con 15 μ M curcumina induce el inicio del proceso apoptótico.

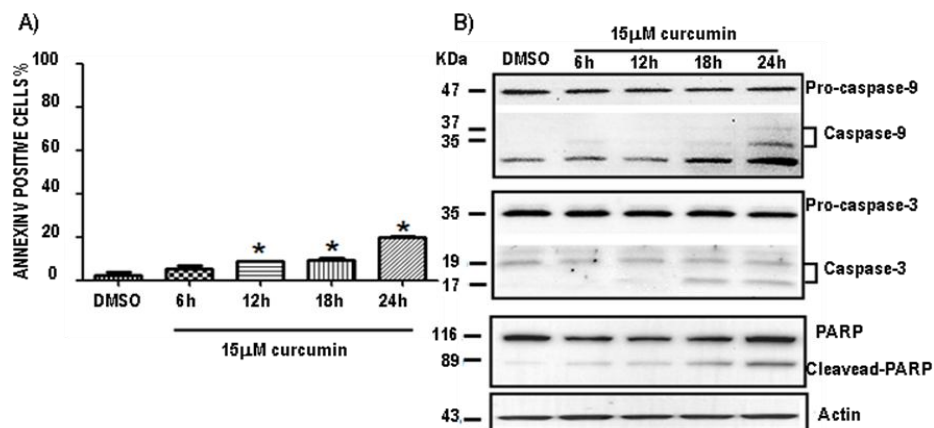


Figura 20. Curcumina induce marcadores pro-apoptóticos en células linfoblastoídes inmortalizadas con EBV. Los datos se presentan como promedios y desviación estándar *p<0.05 comparado con el control. B) El procesamiento de la caspasa 9 y 3 así como de PARP se analizó por medio de western blot. Se muestra un ensayo representativo. Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces.

4) **La actividad de Nrf2 es regulada de manera dependiente de la toxicidad de la curcumina**

Una vez determinados los tiempos de exposición a curcumina y la concentración necesarios para inducir apoptosis en éste modelo celular, evaluamos la cinética de activación de la ruta Nrf2-Keap1 al inicio del proceso apoptótico inducido por este antioxidante. Mediante Western blot evaluamos la proteína total (figura 21a) y nuclear (figura 21b) de Nrf2 en la línea celular NL-45 inducida con 15 μ M en una curva tiempo-respuesta. Observamos un incremento máximo de la proteína total a las 12 horas de inducción, seguida por una marcada reducción en los niveles proteicos de Nrf2 a las 18 horas de tratamiento, tiempo en el cual, con los resultados anteriores observamos que las células comienzan a morir y las caspasas son procesadas. Este comportamiento se pudo observar de igual manera en la proteína nuclear y por inmunofluorescencias (figura 21c) donde Nrf2 comienza a acumularse en el núcleo desde las 6 horas de inducción, con un pico máximo a las 12 horas y un posterior decremento en los niveles proteicos desde las 18 horas de exposición. La actividad de la ruta regulada por Nrf2 fue medida de manera indirecta a través de los niveles de expresión de algunos de sus genes blanco como son *HMOX-1*, *GCLM*, *GCS*, *TXN*, *NQO1* y *SQSTM1* mediante RT-qPCR (figura 21d). Los resultados muestran que *HMOX-1* es el gen que más responde a la inducción por curcumina en este modelo celular (casi 100 veces de cambio) seguido de *GCLM*, *NQO1* y *SQSTM1*. Cuatro de los seis genes analizados presentan un incremento máximo de expresión a las 12 horas y una disminución en los niveles de expresión a las 18 horas (*HMOX-1*, *GCLM*, *GCS* y *TXN*). Por su parte *NQO1* y *SQSTM1* muestran un incremento de manera tiempo dependiente. Estos resultados sugieren que la vía de señalización Nrf2-Keap1 está siendo apagada cuando la célula comienza un proceso apoptótico.

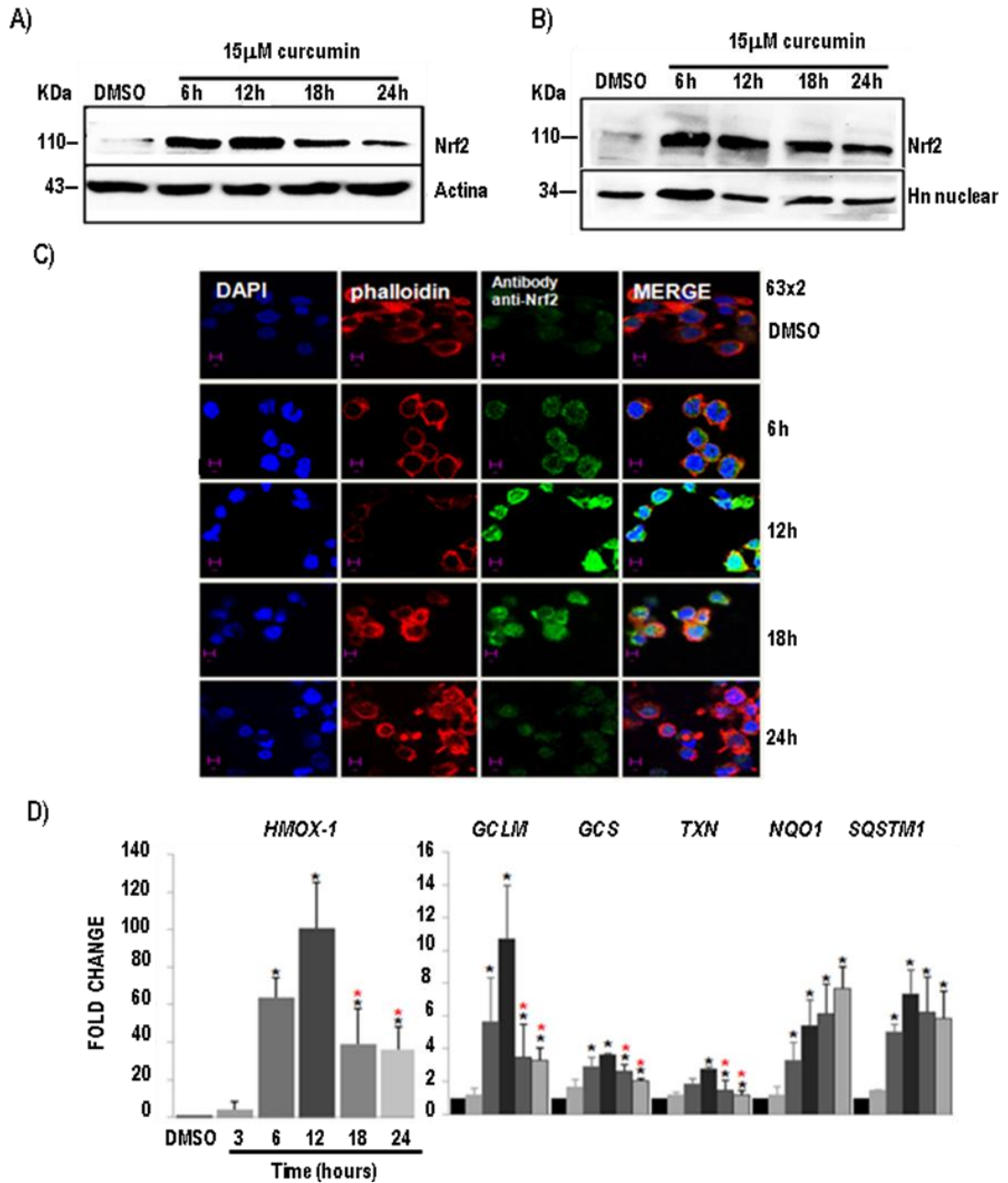


Figura 21. La activación de Nrf2 mediada por curcumina es dependiente de la viabilidad celular. La línea células NL-45 fue expuesta a curcumina 15 μM por los periodos de tiempo indicados. A) Niveles de proteína total y B) nuclear de Nrf2 evaluados mediante western blot. C) Localización celular de Nrf2 determinada mediante microscopia confocal, la barra morada representa la escala (5 micrones). Se muestra un ensayo representativo. D) Los niveles de RNA mensajero de los genes blanco de Nrf2: *HMOX1*, *GCLM*, *GCS*, *TXN*, *NQO1* and *SQSTM1* fueron medidos a través de RT-PCR cuantitativa. Los datos se muestran como veces de cambio respecto al gene RNAr18S y representa el promedio de al menos tres ensayos y la desviación estándar. Asteriscos en negro representan diferencias estadísticamente significativas respecto al control y los asteriscos en rojo representan una disminución en las veces de cambio estadísticamente significativa de los diferentes tiempos de exposición comparados con 12 horas.

5) Participación de p53 en la inducción de apoptosis en linfocitos B inmortalizados con EBV

Ya que tanto los niveles proteicos de Nrf2, así como su actividad parece reducirse cuando la señal apoptótica se ha encendido, hace suponer que la inactivación de la vía de señalización se lleva a cabo bajo un mecanismo regulado. Previamente diferentes estudios han mostrado que la exposición a curcumina en diferentes modelos celulares induce la acumulación de la proteína p53. Por lo tanto, en este trabajo se hizo un primer acercamiento al posible papel de p53 en la activación de la muerte celular programada en este modelo celular. Se analizaron los niveles proteicos de p53 a través de Western blot (figura 22a) y por medio de inmunofluorescencias la localización celular de esta proteína, los resultados señalan que la proteína se localiza en el núcleo de manera basal en las células control y durante la inducción con 15 μ m de curcumina, (figura 22b). Adicionalmente analizamos la actividad de p53 a través de los niveles de expresión de sus genes blanco *p21*, *PUMA* y *BAX*, encontrando que para el caso de los genes *p21* y *BAX* las veces de cambio en los niveles de inducción con respecto al control es aproximadamente 2 veces, mientras que *PUMA* presenta cerca de las 3 veces de cambio, de manera sorprendente la inducción de estos genes se presenta de manera significativa para el caso de *p21* y *PUMA* sólo a las 6 y 12 horas de inducción con 15 μ M de curcumina, y posteriormente la inducción de los niveles de expresión se pierde, adicionalmente los niveles de expresión de *BAX* alcanzan un pico máximo de inducción a las 18 horas el cual se pierde a las 24 horas (Figura 22c). Debido a que los resultados previos muestran que a las 24 horas con 15 μ M de curcumina es cuando se alcanza un mayor porcentaje de muerte celular, la pobre inducción de los genes blanco de p53 en este tiempo de inducción sugieren que en este modelo celular p53 no participa en el desarrollo de

muerte por apoptosis en linfocitos B inmortalizados con EBV, lo que resulta en la posibilidad de un mecanismo alternativo independiente de p53 para la regulación de muerte en este modelo.

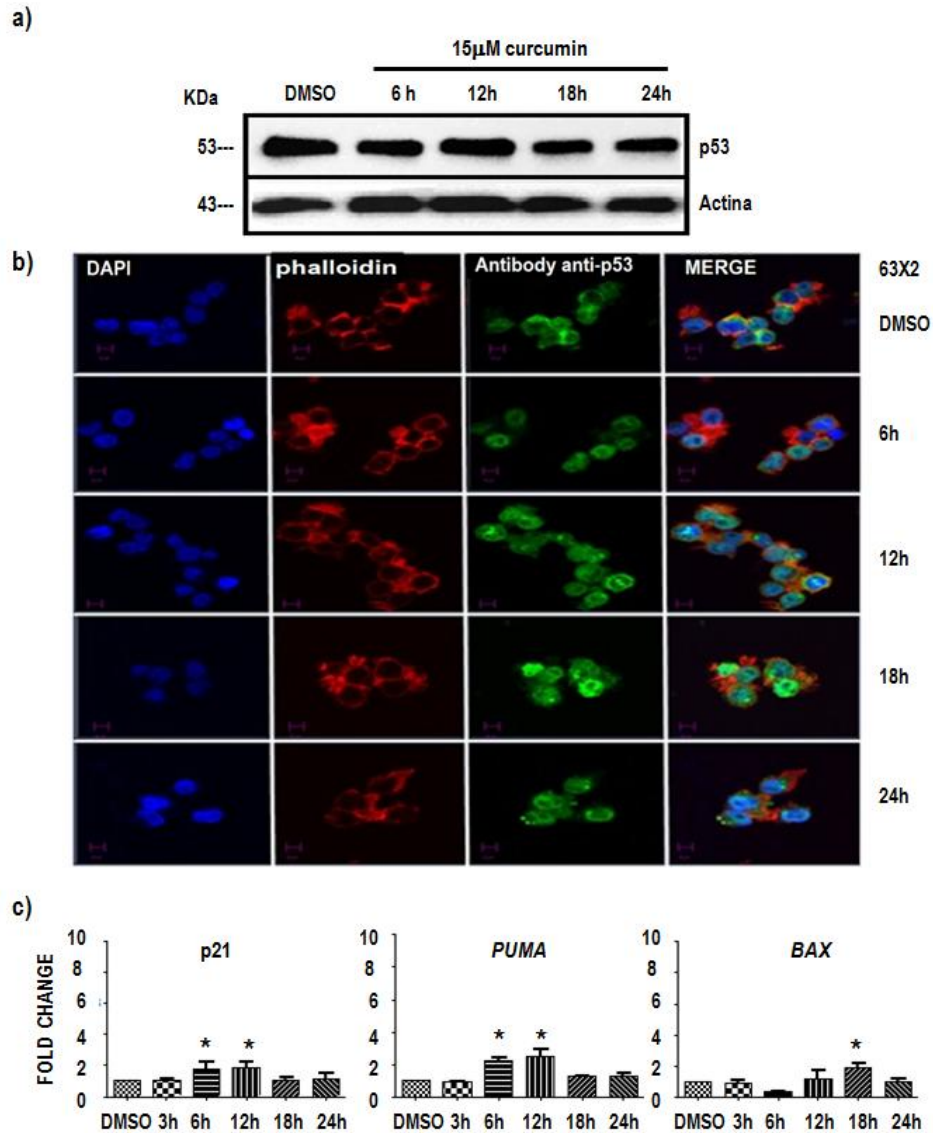


Figura 22. Respuesta de la actividad de p53 mediante la inducción con Curcumina. La línea NL-45 fue tratada con 15 μ M de curcumina por los periodos de tiempo señalados. A) Los niveles de proteína total fueron evaluados mediante western blot. B) La localización celular de la proteína fue evaluada por microscopía confocal, la barra morada representa la escala (5 micrones). C) Los niveles de expresión de los genes blanco de p53: *CDKN1A* (p21^{CIP1/WAF1}), *PUMA* y *BAX* fueron evaluados a través de RT-PCR cuantitativa. Los datos se muestran como el número de veces de cambio respecto al gene 18s y representan el promedio y la desviación estándar de al menos tres replicas

6). La localización celular de Keap1 es citoplasmática durante la inducción con curcumina

Los resultados anteriores sugieren que las células NL-45 no presentan la actividad transcripcional de p53, por lo que el apagado de Nrf2 es independiente de p53. Otro de los mecanismos que producen la inhibición de la ruta está controlado por Keap1. En este trabajo se realizó un primer ensayo de la posible regulación de Keap1 sobre la vía de señalización (figura 23). A través de ensayos de inmunofluorescencia se analizó la localización celular de la proteína Keap1 a distintos tiempos de incubación con 15 μ M de curcumina. Consistente con datos previos en la literatura, la generación de ROS inducida por la curcumina produjo una acumulación de la proteína Keap1 en el citoplasma a partir de las 12 horas de exposición. Sin embargo, no observamos en momento alguno la translocación nuclear de esta proteína. Estos ensayos descartan a Keap1 como el modulador negativo de Nrf2 al inicio del proceso apoptótico.

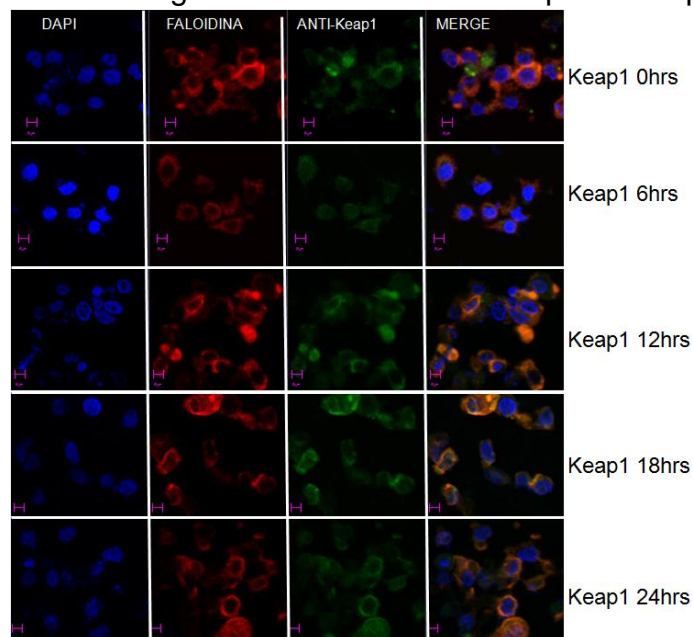


Figura 23. Se evaluó la participación de Keap1 como mecanismo de inactivación de Nrf2. Después del tratamiento con 15 μ M de curcumina por los periodos de tiempo señalados, la localización de Keap1 fue evaluada a través de microscopía confocal. La barra morada representa la escala (5 micrones). Se muestra un ensayo de al menos tres ensayos independientes.

DISCUSIÓN

Nrf2 es el regulador maestro de la respuesta antioxidante al prevenir que las células presenten estrés oxidativo. Recientemente se ha propuesto que una vez que los niveles de ROS exceden la capacidad citoprotectora de Nrf2, la vía debe de apagarse para permitir el desencadenamiento de la apoptosis. Dicha hipótesis, está sustentada fuertemente por diversos trabajos en modelos tumorales, donde se ha mostrado que la activación constitutiva de Nrf2 impide el proceso de muerte, permitiéndole a la célula proliferar y sobrevivir en ambientes altamente oxidantes (Singh *et al*, 2008).

En este trabajo se utilizaron linfocitos inmortalizados con EBV (NL-45) y el fitoquímico curcumina como generador de ROS para estudiar el proceso de inactivación de Nrf2 en la apoptosis inducida por estrés oxidativo. La curcumina presentó un efecto tanto citostático como citotóxico dosis y tiempo dependiente. La incubación con curcumina produjo un incremento en el porcentaje de células en la fase G1 del ciclo celular y una disminución significativa del arresto en G2/M producido por el nocodazol, un potente inhibidor de la síntesis de microtúbulos. Diversos estudios han demostrado la actividad citostática de la curcumina en las diferentes fases del ciclo celular (Goel y Aggarwal, 2010). Se ha propuesto que el arresto en la fase G1 por curcumina es debido a que su metabolismo dentro de la célula genera grandes cantidades de ROS, a través de los cuales daña al DNA. Los efectos citostáticos de la curcumina dependen del modelo celular o animal analizado y se han observado en un rango de 10-100 μ M (Hyung *et al*, 2003).

La evaluación de marcadores de apoptosis temprana, como la translocación de la fosfatidilserina que es reconocida por la anexina V y el procesamiento de las caspasas 9 y 3, así como el procesamiento de PARP, nos permitió detectar un efecto citotóxico de la curcumina posterior a su efecto citostático. De forma similar, algunos estudios han mostrado la presencia de efectos citotóxicos de la curcumina posterior a los efectos citostáticos en la fase

G1/S desde concentraciones de 4 μ M como se demuestra en el estudio hecho en células de osteosarcoma humano (HOS) (Su-Lee, 2009)

Al evaluar la actividad de la vía de señalización Nrf2 durante el inicio de la apoptosis mediada por curcumina, encontramos que ésta proteína presenta un comportamiento bifásico, una acumulación en las primeras 12 horas de exposición a curcumina con un subsecuente decaimiento de sus niveles proteicos nucleares y totales a las 18 horas, momento en el cual la muerte celular comienza e incrementa el procesamiento de las caspasas y de PARP.

Además, *HMOX-1*, *GCLM*, *TXN* y *GCS*, 4 de los 6 genes blancos analizados presentan un comportamiento que correlaciona con respecto a los niveles proteicos de Nrf2, niveles de RNA mensajero máximos a las 12 horas de inducción con curcumina y una disminución posterior a las 18 horas. Lo que sugiere la inactivación de la vía cuando la apoptosis comienza. Adicional al comportamiento bifásico de Nrf2, en este trabajo se muestra que de los 6 genes analizados *HMOX-1* es el gen mas responsivo a la inducción con curcumina la cual incrementa sus niveles de expresión casi 100 veces comparado con el control tratado con DMSO, seguido por *GCLM*, *NQO1*, *SQSTM1* *TXN* y *GCS*. Esto puede deberse a que la curcumina es capaz de inducir un gran número de factores de transcripción como AP-1, STAT 1, 3, 4 y 5, HIF-1, NF- κ B, Egr-1, CBP, etc (Aggarwal, 2007), los cuales pueden ser necesarios para la activación de *HMOX-1* mientras que los factores y coactivadores de genes como *GCS* no responden de manera eficiente a la exposición de curcumina.

Con el uso del pro-oxidante el oridonin, el cual es un potente generador de ROS, se ha mostrado este mismo efecto dual de la acumulación de Nrf2 a dosis pequeñas y una disminución en los niveles proteicos en dosis elevadas de este diterpenoide. Estas observaciones implican que Nrf2 es activado en dosis subtóxicas por ciertos compuestos electrofílicos para mantener la

homeostasis redox de la célula. Sin embargo, cuando las células son expuestas a dosis altamente tóxicas se comprometen a un proceso apoptótico para eliminar las células dañadas, en este punto, se propone que la vía de señalización mediada por Nrf2 debe ser reprimida para permitir la iniciación del proceso de muerte celular. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce el mecanismo encargado de regular esta represión. Faonio y Chen proponen a p53 como la proteína encargada de inactivar la vía, mediante inhibición de las regiones ARE y mediante la unión de p21 a Nrf2, respectivamente. En nuestro modelo celular p53 parece ser inactivado por la presencia del EBV ya que observamos que la proteína se encuentra de manera basal dentro del núcleo, pero parece no presentar actividad transcripcional. Aunque los niveles de expresión de los tres genes blanco de p53 analizados en este estudio presentan un incremento mínimo en el caso de *p21* y *PUMA* a las 6 y 12 horas de inducción y para *BAX* a las 18 horas, los niveles de expresión se pierden al final de la inducción, momento en el cual la muerte celular comienza a incrementarse de manera significativa. Ya que al comparar los niveles de expresión de los genes blanco de p53 analizados en este estudio (2.5 veces de cambio aproximadamente) con los niveles de expresión encontrados en otras líneas celulares expuestas a curcumina y a otros inductores, indican que la inducción de la respuesta de p53 por este fitoquímico en este modelo celular es pobre. En células derivadas de cáncer de mama curcumina induce más de 5 veces la expresión de p21 (Venkiteswaran, 2014), mientras que en células de adenocarcinoma colorrectal DLD-1 tratadas con 20 μ M del pro-apoptótico compuesto 2,3-DCPE (2[[3-(2,3- dichlorophenoxy) propyl]amino]ethanol) los niveles de expresión alcanzados de p21 y PUMA son aproximadamente 50 veces de cambio, comparados con el control (Zhu *et al*, 2004). En células de carcinoma de colon RKO inducidas con el fármaco pro-apoptótico nutlina los niveles de p21 alcanzan las 100 veces de cambio mientras que los niveles de expresión de *PUMA* son de 150 veces de cambio (Vaseva, 2011). Por su parte, la inducción de *BAX* en diferentes estudios no excede las 3 veces de cambio,

niveles similares a los encontrados para el RNA mensajero de este gene en este estudio.

La probable inactivación transcripcional de p53 en nuestro modelo celular puede ser explicada por los mecanismos de inactivación sobre proteína regulados por oncoproteínas del Epstein Barr Virus. Se ha observado que la oncoproteína LMP1 es capaz de mantener los niveles proteicos de p53 e interrumpir la degradación de la proteína por Mdm2 y proteosoma 26S (Li *et al.*, 2012), lo que puede explicar la presencia de la proteína p53 en este modelo celular de manera basal. Adicionalmente, se ha observado que la oncoproteína nuclear EBNA3C puede unirse a p53, interacción que impide a la proteína transactivar la transcripción de sus genes blanco (Fuming *et al.*, 2009), de ésta manera el virus impide que las células que ha infectado presenten un mecanismo apoptótico, promoviendo su immortalización.

Aún cuando la proteína p53 parece estar inhibida por las oncoproteínas del Epstein Barr Virus, observamos muerte celular dosis y tiempo dependiente en este modelo celular. Existen proteínas encargadas de llevar a muerte celular de manera p53 independiente como sus homólogos p63 y p73. Estas proteínas comparten con p53 una homología del 63% en su dominio de unión al DNA y se ha demostrado que pueden tener funciones redundantes en la regulación de la expresión de genes blanco (Levrero *et al.*, 2000). Diversos estudios han demostrado que p73 puede activar genes regulados por p53 e inhibir la progresión en el ciclo celular o inducir apoptosis, ya que ambas proteínas son inducidas en respuesta a daño en el DNA pero por diferentes mecanismos. A diferencia de p53, la proteína mutada de p73 (TAp73) presenta dos isoformas con efectos opuestos: mientras la transactivación de TAp73 presenta efectos pro-apoptóticos, la isoforma amino terminal deletada Δ Np73 tiene funciones anti-apoptóticas (Ramadan, 2005). Los mecanismos por los cuales se ha visto relacionada a la proteína p73 en el proceso apoptótico incluye la regulación transcripcional de genes proapopticos en la vía intrínseca

de la apoptosis en respuesta al daño como *BAX* y *PUMA*, en este estudio demostramos que en este modelo celular estos genes no se inducen de manera significativa, Adicionalmente a la activación de estos genes, se ha observado que p73 regula la vía extrínseca a través de la activación del receptor de superficie celular CD95 (Schilling, 2009) y contrario a la observación de que p73 se localiza y permanece en el núcleo durante la apoptosis, evidencia reciente indica que p73 también se localiza en el citoplasma y en la mitocondria durante el proceso de muerte, sugiriendo un papel exonuclear independiente de su actividad transcripcional. En el citoplasma, p73 puede interaccionar con la proteína Wwox, cuya interacción potencia la actividad pro-apoptotica de esta proteína (Yoon *et al.*, 2015). Otras propuestas de la inducción de la apoptosis independiente de la transcripción regulada por p73, están dadas por su cooperación con la proteína RanBP9, la cual es una proteína de andamiaje que mantiene unidas a la proteína LRP (low density lipoprotein receptor-related protein), a la proteína APP (amyloid precursor protein) y a la enzima BACE1 (site app cleaving enzyme 1) mediante la interacción de sus colas citoplasmáticas. RanBP9 cuenta con actividad apoptótica en respuesta a DNA e interacciona con la región carboxilo terminal de p73, lo que permite la regulación de los niveles de la proteína p73 y la translocación nuclear de RanBP9, así este complejo participa en la inducción de apoptosis (liu *et al.*, 2003). Interesantemente, se ha observado que la curcumina es capaz de inducir la vía de señalización regulada por p73 en líneas celulares tumorales del tracto digestivo (Ruhul, 2015).

La participación de p53 sobre la regulación de la vía de señalización Nrf2-Keap1 durante el inicio de la apoptosis parece improbable tanto por la inhibición del virus de la misma como por el tipo de regulación propuesto de p53 sobre Nrf2, la cual se expone como un impedimento estérico de p53 al unirse a las regiones ARE, lo que no implica degradación de la proteína Nrf2, en este modelo, se observa un decremento en los niveles proteicos totales y

nucleares de Nrf2, sugerentes de degradación de la proteína o de su exportación del núcleo al citoplasma.

Es importante señalar que mientras que los genes blanco de Nrf2, *HMOX-1*, *GCLM*, *TXN* y *GCS*, presentan un comportamiento esperado, *NQO1* y *SQSTM1* presentan una inducción dosis dependiente, de manera interesante ambas proteínas se han relacionado en procesos de muerte celular, *NQO1* mediante la estabilización de las proteínas p53 y p63 (Gong, 2007) y en el caso de *SQSTM1* mediante su participación en la formación de autofagosomas (Komatsu, 2012), son necesarios más ensayos para esclarecer la participación de estas proteínas en el proceso de muerte celular regulado por curcumina en los linfocitos inmortalizados utilizados en este trabajo.

Los resultados encontrados en este trabajo, nos permiten proponer que la regulación de la apoptosis y la inhibición de Nrf2 bajo condiciones de estrés es mediante un mecanismo independiente de p53. Un mecanismo alternativo al del apagado cuando hay daño a nivel DNA es el regulado por Keap1, que aunque en este estudio era poco probable su participación se decidió analizar su localización celular. Encontramos la acumulación de los niveles proteicos de Keap1 la cual se mantiene en el citoplasma durante toda la inducción, sugiriendo que Keap1 no tiene una participación activa dentro de la inhibición de la ruta en este modelo celular, resultado esperado, ya que al estar el antioxidante presente durante todo el proceso, las cisteínas de Keap1 están siendo continuamente oxidadas impidiendo así, la regulación de Keap1 sobre Nrf2.

De forma adicional a la regulación por p53 y por Keap1, la actividad de Nrf2 también puede ser inhibida por la ruta GSK3 β . Aunque la propuesta de la participación de esta proteína se ha visto en condiciones en que el estado redox de la célula se restablece y esta sobrevivirá para posteriormente dividirse. Parece atractiva la idea de que GSK3 β regule a la vía de señalización Nrf2-Keap1 en ambas circunstancias incluyendo cuando la célula ha sido

dañada de manera severa y deba morir. Lo que lo hace atractivo, es la regulación negativa río arriba de GSK3 β por vías de supervivencia celular (PI3K/AKT) e importantemente se ha visto que esta vía regulada por la proteína PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa) puede controlar la expresión de genes citoprotectores, reducir los niveles de ROS y evitar la apoptosis (Martin, 2001). Es posible que río arriba de la señalización de GSK3 β se decida el destino de la célula dependiendo del daño producido en el DNA; si la célula debe de morir, la vía de supervivencia regulada por PI3K/AKT debe de apagarse, entonces, GSK3 β pierde su regulación negativa y Nrf2 es inhibido por la cinasa de manera directa por mediar la fosforilación de los dominios TrCP o indirecta a través de la activación de las proteínas de la familia Src para que el proceso apoptótico se desencadene. De manera adicional, algunos estudios han demostrado que la curcumina induce apoptosis a través de la inhibición del eje PI3K/AKT en leucemias agudas (Hussain, 2006). Para corroborar el posible papel de GSK3 β sobre la inhibición de Nrf2 y la apoptosis, son necesarios más estudios.

RESUMEN DE RESULTADOS

1. En este estudio se observó que la curcumina tiene efectos citotóxicos y probablemente citostáticos en linfocitos B inmortalizados con EBV (NL-45).
2. El mecanismo de muerte celular mediado por curcumina en Linfocitos B inmortalizados con EBV está regulado de manera intrínseca.
3. Aparentemente p53 no está involucrado en mediar la muerte celular programada de linfocitos B inmortalizados con EBV.
4. La vía de señalización Nrf2-Keap1 presenta un efecto bifásico durante la inducción con curcumina.
5. Al final de la inducción, la actividad de Nrf2 parece ser inactivada justo cuando las células se comprometen a morir.
6. La falta de activación de p53 durante la inducción con curcumina y el desencadenamiento de la apoptosis en este modelo celular, sugiere un mecanismo alternativo para el comienzo de la muerte celular y para inhibir a Nrf2 durante procesos de daño al DNA.
7. Se puede descartar a Keap1 como el mecanismo encargado de apagar la vía en este modelo celular.

CONCLUSIÓN

La vía de señalización Nrf2-Keap1 si es inhibida mediante un mecanismo regulado, de manera independiente de p53, para que la muerte celular programada se lleve al cabo.

PERSPECTIVAS

1. Estudiar el efecto citostático de la curcumina en linfocitos B inmortalizados con EBV con técnicas alternas como marcado de nucleótidos o de DNA con (BrdU)
2. Determinar si la proteína p53 está inactivada en este modelo celular, mediante el uso de un inductor conocido de la vía regulada por p53 como la exposición a radiación UV o estaurosporina.
3. Evaluar el probable papel inhibitorio de GSK3 β sobre la vía de regulación Nrf2-Keap1.
4. Realizar un modelo que explique cómo los niveles de ROS pueden regular los mecanismos tanto de activación como de inactivación de la ruta Nrf2-Keap1.

BIBLIOGRAFÍA

Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical weekly*.142:w13659.

Shackelford R, Kaufmann W, Paules R. (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical & Medicine*. 28:1387-1404.

Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signaling*. 24(5):981-90

Jena NR. (2012). DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *Journal of biosciences*. 37(3): 503-517.

Dickinson BC, Chang CJ. (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology*. 7(8):504-511.

Cooper GM. (2000). The Eukaryotic cell cycle. *The Cell: A molecular approach*. 2nd Edition. Sunderland (MA). Sinauer associates.

Lim S, Kaldis P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development (Cambridge, England)*. 140(15):3079-93

Williams GH, Stoeber K. (2012). The cell cycle and cancer. *Journal of Pathology*. 226: 352-364.

Piccolo MT, Crispi S. (2012). The Dual Role Played by p21 May influence the Apoptotic or Anti-apoptotic Fate in Cancer. *Journal of Cancer Research Updates*. 1: 189-202

Fulda S, Debatin KM. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 25:4798-4811.

Kannan K, Sushil J. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7: 153-163.

Shi Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*. 9:459-470.

Kumar S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell death and differentiation*. 14: 32-43.

Hongmei Z. (2012). Extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathway review. Chapter 1. INTECH 2012 Hongmei, licensee InTech.

Daugas E, Susin SA, Zamzami N. (2000). Mitochondria-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J*. 14:729-739.

Denis M, Pengcheng Z, Judy L. (2005). Granzyme A, Induces Caspase-Independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 22(3):355-370.

Kang YH, Yi MJ, Kim MJ.(2004). Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Research*. 64(24):8960-8967.

Ott, M, Gogvadze, V, Orrenius S, Zhivotovsky B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 12: 913-922.

Walczak H, Krammer PH. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Experimental cell research*. 256:58-66.

Wang L, Du F, Wang X. (2008). TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*. 133(4):693-703.

Cory S, Adams JM. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer*. 2(9). 647-656.

Kumar S, Kain V, Sitasawad SL. (2012). High glucose-induced Ca²⁺ overload and oxidative stress contribute to apoptosis of cardiac cells through mitochondrial dependent and independent pathways. *Biochimica et biophysica acta*. 1820(7): 907-920.

Walter P, Ron D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 334(6059):1081-1086.

Yu J, Zhang L. (2004). Apoptosis in human cancer cells. *Current opinion in oncology*. 16(1):19-24.

Yu y Zhang. (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 331: 851-858.

Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, *et al.* 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:432–38

Gyrd-Hansen M, Meier P. (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 10:561-574.

Fridman J, Lowe S. (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22:9030-9040.

Motohashi H, O'Connor T, Kstsuoks F, Engel JD y Yamamoto M. (2002). Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* 294:1-12.

Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A y Kan YW. (1994). 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(21):9926-9930.

Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M y Hayes JD (2003). Identification of a novel Nrf2-regulates antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochemical Journal*. 374:337-348.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD y Yamamoto M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & Development*. 13:76-86.

McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M y Hayes JD. (2006). Dimerization of substrate adaptors can facilitate Cullin mediated ubiquitylation of proteins by a "Tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(34);24756-24768.

Lin W, Shen G, Yuan X, Jain MR, Yu S, Zhang A, Chen JD y Kong AN. (2006). Regulation of Nrf2 transactivation domain activity by p160 RAC3/SRC3 and other nuclear co-regulators. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 39:304-310.

Cuadrado A. (2015). Structural and functional characterization of NRF2 degradation by glycogen synthase kinase 3/β-TrCP. *Free radical biology & medicine*. [Epub ahead of print]

Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ y Hannink M. (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Molecular and Cellular Biology*. 24(24):10941-10953.

Cullinan S, Gordan J, Jin J, Harper J, Diehl J. (2004). The keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative

stress sensing by Cul3-Keap1 ligase. *Molecular and Cellular Biology*. 24 (19): 8477-8486.

Furukawa M, Xiong Y (2005). BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the cullin 3-Roc1 ligase. *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25(1): 162-171

Dinkova-Kostova AT, Hotzclaw WD, Kensler TW. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chemical Research in Toxicology*. 18(12):1779-1791.

Kobayashi M, Itoh K, Suzuki T, Osanal H, Nishikawa K, Katoh Y. (2002). Identification of interactive interface and phylogenic conservation of Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells* 7 (8): 807-820.

Kobayashi A, Kang MI, Okaea H, Ohnsuji M, Zenke Y, Chiba T. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteosomal degradation of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology* 24(16): 7130-9-7139.

Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K. (2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Molecular and Cellular Biology*. 26(1): 221-229.

Zhang DD, Hannink M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Molecular and Cellular Biology*. 23(22):8137-8151.

Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, Shang C, Hirotsu Y, Yokoyama S, Yamamoto M. (2007). Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Molecular and Cellular Biology*. 27:7511-7521.

Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response element. *Biochemical and Biophysical Research Communications-Journal*. 1997;236 (2):313-322.

Zipper LM, Mulcahy RT. (2002). The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(39):36544-36552.

Jain AK, Jaiswal AK. (2006). Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(17):12132-12134.

Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. (2002). Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(45):42769-42774.

Bloom DA, Jaiswal AK. (2003). Phosphorylation of Nrf2 at Ser 40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I κ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization) accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(45):44675-44682.

Kang KW, Cho MK, Lee CH, Kim SG. (2001). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt by tert-butylhydroquinone is responsible for antioxidant response element-mediated rGSTA2 induction in H4IIE cells. *Molecular Pharmacology*. 59(5):1147-1156.

Nakaso K, Yano H, Fukuhara Y, Takeshima T, Wada-Isoe N. (2003). PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FECS Letters*. 546(2-3): 181-184

Misra P, Owuor ED, Li W, Yu S, Qi C, Meyer K. (2002). Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) binding protein (PBP): stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(50): 48745-48754.

Yu R, Mandlekar S, Lei W, Fahl WE, Tan TH, Kong AN. (2000). p38 mitogen-activated protein kinase negatively regulates the induction of phase II drug-metabolizing enzymes that detoxify carcinogens. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(4):2322-2327.

Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green C, Foresti R, Alam J, Motterlini R. (2003). Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and antioxidant-responsive element. *Biochemistry*. 371: 887-895.

Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America*. 98(6):3410-3415.

Enamoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T, Yamamoto M. (2001). High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicological Sciences*. 59:169-177.

Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tuder RM, Biswal S. (2004). Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Journal of clinical investigation*. 114(9): 1248-1259.

Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, Roman J, Singh A, Fryer AD, Fryer AD, Yamamoto M, Kensler TW, Tudor RM, Georas SN, Biswal S. (2005). Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 202(1):47-59.

Cho HY, Reddy SP, Yamamoto M, Kleeberger SR. (2004). The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis. *FASEB J*. 18(11): 1258-1260.

Burton NC, Kensler T W, Guilarte TR. (2006). In vivo modulation of Parkinsonian phenotype by Nrf2. *Neurotoxicology*. 27: 1094-1110.

Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A, Johnson JA. (2008). Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Neuroscience*. 28: 13574-13581.

Young-Joon S, Joydeb KK, Hye-Kung Na. (2008). Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Medica*. 74(13):1526-1539.

Yuesheng Z, Gordon G. (2004). A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*. 3(7):885-893.

Jung KA, Kwak MK. (2010). The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* 15: 7266-7291.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 47:89-116.

Seow A, Yuang JM, Sun CL, Van Den Verg D, Lee HP, Yu Mc. (2002). Sofalcone, an anti-ulcer chalcone derivative, suppresses inflammatory crosstalk between macrophages and adipocytes and adipocyte differentiation: implication of heme-oxygenase-1 induction. *Biochemical and Biophysical and Biophysical Research communications*. 381:566-571.

Hong F, Freeman ML, Liebler DC. (2005). Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chemical Research in Toxicology*. 18: 1917-1926.

Masutani H, Otsuki R, Yamaguchi Y, Takenaka M, Kanoh N, Takatera K, Kunimoto Y, Yodol J. (2009). Fragrant unsaturated aldehydes elicit activation of the Keap1/Nrf2 system leading to the upregulation of thioredoxin expression and protection against oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 1790:1149-1160.

Uchida K, Shibata T. (2008). 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2: an electrophilic trigger of cellular responses. *Chemical Research in Toxicology*. 21:138-144.

Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790:1149-1160.

Ogborne R, Rushworth S, O'Connell M. (2005). α -Lipoic Acid-Induced Heme Oxygenase-1 Expression Is Mediated by Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 and p38 mitogen-Activated Protein Kinase in Human Monocytic Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 25:2100-2105

Zhang Y, Munday R. (2008). Dithiolethiones for cancer chemoprevention: where do we stand). *Molecular Cancer Therapeutics*. 7:3470-3479.

Prince M, Li Y, Childers A, Itoh K, Yamamoto M, Kleiner HE. (2009). Comparison of citrus coumarins on carcinogen-detoxifying enzymes in Nrf2 knockout mice. *Toxicology Letters*. 185:180-186.

Egner PA, Kensler TW, Prestera T, Talalay P, Libby AH, Joyner HH, Curphey TJ. (1994). Regulation of phase 2 enzyme induction by oltipraz and other dithiolethiones. *Carcinogenesis*. 15:177-181.

He X, Ma Q. (2009). NRF2 Cysteine Residues Are Critical for Oxidant/Electrophile-Sensing, Kelch-Like ECH-Associated Protein-1-Dependent Ubiquitination-Proteasomal Degradation, and Transcription Activation. *Molecular pharmacology* 76(6):1265-1278.

Platanias LC. (2009). Biological responses to arsenic compounds. *The Journal of Biological Chemistry*. 284:18583-18587.

Morales AA, Gutman D, Cejas PJ, Lee KP, Boise LH. (2009). Reactive oxygen species are not required for an arsenic trioxide-induced antioxidant response or apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 284:12886-12895.

Wang XJ, Hayes JD, Higgins LG, Wolf CR, Dinkova-Kostova AT. (2010). Activation of the NRF2-signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones. *Chemistry & Biology*. 17:75-85.

Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM, Cuadrado A. (2004). Regulation of heme-oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:8919-8929.

Chow JM, Shen SC, Huan SK, Lin HY, Chen YC. Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 69:1839-1851.

Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. (2008). Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *European Journal of Pharmacology*. 591: 66-72.

Aggarwal B, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. (2007). Curcumin: the Indian solid gold. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 595:1-75.

MacNelly SJ, Harrison EM, Ross JA, Garden OJ, Wigmore SJ. (2007). Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *International Journal of Molecular Medicine*. 19: 165-172.

Farombi EO, Shrotriya S, Na HK, Kim SH, Surh YJ. (2008). Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1. *Food and Chemical Toxicology*. 46:1279-1287.

Garg R, Gupta S, Maru GB. (2008). Dietary curcumin modulates transcriptional regulators of phase I and phase II enzymes in benzo(a)pyrene-treated mice: mechanism of its anti-initiating action. *Carcinogenesis*. 29: 1022-1032.

Qin XY, Cheng Y, Cui J, Zhang Y, Yu LC. (2009). Potential protection of curcumin against amyloid beta-induced toxicity on cultured rat prefrontal cortical neurons. *Neuroscience Letters*. 463: 158-161.

Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV. (2008). Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65:1631-1652.

Ju-Hyung W, Young-Ho K, Yun-Jung C, Dae-Gon K, Kyung-Seop L, Jae Hoon B, Do Sik M, Jong-Soo C, Yong-Jin J, Young Han L, Jong-Wook P, Taeg Kyu K. (2003). Molecular mechanism of curcumin-induced cytotoxicity: induction

of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of BclXL and IAp, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis*. 24:1199-1208.

Cao AL, Qing-Feng T, Wen-Chao Z, Yan-Yan Q, Song-Jiao H, Pei-Hao Y. (2014). Ras/ERK signaling pathway is involved in curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma AGS cells. *Journal of Asian Natural Products Research*. 17:56-63.7

Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. (2008). Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacological Research* 58(5–6):262–270.

Sporn MB, Liby KT. (2012). NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nature reviews. Cancer* 12(8):564–571.

Shelton P, Jaiswal AK.(2013). *The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? FASEB J*. 27(2):414–423.

Gañán-Gómez I, Wei Y, Yang H, Boyano-Adánez MC, García-Manero G. (2013). Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2. *Free Radical Biology & Medicine-Journal* 65:750–764.

Kansanen E, Kuosmanen S, Leinonen H, Levonen AL. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*. 1:45-49.

Nioi P, Nguyen T. (2007). A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 362: 816-821.

Jaramillo M, Zhang D. (2013). The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes & Development*. 27:2179-2191.

Geismann C, Arlt A, Sebens S, Schafer H. (2014). Cytoprotection “gone astray”: nrf2 and its role in cancer. *OncoTargets and therapy*. 7:1497:1518.

Hye-Kyung N, Young-Joon S. (2014). Oncogenic potencial of Nrf2 and its principal target protein heme oxygenase-1. *Free Radical Biology and Medicine*. 67:353-365.

Niture K, Jaiswal A. (2012). Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *The journal of biological chemistry*. 287:9873-9886.

You A, Chang-Won N, Nobunao W, Masayuki Y, Thomas W, Mi-Kyoung K. (2011). Transcription factor Nrf2 maintains the basal expression of Mdm2: An implication of the regulation of p53 signaling by Nrf2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 507:356-364.

Singh A, Boldin-Adamsky S, Thimmulappa R. (2008). RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2 related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer research*. 68:7975-7984.

Chung S, Yu T, Ting C, Jen H. (2012). Activating Nrf-2 Signaling Depresses Unilateral Uretal Obstruction-Evoked Mitochondrial Stress-Related Autophagy, Apoptosis and Pyroptosis in kidney. *PLOS ONE*: 7 e 47299.

Sun Z, Zhang S, Jefferson Y, Zhang D. (2007) Keap1 controls postinduction repression of the nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Molecular and cellular biology*. 27:6334-6349.

Sun Z, Wu T, Zhao F, Lau A, Birch C, Zhang D. (2011). KPNA6 (importin α 7)-Mediated Nuclear Import of Keap1 Represses the Nrf2-dependent antioxidant response. *Molecular and Cellular Biology*. 31:1800-1811.

Kaspar JW, Jaiswal AK. (2011). Tyrosine phosphorylation controls nuclear export of Fyn, allowing Nrf2 activation of cytoprotective gene expression. *FASEB*. 25:1076-1087.

Niture SK, Jain AK, Shelton PM, Jaiswal AK. (2011). Src subfamily kinases regulate nuclear export and degradation of transcription factor Nrf2 to switch off Nrf2-mediated antioxidant activation of cytoprotective gene expression. *The journal of biological chemistry*. 286:28821-28832.

Chowdhry S, Zhang Y, McMahon M, Sutherland C, Cuadrado A, Hayes JD. (2013). Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene*. 32(32): 3765-3781.

Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D, Pierantoni MG, Napolitano M, Russo T, Cimino F. (2006). p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *The journal of biological chemistry*. 281: 39776-39784.

Chen W, Jiang T, Wang H, Tao S, Lau A, Fang D, Zhang D. (2012). Does Nrf2 contribute to p53-mediated control of cell survival and death?. *Antioxidants & Redox Signaling*. 17:1670-1675.

Córdova E, Martínez-Hernández A, Uribe-Figueroa L, Centeno F, Morales-Marin M, Koneru H, Coleman M, Orozco L. (2014). The NRF2-KEAP1 pathway is an early responsive gene network in arsenic exposed lymphoblastoid cells. *PLOS ONE*. 9: e88069.

Goel A, Aggarwal B. (2010). Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotectors and radioprotector for normal organs. *Nutrition and Cancer*. 62(7): 919-930.

Su-Lee D, Kyoung-Lee M, Hee-Kim J. (2009). Curcumin Induces Cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells. *Anticancer research*. 29: 5039-5044.

Venkiteswaran S, Hsu HC, Yang P, Thomas T, Thomas TJ. (2014). Curcumin interderes with ER-2 signaling in a redox-dependent manner in sk-br-3 human creast cancer cells. *Journal of human nutrition & food science*.2(2): 1030.

Zhu H, Zhang L, Wu S, Teraishi F, Davis JJ, Jacob D, Fang B. (2004). Induction of S-phase arrest and p21 overexpression by a small molecule 2[[3-(2,3-dichlorophenoxy)propyl] amino]ethanol in correlation with activation of ERK. *Oncogene*. 23(29): 4984-4992.

Vaseva AV, Yallowitz, Marchenko ND, XU S, Moll UM. (2011). Blockade of Hsp90 by 17AAG antagonizes MDMX and synergizes with Nutlin to induce p53-mediated apoptosis in solid tumors. *Cell Death and Disease*. 2: e156.

Fuming Y, Abhik S, Masanao M, Pankaj K, Jason K, Qiliang C, Choudhuri T, Robertson E. (2009). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C targets p53 and modulates its transcriptiona and apoptotic activities. *Virology*. 388: 236-247.

Li L, Li W, Xiao L, Xu J, Chen X, Tang M, Dong Z, Tao Q, Cao Y. (2012). Viral oncoprotein LMP1 disrupts p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through modulationg K63-linked ubiquitination of p53. *Cell cycle* 11(12): 2327-2336.

Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Sabatini S, Gong J, Wang JYJ, Melino G. (2000). The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *Journal of cell science*. 113:1661-1670.

Ramadam S, Terrinoni A, Catani MV, Sayan AE, Knight RA, Mueller M, Krammer P, Melino G, Candi E. (2005). p73 induces apoptosis by different

mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 331:713-717.

Schilling T, Schleithoff ES, Kairat A. (2009). Active transcription of the human FAS/CD95/TNFRSF6 gene involves the p53 family. *Biochemical and Biophysical Research communications*. 387, 399-404.

Yoon MK, Ha JH, Lee MS, Chi SW. (2015). Structure and apoptotic function of p73. *BMB reports*. 48:81-90.

Liu G, Xia T, Chen X. (2003). The activation domains, the proline-rich domain, and the C-terminal basic domain in p53 are necessary for acetylation of histones on the proximal p21 promoter and interaction with p300/CREB binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 278, 17557-17565

Ruhul A, Abedul H, Aminur M, Chen ZG, Khuri F, Shin D. (2015). Curcumin induces apoptosis of upper aerodigestive tract cancer cells by targeting multiple pathways. *PLOS ONE* 10(4): e0124218

Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y. (2012). P62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. *Pharmacological research*. 66:457-462.

Martin D, Salinas M, López-Valdaliso R, Serrano E, Recuero M, Cuadrado A. (2001). Effect of the Alzheimer amyloid fragment Aβ(25-35) on Akt/PKB kinase and survival of PC12 cells. *Journal of neurochemistry*. 78:1000-1008.

Hussain AR, Al-Rasheed M, Manogaran PS, Al-Hussein KA, Plataniias LC, Kuraya K, Uddin S. (2006). Curcumin induces apoptosis via inhibition of PI3'-kinase/AKT pathway in acute T cell leukemias. *Apoptosis*. 11:245-254.