



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“CAMBIOS CINÉTICOS EN LA ACTIVIDAD DE Nrf2 EN CÉLULAS DE HÍGADO DE RATA INDUCIDOS POR LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA DE HIERRO ( $\text{Fe}^{+3}$ )”

**PAULA ANDREA MORALES SANDOVAL**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario.  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales

PROFESORA GUÍA: DRA. VIRGINIA FERNÁNDEZ A.

**SANTIAGO, CHILE  
2013**



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“CAMBIOS CINÉTICOS EN LA ACTIVIDAD DE Nrf2 EN CÉLULAS DE HÍGADO DE RATA INDUCIDOS POR LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA DE HIERRO (Fe<sup>+3</sup>)”

## **PAULA ANDREA MORALES SANDOVAL**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales.

NOTA FINAL: .....

		NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA	: DRA. VIRGINIA FERNÁNDEZ	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: DR. LUIS VIDELA.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: DR. EDUARDO KESSI.	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**

2013

MEMORIA DE TÍTULO

**“CAMBIOS CINÉTICOS EN LA ACTIVIDAD DE Nrf2 EN CÉLULAS DE HÍGADO DE RATA INDUCIDOS POR LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA DE HIERRO (Fe<sup>+3</sup>)”**

**“Kinetic changes in the activity of Nrf2 in rat liver cells induced by subchronic administration of iron (Fe<sup>+3</sup>)”**

**Paula Andrea Morales Sandoval**

Laboratorio de estrés oxidativo y hepatotoxicidad, ICBM, Programa de Farmacología Molecular y clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

**Financiamiento**

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto FONDECYT N° 1110006

## RESUMEN

Nrf2 es un factor de transcripción que estimula la expresión de genes citoprotectores frente al estrés oxidativo (EOX). En condiciones homeostáticas Nrf2 está en el citoplasma formando un complejo con su inhibidor Keap1. Bajo condiciones de EOX moderado, este complejo se disocia, Nrf2 transloca al núcleo y se une al DNA, regulando la expresión de proteínas citoprotectoras, como hemoxigenasa-1. El hierro (Fe) es un micronutriente esencial que cataliza reacciones de óxido reducción, generando EOX celular. Se ha demostrado que la aplicación de un protocolo de tratamiento subcrónico con Fe, genera EOX transitorio y preacondiciona al hígado de rata frente a la isquemia reperusión (IR).

El objetivo de este estudio fue probar la hipótesis de que la administración subcrónica de Fe<sup>+3</sup> en ratas incrementa el estado de estrés oxidativo hepático activando al factor de transcripción Nrf2 y la consiguiente expresión de hemoxigenasa-1. Para tales efectos, se utilizó un protocolo de 6 dosis subcrónicas de Fe (50mg/kg *i.p.* en días alternados) o suero salino (controles) en ratas macho Sprague-Dawley y se evaluaron muestras hepáticas obtenidas 24 horas después de cada dosis. Los cambios cinéticos en el estado de EOX hepático se evidenciaron utilizando la medición espectrofotométrica del contenido total de equivalentes de glutatión reducido (GSH). La translocación nuclear de Nrf2 y sus posibles efectos, se evaluaron mediante la técnica de Western blot a través de la detección de cambios en las relaciones Nrf2 nuclear / Nrf2 citosólico y Keap1 nuclear / Keap1 citosólico y la expresión citosólica de hemoxigenasa-1.

Se observó un aumento en el EOX hepático, seguido de su normalización. En paralelo, la relación Nrf2 nuclear / Nrf2 citosólico incrementó significativamente, señalando su mayor disociación de Keap1 y translocación al núcleo; acompañado de un aumento citosólico de hemoxigenasa-1.

**Palabras clave: estrés oxidativo transitorio, hemoxigenasa-1, hepático, hierro, Keap1, Nrf2.**

## **ABSTRACT:**

Nrf2, a redox-sensitive transcription factor, regulates the expression of cytoprotective genes. Under homeostatic conditions, Nrf2 is bound in the cytoplasm to its inhibitor Keap1 (Nrf2/Keap1 complex). Under moderate oxidative stress (OS) conditions, the Nrf2/Keap1 complex is dissociated and Nrf2 is translocated to the nucleus and bound to DNA specific sequences (ARE) regulating the expression of cytoprotective proteins, such as heme oxygenase-1 (HO-1). Fe, an essential micronutrient, catalyses and triggers cellular OS. Protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat is afforded by a subchronic Fe protocol, in concomitance with the induction of transient/moderate OS.

The aim of this study was to test the hypothesis “subchronic Fe administration enhances liver oxidative stress status in the rat, activates transcription factor Nrf2, incrementing the expression of hemoxygenase-1, thus contributing to Fe-induced improvement of liver injury induced by IR”. Sprague Dawley male rats received six Fe doses (50 mg/kg *i.p* on alternate days) or saline (controls) and assessments were carried out 24 h after each Fe dose. Liver GSH was assessed spectrophotometrically and expressed as total reduced glutathione (GSH) equivalents. Nuclear translocation of Nrf2 and effects on hemoxygenase-1 content were evaluated by Western blot by assessing the changes in Keap1 nuclear / Keap1 cytosolic, Nrf2 nuclear /Nrf2 cytosolic ratios and cytosolic content of hemoxygenase-1.

Early enhancements (2 Fe doses) in liver OS, followed by its normalization were observed. These effects were paralleled by significant Increments in the Nrf2 nuclear / Nrf2 cytosolic ratio, indicating enhanced Nrf2 dissociation from Keap1 and translocation to the nucleus, an effect that may lead to the enhanced hemoxygenase-1 cytosolic content.

It is concluded that Fe-induced hepatoprotection in IR injury is mediated by early enhanced Nrf2 activation and hemoxygenase-1 expression.

**Key words: oxidative stress, heme oxygenase-1, hepatic, iron, keap1; Nrf2.**

## INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe), el metal de transición más abundante en nuestro organismo, es un micronutriente esencial y biocatalizador de importantes reacciones de óxido-reducción. Se caracteriza por promover el intercambio de electrones bajo condiciones aeróbicas, siendo esencial en niveles bajos para la fosforilación oxidativa mitocondrial y respuestas citoprotectoras. Además puede ser potencialmente tóxico, debido a la generación incontrolada de especies reactivas derivadas del oxígeno (EROS), cuando su capacidad de eliminación se ve superada (Aust *et al.*, 1985; Puntarulo, 2005). En solución acuosa el Fe se presenta en dos estados de oxidación,  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$ , lo que le permite actuar como catalizador en reacciones redox, al donar o aceptar electrones (Galatro y Puntarulo, 2007).

El transporte y almacenamiento de Fe incluye la participación de la transferrina, lactoferrina, ferritina y hemoproteínas, siendo el hígado uno de los principales sitios para su almacenamiento (Ferrali *et al.*, 1992; Galatro y Puntarulo, 2007). Bajo condiciones fisiológicas, el transporte sanguíneo del Fe es mediado por transferrina, proteína sérica que une con alta afinidad dos iones  $\text{Fe}^{+3}$  alcanzando un 30% de saturación, los cuales son incorporados a las células vía receptores para transferrina, reducidos a  $\text{Fe}^{+2}$  y liberados al citosol. Una fracción de este Fe, correspondiente al 3-5% del total celular, permanece unida a moléculas de bajo peso molecular tales como citrato, ATP, pirofosfato y ácido ascórbico, constituyendo el llamado “*pool* de Fe lábil”, el que puede promover la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno (EROS) en la célula a través de reacciones de Fenton/Haber-Weiss desarrollando un estrés oxidativo concomitante (Pantopoulos y Hentze, 2000; Kruszewski, 2004; Galatro y Puntarulo, 2007). Las EROS peroxidan diversas biomoléculas, entre ellas proteínas, lípidos de membranas y DNA, lo que puede determinar la muerte celular. A este nivel, moléculas antioxidantes son efectivas en el tratamiento de estos desórdenes (Sies, 1997). El exceso de Fe intracelular es secuestrado por ferritina, la principal proteína para el almacenamiento de Fe, cumpliendo así un papel clave en la prevención de la toxicidad desencadenada por el Fe (Puntarulo, 2005).

Se ha propuesto recientemente que el estrés oxidativo representa una forma de hormesis, produciendo efectos biológicos beneficiosos cuando se generan bajos niveles de EROS y respuestas perjudiciales si los niveles son elevados o después de una exposición prolongada (Videla, 2010). En efecto, aumentos moderados y reversibles de las EROS en un período de tiempo definido pueden ejercer regulación de la expresión génica con respuestas citoprotectoras (Dröge, 2002), protegiendo así a órganos de los efectos perjudiciales (Das y Das, 2008).

La lesión por isquemia-reperfusión (IR) se produce al privar de flujo sanguíneo a un órgano y luego reestablecerlo. Las lesiones producidas durante la fase de isquemia se relacionan, sobre todo, con la privación de nutrientes y oxígeno que reducen los fenómenos respiratorios celulares y pueden llegar a causar, en pocos minutos, lesiones irreversibles en órganos vitales. La reperfusión significa la nueva entrada de oxígeno, que genera una respuesta inflamatoria que no solo daña el órgano sometido a isquemia, sino también órganos distantes (Grande *et al.*, 2006). La lesión hepática por IR es un fenómeno complejo en el que contribuyen gran cantidad de factores, haciendo difícil conseguir protección efectiva enfocándose a mecanismos individuales. Respecto a esto, el desarrollo del preacondicionamiento hepático ha sido explorado extensivamente los últimos años como una estrategia protectora para mejorar la resistencia de las células hepáticas a los eventos de IR, asociados a cirugías bajo exclusión vascular (Fernández *et al.*, 2007). Entre otras estrategias, esto se ha logrado a través de la pre-exposición del hígado a condiciones que gatillan estados de estrés oxidativo moderado, como isquemia transitoria (Peralta *et al.*, 1997) hipertermia (Terajima *et al.*, 2000), administración de hormona tiroidea ( $T_3$ ) (Fernández *et al.*, 2007) o condiciones prooxidantes inducidas por doxorubicina (Ito *et al.*, 2000), hidroperóxido de tert-butilo (Rüdiger *et al.*, 2003), terapia de oxígeno hiperbárico (Yu *et al.*, 2005), ozono (Ajamieh *et al.*, 2004) y suplementos de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (Zúñiga *et al.*, 2011).

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio señalan que la administración de  $Fe^{+3}$  a ratas induce un estrés oxidativo moderado y transitorio, constituyendo una estrategia de preacondicionamiento frente a la IR hepática (1 h

de isquemia, seguida de 20 h de reperfusión) la cual puede ser de relevancia clínica (Galleano *et al.*, 2011).

Las respuestas anteriores, que representan mecanismos adaptativos para restablecer la homeostasis redox y promover la supervivencia celular, se producen a través de la recuperación de la vía de señalización regulada por el factor de transcripción redox-sensible NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B), inhibida durante la IR, y puede constituir una alternativa relevante de preconditionamiento para la cirugía hepática bajo exclusión vascular (Galleano *et al.*, 2011)

Además de los mecanismos citoprotectores desencadenados por la unión al DNA de NF- $\kappa$ B, la inducción de estrés oxidativo moderado puede regular la expresión de diferentes proteínas protectoras, incluyendo enzimas antioxidantes a través de la activación del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) (Itoh *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2004).

Nrf2 participa en respuestas de citoprotección y regula positivamente la transcripción basal e inducible de muchos genes citoprotectores, entre los cuales se incluyen aquellos involucrados en la metabolización de drogas, detoxificación y defensa frente al estrés oxidativo (enzimas antioxidantes), reacciones de conjugación de la fase-II y transportadores de la fase-III. De esta manera la expresión de los genes relacionados con la citoprotección puede rápidamente y de forma coordinada neutralizar, detoxificar y eliminar los diversos xenobióticos potencialmente tóxicos (Klaassen y Reisman, 2010; Li *et al.*, 2008). El análisis genómico de las secuencias de los promotores de dichos genes ha revelado la presencia de una secuencia de consenso para la unión de Nrf2, llamada elemento de respuesta antioxidante (ARE) (Zhang, 2006). En el ratón, Nrf2 está estructurado por 373 aminoácidos y posee una masa molecular aparente de 68 kDa. Los Nrfs pertenecen a una familia de proteínas básicas con un característico cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal, siendo la región básica responsable de la unión al DNA, mientras que la región ácida sería requerida para la activación transcripcional. Se ha descrito que los Nrfs tienen seis dominios conservados asociados a su regulación negativa, los cuales han sido denominados Neh y están localizados en la región N-terminal (Zhang, 2006). En condiciones fisiológicas Nrf2



se encuentra secuestrado en el citoplasma por su inhibidor, la proteína Keap1 (Zhang, 2006). En respuesta a electrófilos y en períodos de estrés oxidativo, Nrf2 es liberado desde el citoplasma y transloca al núcleo para unirse a AREs ubicados en regiones promotoras de genes blanco (Aleksunes y Manautou, 2007).

Keap1 es una proteína de 624 aminoácidos con una masa molecular de 69 kDa y cinco dominios, dos de los cuales, BTB-POZ y Kelch, son canónicos y Kelch aparece repetido seis veces. Posee una región N-terminal, región C-terminal y la región de intervención, la cual posee residuos de cisteína capaces de oxidarse y de registrar el estado oxidativo de la célula. Keap1 corresponde a una proteína citoplasmática que se une a la actina del citoesqueleto, reteniendo y secuestrando pasivamente a Nrf2 en el citoplasma en condiciones fisiológicas (Zhang, 2006). En respuesta a electrófilos y en períodos de estrés oxidativo, Nrf2 es liberado desde el citoplasma y transloca al núcleo formando un heterodímero con proteínas Maf para unirse a AREs ubicados en regiones promotoras de genes blanco (Aleksunes y Manautou, 2007; Zhang, 2006). La degradación de Nrf2 ocurre mediante la vía de ubiquitinación y reconocimiento del proteosoma (Kobayashi *et al.*, 2006), proceso en el cual Keap1 también desempeña un papel activo en la orientación de su ubiquitinación y degradación proteosomal (Cullinan *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que Nrf2 regula la expresión de la hemoxigenasa-1 (HO-1) (Alam *et al.*, 1999). Esta enzima cataliza la etapa limitante en el catabolismo del grupo hemo a monóxido de carbono (CO), Fe y biliverdina/bilirrubina, en cerebro y en otros tejidos, promoviendo el depósito mitocondrial de Fe, protegiendo a las células al degradar metaloporfirinas prooxidantes y facilitando la salida de Fe desde las células (Otterbein *et al.*, 2003; Tapia, 2007). Los productos de la acción de HO-1, en particular CO y biliverdina/bilirrubina, ejercen efectos protectores frente al estrés oxidativo en diversos tejidos y órganos, por lo cual se ha sugerido que la inducción de la expresión de HO-1 constituye un factor de hepatoprotección frente a agentes deletéreos tales como el tetracloruro de carbono, el acetaminofeno y metales pesados (Farombi y Surh, 2006).

Teniendo en consideración que la activación de Nrf2 se produce bajo la producción moderada de EROS, como aquella observada en el preacondicionamiento con Fe, la hipótesis de este estudio fue la siguiente:

“La administración subcrónica de Fe en ratas incrementa el estado de estrés oxidativo hepático, activando al factor de transcripción Nrf2 y la expresión de hemoxigenasa-1, contribuyendo así a mejorar el daño hepático inducido por la IR”.

Para poner a prueba la hipótesis descrita, se utilizaron muestras de hígado de ratas sometidas a un tratamiento subcrónico con  $Fe^{+3}$ , y se evaluó la relación entre la inducción de EOX hepático moderado, mediante cambios en el contenido de equivalentes totales de glutatión reducido (GSH), con la translocación al núcleo de Nrf2 disociado de su inhibidor Keap1, a través de cambios en los contenidos citosólico y nuclear de Nrf2 y Keap1. Estos resultados se relacionaron con cambios en la expresión citoplasmática de hemoxigenasa-1.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1- Financiamiento.

El presente estudio fue financiado por el proyecto FONDECYT N° 1110006: "Estrategias de preconditionamiento para proteger al hígado frente al daño producido por isquemia-reperusión" y se realizó en el "Laboratorio de estrés oxidativo y hepatotoxicidad" del Programa de Farmacología Clínica y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### 2- Animales de experimentación.

Para este estudio se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (Bioterio Central, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) con pesos de 180-200g., las cuales contaron con temperatura ambiental controlada y fueron expuestas a ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Se les proporcionó dieta sólida estándar (Alimentos Champion S.A., Santiago) y agua *ad libitum*.

La suplementación con Fe contempló la administración por vía intraperitoneal (*i.p.*) de una a seis dosis de 50 mg/kg de Fe-dextrano, diluido en solución salina tamponada a pH 7,4 (tampón fosfato salino: PBS), día por medio (grupo tratado), durante un período total de diez días (Figura 1). El grupo control recibió volúmenes equivalentes de solución salina.

Los grupos experimentales para los estudios cinéticos fueron los siguientes:

- Grupo (a): control (dosis isovolumétricas de solución salina). Tres animales.
- Grupo (b): 1 dosis de Fe-dextrano. Cuatro animales.
- Grupo (c): 2 dosis de Fe-dextrano. Cinco animales.
- Grupo (d): 3 dosis de Fe-dextrano. Cuatro animales.
- Grupo (e): 4 dosis de Fe-dextrano. Cuatro animales.
- Grupo (f): 5 dosis de Fe-dextrano. Cuatro animales.
- Grupo (g): 6 dosis de Fe-dextrano. Tres animales.

En cada grupo experimental las muestras hepáticas fueron obtenidas de animales anestesiados [1 ml/kg *i.p.* de zolazepam clorhidrato (25 mg/ml) y tiletamina clorhidrato (25 mg/ml) (Zoletil 50; Virbac S/A, Carros, Francia)] 24 horas posteriores a la última dosis de Fe.

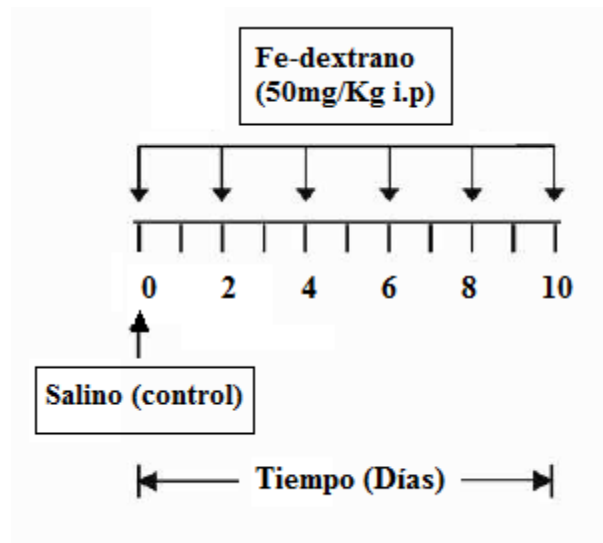


Figura 1: Protocolo experimental. Ratas macho Sprague-Dawley recibieron solución salina a los 0, 4 y 10 días (tiempo cero, controles) o Fe-dextrano (50mg/kg) a los 0, 2, 4, 6, 8, y 10 días.

El presente estudio contó con la aprobación del comité de Bioética de la Facultad de Medicina sobre investigación en animales (Nº CBA 0381 FMUCH) y cumplió con los protocolos de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Academy of Sciences, NIH Publication 86-23, revisado 1985).

### 3- Evaluación histológica del depósito hepático de Fe.

Muestras de hígado obtenidas 24 horas después de 2, 3 y 6 dosis de Fe, se fijaron en formalina tamponada con fosfato. Luego fueron embebidas en parafina y teñidas con reactivo de Perls.

### 4- Cambios cinéticos en parámetros de estrés oxidativo hepático.

En muestras de hígado, perfundido *in situ* con una solución fría que contenía 150 mM KCl y 5 mM Tris (pH 7.4) para remover la sangre, se evaluó el contenido de

equivalentes totales de glutatión reducido (GSH). Para ello se preparó homogeneizados hepáticos desproteinizados ( $\text{HClO}_4$  1N), seguido de neutralización ( $\text{K}_3\text{PO}_4$  1,75M). El contenido de GSH se evaluó mediante la técnica autocatalítica descrita por Tietze (Tietze, 1969), utilizando la reacción catalizada por glutatión reductasa en presencia de NADPH, la cual reduce al glutatión oxidado (GSSG) y genera dos moles de GSH/mol de GSSG. La reacción posterior del GSH con DTNB (ácido 5,5' ditiobis-2-nitrobenzoico) genera TNB compuesto coloreado cuya formación se registra por el aumento de absorbancia a 412 nm. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{moles}$  de GSH/g de hígado.

#### **5- Cambios cinéticos de los contenidos hepáticos de Nrf2 y Keap1, citosólico y nuclear, y de hemoxigenasa-1 citosólica, en ratas suplementadas con Fe dextrano.**

Para realizar este objetivo, las muestras hepáticas obtenidas 24 horas posteriores a la dosis final de Fe, fueron congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a  $-80^\circ\text{C}$ .

Con el fin de realizar los ensayos Western blot para Nrf2 y Keap1, en fracciones citosólica y nuclear, y el de hemoxigenasa-1, se obtuvieron extractos proteicos de ambas fracciones desde homogeneizados de hígado en 5 ml de tampón A [Hepes 10 mM pH 7,9, Nonidet P-40 al 0,6%, NaCl 150 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 0,5mM], seguido de centrifugación (30 s, 2000 x g,  $4^\circ\text{C}$ ) (Deryckere y Gannon, 1994) e incubación (5 minutos) del sobrenadante en hielo y posterior centrifugación (5 minutos, 5000 x g,  $4^\circ\text{C}$ ). El sobrenadante, que corresponde al extracto de proteínas citosólicas, se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$ . El sedimento se resuspendió en tampón B [Hepes 20 mM pH 7,9, glicerol al 25%, NaCl 420 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,2 mM, EDTA 0,2 mM, ditiotreitól 0,5 mM, PMSF 0,5 mM, benzamidina 2 mM y 5 mg/ml de inhibidores de proteasas (pepstatina, leupeptina y aprotinina)], seguido de incubación en hielo (20 minutos) y centrifugación (30 segundos, 5000 x g,  $4^\circ\text{C}$ ). El sobrenadante de dicha centrifugación corresponde al extracto de proteínas nucleares.

La concentración de proteínas en ambas fracciones se determinó con el reactivo de Bradford (Winkler Ltda. USA), previa dilución (PBS) de las muestras, 1:500 para extractos citosólicos y 1:10 para proteínas nucleares, seguido de la adición del reactivo de Bradford (1 mL) a 40 µl de extracto proteico, y registro de la absorbancia (590 nm). Se utilizó una curva de calibración, ajustada según datos registrados en nuestro laboratorio.

Para los ensayos Western blot se utilizó 50 µg de proteínas citosólicas (fracción citosólica de Nrf2, Keap1 y hemoxigenasa-1) y 35 µg de proteínas nucleares (fracción nuclear de Nrf2 y Keap1). Estas proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12% mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970), transferidas a membranas de nitrocelulosa (75 mA, durante toda la noche) y luego bloqueadas (una hora, temperatura ambiente) con TBS que contiene 5% de albúmina bovina sérica. En todos los ensayos se utilizó marcadores de peso molecular (20 a 118 kDa) y los geles fueron teñidos con azul de Coomassie para controlar la integridad de las proteínas. La tinción con rojo Ponceau indica la presencia de proteínas en las membranas de nitrocelulosa, las que se lavaron con TBS que contiene 0,1% de Tween-20, e hibridadas con anticuerpos policlonales de conejo para Nrf2 (Abcam, Cambridge, MA), Keap1 (Abcam, Cambridge, MA) y hemoxigenasa-1 (Santa Cruz Biotechnology, CA) y anticuerpos monoclonales de conejo tanto para β-actina (Abcam, Cambridge, MA), control de carga para citosol, como para lámina A/C (Abcam, Cambridge, MA) control de carga para núcleo. Luego de lavados sucesivos los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron mediante peroxidasa anti-IgG de conejo, y la quimioluminiscencia se detectó con un kit de detección (Pierce, Rockford, IL). Las bandas fueron analizadas mediante densitometría usando *Gel Documentation System, Biosens SC-750* (Shanghai Bio-Tech Co., Ltda., China).

## **6- Análisis Estadístico.**

Todos los resultados mostraron una distribución Gausiana según el test de Kolgomorov-Smirnov y se expresaron como promedios ± error estándar de la media (ESM) para tres a cinco animales por grupo. La significancia estadística de las diferencias entre los valores promedios de los diferentes grupos experimentales fue

determinada por análisis de varianza (ANDEVA) unifactorial seguido del test de Newman-Keuls (GraphPad Prism versión 2.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) con un nivel de significancia de 5 % ( $p < 0,05$ ). El análisis de la asociación entre diferentes variables fue efectuado mediante la determinación del coeficiente de correlación (r) de Pearson.

## RESULTADOS

### 1- Cambios en depósitos hepáticos de hierro: análisis histológico.

El protocolo subcrónico de Fe determinó un aumento progresivo de los depósitos hepáticos de este metal (Figura 2).

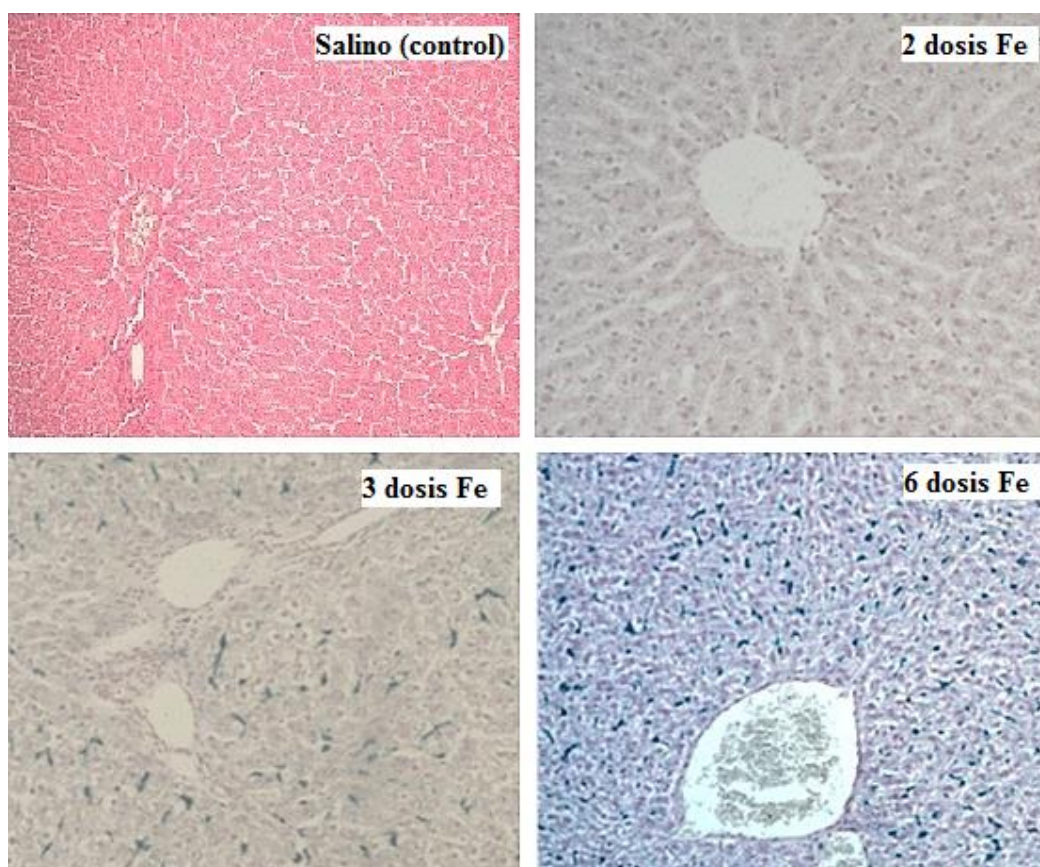


Figura 2. Muestras representativas de hígado, obtenidas de animales sometidos a 2, 3 o 6 dosis de Fe y salino (control). Muestras fueron teñidas con reactivo de Perls (aumento original 400x).



## 2- Cambios en el contenido hepático de equivalentes totales de glutatión reducido (GSH), gatillados por el protocolo subcrónico de Fe dextrano.

El estudio cinético evidencia una disminución significativa de 33% en el contenido hepático de GSH luego de 2 dosis de Fe, con normalización de este parámetro luego de 3 dosis, señalando el desarrollo de un estrés oxidativo hepático reversible (Figura 3).

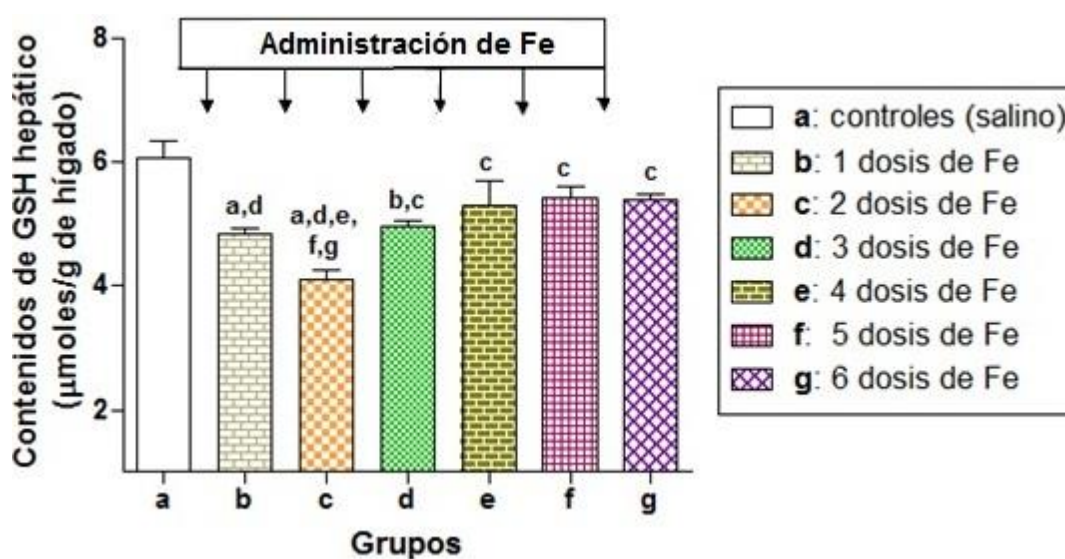


Figura 3: Cinética de cambios en el contenido hepático de equivalentes totales de glutatión reducido (GSH). Los animales recibieron 1 a 6 dosis de Fe-dextrano y las muestras fueron extraídas 24 horas después de cada dosis. Los resultados están expresados como promedios  $\pm$  SEM, con un tamaño muestral de 3 a 5 animales por grupo. Las diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA unifactorial y test de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ) se indican con las letras que identifican a cada grupo experimental.

### 3- Cambios cinéticos en contenidos citosólico y nuclear del Nrf2 hepático.

El contenido de Nrf2 citosólico presentó un aumento transitorio y significativo de 80% ( $p < 0,05$  respecto a controles) luego de la administración de 3 dosis de Fe, con una posterior normalización de dicho parámetro (Figura 4 A), los que se asociaron con aumentos progresivos del contenido nuclear de este factor, con efectos máximos luego de 3 y 4 dosis de Fe (290%) ( $p < 0,05$  respecto a controles), y normalización luego de la última dosis de Fe (Figura 4 B).

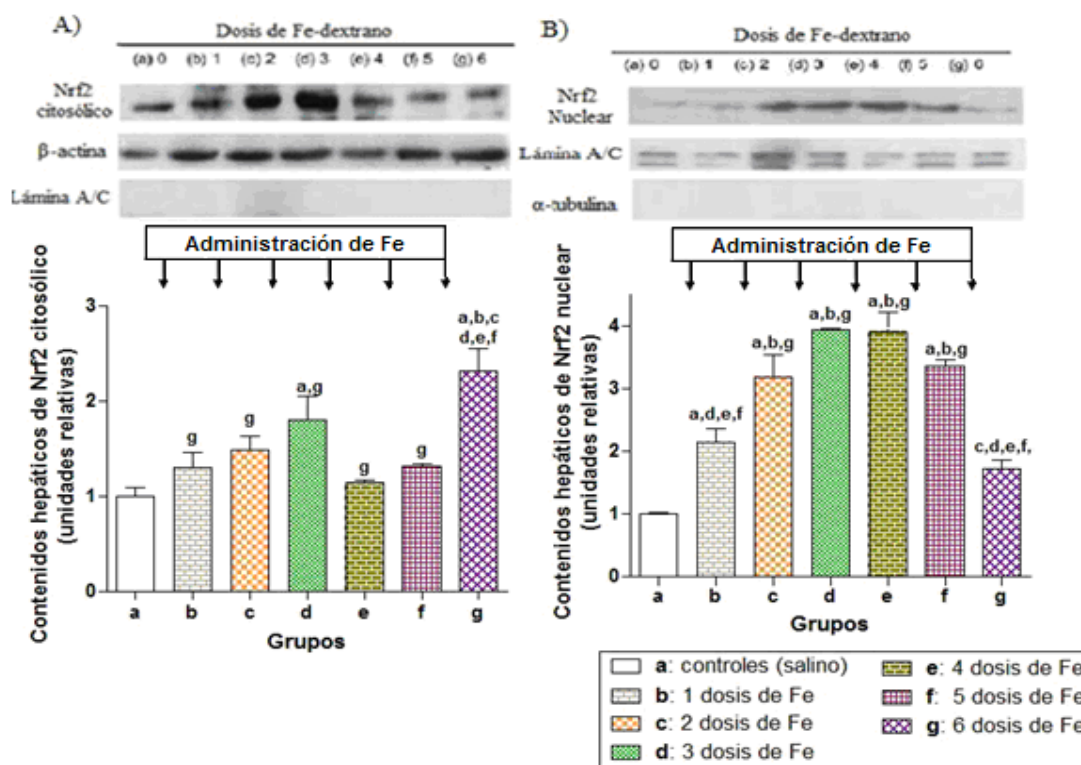


Figura 4: Cambios en contenidos citosólico (A) y nuclear (B) de Nrf2 en hígado de ratas tratadas con Fe (1 a 6 dosis), según se indica en la figura 1. (A) Niveles proteicos de Nrf2 citosólico (68 kDa),  $\beta$ -actina (43kDa), y lámina A/C (65 kDa) (panel superior) y cinética del contenido citosólico de Nrf2 (panel inferior). (B) Niveles proteicos de Nrf2 nuclear, lámina A/C, y  $\alpha$ -tubulina (52 kDa) (panel superior) y cinética del contenido nuclear de Nrf2 (panel inferior). Los valores son promedios  $\pm$  ESM para 3 a 5 animales por grupo. Las diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA unifactorial y test de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ) se indican con las letras que identifican a cada grupo experimental.

La figura 5 muestra los cambios cinéticos en la relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico, observándose un aumento progresivo con valor máximo (240% respecto a controles) luego de 4 dosis de Fe ( $p < 0,05$  respecto a controles).

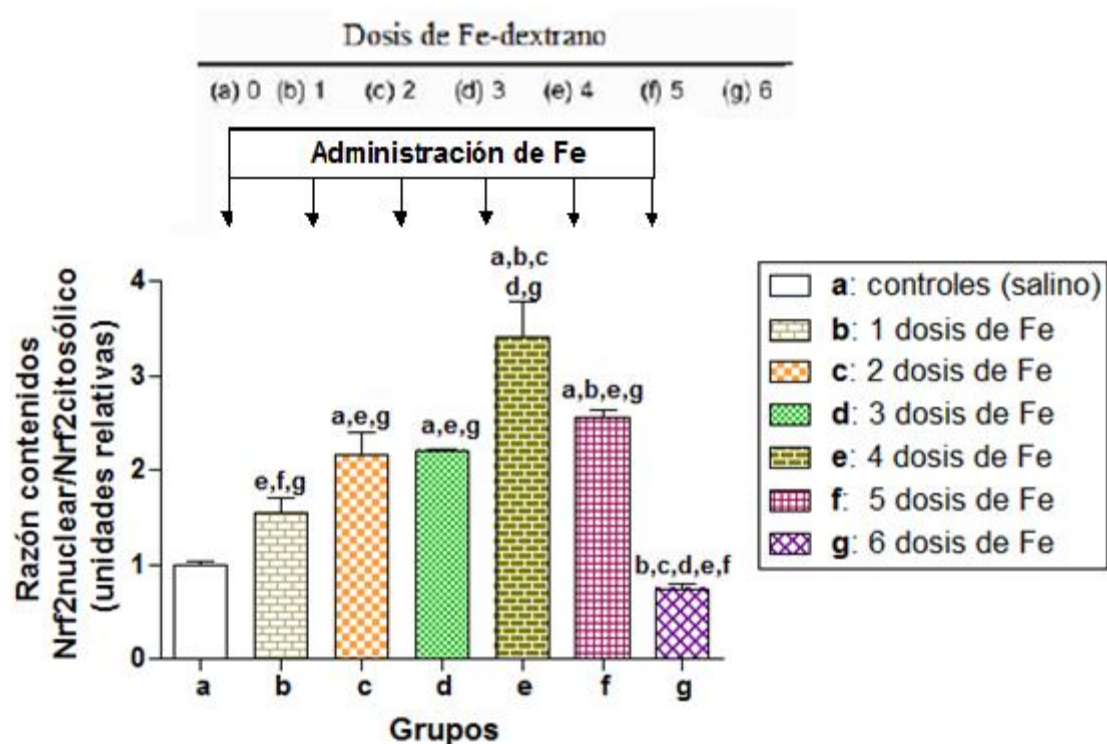


Figura 5: Cambios cinéticos de la relación Nrf2nuclear/Nrf2citosólico. Los valores son promedios  $\pm$  ESM para 3 a 5 animales por grupo. Las diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA unifactorial y test de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ) se indican con las letras que identifican a cada grupo experimental.

#### 4- Cambios cinéticos de contenidos citosólico y nuclear de Keap1 hepático.

El tratamiento subcrónico con Fe indujo cambios en el contenido hepático de Keap1, tanto a nivel citosólico como a nivel nuclear. En relación a controles, la fracción citosólica aumentó significativamente (67%) luego de 2 y 3 dosis de Fe, con normalización luego de 4 y 5 dosis y posterior aumento (55%,  $p < 0,05$ ) luego de 6 dosis (Figura 6 A). A nivel nuclear, Keap1 alcanzó un incremento de 64% después de 3 dosis de Fe, con posterior normalización, luego de 4 a 6 dosis de Fe (Figura 6 B)

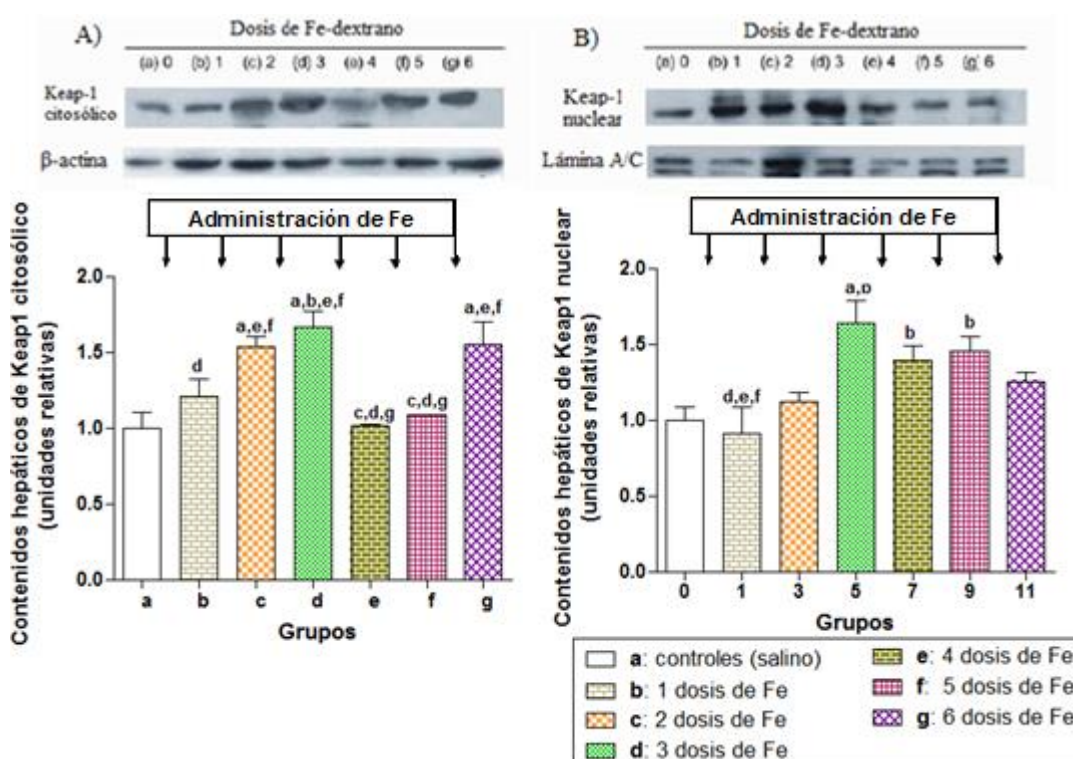


Figura 6: Cambios en contenidos citosólico (A) y nuclear (B) de Keap1 en hígado de ratas tratadas con Fe (1 a 6 dosis), según se indica en la figura 1. (A) Niveles proteicos de Keap1 citosólico (70 kDa),  $\beta$ -actina (43kDa), y lámina A/C (65 kDa) (panel superior) y cinética de los contenidos citosólicos de Keap1 (panel inferior). (B) Niveles proteicos de Keap1 nuclear, lámina A/C, y  $\alpha$ -tubulina (52 kDa) (panel superior) y cinética del contenido nuclear de Keap1 (panel inferior).

La figura 7 muestra que la relación de Keap1nuclear/Keap1citósólico permanece comparable a valores control en todos los grupos experimentales.

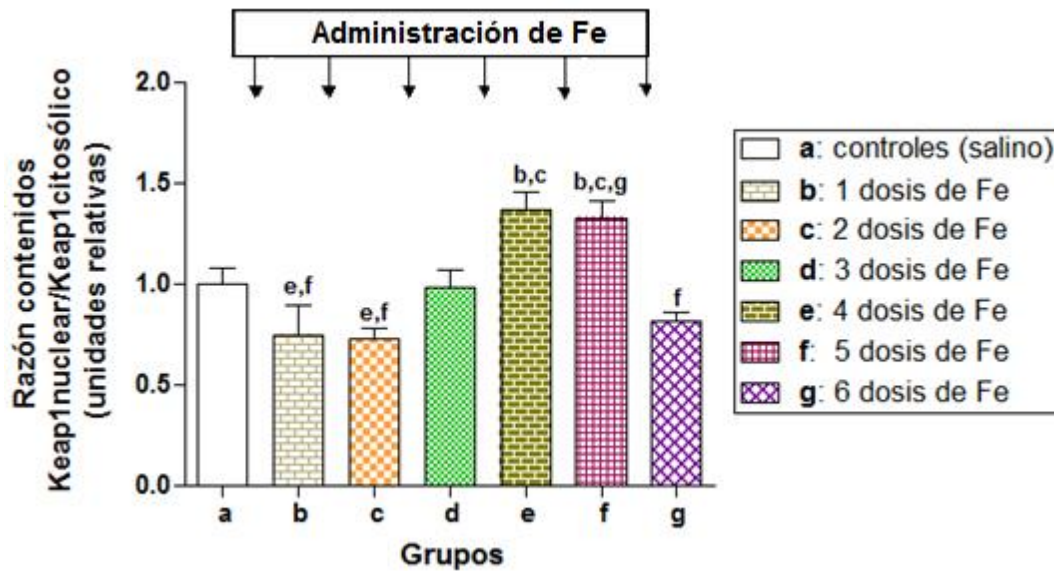


Figura 7: Cambios cinéticos de la relación Keap1nuclear/Keap1citósólico. Los valores son promedios  $\pm$  ESM, para 3 a 5 animales por grupo. Las diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA unifactorial y test de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ) se indican con las letras que identifican a cada grupo experimental.

Por otra parte, la relación Keap1/Nrf2 nuclear disminuyó significativamente (58% a 65%) luego de 1 a 5 dosis de Fe, para volver a valores control después de la última dosis de Fe (Figura 8).

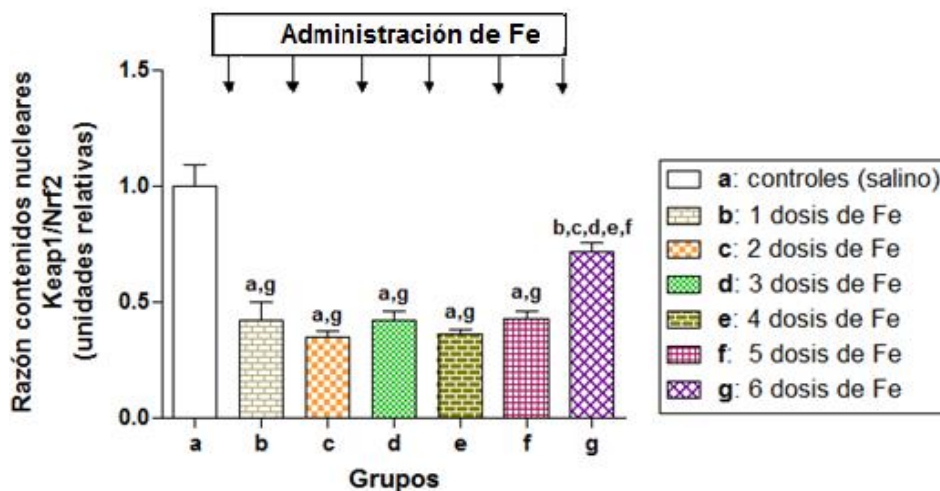


Figura 8: Cinética de la relación contenido nuclear de Keap1/Nrf2. Los valores son promedios  $\pm$  ESM, para 3 a 5 animales por grupo. Las diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA unifactorial y test de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ) se indican con las letras que identifican a cada grupo experimental.

### 5- Cambios en el contenido hepático de hemoxigenasa-1

El protocolo de Fe subcrónico incrementó progresiva y significativamente el contenido hepático de hemoxigenasa-1, con efecto máximo (63%) luego de 3 dosis Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico (Figura 9). Más aún, ambos parámetros (Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico y hemoxigenasa-1) se correlacionaron significativamente ( $r = 0,82$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 10).

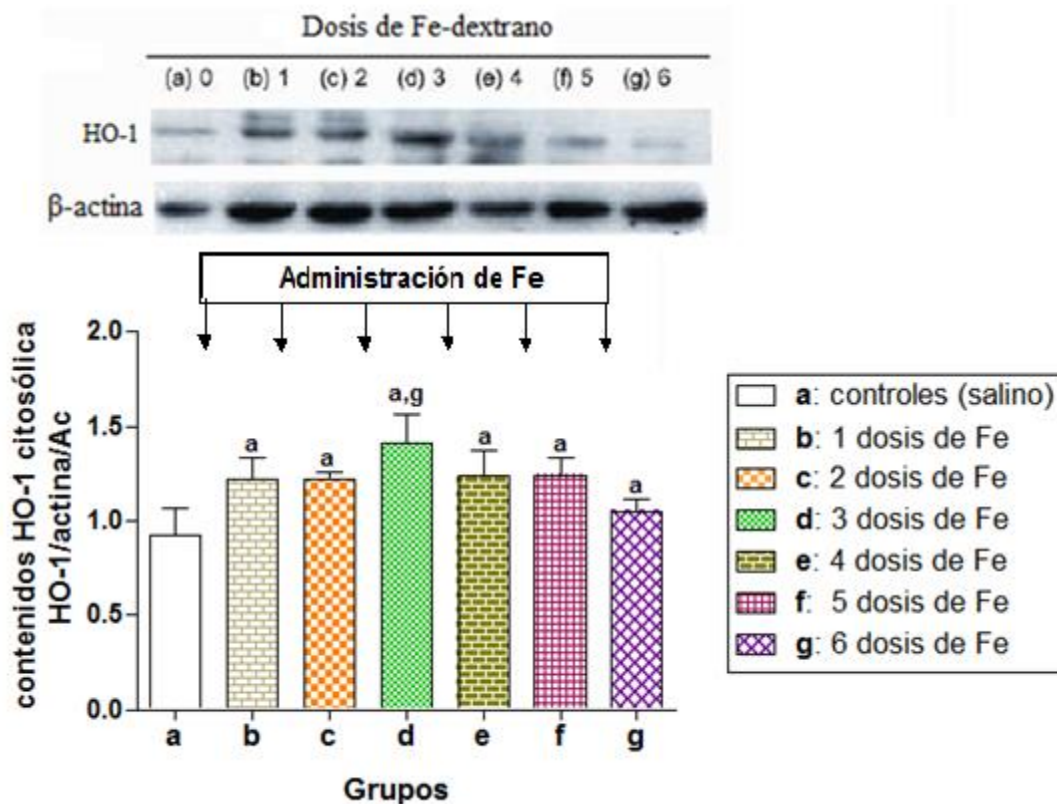
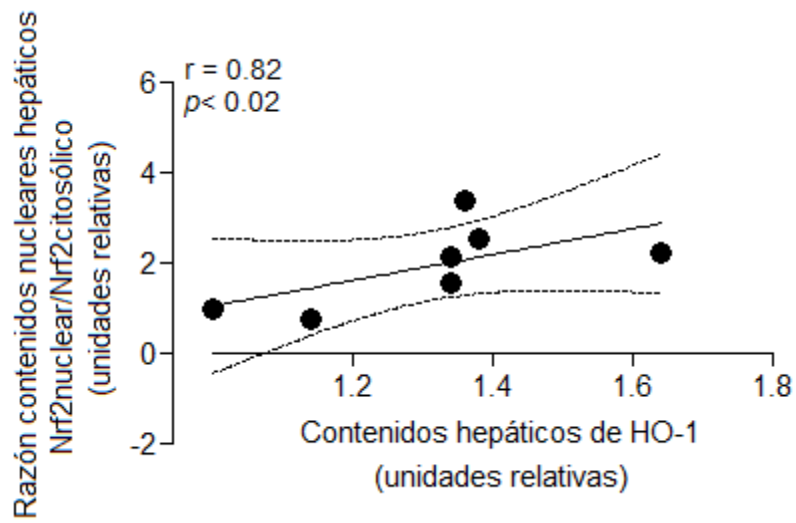


Figura 9: Cambios en contenido citosólico de hemoxigenasa-1 (HO-1) en hígado de ratas tratadas con Fe (1 a 6 dosis), según se indica en la figura 1. Niveles proteicos de HO-1 (32 kDa) y  $\beta$ -actina (43kDa) (panel superior) y cinética del contenido de HO-1 (panel inferior). Los valores son promedios  $\pm$  ESM, para 3 a 5 animales por grupo. Las diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA unifactorial y test de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ) se indican con las letras que identifican a cada grupo experimental.



**Figura 10: Correlación entre la relación de contenido Nrf2 nuclear / citosólico y el contenido HO-1. La línea punteada indica los límites de confianza de la correlación, obtenida mediante el análisis de correlación de Pearson ( $r$ , coeficiente de correlación de Pearson).**

## DISCUSIÓN

El desarrollo del preacondicionamiento hepático ha sido explorado extensamente durante los últimos años como una estrategia protectora para mejorar la resistencia de las células hepáticas a los eventos de IR, asociados a cirugías bajo exclusión vascular (Fernández *et al.*, 2007). A este nivel, la inducción de respuestas de defensa celular por parte del factor de transcripción Nrf2, cobra importancia por su capacidad de mediar respuestas de defensa frente a efectos adversos gatillados por agentes oxidantes exógenos y/o electrofílicos, contribuyendo a la mantención de la homeostasis redox y representando uno de los más eficientes mecanismos de citoprotección frente a la citotoxicidad (Nguyen *et al.*, 2009; Niture *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010; Zhang, 2006).

La sobredosis de hierro se ha relacionado con diversas lesiones hepáticas tales como fibrosis y cirrosis, además de generar diversos daños en otros órganos. Bajo este contexto, el estrés oxidativo y la citotoxicidad se desencadena en el hígado de rata cuando el hierro se administra en dosis de 200 mg/kg y 500 mg/kg (Galleano y Puntarulo, 1994). Frente a esta situación, se producen elevadas cantidades de ERO y ERN lo que puede dar lugar a cambios persistentes en la transducción de las señales y en la expresión génica (Dröge, 2002), de modo que la vía de señalización de Nrf2 con sus efectos citoprotectores se ve superada. Por otra parte, se ha indicado que dosis de 100-125 mg/kg de hierro administradas por vía intramuscular o endovenosa (100-125 mg/kg, 1-3 veces/semana durante 4-12 semanas) son bien toleradas terapéuticamente en tratamientos de anemia en humanos (Silverstein y Rodgers, 2004; Bayraktar y Bayraktar, 2010). Por lo tanto, el protocolo subcrónico de hierro utilizado en este trabajo (50 mg/Kg) podría constituir una estrategia de preacondicionamiento adecuada para la aplicación clínica, debido a que los efectos secundarios son mínimos (Galleano y Puntarulo, 1994; Puntarulo, 2005; Puntarulo y Galleano 2009).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio revelaron que el tratamiento subcrónico con Fe induce un estrés oxidativo moderado transitorio y constituye además una estrategia de preacondicionamiento frente a la isquemia reperusión (IR) hepática en la rata, aumentando las concentraciones de Fe lábil en



el hígado y permitiendo la recuperación de la actividad del factor de transcripción redox sensible NF- $\kappa$ B, disminuída por la IR (Galleano *et al.*, 2011). Bajo condiciones similares, en este trabajo se logró demostrar que la administración subcrónica de Fe a ratas, genera estrés oxidativo hepático transitorio e incrementa la translocación desde el citosol al núcleo del factor de transcripción redox sensible Nrf2, mecanismo que es considerado una etapa de activación para factores de transcripción. La administración de Fe utilizando un protocolo subcrónico, generó un estado de estrés oxidativo transitorio hepático como lo evidencia la respuesta cinética obtenida para el contenido de GSH total hepático. En este sentido, se ha demostrado que la administración de nitroacetato férrico a ratones génicamente modificados y carentes de Nrf2 (Nrf2  $-/-$ ) incrementa el estado de estrés oxidativo junto con disminuir los niveles de GSH y la actividad glutamato cisteína ligasa, enzima clave en la síntesis de GSH (Kanki *et al.*, 2008), lo que permite dimensionar la importancia del Nrf2 como generador de respuestas citoprotectoras antioxidantes.

Paralelo al descenso del GSH, la cuantificación de Nrf2 evidenció un aumento significativo y progresivo (2 a 4 dosis de Fe) en la relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico, lo que sugiere su translocación al núcleo, en paralelo al incremento en el estado de estrés oxidativo hepático, proceso consistente con la activación de Nrf2 (Romanque *et al.* 2011) producto del aumento en la disociación del complejo Nrf2-Keap1 gatillada por el estado pro-oxidante (Niture *et al.* 2010). El incremento en el Nrf2 nuclear, inducido por Fe, no fue acompañado por cambios en el contenido nuclear de Keap1, inhibidor de Nrf2, observándose una disminución significativa (58% a 65%) en la relación nuclear Keap1/Nrf2 luego de 1 a 5 dosis. Estos cambios se pueden interpretar como un mayor aumento en el contenido de Nrf2 en el núcleo, respecto a su inhibidor, cambios que favorecen la unión de Nrf2 a secuencias específicas del DNA, conocidas como elementos de respuesta antioxidante (ARE), presentes en genes que codifican proteínas antioxidantes y detoxificantes (Aleksunes y Manautou, 2007, Niture *et al.* 2010; Singh *et al.* 2010). De esta manera, en el presente estudio la activación de Nrf2 sería desencadenada por el estrés oxidativo transitorio gatillado por Fe, producto del cual habría oxidación de residuos de cisteínas críticas (cisteína-151) en Keap1, provocando un cambio conformacional en su estructura de Keap1 (Zhang, 2006), con pérdida de su

afinidad por Nrf2, el que es liberado y transloca al núcleo para ejercer su actividad transcripcional (Egglar *et al.*, 2005).

En concordancia, y de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se observa que la activación de Nrf2 inducida por Fe, parece incrementar la expresión del gen que codifica para hemoxigenasa-1. Esto queda en evidencia por el estudio cinético que indica un incremento en el contenido citosólico de esta proteína cuyo efecto máximo se observa luego de 3 dosis de Fe.

Debido a que varios de los estímulos que inducen la expresión de la HO-1 son pro-oxidantes y se ha encontrado evidencia que indica que la inducción de HO-1 provee de efecto protector en modelos *in vitro* e *in vivo* asociados al estrés oxidativo, se ha considerado que la activación del gen de hemoxigenasa-1 representa un mecanismo de defensa celular frente al estrés oxidativo y a otros estímulos nocivos en varios órganos (Schipper *et al.*, 2009; Soares y Bach, 2009). Hemoxigenasa-1 actúa como una molécula anti-apoptótica, anti-inflamatoria y anti-proliferativa a través de productos generados como el catabolismo del grupo hemo a monóxido de carbono, biliverdina/bilirrubina y hierro libre (Farombi y Surh, 2006; Otterbein *et al.*, 2003).

Para analizar la regulación de Nrf2 es necesario considerar la disminución en la relación Nrf2nuclear/Nrf2citosólico luego de la quinta dosis de Fe, el aumento en la relación de contenidos nucleares de Keap1/Nrf2 y la caída en el contenido citosólico de hemoxigenasa-1, eventos que se manifiestan luego de la sexta dosis de Fe. La disminución en la señalización de Nrf2 posterior a la activación observada, como también en el contenido de hemoxigenasa-1, se asocia no sólo con la normalización del estado redox celular, sino que también con el aumento del contenido citosólico de Keap1 hepático. Esto puede representar una retroalimentación negativa de los niveles de Nrf2 y su degradación proteosomal, en donde Keap1 también tendría una implicancia relevante (Nguyen *et al.*, 2009).

La presencia de Keap1 en el núcleo observada en cada una de las muestras, podría demostrar la propuesta experimental de que esta proteína se dirige transitoriamente al núcleo para facilitar la degradación de Nrf2 vía ubiquitinación por

Cul3 en este compartimento. En contraste, se ha sugerido que, además de su papel en la promoción de la degradación citoplásmica de Nrf2, bajo condiciones de estrés oxidativo Keap1 trasloca al núcleo y acompaña a Nrf2 hasta el citoplasma para su posterior degradación (Nguyen *et al.*, 2009). En la actualidad, el mecanismo de control exacto para el ingreso de Keap1 al núcleo en respuesta a condiciones de estrés oxidativo celular es incierto, sin embargo hay estudios *in vitro* en los cuales se ha determinado que cinéticamente Nrf2 transloca al núcleo más rápido que su inhibidor Keap1. Más aún, se ha determinado una interacción directa entre Keap1 y una importina nuclear denominada KPNA6, a través de la cual Keap1 se transporta directamente al núcleo, promoviendo la ubiquitinación y degradación de Nrf2 y, por lo tanto, regulando negativamente el nivel proteico de Nrf2 y la transcripción de sus genes diana (Zhang *et al.*, 2011).

A fin de evaluar con más precisión los fenómenos observados en la realización de este trabajo, en relación a cambios en los contenidos citosólico y nuclear de Nrf2 y su inhibidor Keap1, hubiese sido interesante realizar técnicas complementarias, tales como PCR a tiempo real para analizar los cambios en la expresión de ARN mensajero tanto del factor de transcripción Nrf2, de su inhibidor Keap1 y de la proteína citoprotectora hemoxigenasa-1. Por otra parte, para analizar de mejor manera la disociación del complejo Nrf2-Keap1, se podría haber realizado una co-inmunoprecipitación proteica, que es una técnica ideal para el estudio de este tipo de interacciones.

En conclusión, los resultados de este estudio muestran que la administración de Fe a ratas, mediante un protocolo subcrónico, conduce al desarrollo de estrés oxidativo transitorio y a la activación de Nrf2, como lo indica el agotamiento temprano GSH y el incremento en el contenido de Nrf2 nuclear. Estos cambios se asocian con la inducción de hemoxigenasa-1, cuyo nivel citosólico aumenta en paralelo a los cambios en el Nrf2 nuclear. Hemoxigenasa-1 es una proteína antioxidante que podría constituir un mecanismo citoprotector que contribuya al preacondicionamiento hepático inducido por Fe frente a la IR hepática.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- **Ajamieh, H.; Menendez, S.; Martínez, G.; Candelari, E.; Re, L.; Giuliani, A.; Fernández, O.** 2004. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of ischemiareperfusion. *Liver Int.*, 24: 55-62.
- 2- **Alam, J.; Stewart, D.; Touchard, C.; Boinapally, S.; Choi, A.M; Cook, J.** 1999. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.*, 274: 26071–26078.
- 3- **Aleksunes, L.; Manautou, J.** 2007. Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol. Pathol.*, 35 (4): 459-73.
- 4- **Aust, S.; Morehouse, L.; Thomes, C.** 1985. Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Radic. Biol. Med.*, 1: 3-15.
- 5- **Bayraktar U., Bayraktar S.** 2010. Treatment of iron deficiency anemia associated with gastrointestinal tract diseases. *World J Gastroenterol* 16: 2720-2725.
- 6- **Cullinan, S.; Gordan, J.; Jianping, 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 a Cul3-Keap1ligase. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 8477- 8486.
- 7- **Das, M.; Das, D.** 2008. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life*; 60: 199–203.
- 8- **Deryckere, F.; Gannon, F.** 1994 A one hour minipreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *Biotechniques* 16: 405.
- 9- **Dröge, W.** 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, 82: 47–95.
- 10- **Eggler A., Liu G., Pezzuto J., van Breemen R., Mesecar A.** 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* 19; 102(29): 10070-5.

- 11-Farombi, E.; Surh, Y.** 2006. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 39 (5): 479-491.
- 12-Fernández, V.; Castillo, I.; Tapia, G.; Romanque, P.; Uribe, S.; Uribe, M.; Cartier, D.; Santander, G.; Vial, M.; Videla, L.A.** 2007. Thyroid hormone preconditioning: protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat. *Hepatology*, 45 (1): 170-177.
- 13-Ferrali, M.; Signorini, C.; Ciccoli, L.; Comporti, M.** 1992. Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. *Biochem. J.* 285: 295–301.
- 14-Galatro, A.; Puntarulo, S.** 2007. Mitochondrial ferritin in animals and plants *Front Biosci.* 12: 1063-1071.
- 15-Galleano, M.; Puntarulo, S.** 1994. Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27:2331–2498.
- 16-Galleano, M.; Tapia, G.; Puntarulo, S.; Varela, P.; Videla, L.A.; Fernández V.** 2011. Liver preconditioning induced by iron in a rat model of ischemia/reperfusion. *Life Sci.*, 89: 221-228.
- 17-Grande L, Roselló J, Peralta C.** 2006. El preacondicionamiento isquémico del hígado: de las bases moleculares a la aplicación clínica. *Cir Esp.*, 80: 275-282.
- 18-Ito K, Ozasa H, Sanada K, Horikawa S.** 2000. Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology.* 31: 416-419.
- 19-Itoh, K.; Tong, K.; Yamamoto, M.** 2004. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36: 1208–1213.
- 20-Kanki, K.; Umemura, T.; Kitamura, Y.; Ishii, Y.; Kuroiwa, Y.; Kodama, Y.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Nishikawa, A.; Horise, M.** 2008. A possible role of Nrf2 in prevention of renal oxidative damage by ferric nitrilotriacetate. *Toxicol Pathol* 36: 353-361.
- 21-Klaassen, C.; Reisman, S.** 2010. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 244(1): 57-65.

- 22- Kobayashi, A.; Kang, M.; Watai, Y.; Tong, K.; Shibata, T.; Uchida, K.; Yamamoto, M.** 2006. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.*, 26: 221-229.
- 23- Kruszewski, M.** 2004. The role of labile iron pool in cardiovascular diseases. *Acta Biochem. Pol.* 51: 471-480.
- 24- Laemmli, UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- 25- Li, W.; Khor, T.; Xu, C., Shen, G.; Jeong, W.; Yu, S.; Kong, A.** 2008. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF- $\kappa$ B-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, 76: 1485-1489.
- 26- Nguyen T., Nioi P., Pickett C.** 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 15;284 (20): 13291-13295.
- 27- Nguyen, T.; Yang, C.; Pickett, C.** 2004. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic. Biol Med* 37: 433–441.
- 28- Niture, S., Kaspar, J., Shen, J., Jaiswal A.** 2010. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol.* 244: 37-42.
- 29- Otterbein LE.; Soares MP.; Yamashita K.; Bach FH.** 2003. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol*; 24: 449-455.
- 30- Pantopoulos, K., Hentze, M.** 2000. Nitric oxide, oxygen radicals, and iron metabolism. *Nitric Oxide* 19: 293-313.
- 31- Peralta, C.; Hotter, G.; Closa, D.; Gelpi, E.; Bulbena O.; Roselló-Catafau, J.** 1997. Protective effects of preconditioning on the injury associated to ischemia reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology.* 25: 934-937.
- 32- Puntarulo, S.** 2005. Iron, oxidative stress and human health. *Mol. Aspects Med.*, 26: 299–312.
- 33- Puntarulo S., Galleano M.** 2009. Forms of iron binding in the cells and the chemical features of chelation therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 9:1136-1146.

- 34-Romanque, P.; Cornejo, P.; Valdés, S.; Videla, L.A.** 2011. Thyroid hormone administration induces rat liver Nrf2 activation: suppression by N-acetylcysteine pretreatment. *Thyroid*. 21:655-662.
- 35-Rüdiger, H., Graf, R., Clavien, P.** 2003. Sublethal oxidative stress triggers the protective effects of ischemic preconditioning in the mouse liver. *J Hepatol*. 39: 972-977.
- 36-Schipper H., Song W., Zukor H., Hascalovici J., Zeligman D.** 2009. Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *J Neurochem*. 110: 469-85.
- 37-Sies, H.** 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, 82(2): 291-5.
- 38-Silverstein S., Rodgers G.,** 2004. Parenteral iron therapy options. *Am J Hematol*. 76:74-78.
- 39-Singh, S., Vrishni, S., Singh, B.K., Rahman I., Kakkar, P.** 2010. Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radic Res* 44: 1267-1288.
- 40-Soares M, Bach F.** 2009. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol Med*. 15: 50-8.
- 41-Tapia, A.** 2007. Proponiendo biomarcadores para evaluar las alteraciones en la homeostasis cerebral de hierro y su relación con la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer. *Rev. Chilena Neuro-Psiquiat.*, 45 (1): 29-41.
- 42-Terajima, H.; Enders, G., Thiaener, A.; Hammer, C.; Kondo, T.; Thiery, J.; Yamamoto, Y.; Kamaoka, Y.; Messmer, K.** 2000. Impact of hyperthermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculation disturbances is an isolated perfusion model of rat liver. *Hepatology* 31: 407-415.
- 43-Tietze, F.** 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, 27: 287-290.
- 44-Videla, L.A.** 2010. Hormetic responses of thyroid hormone calorigenesis in the liver: Association with Oxidative Stress. *IUBMB Life*, 62: 460–466.

- 45- Yu, S.; Chiu, J.; Yang, S.; Yu, H.; Hsied, C.; Chen, P; Liu, W.; Wu; C.** 2005. Preconditioned hyperbaric oxygenation protects the liver against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res.*, 128: 28-36.
- 46- Zhang, D.** 2006. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab. Rev.*, 38: 769-789.
- 47- Zhang, D.; Sun, Z.; Wu, T.; Zhao F.; Lau, A.; Birch, C.** 2011. KPNA6 (Importin 7) mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response. *Molecular and cellular biology.* 31: 1800–1811.
- 48- Zúñiga, J.; Cancino M.; Medina, F.; Varela, P.; Vargas, R.; Tapia G.; Videla, L.A.; Fernández, V.** 2011. N-3 PUFA supplementation triggers PPAR- $\alpha$  activation and PPAR- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia reperfusion injury. *PLoS ONE* 6:e28502.