



*Universidad de Chile
Facultad de Medicina
Escuela de Postgrado*

**“INFLUENCIA DE LAS CÉLULAS DE KÜPFER
SOBRE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR Nrf2”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en
Ciencias Médicas mención farmacología**

Autor: Bárbara Leticia Núñez Valdovinos

**Director de Tesis
Prof. Dr. Luis A. Videla**

**Director de Tesis
Dra. Pamela Romanque U.**

2012

“ ...De los miedos nacen los corajes; y de las dudas las certezas.

Los sueños anuncian otra realidad posible y los delirios, otra razón”

Eduardo Galeano

Dedicado a;

Ana María Valdovinos, mi madre, quien siempre me ha regalado alegría y palabras de aliento, quien pasa por un difícil momento.

A mi tío Víctor por su motivación constante y a mi hermana Priscila por su cariño.

A ellos, por su apoyo incondicional en cada uno de mis proyectos.

Agradecimientos

A mi tutor de tesis Dr. Luis Videla por su paciencia,

Dra. Pamela Romanque por sus consejos.

A los docentes del laboratorio y a todos aquellos que contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

Tesis financiada por los proyectos FONDECYT 1090010 y 1120034.

INDICE GENERAL

PORTADA

Páginas

1

DEDICATORIA Y

2-3

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

- Índice general 4-5
- Índice de figuras y tablas 6-7
- Abreviaturas 8

RESUMEN/ ABSTRACT

9-10

INTRODUCCIÓN

- Consideraciones generales de las células de Küpffer 11
- Subpoblaciones de las Células de Küpffer 12
- Activación de las Células de Küpffer 12-13
- Complejo NADPH oxidasa 13-14
- Células de Küpffer y Estrés Oxidativo 15-16
- Factores de transcripción nuclear sensibles a óxido reducción 16-17
- Complejo Nrf2-Keap1-ARE 18
- Regulación de la actividad de Nrf2 19
- Elemento de Respuesta Antioxidante 20-21

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- Hipótesis, Objetivo general y Objetivos específicos 23

METODOLOGÍA

- Animales de experimentación 24
- Determinación de la función fagocítica y la actividad respiratoria de las células de Küpffer en el hígado perfundido de rata 24
 - a) Protocolo quirúrgico 25
 - b) Protocolo de perfusión hepática *in vitro* 25-26
- Técnicas 26-27
 - a) Técnica de Western Blot 26-27
 - b) Método de Bradford para cuantificación de proteínas 28
 - c) Determinación de la actividad de la LDH en perfusado hepático 28-29

	d) Histología hepática	29
	• Expresión de Resultados y Análisis estadístico	29
RESULTADOS		30
	• Validación de las condiciones óptimas de perfusión hepática	
	a) Respuesta Respiratoria de las CK inducida por la infusión de CC	31
	b) Evaluación histológica de las células de Küpffer	32-34
	c) Determinación de la viabilidad del hígado perfundido: actividad de LDH sinusoidal en el perfusado hepático	34-35
	• Contenido proteico del complejo Nrf2 y Keap1 en los compartimentos citosólico y nuclear	35-38
	• Cuantificación de Nrf2, en el período de activación máxima de Nrf2, bajo efecto de GdCl ₃	39
DISCUSIÓN		40-46
CONCLUSIONES		47
BIBLIOGRAFÍA		48-53

ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS

Figura 1.	Activación y ensamblaje de NADPH oxidasa	15
Figura 2.	Regulación de la vía Keap1-Nrf2-ARE	17
Figura 3.	Estructura, interacción y activación de Nrf2: papel de Keap1	20
Figura 4.	Protocolo de perfusión hepática	26
Figura 5.	Estudio representativo de la RR inducida por 10 minutos de CC en el hígado perfundido de rata	30
Figura 6.	A. Respuesta respiratoria, inducida por CC durante 5 minutos. B. Respuesta respiratoria inducida por CC durante 10 minutos. C. Respuesta Respiratoria inducida por CC durante 15 minutos	31
Figura 7.	A. Correlación entre la respuesta respiratoria inducida y el tiempo de infusión de CC. B. Correlación entre la velocidad de captación de CC y el tiempo de infusión de CC.	32
Figura 8.	Histología de una preparación de hígado perfundido de rata durante de 15 min de infusión de CC	33
Figura 9.	Histología de cortes de hígado sometidos a perfusión. Tinción Hematoxilina-eosina A. Tiempo 0 B. Infusión de CC durante 5 minutos C. Infusión de CC durante 10 minutos D. Infusión de CC durante 15 minutos	33
Figura 10.	Liberación sinusoidal de deshidrogenasa láctica en función del tiempo de infusión con CC, en hígado de rata aislado y perfundido.	35

Figura 11.	A. Contenido de Nrf2 citosólico. B. Contenido de Nrf2 nuclear. C. Relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico.	37
Figura 12.	Correlación entre ΔQO_2 inducido por CC y la relación entre contenido Nrf2 nuclear / Nrf2 citosólico	38
Figura 13.	Contenido de Keap-1 citosólico	38
Figura 14.	Muestras representativas aisladas de Nrf2 asociado con ΔQO_2 a tiempo 0 y 10 minutos de infusión con CC y bajo efecto de GdCl_3 A. Citosólico B. Nuclear	39
Tabla 1.	Genes mediados por Nrf2-ARE	22
Tabla 2.	Arquitectura hepática y acumulación de CC en hígado de ratas analizadas por microscopía óptica en distintos períodos de perfusión con CC.	34

ABREVIATURAS

ARE	: Elemento de Respuesta Antioxidante
BSA	: Suero de albúmina bovino
CC	: Carbono coloidal
CK	: Células de Küpffer
ΔQO_2	: Delta o diferencia del consumo de oxígeno
EOX	: Estrés Oxidativo
EROS	: Especies reactivas de oxígeno
ERNs	: Especies reactivas del nitrógeno
<i>i.p</i>	: intraperitoneal
Keap1	: Kelch-like ECH-associated protein 1.
Mrps	: proteínas asociadas a resistencia a multidroga
Nrf2	: factor-2 relacionado al factor nuclear eritroide-2
PG	: prostaglandina
QO_2	: Consumo de Oxígeno
RR	: Respuesta Respiratoria

RESUMEN

La Respuesta Respiratoria (RR) de las células de Küpffer (CK) produce un aumento del consumo de oxígeno hepático y la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS), las cuales aumentan el estado de estrés oxidativo tisular, que en caso de ser prolongado, puede ocasionar daño en el tejido. El estrés oxidativo transitorio, sin embargo, es capaz de activar respuestas hepatoprotectoras que involucran la activación de distintos factores de transcripción redox-sensibles. Nrf2 es un factor de transcripción nuclear redox sensible, que se caracteriza por responder a bajos niveles de EOX, regulando la expresión de enzimas antioxidantes, transportadores de membrana, enzimas de biotransformación de xenobióticos y compuestos endógenos de desecho. En este estudio se evaluó la participación de las CK sobre la activación de Nrf2 y su inhibidor la proteína Keap1, mediante la inducción de la RR de las CK a través de la fagocitosis de carbono coloidal (CC) durante 5 a 15 minutos, en un modelo de hígado perfundido aislado de rata. Cuando las condiciones de viabilidad hepática son óptimas, se observa dependencia entre la activación de las CK, la inducción de su RR y la activación de Nrf2 (Western blot), lo que queda establecido por: (i) la disminución progresiva del contenido de Nrf2 citosólico y el aumento del Nrf2 nuclear en el lapso de 10 minutos de estimulación, con el consecuente incremento significativo de la relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico e (ii) la correlación significativa establecida entre la RR y la activación de Nrf2. A los 15 minutos de estimulación con CC se observa una RR máxima con disminución significativa de los niveles de Nrf2 total y de su inhibidor Keap1 que podría indicar su degradación oxidativa. La inactivación de las CK por cloruro de gadolinio ($GdCl_3$; administrado 72 h previas) no produjo resultados concluyentes al no detectarse Nrf2 en el hígado, lo que podría deberse a una interacción inespecífica entre $GdCl_3$ y Nrf2 conducente a su agregación y eliminación.

Se concluye que la RR de las CK inducida por la fagocitosis de CC activa a Nrf2 precozmente. Nrf2 es translocado desde el citosol al núcleo para ejercer su acción transcripcional por un mecanismo dependiente de EROS. Esto se traduciría en la inducción de sistemas de defensa celular, una respuesta que puede permitir el adecuado funcionamiento de las CK bajo condiciones pro-oxidantes sostenidas.

ABSTRACT

The respiratory burst (RB) of Kupffer cells (KC) is related to an increase in liver oxygen consumption and reactive oxygen species (ROS) production, which may induce oxidative stress and injury if it is prolonged in time. Transient oxidative stress, on the other hand, is capable of inducing hepatoprotective responses related to the activation of redox-sensitive transcription factors. The nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) is characterized by its sensitivity to low levels of ROS, controlling the expressions of antioxidant proteins, membrane transporters, and detoxification enzymes among others. The aim of this study was to evaluate the activation of the redox sensitive factor Nrf2 in relation to the Nrf2 inhibitor, protein Keap1, in the isolated perfused rat liver infused with colloidal carbon (CC) for 5 to 15 minutes to stimulate the RB of Kupffer cells. In conditions of optimal liver cell viability, stimulation of KC leading to RB activity is associated with liver Nrf2 activation (Western blot), as evidenced by (i) the progressive diminution in the cytosolic content of Nrf2 and increase in that of nuclear Nrf2 in the time interval of 10 min stimulation, with the consequent significant increase in the respective nuclear Nrf2/cytosolic Nrf2 ratios, and (ii) the significant direct correlation established between the RB and Nrf2 activation. KC CC-stimulation for 15 minutes inducing maximal RB activity is associated with loss of total Nrf2 and of the Nrf2 inhibitor Keap1, which could indicate enhanced oxidative degradation. Inactivation of KC by gadolinium chloride (GdCl₃) pretreatment (72 h) provided non conclusive results since liver Nrf2 was not detected, which could be due to an unspecific interaction between GdCl₃ with Nrf2 leading to Nrf2 aggregation and elimination. It is concluded that the RB activity of CC-stimulated Kupffer cells triggers Nrf2 activation. Nrf2 undergoes cytosol-to-nuclear translocation in association with ROS generation in order to trigger gene transcription, which may lead to the induction of mechanisms affording cellular protection under pro-oxidant conditions underlying prolonged Kupffer cell stimulation.

INTRODUCCIÓN

Consideraciones generales sobre las células de Küpffer

Las células de Küpffer (CK) son macrófagos hepáticos, las cuales están localizadas en el lumen sinusoidal, representando la primera línea de defensa de este órgano. Su ubicación es estratégica y favorece su contacto con el material particulado e inmunorreactivo del tracto gastrointestinal (Claria y Titos, 2004). Estas células constituyen el mayor componente del sistema retículo endotelial representando el 80%–90% de los macrófagos orgánicos y el 10% a 15% de las células no parenquimales hepáticas. (György, 2009; Kolios y cols, 2006).

Las CK pueden ser activadas por distintos estímulos, gatillando la liberación de una amplia gama de mediadores biológicos. Entre ellos podemos mencionar: i) especies reactivas del oxígeno (EROS) tales como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ii) especies reactivas del nitrógeno (ERNs), tales como el óxido nítrico ($\bullet NO$) y el peroxinitrito ($ONOO^-$), iii) numerosas citoquinas, eicosanoides, quimioquinas y factores de crecimiento (Urtasun y Nieto, 2007), los cuales ejercen efectos fisiológicamente diversos. Los principales aspectos funcionales de las CK son (i) fagocitosis, fenómeno que genera una respuesta bioquímica que provoca la interacción entre los hepatocitos y otras células hepáticas, a través de mediadores, (ii) atracción de células no residentes en el hígado por medio de la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas, (iii) eliminación de detritus celulares, microorganismos y células apoptóticas, y (iv) procesamiento, presentación de antígenos y regulación de linfocitos T citotóxicos contribuyendo a la respuesta inmune innata (György, 2009).

Subpoblaciones de las células de Küpffer

Existen subpoblaciones de las CK cuya morfología y funcionalidad depende de su distribución dentro del acino hepático. Las CK grandes o maduras se caracterizan por poseer el receptor de superficie CD163 o antígeno ED2. Ellas están localizadas en la zona periportal, presentan gran actividad fagocítica y lisosomal, y son activas generadoras de mediadores biológicos como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , prostaglandina (PG) E2 e interleuquina (IL)-1 (György, 2009; Bilzer y cols. 2006). Las CK pequeñas están ubicadas en áreas perivenosas y mediozonales, poseen un receptor transmembrana glicosilado CD68 o ED1 y en contraste con las CK ED2 liberan altas concentraciones de NO.

Las CK ED2 (+) pueden ser inactivadas selectivamente en modelos experimentales con el uso de cloruro de gadolinio (GdCl₃) (Hardonk y cols, 1992). Existe evidencia que a las 72 h de la administración de GdCl₃, no se afectan significativamente las células ED1 (+); sin embargo, hay una eliminación completa de las células ED2 (+) (Tapia y cols; 2010, Santibañez, 2010).

Activación de las células de Küpffer

Las CK pueden ser activadas por distintos estímulos, entre los cuales se pueden mencionar hormonas, xenobióticos, fármacos, PGs, endotoxinas, lipopolisacárido (LPS) y daño por isquemia reperusión. Ello provoca la liberación de mediadores de respuesta inflamatoria y reparadora (Urtasun y Nieto, 2007) tales como O₂^{•-}, •NO, enzimas proteolíticas,

factor activador de plaquetas, TNF- α , IL-1, IL-6 y productos tóxicos contra células tumorales involucradas en la patogénesis de la injuria y necrosis hepatocelular (Kolios y cols, 2006; Tapia y cols, 2010). Se ha observado en modelos experimentales, que existe una correlación entre el grado de activación de las CK y el grado de destrucción hepatocelular. Al mismo tiempo, las CK cumplen un rol fundamental en la respuesta homeostática hepática frente a las lesiones, participando en la síntesis de antioxidantes y otras sustancias con funciones hepatoprotectoras como el \bullet NO, IL-10 e IL-18 (Santibañez, 2010; Tapia y cols, 2010).

En condiciones basales, las CK tienen una capacidad limitada de producir EROS, sin embargo, después de su estimulación y activación, generan y liberan EROS cuya producción máxima ocurre durante la actividad fagocítica (Urtasun y Nieto, 2007). La fagocitosis gatilla el *estallido o respuesta respiratoria* (RR) de las CK, aumentando el consumo de oxígeno hepático (QO_2) (Decker 1990; Wang y cols, 1993; Qu y cols, 1996). Esta RR es generada por el complejo enzimático nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, el cual cataliza la formación de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 a expensas de O_2 y NADPH, constituyendo una de las fuentes endógenas más importantes de EROS en el organismo. La actividad de las CK puede ser monitorizada en modelos experimentales de perfusión hepática con carbón coloidal (CC), el cual es captado y fagocitado por las CK, (Cowper y cols, 1990; Tapia y cols, 1997) gatillando la RR, la producción de EROS y en menor medida ERNS.

Complejo NADPH oxidasa

Las CK expresan un complejo enzimático NADPH oxidasa fagocítica, el cual está constituido por un hétero dímero flavocitocromo b558 unido a la membrana, que se compone de una subunidad catalítica gp91^{phox}/NOX2 y una subunidad regulatoria p22^{phox}, además de factores citosólicos como p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y una pequeña GTPasa Rac2. En reposo los componentes proteicos del complejo se encuentran en distintos compartimentos: el heterodímero NOX2/ gp91^{phox}-p22^{phox} se encuentra en la membrana, mientras que p47^{phox}-p67^{phox}-p40^{phox} se encuentran en el citosol. Una vez activado los componentes citosólicos son fosforilados y se translocan a la membrana plasmática donde son ensamblados. Los ligandos gatillan la fosforilación de un dominio autoinhibitorio de p47^{phox}, generando un cambio conformacional que permite la interacción con otros componentes citosólicos y favorece su ensamblaje. Posteriormente el complejo es translocado a la membrana y alineado a través de la interacción de p22^{phox} (Figura 1), conformando un sistema enzimático activo que interactúa con el flavocitocromo b. La subunidad gp91^{phox} funciona transfiriendo electrones desde el NADPH citosólico asociado a FAD hacia los grupos hemo del flavocitocromo. El complejo NADPH oxidasa no presenta actividad constitutiva, la activación es dependiente de ligando, su ensamblaje requiere de la organización, activación y estabilización de sus componentes, y es un proceso que una vez iniciado consume O₂ de manera casi instantánea. La naturaleza univalente de la reducción del O₂ produce O₂^{•-} como producto inmediato y H₂O₂ como consecuencia de la dismutación del O₂^{•-} (Nauseef W M, 2008), proceso clave en la respuesta a LPS en infecciones bacterianas (De Minicis y Brenner, 2008) y en la presentación de antígenos (Maemura K y cols, 2005).

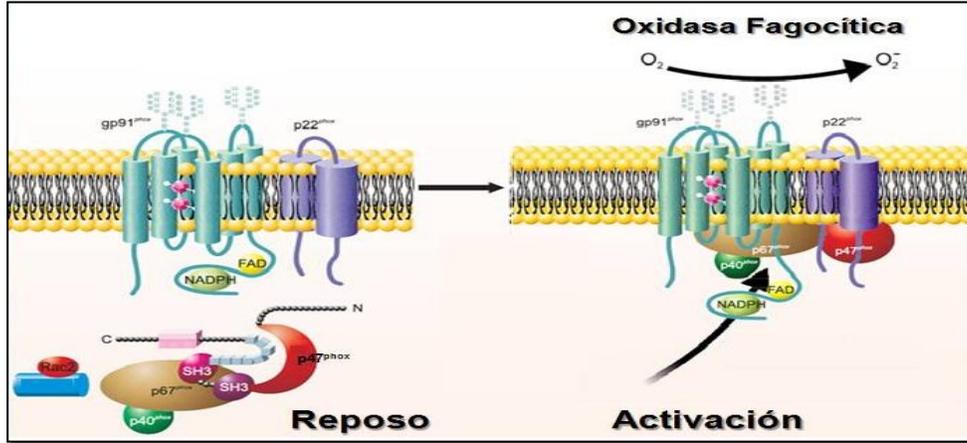


Figura 1. Activación y ensamblaje de NADPH oxidasa. Modificado de Nauseef (2008).

Células de Küpffer y estrés oxidativo

Las EROS y ERNS son generadas fisiológicamente durante el metabolismo aerobio celular. Estas especies tienen capacidad potencial para dañar biomoléculas y afectar así la viabilidad y/o supervivencia celular. La capacidad citotóxica depende del tipo celular, del nivel y del tiempo de exposición a ellas (Dröge, 2002). El desbalance entre el aumento de EROS/ERNS y la disminución de mecanismos antioxidantes endógenos genera el estrés oxidativo (EOX) (Sies, 1986).

Las EROS pueden activar vías metabólicas y de señalización celular, e inducir la maquinaria celular de defensa antioxidante por medio de la expresión de proteínas antioxidantes, que son las principales encargadas en restablecer los niveles redox intracelulares. Además, las EROS pueden inducir la expresión de proteínas de fase aguda (haptoglobina, β -fibrinógeno) y proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Fernández y Videla,

2009; Videla, 2009), vía activación de factores transcripcionales específicos sensibles a óxido reducción, tales como la proteína activadora 1 (AP-1), factor nuclear- κ B (NF- κ B) y el factor-2 relacionado al factor nuclear eritroide-2 (Nrf2), (Fernández y Videla, 2009; Videla, 2009; Romanque y cols, 2011).

En el tejido hepático, las CK son responsables de la respuesta pro-oxidante inicial. Ellas estimulan a los hepatocitos y amplifican el estado pro-oxidante, existiendo evidencia que la habilidad para presentar antígenos por las CK decrece cuando se inhibe la producción de EROS (György, 2009). Además, las CK presentan un bajo potencial antioxidante, por lo cual los hepatocitos asumen el impacto de mecanismos mediados/regulados por EROS (György, 2009). Se ha demostrado en modelos experimentales que el incremento en el estado pro-oxidante hepático por la acción calorigénica de la hormona tiroidea (T_3), gatilla la activación de NF- κ B con aumento en la liberación de TNF- α . Estas respuestas resultan atenuadas por antioxidantes y la eliminación de las CK por cloruro de gadolinio ($GdCl_3$), reflejando así, la dependencia entre producción de EROS y la activación de CK (Fernández y cols., 2005 a y b; Fernández y Videla, 1993; Venditti y cols, 2003, Videla y cols 1997).

Factores de transcripción nuclear redox-sensibles

Existen una serie de factores de transcripción nuclear sensibles o activables por óxido reducción, entre los que destacan NF- κ B, AP-1 y Nrf2 (Videla, 2009). Se ha demostrado experimentalmente en modelos de perfusión hepática con CC que al inducir la RR por activación de las CK, aumenta la capacidad de unión al DNA de NF- κ B (Romanque y cols, 2003), existiendo interdependencia entre el QO_2 , la producción de EROS, la expresión de

citoquinas y la activación de NF- κ B. Del mismo modo, el aumento en el estado de EOX hepático inducido por la administración de T₃ aumenta tempranamente la expresión de Nrf2 (Romanque y cols, 2011), no existiendo estudios que correlacionen la influencia de la RR de las CK en la actividad y expresión de Nrf2.

El factor de transcripción Nrf2 es activado por niveles bajos de EOX (Gloire y cols, 2006) y tiene un papel citoprotector en varios tejidos, promoviendo la expresión de enzimas antioxidantes, enzimas de biotransformación de fase-2 y proteínas de transporte, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como *Elemento de Respuesta Antioxidante* o ARE (Antioxidant Response Element) (Figura 2) (Aleksunes y Manautou, 2007).

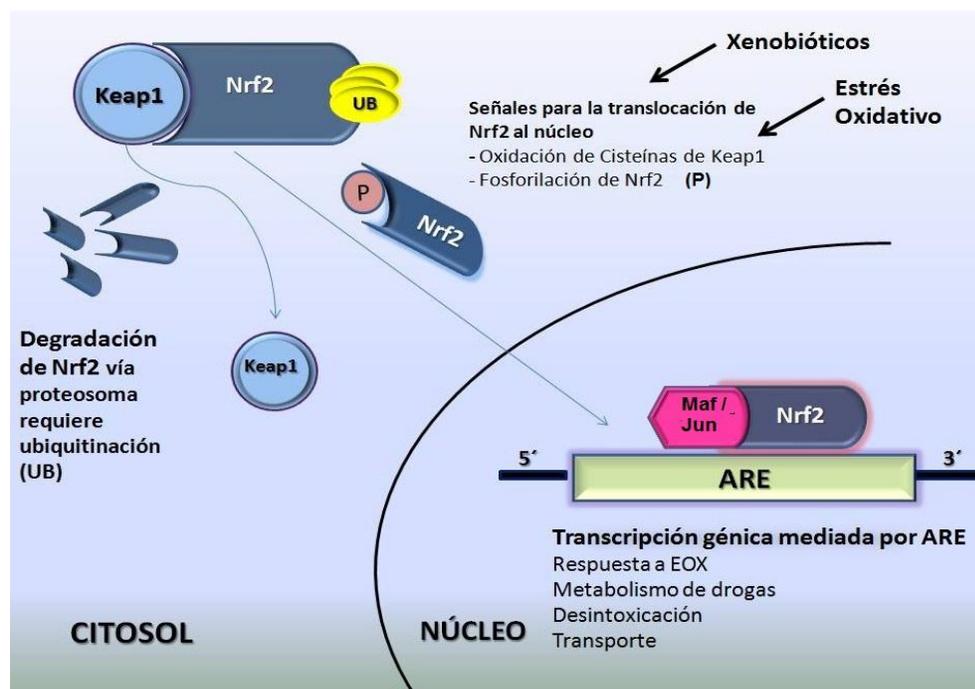


Figura 2. Regulación de la vía Keap-1-Nrf2-ARE. Modificado de Aleksunes y Manautou (2007).

Complejo Nrf2-Keap1-ARE

Nrf2 es un factor transcripcional activable por EOX y agentes electrofílicos, que se caracteriza por (i) tener un peso molecular de 68 kD, (ii) pertenecer a una familia de proteínas con cierre de leucinas, y (iii) por ser degradado en un proceso constitutivo realizado vía proteosoma, dependiente de la marcación con la proteína ubiquitina (Yamamoto y cols, 2008), condición que genera su inestabilidad proteica (vida media 13-20 minutos) (Itho y cols, 2003). Nrf2 consta de seis dominios altamente conservados asociados a su regulación negativa, denominados como Neh2 (Nrf2, ECH [chicken Nrf2] homologous domain); que corresponden al sitio de reconocimiento e interacción con afinidad variable para unirse a su inhibidor, la proteína Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Nrf2 se encuentra en forma basal en el citosol unido a su represor Keap1, en continua degradación (Yamamoto y cols, 2008).

La proteína Keap1 de 69 kD es citosólica y se ancla al citoesqueleto por interacciones específicas con actina. Consta de una región de intervención (IVR) rica en residuos de cisteína, un dominio adaptador para la proteína Cul 3, dependiente del complejo ligasa ubiquitina que favorece la degradación continua vía proteosoma de Nrf2, y un sitio de unión para interactuar con Nrf2 en su porción N terminal (Neh2) (Figura 3A) (Königsberg, 2007).

Regulación de la actividad de Nrf2

La actividad de Nrf2 es regulada predominantemente por Keap1. El mecanismo propuesto para la regulación de la actividad transcripcional de Nrf2 en el núcleo en respuesta a EOX, incluye (i) la acción inhibitoria de Keap1 sobre Nrf2 debido al secuestro citosólico, que depende del anclaje de Keap1 con el citoesqueleto, (ii) la interacción de Keap1 con Cul3 y (iii) la ubiquitinación de los residuos de lisina (K) de Nrf2 promoviendo su degradación vía proteosoma (Figura 3A) (Zhang, 2004). De esta manera, Keap1 suprime la translocación nuclear de Nrf2 y en consecuencia su actividad transcripcional (Venugopal y Jaiswal, 1996, 2004), proceso que es inhibido en condiciones de EOX. La activación y translocación desde el citosol al núcleo es de vital importancia para la supervivencia celular, evitando el daño asociado a la producción de EROS y agentes electrofilicos. Su activación es mediada por mecanismos que disminuyen la degradación de Nrf2 (Nguyen T, 2009) y dependen de la disociación del complejo que forma con Keap1. Las EROS oxidan directamente residuos de cisteína de Keap1 (Figura 3B) lográndose la disociación del complejo Keap1-Nrf2 (Copples y cols., 2008). Los residuos de cisteína de Keap1 actúan como *sensor redox*, modulando y estabilizando a Nrf2 por disociación de Keap1 (Eggleter y cols, 2005; Aleksunes y Manautou, 2007; Sun Z y cols., 2009). Una vez que Nrf2 se disocia de Keap1, se transloca al núcleo y forma heterodímeros con pequeñas proteínas fosforiladas llamadas Maf/Jun, lo cual facilita su interacción con la región ARE del ADN y la consecuente transcripción de genes blancos. La fosforilación de Nrf2 por diversas quinasas cumple un papel estabilizador en la disociación de Nrf2/Keap1; sin embargo como estímulo único, es incapaz de translocar Nrf2 al núcleo (Figura 2) (Aleksunes y Manautou, 2007).

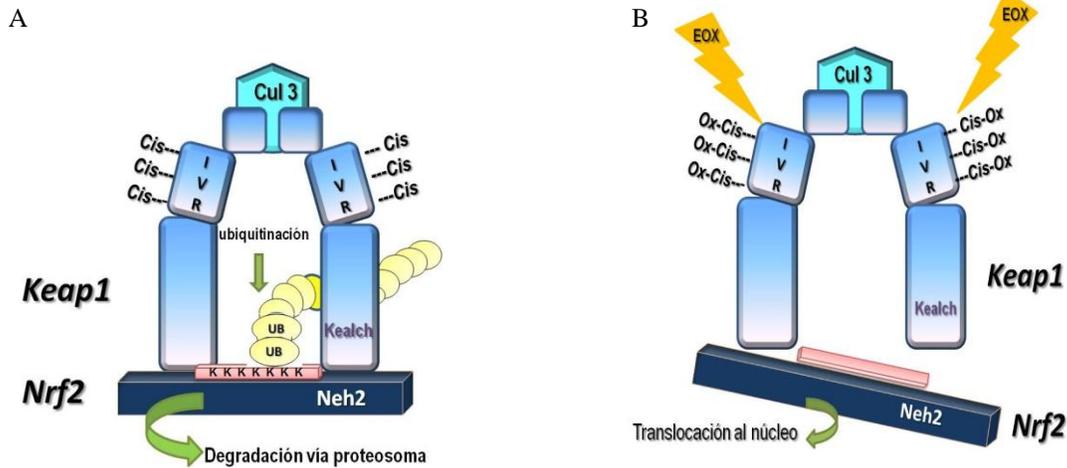


Figura 3. Estructura, interacción y activación de Keap1 y Nrf2. Modificado de Königsberg (2007).

Elemento de respuesta antioxidante (ARE) y Nrf2

Nrf2 tiene un rol citoprotector, el cual se ha evidenciado en modelos experimentales de citotoxicidad por acetaminofeno y otros tóxicos, en ratas nulas para Nrf2 que presentan mayor susceptibilidad al daño hepático (Klaassen y Reisman, 2010) y mayor frecuencia de hepatocarcinoma comparado con ratas silvestres para Nrf2 (Copples y cols, 2007). Esta acción citoprotectora se debe a que Nrf2 activa la secuencia ARE del ADN, que es una región amplificadora del ADN tipo *cis*, con una secuencia definida como 5'-TGACnnnGCA-3', que regula la expresión génica basal e inducible de mediadores de citoprotección en respuesta a xenobióticos, metales pesados y EROS. Nrf2 es una proteína que posee dominios tipo cierre de leucinas, responsables de la unión al ADN, que en asociación con proteínas Maf/Jun

permite la activación transcripcional de genes blanco mediados por ARE (Figura 2) (Kaspar y cols, 2009; Sun, 2009).

La vía de señalización Nrf2-ARE está implicada en una variedad de funciones celulares que incluyen (i) la biotransformación de xenobióticos, (ii) reacciones de reducción catalizadas por la NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1, reacciones de conjugación (glutación-S-transferasas [GSTs] y UDP-glucuronil-transferasas [UGTs]), (iii) eliminación de EROS y biosíntesis del glutatión (GSH), (iv) proteínas de transporte para el eflujo de xenobióticos conjugados y potencialmente tóxicos (proteínas asociadas a resistencia a multidrogas [MRPs]) (Figura 2 y Tabla 1) (Itoh y cols, 1997; Klaassen y Reisman, 2010). Por lo tanto, la activación de la vía transcripcional Nrf2-ARE presenta un papel clave en el sistema de defensa celular, modulando la expresión constitutiva de genes asociados a citoprotección. De esta forma, amplifica y mantiene la homeostasis redox, bajo condiciones basales y de estrés oxidativo/electrofílico (Lee y cols, 2005; Nguyen T, 2009).

Proceso celular	Genes controlados por Nrf2	Función
Homeostasis del glutatión	Glutamato-cisteína ligasa (GCL)	Cataliza la formación de γ -glutamil-cisteína
	Glutatión sintetasa (GS)	Cataliza la adición de glicina a γ -glutamil-cisteína
	Glutatión-S-transferasa (GST)	Conjuga el GSH con agentes electrofílicos
	Glutatión peroxidasa (GPx)	Reduce peróxidos a derivados hidroxilados
Metabolismo de drogas	NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1)	Reduce quinonas divalentemente evitando la formación de especies radicalarias
	UDP-glucuroniltransferasa (UGT)	Cataliza la adición de ácido glucurónico a metabolitos hidroxilados
	Epóxido oxidasa microsomal (EHm)	Hidroliza epóxidos a dioles
Respuesta a Estrés	Heme oxigenasa -1 (HO-1)	Cataboliza la transformación del grupo heme a monóxido de carbono, biliverdina y hierro libre
Metabolismo del hierro	Ferritina	Secuestrador celular de hierro
Excreción y transporte	Proteína asociada a resistencia a drogas (MRP)	Eflujo de drogas o sus conjugados desde el interior celular

Tabla 1. Genes regulados por Nrf2-ARE (Modificado de Aleksunes y Manautou, 2007).

HIPÓTESIS

La inducción de la respuesta respiratoria de las células de Küpffer asociada a la fagocitosis de carbono coloidal incrementa los niveles proteicos nucleares del factor de transcripción nuclear Nrf2.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la influencia de la respuesta respiratoria de las células de Küpffer sobre la activación del factor de transcripción nuclear redox sensible Nrf2 en hígado de rata.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar las proteínas Nrf2 y Keap1 a nivel citosólico y nuclear por técnica de Western Blot, en extractos de hígado de ratas obtenidos a los 5, 10 y 15 minutos de infusión con CC, en relación a hígados perfundidos en ausencia de CC. Correlacionar la activación de Nrf2 con la RR inducida por CC.
2. Determinar Nrf2, en el período máximo de activación inducido por la infusión de CC en hígados de ratas tratadas previamente con el inactivador de las CK cloruro de gadolinio (GdCl₃).

METODOLOGÍA

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley, Bioterio Central, ICBM Facultad de Medicina, Universidad de Chile, con un peso corporal entre 120-150 g, alimentadas con una dieta sólida estándar (Alimentos Champion S.A Santiago) y agua *ad libitum*, con temperatura ambiental controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. El protocolo de tratamiento de los animales, cumple con las normas del “Comité de Bioética sobre investigación en animales” de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile y fue aprobado por dicho comité (Número CBA N° 0269 FMUCH).

Determinación de la función fagocítica y la actividad respiratoria de las células de Küpffer en el hígado perfundido de rata

Para determinar la función fagocítica y la respuesta respiratoria de las CK, se utilizó la técnica de perfusión hepática e infusión de CC en hígado de rata aislado. La perfusión hepática se realizó de acuerdo a lo descrito por Cowper y cols. (1990) y adaptado en nuestro laboratorio (Tapia y cols, 1997).

a) Protocolo quirúrgico

Previa anestesia de los animales con nembutal (50 mg/kg) *ip*, el hígado se expone y disecciona por sus ligamentos gástricos e intestinales. A continuación se inyectan 250 UI de heparina sódica subcapsular en el bazo, y la vena porta es canulada con un catéter conectado a un matraz que contiene líquido de perfusión [NaCl 118 mM, KCl 4,8 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, NaHCO₃ 25 mM y glucosa 10 mM, equilibrado con carbógeno (O₂/CO₂ 19/1 v/v), a pH 7,4]. Luego, la vena cava superior es canulada, la aorta abdominal es cortada y la vena cava inferior ligada. Al término de este proceso, se extrae el hígado y se transfiere al equipo de perfusión.

Una vez establecido el período de estimulación máxima de Nrf2, un grupo separado de animales fue tratado con GdCl₃ (10 mg/kg, dosis única) *iv* (Hardonk y cols, 1992), 72 horas previas a implementar el protocolo de perfusión con CC y en ausencia de CC.

b) Protocolo de perfusión hepática *in vitro*

La perfusión es realizada a temperatura (36-37C°) y flujo (3,5-4,5 mL/g hígado/min) constantes, sin recirculación del perfusado. El líquido de perfusión es recolectado desde la vena cava superior y analizado por un electrodo sensor de O₂. Los primeros 15 minutos corresponden al período de estabilización del sistema, los siguientes 15 minutos corresponden a la determinación del QO₂ basal hepático, posterior a lo cual se infunde CC a concentración de 0,5 mg/mL (medida por espectrofotometría 623 nm) y el QO₂ es registrado en forma continua por 5, 10 o 15 min adicionales. Simultáneamente, el líquido efluente del perfusado es obtenido cada 5 min para determinar la liberación de deshidrogenasa láctica (LDH) como

medida de viabilidad del hígado. Una vez finalizada la perfusión se toman muestras de tejido hepático para microscopía, medición de LDH hepática y preparación de extractos citoplasmáticos y nucleares para la cuantificación de proteínas por técnica de Western Blot.

La RR o ΔQO_2 inducida por la infusión de CC es calculada mediante la integración del área bajo la curva del QO_2 hepático, sobre los niveles basales. Los resultados se expresan como $\mu\text{moles } O_2/ \text{g de hígado}$ (Figura 4).

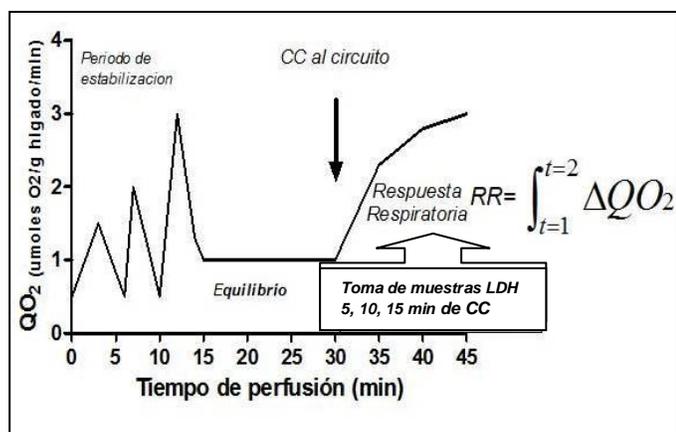


Figura 4. Protocolo de perfusión hepática.

Técnicas

a) Técnica de Western Blot

Con el fin de cuantificar Nrf2 y Keap1, el tejido hepático es procesado para extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares según la técnica descrita por Deryckere y Ganon (1994). La cuantificación proteica es efectuada por el método de Bradford (1976).

El tejido hepático es congelado en nitrógeno líquido (100-500 mg), homogenizado y suspendido en solución buffer A (IGEPAL CA-630 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO,

USA) (NP-40) 0,6%, NaCl 150 mM, HEPES 10 mM pH 7,9, EDTA 1 mM, Fenil-metil-sulfonil-fluoruro, (PMSF) 0,5 mM). Los extractos nucleares se suspenden en Solución B (HEPES 20 mM pH 7,9 glicerol, al 25% NaCl 420 mM. MgCL₂ 2 1,2 mM EDTA 0,2 mM, ditiotreititol 0,5 mM, PMSF 0,5 mM, benzamidina 2 mM) e inhibidores de proteasas (1 mM fluorida fenilmetilsulfonil, 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina y 1 mM ortovanadato). Los extractos nucleares (100 µg) y citosólicos de proteínas (50 µg) son separados en geles de policramida 12% usando SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y luego transferidos a membranas de nitrocelulosa, la cual es bloqueada con Tris buffer salino (TBS) y suero de albúmina bovino (BSA) al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los geles se lavan con TBS Tween 20 0,1% p/V e incuban con anticuerpo policlonal de conejo para Nrf2 o Keap1 (Abcam, Cambridge, MA). Como control de carga interno, se utiliza un anticuerpo monoclonal de ratón para β-actina (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH) para las fracciones citosólicas, y lamina A/C (BD Transduction Laboratories, San José, CA), para las fracciones nucleares. Luego, se realizan tres lavados con TBS Tween-20 y los complejos antígeno-anticuerpo se detectan usando los anticuerpos secundarios, cabra anti-conejo IgG o cabra anti-ratón IgG, usando como revelador el kit de quimioluminiscencia Supersignal West Pico (Pierce, Rockford, IL). La placa fotográfica obtenida se escanea y se realiza el análisis de las bandas por método densitométrico utilizando el software Scion Image (Scion Corp, Frederick, MD). Las bandas obtenidas se normalizan por la cuantificación de β-actina para proteínas citosólicas o lamina A/C para proteínas nucleares.

b) Método de Bradford para cuantificación de proteínas

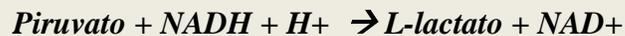
Se utiliza el reactivo Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para cuantificar proteínas en los extractos citoplasmáticos y nucleares. La dilución de la muestra para extractos citoplasmáticos y nucleares es respectivamente 1:500 y 1:10 en PBS a pH 7,4.

Cuarenta μL de la muestra diluida se mezcla con 1 mL de reactivo de Bradford, determinándose la absorbancia a 590 nm, usando 1 mL de solución Bradford como blanco. La curva de calibración fue determinada según datos registrados en nuestro laboratorio.

c) Determinación de la actividad de la LDH hepática en perfusado hepático

Como prueba de viabilidad hepática celular se determinó la liberación de LDH. Las muestras del efluente del perfusado obtenidas en los distintos períodos de perfusión con o sin CC, se filtraron y congelaron a -20°C hasta el momento de su procesamiento. La muestra de efluente (0,1 ml de perfusado) se mezcla con buffer fosfato salino (0,05 M pH 7,5; piruvato 0,63 mM; 150 μL cloroformo y NADH 11,3 mM) y la muestra blanco se trata en forma similar omitiendo el NADH según el método descrito por Bergmeyer y Bernt (1974).

La enzima LDH cataliza la siguiente reacción:



La actividad LDH se determina espectrofotométricamente midiendo la desaparición de la absorbancia a 340 nm de NADH en función del tiempo. Una unidad de actividad de LDH representa la formación de $1\mu\text{mol}$ de NAD^+ /min a 37°C . El flujo sinusoidal de LDH se

expresó en mU/g hígado/min; la liberación total de LDH en el período estudiado se obtuvo integrando los valores del área bajo la curva, los cuales se compararon con la actividad LDH en el tejido hepático (U/g hígado).

d) Histología hepática

Se utilizó microscopía óptica para analizar cortes de hígado fijados en formalina tamponada (10%) e incluidos en parafina sólida y teñidos con hematoxilina-eosina.

Expresión de resultados y análisis estadísticos

Los resultados que muestran una distribución Gausiana de acuerdo al test de Kolmogorov-Smirnov fueron expresados como promedio \pm error estándar de la media para 3 a 7 animales por grupo experimental. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales se evaluaron mediante ANOVA unifactorial seguido del test Newman-Keuls (GraphPad Prisma versión 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com), con un límite de confianza del 5% ($p < 0,05$). La asociación entre las variables fue realizada por el coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS

Validación de las condiciones óptimas de perfusión hepática

a) Respuesta respiratoria de las CK inducida por la infusión de CC

De acuerdo al protocolo de perfusión hepática (Figura 4), la velocidad de consumo de oxígeno se incrementó con la incorporación del CC, representando una RR (ΔQO_2) de 2,3 $\mu\text{moles O}_2/\text{g hígado}$ luego de 10 min de estimulación (Figura 5). En estas condiciones, los valores promedio obtenidos del ΔQO_2 para los 5, 10 y 15 minutos de perfusión con CC fueron respectivamente $0,97 \pm 0,23$ (n=3) $\mu\text{mol/g hígado}$ (Figura 6A); $1,7 \pm 0,05$ (n=3) (Figura 6B); y $2,3 \pm 0,23$ (n=7) (Figura 6C).

La RR de las CK se correlaciona linealmente con el tiempo de infusión de CC (Figura 7A); sin embargo la velocidad de captación del CC por parte de las CK se mantuvo constante en el tiempo (Figura 7B).

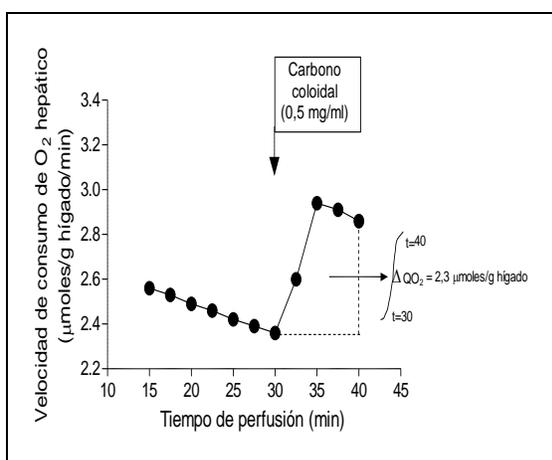


Figura 5. Estudio representativo de la respuesta respiratoria (ΔQO_2). Velocidad del QO_2 en función del tiempo de perfusión con CC. La RR es inducida durante 10 minutos de infusión de CC (concentración 0,5 mg/ml), en hígado perfundido de rata y es expresada como $\mu\text{moles de O}_2/\text{g}$ de hígado.

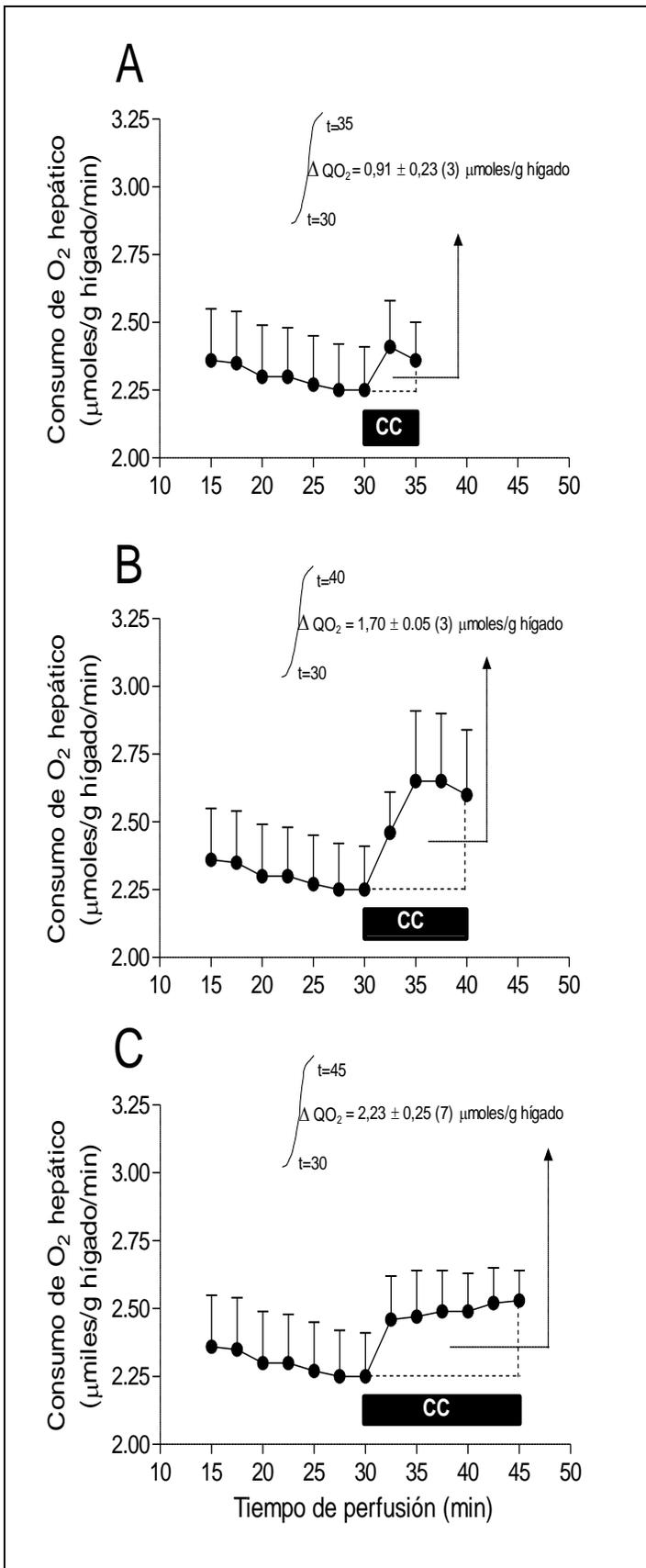


Figura 6.

Respuesta respiratoria (ΔQO_2 ; $\mu\text{moles de O}_2/\text{g de hígado}$) inducida en el hígado perfundido de rata mediante la infusión de CC por 5 (A), 10 (B) y 15 (C) minutos. Los datos corresponden al promedio \pm ESM para 3-7 animales por cada período de perfusión con CC.

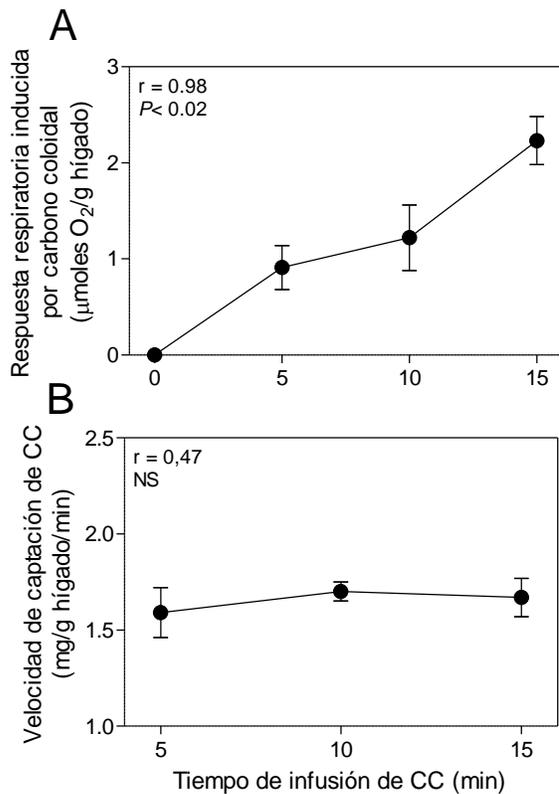


Figura 7.

Correlación de la respuesta respiratoria inducida y el tiempo de infusión de CC (A) y correlación de velocidad de captación de CC en el hígado perfundido de rata en función del tiempo (B).

Los datos corresponden al promedio \pm ESM para 3-7 animales para cada período de infusión con CC. Las asociaciones entre variables se calcularon mediante el coeficiente de correlación (r) de Pearson (NS, no significativo).

b) Evaluación histológica de las células de Küpffer

La microscopía de luz se realizó en cortes de hígado en distintos períodos de perfusión con CC. Este estudio muestra que las partículas de CC están localizadas en las células de Küpffer y ausentes en los hepatocitos (Figura 8), observándose un aumento cuantitativo en la captación de CC en relación al tiempo de infusión con CC (Tabla 2). En la evaluación del daño hepático por microscopía óptica no se evidenciaron alteraciones en la histoarquitectura hepática (Figura 9).

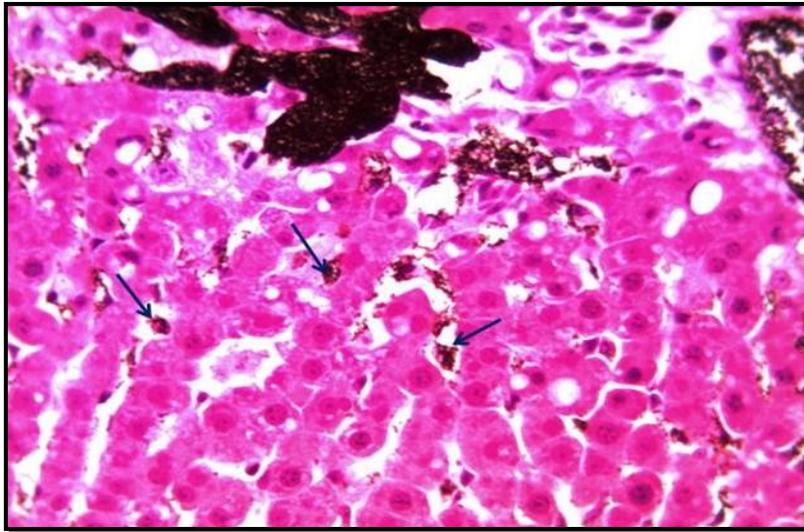


Figura 8. Histología de una preparación de hígado perfundido de rata, posterior a 15 min de infusión con CC. Las flechas indican las células de Küpffer con CC fagocitado. (Tinción hematoxilina-eosina, aumento 400x).

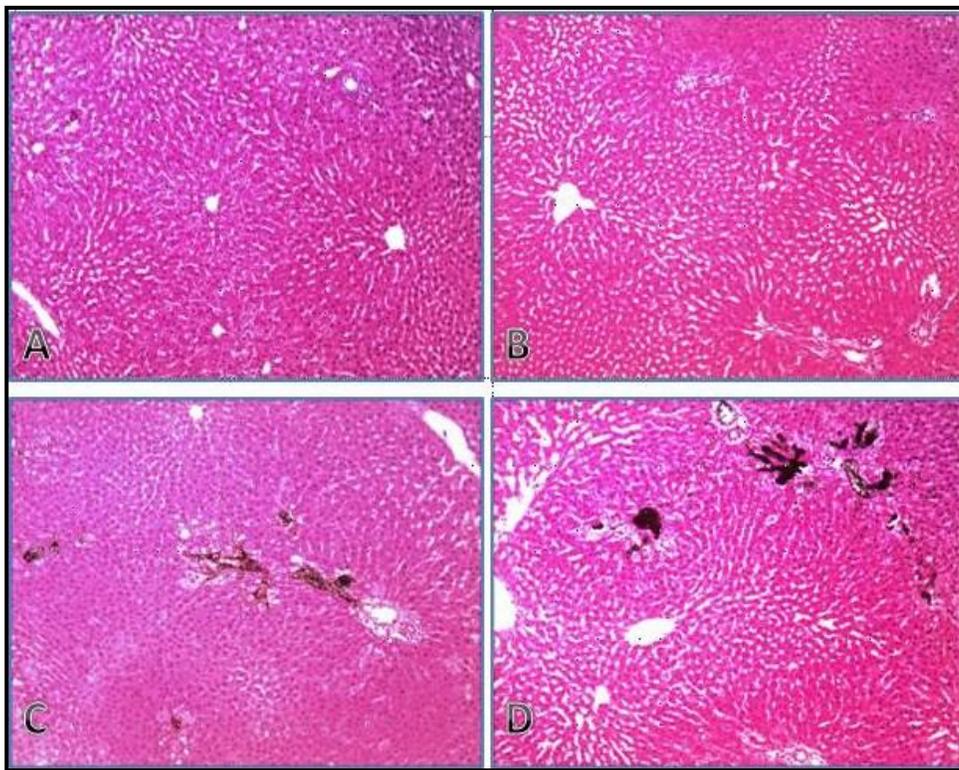


Figura 9. Histología de cortes de hígado infundidos sin CC (A) y con CC (5 mg/ml) durante 5 (B), 10 (C) y 15 (D) minutos. Tinción Hematoxilina-eosina (aumento 100x).

Tiempo de Perfusión	Arquitectura	CC
Control	Conservada	-
5 min	Conservada	+
10 min	Conservada	++
15 min	Conservada	+++

Tabla 2.

Arquitectura hepática y cuantificación de carbono coloidal (CC) en cortes de hígado de ratas analizados por microscopía óptica, en distintos períodos de perfusión con CC y control.

c) Determinación de la viabilidad del hígado perfundido: actividad LDH sinusoidal en el perfusado hepático

Al existir daño celular, la actividad LDH del perfusado hepático supera el 10% de la actividad LDH del tejido. La liberación de la LDH al perfusado hepático fue calculada como la velocidad del eflujo sinusoidal (mU/g de hígado/min) en función del tiempo de infusión con CC, y la actividad total de LDH, por la integración de los valores del área bajo la curva (Figura 10). Entre los 30 y 45 min de infusión con CC, la actividad total de LDH liberada al perfusado hepático correspondió a 783 mU/g/hígado lo que corresponde al 0,34% de la actividad LDH en el tejido hepático, 231000 ± 1800 mU/g hígado (n=15). Este valor es concordante con un protocolo experimental realizado en condiciones óptimas de viabilidad del tejido, lo que fue corroborado por el análisis histológico (Figura 9 y Tabla 2).

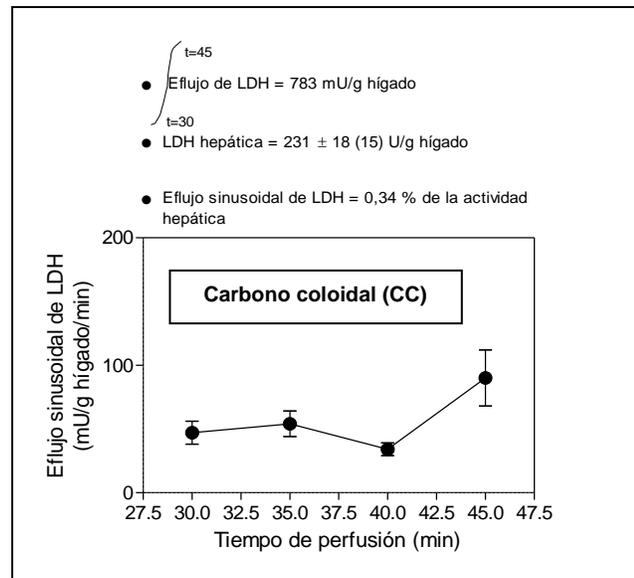


Figura 10. Liberación sinusoidal de deshidrogenasa láctica (LDH) en hígado de rata aislado y perfundido, en función del tiempo de infusión con CC (5 mg/mL), expresada en mU/g hígado/min. Los datos corresponden al promedio \pm ESM para 9-15 animales para cada período de infusión con CC. La actividad total de LDH al perfusado hepático fue calculada por la integración de los valores del área bajo la curva.

Contenido proteico de Nrf2 y Keap1 en los compartimentos citosólico y nuclear

El contenido citosólico de Nrf2 declinó progresivamente y en forma dependiente del tiempo de infusión con CC, evidenciándose una disminución significativa de 24% y 65% a los 10 y 15 minutos, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 11A). En forma inversa a la caída del contenido de Nrf2 en el citosol, a nivel nuclear se observó un incremento significativo de Nrf2, respecto al control, en el lapso de 5 a 10 minutos de iniciada la perfusión con CC, sin embargo Nrf2 retorna a los niveles basales al minuto 15 de infusión con CC (Figura 11 B).

El período máximo de activación de Nrf2 corresponde a los 10 minutos de iniciada la infusión de CC.

El cociente de Nrf2 entre ambas fracciones nuclear y citosólica asociado a la infusión de CC a los 5 y 10 minutos, se incrementó significativamente sobre los niveles basales en 95% y 131% ($p < 0.05$), respectivamente (figura 11C). Estos resultados implican la activación del factor transcripcional y su translocación desde el citosol al núcleo, existiendo una correlación significativa entre la RR inducida por CC y la relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico en el lapso de 10 minutos de estimulación ($r = 0,77$; $p < 0,05$) (Figura 12). El contenido total relativo de Nrf2 (fracción citosólica más nuclear) durante los 5 y 10 minutos de infusión con CC es similar y comparable al valor del control, sin embargo, a los 15 minutos de estimulación con CC el Nrf2 total descendió 28% respecto al valor control (calculado a partir de las Figuras 11A y 11B), lo cual no permite interpretar posibles cambios en la relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico.

La variación en los niveles de Nrf2 provocados por la infusión de CC en hígados perfundidos fueron acompañados por una disminución significativa (82%; $p < 0.05$) del contenido citosólico de Keap1 a los 15 minutos, no observándose variación significativa a los 5 y 10 min de estimulación con CC (Figura 13). En el protocolo experimental realizado no se observó presencia de Keap1 nuclear en todos los períodos de tiempo estudiados (datos no mostrados).

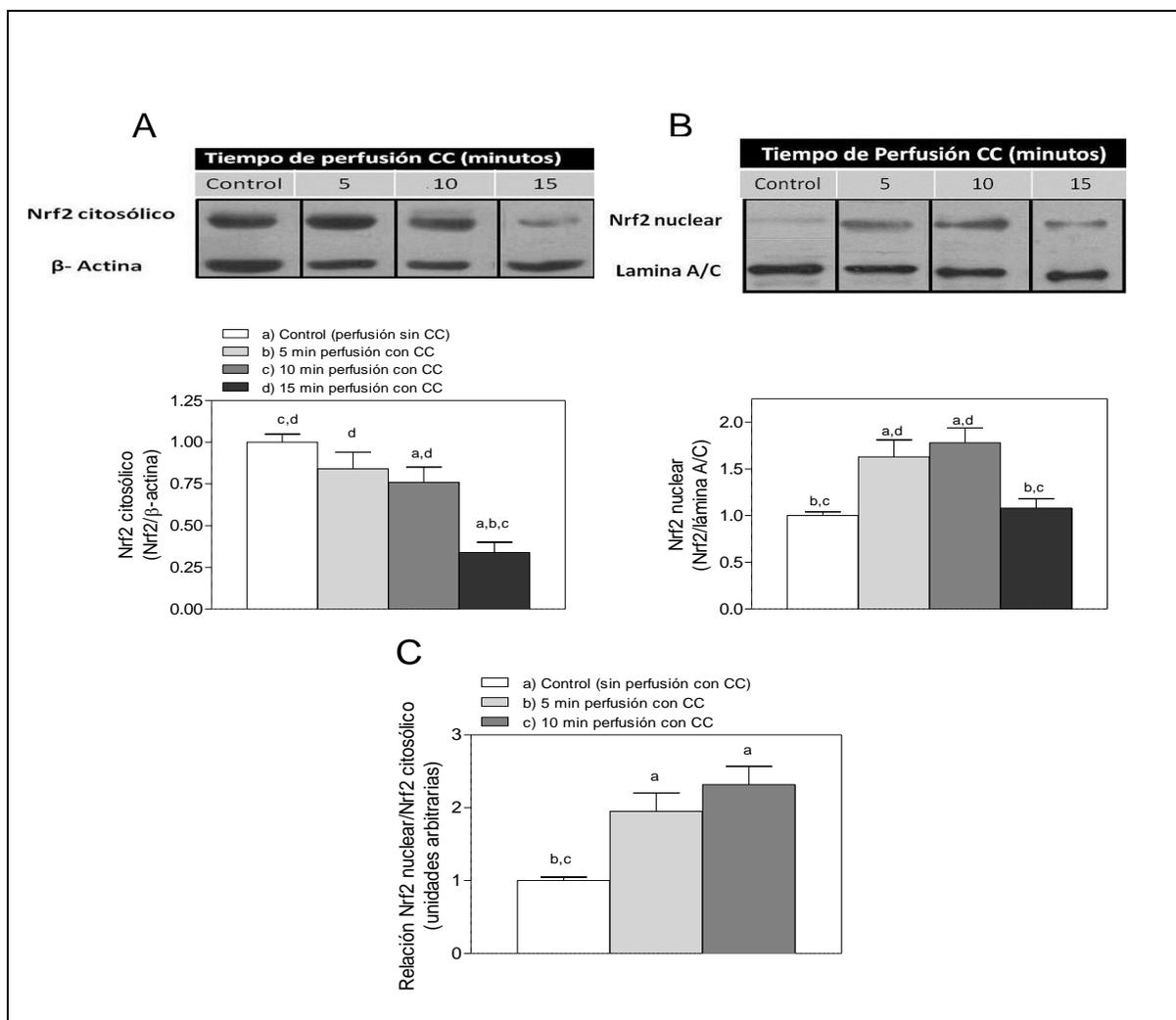


Figura 11. Contenido de Nrf2 citosólico y Nuclear. (A) Segmento superior; western blot representativo de Nrf2 citosólico (68 kDa) y su respectivo control de carga β-actina (43 kDa). Segmento inferior; gráfica que corresponde al estudio densitométrico Nrf2/β-actina. (B) Segmento superior; western blot representativo de Nrf2 citosólico y su respectivo control de carga lámina A/C (65 kDa). Segmento inferior gráfica que corresponde al estudio densitométrico Nrf2/Lámina A/C. Los valores normalizados corresponden a los promedios ± ESM para 3 a 5 animales por grupo. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los perfundidos con CC es determinada por prueba ANOVA unifactorial seguido del test Newman-Keuls ($P < 0,05$) y se indica sobre cada barra con las letras de los respectivos grupos. (C) Relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico.

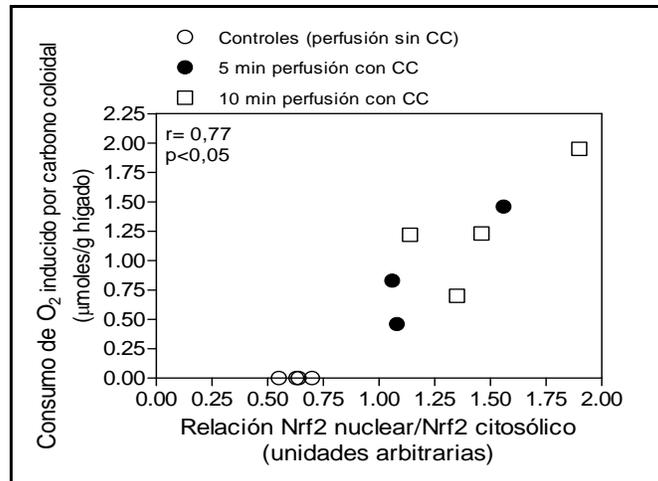


Figura 12. Correlación ΔQO_2 inducido por CC y la relación entre contenido Nrf2 nuclear /Nrf2 citosólico

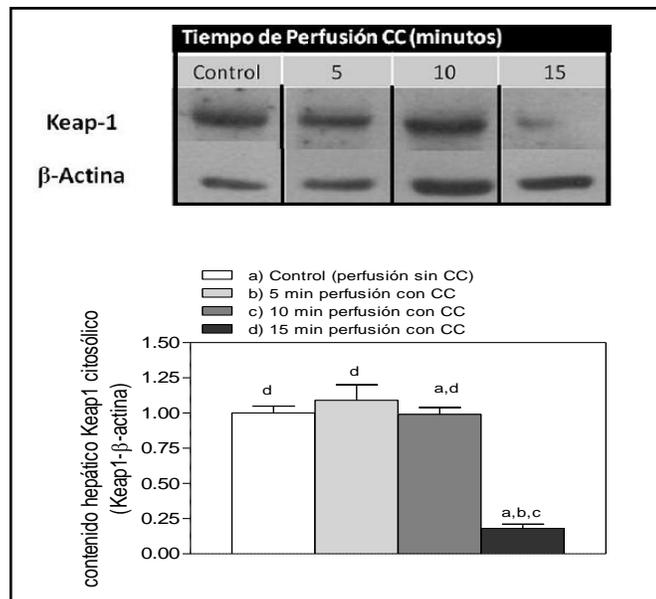


Figura 13. Contenido de Keap-1 citosólico. Segmento superior; western blot representativo de Keap-1 citosólico (70 kDa) y β -actina (43 kDa) como control de carga de cada muestra. Segmento inferior; gráfica que corresponde al estudio densitométrico Keap-1/ β -actina, los valores corresponden a los promedios \pm ESM para 3 a 5 animales por grupo y luego normalizados. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los perfundidos con CC es determinada por prueba ANOVA unifactorial seguido del test Newman-Keuls ($P < 0,05$) y se indica sobre cada barra con las letras de los respectivos grupos.

Cuantificación de Nrf2, en el período de activación máxima de Nrf2, bajo efecto de GdCl₃

Las ratas fueron tratadas con GdCl₃, 72 h previas a la infusión de CC durante 10 minutos (período máximo de activación de Nrf2). En este estudio no se observó presencia de Nrf2 en su fracción citosólica y tampoco en la nuclear, en condiciones en que la RR inducida por CC es nula, al compararla con experimentos realizados en ratas no tratadas con GdCl₃, a tiempo 0 y 10 minutos de estimulación con CC (Figura 14).

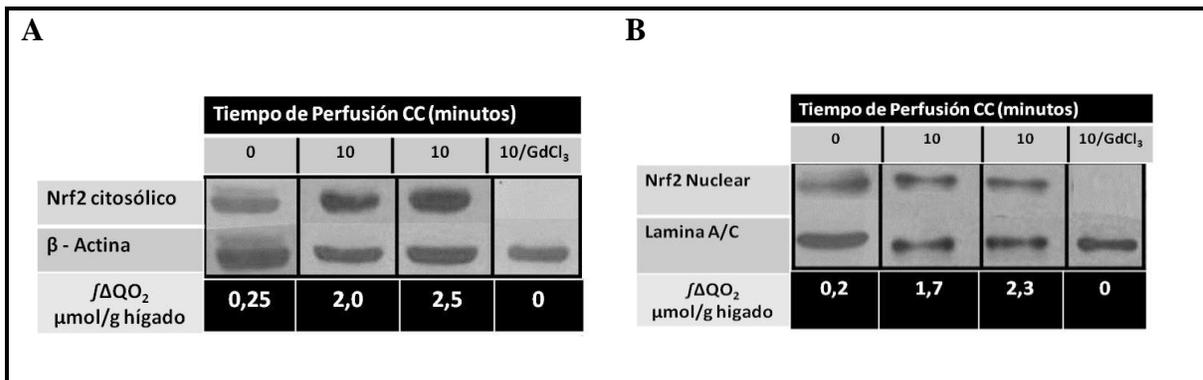


Figura 14. Western blot representativo de Nrf2 citosólico (A) y Nuclear (B), en muestras aisladas, a tiempo 0, 10 minutos de infusión con CC y bajo efecto de GdCl₃ (10 mg/kg, 72 h previas) cada banda presenta su respectivo control de carga (β-actina y Lámina A/C para muestra citosólica y nuclear respectivamente). El valor de la fila inferior corresponde al ΔQO₂ medido para cada muestra y expresado en μmol O₂/g hígado.

DISCUSIÓN

Respuesta Respiratoria, Células de Küpffer y Estrés Oxidativo

En el modelo experimental de hígado perfundido y aislado de rata en condiciones de infusión de CC, la captación de CC fue realizada exclusivamente por macrófagos hepáticos, lo que fue confirmado por el estudio histológico. La fagocitosis involucra la activación de la NADPH oxidasa macrofágica y se asocia a un aumento del QO_2 sobre el nivel basal, debido a la inducción de la RR por parte de las CK al infundir CC. La RR inducida por la infusión de CC fue realizada en condiciones óptimas de viabilidad del tejido, lo cual fue verificado: (i) por la presencia de una arquitectura hepática normal evidenciada por análisis histológico, (ii) por la liberación sinusoidal de la LDH que alcanzó al 0,34% de los niveles de LDH intrahepática, resultados concordantes con reportes previos (Romanque y cols, 2003; Cowper y cols, 1990; Tapia y cols, 1997; Cisternas y cols 2005).

El funcionamiento de las CK medido en el sistema de perfusión hepática se caracterizó por la RR gatillada por la estimulación con CC, que se incrementó significativamente en forma progresiva y se correlacionó linealmente con el tiempo de perfusión de CC en el lapso de 15 minutos. Para cada uno de los intervalos de tiempo de infusión de CC evaluados, la velocidad de captación de CC se mantuvo sin variaciones, hecho que podría ser explicado por la presencia de un número constante de CK fagocíticamente activas y al empleo de una concentración de CC (0,5 mg/mL) que es saturante, infundida en condiciones de flujo constante.

La RR de las CK está estrechamente ligada a la actividad enzimática NADPH oxidasa, proceso activo que consume oxígeno e implica la generación de EROS, con el consecuente aumento del estado pro-oxidante, tanto en los macrófagos hepáticos como en otras células que conforman el tejido hepático (Decker K, 1990). Esta RR puede contribuir a condicionar respuestas de sobrevivencia o de injuria hepatocelular, dependiendo del nivel de EROS generado y el tiempo de exposición a ellos (Drögue 2002; Videla 2003). Considerando que la actividad de la enzima NADPH oxidasa contribuye al estado pro-oxidante en las CK y que los mecanismos antioxidantes se encuentran predominantemente en el parénquima celular hepático (Sies H, 1991; Meister A, 1983; Vrba y Mondriansky, 2002), la activación de mecanismos de citoprotección, vía factores transcripcionales redox-sensibles específicos en las CK, presentaría un papel clave en la mantención de la viabilidad celular. Esto es particularmente importante en condiciones de EOX a largo plazo, en que el funcionamiento adecuado de las CK es esencial para la homeostasis hepática. En este contexto, se ha demostrado que las CK cumplen un papel relevante en la respuesta homeostática al EOX en situaciones de daño hepatocelular agudo y crónico (Tsukamoto, 2002; Bilzer y cols., 2006), en que las EROS derivadas de la activación de las CK pueden simultáneamente actuar como segundos mensajeros gatillando rutas de señalización y transducción de señales. Este mecanismo permite incrementar la expresión de moléculas citoprotectoras, respuesta en la que están implicados factores transcripcionales redox-sensibles como NF- κ B, AP-1 (Maemura y cols, 2005; Iles y cols, 2002) y Nrf2 (Romanque y cols, 2011). Estudios previos evidencian que la disminución de la unión al DNA de NF- κ B en la injuria hepática por isquemia-reperusión, es normalizada por el preconditionamiento con la hormona tiroidea (T_3) mediante un mecanismo redox asociado a las CK (Fernández y cols, 2007 a y b, 2008;

Mardones y cols, 2011), hormona que también es capaz de activar precozmente al Nrf2 hepático y podría ser una estrategia de preconditionamiento farmacológico. (Romanque y cols, 2011).

Complejo Nrf2/Keap1 y RR de las CK bajo estimulación con CC

La estimulación continua de las CK por la infusión constante de CC al hígado perfundido, indujo un aumento progresivo de la RR y una disminución en el contenido citosólico de Nrf2, el que fue mínimo a los 15 min. En el núcleo, los niveles proteicos cuantificados se incrementaron, alcanzando el valor máximo a los 10 minutos de infusión de CC. Al analizar los niveles de Nrf2 normalizados respecto de los valores controles en ambos compartimentos citosólico y nuclear, se evidenció un drástico aumento en la relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico, el que fue máximo a los 10 minutos de estimulación con CC. Estos resultados sugieren la translocación de Nrf2 desde el citosol al núcleo como criterio de activación del factor transcripcional, cuya temporalidad coincide con los cambios en la RR de las CK. Esta propuesta está sustentada por la correlación significativa establecida entre la RR y la relación de Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico en el lapso de 10 minutos de estimulación con CC. La sumatoria de los niveles normalizados de Nrf2 citosólico y nuclear indican una disminución neta del 28% a los 15 minutos de infusión de CC, respecto de los valores del control, y se asocia a la máxima RR de las CK alcanzada por estimulación con CC. La disminución del contenido neto de Nrf2 a los 15 minutos podría deberse a una mayor degradación asociada a la elevada RR alcanzada, una menor síntesis, o a mecanismos regulatorios sobre Nrf2 como la susceptibilidad a fosforilación. Este último mecanismo por sí solo no es capaz de explicar la translocación nuclear de Nrf2, pero su alteración podría

desestabilizar la interacción de Nrf2 con la secuencia ARE (Aleksunes y Manautou, 2007; Yeligar K, 2010), facilitando el retorno a los niveles basales de Nrf2 a los 15 minutos de estimulación con CC, factores que deberán ser analizados en estudios futuros.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la estimulación de las CK por infusión de CC al hígado perfundido de rata, que gatilla la RR macrofágica por activación de la NADPH oxidasa, activa al Nrf2 hepático en forma temprana. Esta conclusión está apoyada por la correlación directa y significativa establecida entre la RR inducida por CC y la relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico en el lapso de 10 minutos de estimulación. No obstante que la inactivación de la CK por $GdCl_3$, que anula la RR, conduce a niveles no detectables de Nrf2 en el citosol y núcleo, lo cual apoyaría la hipótesis planteada, estos resultados son difíciles de interpretar. En efecto, bajo condiciones de tratamiento con $GdCl_3$ se hubiera esperado que los niveles de Nrf2 disminuyeran a los valores basales observados en ausencia de estimulación con CC, que corresponderían a la expresión basal de Nrf2 por los hepatocitos. De acuerdo al mecanismo de acción del $GdCl_3$ propuesto por Hardonk y cols. (1992), la inactivación de las CK se debería a la liberación del Gd^{+3} al activarse los macrófagos, el cual formaría conglomerados proteicos que precipitan, impidiendo así la función normal de las proteínas afectadas. Estos conglomerados proteicos han sido detectados tanto en la CK como en los hepatocitos (Hardonk y cols, 1992), lo cual plantea la posibilidad de la interacción entre Gd^{+3} y Nrf2 impidiendo su detección. En apoyo de esta propuesta, $GdCl_3$ disminuye temporal y selectivamente el contenido de los citocromos c_1 y c en mitocondrias de hígado de rata, sin cambios en en el contenidos de los citocromos b y aa_3 (Ferreira y cols, 1998) y del citocromo P450 microsómico (Badger y cols, 1997). Una alternativa para resolver el problema suscitado, es el estudio futuro reemplazando el $GdCl_3$ por apocinina, inhibidor específico de la NADPH oxidasa (Stefanska y Pawliczak, 2008), previo a la estimulación con CC.

La activación del Nrf2 hepático por el gatillamiento de la RR macrofágica por CC, es concordante con estudios previos utilizando hormona tiroidea, la cual activa a Nrf2 a las 1-2 horas de su administración *in vivo* mediante un mecanismo redox-sensible, el cual es inhibido por el pre-tratamiento con el antioxidante N-acetilcisteína (Romanque y cols, 2011).

En referencia a la proteína Keap1, el contenido citosólico de Keap1 disminuyó significativamente a los 15 minutos (82%) de infusión de CC, al compararlos con el control. Estos hallazgos pueden ser interpretados de acuerdo al funcionamiento del sistema de señalización propuesto para el complejo Nrf2/Keap1. En condiciones basales, Nrf2 se encuentra secuestrado en el citosol por unión a Keap1, el cual promueve la continua degradación proteosómica de Nrf2, proceso dependiente de la poli-ubitiquinación de Nrf2 por Cul3 (Singh y cols, 2010; Zhang, 2006). Este proceso puede ser irrumpido por las EROS generadas por la RR de las CK bajo estimulación con CC, ya que ellas oxidan residuos de cisteínas críticas (cisteína-151) provocando un cambio conformacional en la estructura de Keap1 (Zhang, 2006). En concordancia con esta proposición, la RR de las CK es máxima a los 15 minutos de estimulación con CC y la disminución de Keap1 citosólico coincide con aquella de Nrf2 total, sugiriendo degradación de las proteínas Keap1 y Nrf2. De esta forma, Keap1 pierde la afinidad por Nrf2, es ubiquitinizado y degradado por el proteosoma (Kensler, 2007; Egger y cols, 2005). Keap1 no fue cuantificable en el núcleo durante el período experimental estudiado, resultado que podría deberse a que Keap1 es una proteína citosólica, la cual es degradada una vez que libera a Nrf2 y no tiene péptido señal de reconocimiento nuclear. Algunos autores sugieren que Keap1 migraría con posterioridad al núcleo, para regular la activación de Nrf2 sobre la secuencia ARE (Nguyen T y cols, 2009). Sin embargo, se requieren estudios futuros para determinar si Keap1 tiene un rol regulatorio sobre Nrf2 a nivel nuclear.

Nrf2 y citoprotección

La activación de Nrf2 hepático, asociado a la estimulación de las CK, concuerda con el aumento en la capacidad de unión al DNA de NF- κ B (Romanque y cols, 2003), factor transcripcional que gatilla la expresión de proteínas de fase aguda y citoquinas (Kang y cols, 2000; Gloire y cols, 2006). La función del sistema de señalización Nrf2/Keap1 en el hígado implica la activación de la expresión de enzimas relacionadas con la biotransformación y excreción de xenobióticos, entre ellos, fármacos o tóxicos y la neutralización de EROS, con una connotación de citoprotección (Klaassen y cols, 2010). Sin embargo, el estado de estrés oxidativo sostenido en el tiempo, como el relacionado con la exposición a xenobióticos y electrófilos, lleva a una desregulación del complejo Nrf2/Keap1, lo cual tiene la capacidad de afectar no sólo la respuesta hepática, sino que la de otros tejidos. Algunos estudios han reportado la existencia de mutaciones en Keap1 en el cáncer de mama, pulmón y vejiga, con la consecuente disminución de Keap1 funcional, acumulación de Nrf2 en el núcleo y activación de la expresión de enzimas de conjugación de fase-II y transportadores MRP, que contribuyen a la quimioresistencia (Wang X.J y cols 2008, Kaspar y cols., 2009). Del mismo modo, la inhibición de Nrf2, se asocia a lesiones por hiperoxia y daño pulmonar agudo. Al respecto, estudios en ratones nulos para Nrf2 evidencian susceptibilidad a la exposición de carcinógenos como benzopireno y aminas 4-hidroxibutílicas (Kaspar y cols. 2009).

En resumen, la estimulación de las CK por infusión de CC en el hígado implica generación de EROS, con activación temprana del sistema de señalización Nrf2. La activación de este sistema no sólo tiene importancia a nivel de los macrófagos hepáticos en el sentido de

mantener una viabilidad adecuada en condiciones de estimulación sostenidas, sino también a nivel de los hepatocitos. En este último caso, se visualizan dos vías de señalización: (i) EROS producidas en la RR de las CK estimuladas, las cuales pueden alcanzar los hepatocitos con activación de Nrf2 y otros factores transcripcionales como NF- κ B y AP-1 que median citoprotección, (ii) liberación de TNF- α que puede estimular la producción de EROS mitocondriales en células parenquimatosas, generando citoprotección por activación de factores redox-sensibles (Iles y cols 2002; Romanque y cols 2003 y 2011).

CONCLUSIONES

La preparación de hígado perfundido y aislado de rata operando en condiciones óptimas de viabilidad, corroborada por (i) la ausencia de alteraciones en la histoarquitectura hepática y (ii) la mínima liberación sinusoidal de LDH respecto a la del tejido hepático, permite determinar el funcionamiento de las CK. En estas condiciones, el CC infundido al hígado perfundido es fagocitado por las CK, lo que es confirmado por los estudios histológicos que evidencian la presencia de partículas de CC exclusivamente en las CK, induciéndose la RR de las CK la cual aumenta progresivamente en función del tiempo de infusión de CC.

Existe dependencia entre la activación de las CK y la inducción de su RR con la activación de Nrf2, lo que queda establecido por: (i) la disminución progresiva del contenido de Nrf2 citosólico y aumento del Nrf2 nuclear en el lapso de 10 minutos de estimulación, con el consecuente incremento significativo de la relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico, (ii) la correlación significativa establecida entre la RR y la activación de Nrf2. Los estudios de inactivación de las CK, por tratamiento con $GdCl_3$, sobre la activación de Nrf2 por la estimulación macrofágica no son concluyentes al no ser detectado Nrf2 en estas condiciones, lo que podría indicar una interacción inespecífica entre Gd^{+3} y Nrf2 conducente a su agregación y eliminación.

Nrf2 es un factor transcripcional de respuesta temprana ante condiciones pro-oxidantes, lo que podría favorecer un adecuado funcionamiento de los macrófagos e inducir protección en hepatocitos en condiciones pro-oxidantes sostenidas.

BIBLIOGRAFÍA

Aleksunes LM, Manautou JE (2007) Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol* 35(4):459-473.

Badger DA, Kuester RK, Sauer JM, Sipes IG (1997) Gadolinium chloride reduces cytochrome P450: relevance to chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicology* 121: 43-53.

Bergmeyer HU y Bernt E (1974) "Lactate dehydrogenase" in H.U Bergmeyer (editor) *Methods for Enzymatic Analysis*, New York: Academic Press, Vol 2, pp 574-579.

Bilzer M, Roggel F, Gerbes A (2006) Role of Kupffer cell in host defense and liver disease. *Liver Int* 26: 1175-1186.

Bradford, MAA (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation o microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem* 72: 248-260.

Cisternas F, Tapia G. Romanque P (2005) Early histological and functional effects of chronic copper exposure in rat liver *BioMetals* 18: 541-551.

Clària J, Titos E (2004) Kùpffer cell. *Gastroenterol Hepatol* 27(4):264-273.

Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK (2008) The Nrf2-Keap1 efence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology* 3; 246(1):24-33.

Cowper KB, Currin R, Dawson T (1990) A new method to monitor Kupffer-cell function continuously in the perfused rat liver Dissociation of glycogenolysis from particle phagocytosis. *Biochem. J.* 266: 141-147.

Decker K (1990) Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kùpffer cells). *Eur J Biochem* 192: 245-261.

De Minicis S, Brenner DA (2008) Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. *J Gastroenterol Hepatol* 1: 98-103.

Deryckere F, Gannon F (1994) A one-hour minipreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *BioTechniques* 16(3):405

Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47– 95.

Eggler AL, Liu G, Pezzuto JM, van Breemen RB, Mesecar AD (2005) Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(29):10070-5.

Fernandez V, Tapia G, Castillo I, Romanque P, Cartier-Ugarte D, Uribe S, Santander G, Vial M, Videla LA (2007a) Thyroid hormone preconditioning: Protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat. *Hepatology* 45: 170-177.

Fernández V, Reyes S, Bravo S, Sepúlveda R, Romanque P, Santander G, Castillo I, Varela P, Tapia G, Videla LA. (2007b) Involvement of Kupffer cell-dependent signaling in T3- induced hepatocyte proliferation in vivo. *Biol Chem* 388:831-837

Fernandez V, Videla LA (2008) Free Radical Pathophysiology, En: Álvarez S y Evelson P. (Eds). Thyroid hormone redox signaling and liver preconditioning. Cap 22, pp 401-416.

Fernandez V, Videla LA (2009) Kupffer Cell-Dependent Signaling in Thyroid Hormone Calorigenesis: Possible Applications for Liver Preconditioning. *Cur Signal Transd Ther* 4: 144-151.

Ferreira J, Tapia G, Videla LA (1998) Effects of the Kupffer cell inactivator gadolinium chloride on rat liver oxygen uptake and content of mitochondrial cytochromes. *FEBS Lett* 426: 263-265.

Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J (2006) NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 72:1493-1505.

György B (2009) Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. *J Hepatol* 51: 212–223.

Hardonk M.J, Dijkhuis F.W.J, Hulstaert C.E and Koudstaal J (1992) Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol* 52: 296-392.

Iles KE, Dickinson DA, Watanabe N, Iwamoto T, Forman HJ (2002) AP-1 activation through endogenous H₂O₂ generation by alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med* 32: 1304-1313.

Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh K, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997) An Nrf2/small maf heterodimers mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*; 236:313–322.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1:76-86.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M (2003) Keap1 regulates both cytoplasmic–nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* 8:379–391.

Jaiswal AK (2004) Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 36 (10):1199-1207.

Kang JL, Go YH, Hur KC, Castranova V (2000) Silica-induced nuclear factor-kappa B activation: involvement of reactive oxygen species and protein tyrosine kinase activation. *J Toxicol Environ Health* 60:27-46.

Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK (2009) Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 47(9):1304-1309.

Klaassen CD, Reisman SA (2010) Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1;244(1):57-65.

Kolios G, Vassilis V, Kouroumalis E (2006) Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* 12: 7413-7420.

Königsberg M (2007) Nrf2: La historia de un nuevo factor de Transcripción que responde a estrés oxidativo *Rev Edu Bioquím* 26, 18-25.

Lee JM, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA (2005) Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J* 19(9):1061-1066.

Maemura K, Zheng Q, Wada T, Ozaki M, Takao S, Aikou T, Bulkley GB, Klein AS, Sun Z (2005) Reactive oxygen species are essential mediators in antigen presentation by Kupffer cells. *Immunol Cell Biol* 83(4):336-343.

Mardones M, Valenzuela R, Romanque P, Covarrubias N, Anghileri F, Fernández V, Videla LA, Tapia G (2012) Prevention of liver ischemia reperfusion injury by a combined thyroid hormone and fish oil protocol. *J Nutr Biochem*, en prensa.

Meister A (1983) Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids. *Biochem Soc Trans* 11(6):793-794.

Nauseef WM (2008) Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J Biol Chem* 283(25):16961-16965.

Nguyen T, Nioi P, Pickett CB (2009) The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 284(20):13291-13295.

Qu W, Zhong Z, Goto M, Thurman RG (1996) Kupffer cell prostaglandin E2 stimulates parenchymal cell O2 consumption: alcohol and cell-cell communication. *Am. J. Physiol* 270: G574-G580.

Romanque P, Tapia G, Videla LA (2003) Kupffer cell stimulation in the isolated perfused rat liver triggers nuclear factor-kappa B DNA binding activity. *Redox Rep* 8: 341-346.

Romanque P., Cornejo P, Valdés S y Videla L.A (2011) Thyroid hormone Administration Induces Rat Liver Nrf2 Activation: Suppression by N-Acetylcysteine pretreatment. *Thyroid*. Jun;21(6):655-662.

Santibañez C (2010) Papel de las células de Kupffer en el precondicionamiento hepático inducido por L-3,3',5-triyodotironina (T3). Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Sies H, Mehlhorn R (1986) Mutagenicity of nitroxide-free radicals. *Arch Biochem Biophys* 15;251(1):393-396.

Singh S, Vrisni S, Singh BK, Rahman I, Kakkar OP (2010) Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radic Res* 44:1267-1288.

Stefanska J, Pawliczak R (2008) Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm* vol. 2008. article ID 106507, 10 pages.

Sun Z, Chin YE, Zhang DD (2009) Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Mol Cell Biol* 29: 2658-2672.

Tapia G, Pepper I, Smok G, Videla LA (1997) Kupffer cell function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat. *Free Radic Res* 26:267–279.

Tapia G, Troncoso P, Galleano M, Fernandez V, Puntarulo S, Videla LA (1998) Time course study of the influence of acute iron overload on Kupffer cell functioning and hepatotoxicity assessed in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 27:1311-1316.

Tapia G, Santibañez C, Farias J (2010) Kupffer-cell activity is essential for thyroid hormone rat liver preconditioning *Mol Cell Endocrinol* 323: 292–297.

Tsukamoto H, Lin M (1997) The role of Kupffer cells in liver injury. En: Wisse, E., Knook, D.L., Balabaud, C. (Eds.), *Cells of the Hepatic Sinusoid*, vol. 6. The Kupffer Cell Foundation, CE Leiden, The Netherlands, pp. 244–250.

Tsukamoto H (2002) Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. *Antioxid Redox Signal* 4:741–748.

Urtasun, R. y Nieto, N (2007) Células estrelladas hepáticas y estrés oxidativo. *Rev Esp Enferm Dig* 99: 223-230.

Venditti P, De Rosa R, Di Meo S (2003) Effect of thyroid state on H₂O₂ production by rat liver mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* 205: 185–192.

Venugopal R, Jaiswal AK (1996) Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14960-14965.

Videla LA, Troncoso P, Arisi AC, Junqueira BC (1997) Dose-dependent effects of acute lindano treatment on Kupffer cell function assessed in the isolated perfused rat liver. *Xenobiotica* 27:747-757.

Videla LA (2009) Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. *World J Hepatol* 1: 72-78.

Vrba J, Mondriansky M (2002). Oxidative burst of Kupffer cells: Target for liver injury treatment. *Biomed Papers* 146:15-20.

Wang JF, Komarov P, de Groot H (1993) Luminol chemiluminescence in rat macrophages and granulocytes: the role of NO, O₂/H₂O₂, and HOCl. *Arch Biochem Biophys* 304: 189–196.

Wang XJ, Suny Z, Villeneuve F, Zhang FZ, Yanjie Li and Zhang DD (2008) Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 29;6 1235–1243.

Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, Wakabayashi J, Maher J, Motohashi H, Yamamoto M (2008) Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol Cell Biol* 28: 2758-2770.

Yeligar SM, Machida K, Kaira VK (2010) Ethanol-induced HO-1 and NQO1 are differentially regulated by HIF-1 α and Nrf2 to attenuate inflammatory cytokine expression. *J Biol Chem* 285:35359-35373.

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

Zhang DD (2006) Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* 38:769-789.