

**VNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE**  
**FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**



**PAPEL DEL GENOMA MITOCONDRIAL Y DEL  
ESTRÉS OXIDATIVO EN LA REGULACIÓN DE LA  
EXPRESIÓN DE SISTEMAS DE QUIMIORRESISTENCIA:  
BILIVERDINA REDUCTASA Y PROTEÍNAS ABC**

**TESIS DOCTORAL**  
**M<sup>a</sup> ESTER GONZÁLEZ SÁNCHEZ**  
**2013**



**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE  
FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**PAPEL DEL GENOMA MITOCONDRIAL  
Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA REGULACIÓN DE LA  
EXPRESIÓN DE SISTEMAS DE QUIMIORRESISTENCIA:  
BILIVERDINA REDUCTASA Y PROTEÍNAS ABC**

Memoria que presenta **Dña. M<sup>a</sup> Ester González Sánchez**  
para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 25 de marzo de 2013



---

D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada “PAPEL DEL GENOMA MITOCONDRIAL Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SISTEMAS DE QUIMIORRESISTENCIA: BILIVERDINA REDUCTASA Y PROTEÍNAS ABC.” presentada por D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Ester González Sánchez para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca y la Dra. Dña. M<sup>a</sup> José Pérez García, Investigadora del Hospital Universitario de Salamanca (IESCYL-IBSAL) y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día veinticinco de marzo de dos mil trece.

Fdo. M<sup>a</sup> Jesús Monte Río





---

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y DÑA. M<sup>a</sup> JOSÉ PÉREZ GARCÍA, INVESTIGADORA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA (IESCYL-IBSAL) Y PROFESORA ASOCIADA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada “PAPEL DEL GENOMA MITOCONDRIAL Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SISTEMAS DE QUIMIORRESISTENCIA: BILIVERDINA REDUCTASA Y PROTEÍNAS ABC.” presentada por D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Ester González Sánchez para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a veinticinco de marzo de dos mil trece.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. M<sup>a</sup> José Pérez García





---

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación con Referencia AP2008-03762.

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado en parte con cargo al CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III), y a los siguientes Proyectos de Investigación:

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto GR75/2008. “Resistencia a la terapia farmacológica en el tratamiento del cáncer hepático y digestivo. Investigación de los mecanismos implicados y desarrollo de un método predictivo”. Investigador Principal: JJ García Marín. 2008-2010.

Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento del MICINN. Proyecto: SAF2010-15517. “Relación entre FXR y riesgo de carcinogénesis en tejidos del circuito enterohepático. Implicaciones terapéuticas”. Investigador principal: JJ García Marín. 2011-2013.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA023A11-2. “Evaluación de estrategias de supresión tumoral por inducción de diferenciación celular mediante la activación de la vía de señalización regulada por el gen NR1H4”. Investigador Principal: MJ Monte Río. 2011-2013.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA070A11-2. “Valor diagnóstico e interés como diana farmacológica en el tratamiento del colangiocarcinoma del gen SLC10A2”. Investigador Principal: RI Rodríguez Macías. 2011-2012.

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. Proyecto BIO/11. “Bases moleculares de la respuesta SOS mediada por el receptor nuclear FXR y su papel en la hepatocarcinogénesis”. Investigador Principal: JJ García Marín. 2011-2012.

Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Proyecto PI08/0151. “Papel del genoma mitocondrial en el control de la señalización retrógrada de la expresión de proteínas de resistencia a la quimioterapia en células hepáticas”. Investigador principal: María José Pérez García. 2009-2011.

Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Proyecto PII1/00337. “Efecto de analgésicos y antiinflamatorios prescribibles durante el embarazo sobre la expresión/función de la proteína de resistencia a la quimioterapia en el cáncer de mama (BCRP) en la barrera placentaria”. Investigador principal: María José Pérez García. 2012-2014.



- Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido publicados como artículos en las siguientes revistas:

Nytofte N.S., Serrano M.A., Monte M.J., **Gonzalez-Sanchez E.**, Tumer Z., Ladefoged K., Briz O., Marin J.J.G. (2011). A homozygous nonsense mutation (c.214C>A) in the biliverdin reductase alpha gene (BLVRA) results in accumulation of biliverdin during episodes of cholestasis.

*Journal of Medical Genetics* **48(4)**, 219-225.

Perez M.J., **Gonzalez-Sanchez E.**, Gonzalez-Loyola A., Gonzalez-Buitrago J.M., Marin J.J.G. (2011). Mitochondrial genome depletion dysregulates bile acid- and paracetamol-induced expression of the transporters Mdr1, Mrp1 and Mrp4 in liver cells.

*British Journal of Pharmacology* **162(8)**, 1686 -1699.

- En forma de abstract en las siguientes revistas:

**González-Sánchez E.**, Pérez M.J., Briz O., Serrano M.A., Monte M.J., Marín J.J.G. (2012). Papel protector de la biliverdina frente a la toxicidad inducida por ácidos biliares en células hepáticas. *Gastroenterología y Hepatología* **35**, 148.

**Gonzalez-Sanchez E.**, Perez M.J., Nytofte N.S., Briz O., Serrano M.A., Monte M.J., Jimenez F., Gonzalez-San Martin F., Marin J.J.G.(2012). Protective effect of biliverdin and biliverdin reductase against bile acid-induced toxicity in liver cells. *Journal of Hepatology*, **56** (Suppl 2), 140.

**Gonzalez-Sanchez E.**, Blazquez A.G., Briz O, Ghanem., C.I., Perez M.J., Marin J.J.G. (2012). Effect of acetaminophen treatment on the role of export pumps ABC1, ABCC1-4 and ABCG2 in the placental barrier. *The FEBS Journal*, **279**, (Suppl 1), 258.

- Han sido presentados en los siguientes congresos:

Congreso: XXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Oviedo (2009).

Autores: **González-Sánchez E.**, Pérez M.J., Revuelta I.E, Rosales., R., Keck E., Marín J.J.G.

Título: Implicación del genoma mitocondrial en la regulación de la expresión de proteínas transportadoras ABC mediada por ácidos biliares en células hepáticas

Tipo de comunicación: Póster



Congreso: XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba (2010).

Autores: Briz O., Serrano M.A., **González-Sánchez E.**, Sánchez-Vicente L., Nytofte N.S., Monte M.J., Tumer Z., Ladefoged K., Marín J.J. G.

Título: Identificación de una mutación inactivante en el gen de la biliverdina reductasa alfa (*BLVRA*) que causa ictericia verde debida a la hiperbiliverdinemia durante episodios de colestasis

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba (2010).

Autores: **González-Sánchez E.**, Pérez M.J., González-Loyola A., González-Buitrago J.M., Jiménez F., González- San Martín F., Marín J.J. G.

Título: Efecto del paracetamol en la expresión de proteínas ABC en células Rho

Tipo de comunicación: Oral y Póster

Congreso: Falk Symposium 175. XXI Internacional Bile Acid Meeting. Freiburg (2010).

Autores: Macias R.I.R., Perez M.J., **Gonzalez-Sanchez E.**, Gonzalez-Loyola A., Rosales R., Romero M.R., Serrano M.A., Marin J.J.G.

Título: Effect of mitochondrial genome depletion in bile acid-induced regulation of ABC transporters in Hepa1-6 mouse hepatoma cells.

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona (2011).

Autores: **González-Sánchez E.**, Pérez M.J., Briz O., Serrano M.A., Monte M.J., Marín J.J.G.

Título: Papel protector de la biliverdina frente al efecto tóxico de compuestos oxidantes endógenos y xenobióticos

Tipo de comunicación: Oral

Congreso: XXXVII Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid (2012).

Autores: **González-Sánchez E.**, Pérez M.J., Briz O., Serrano M.A., Monte M.J., Marín J.J.G.

Título: Papel protector de la biliverdina frente a la toxicidad inducida por ácidos biliares en células hepáticas

Tipo de comunicación: Oral

Congreso: 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Barcelona (2012).

Autores: **Gonzalez-Sanchez E.**, Perez M.J., Nytofte N.S., Briz O., Serrano M.A., Monte M.J., Jimenez F., Gonzalez-San Martin F., Marin J.J.G.

Título: Protective effect of biliverdin and biliverdin reductase against bile acid-induced toxicity in liver cells

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: 8<sup>th</sup> YSA-PhD-Symposium. Viena (2012).

Autores: **Gonzalez-Sanchez, E.**, Perez M.J., Nytofte N.S., Briz O., Serrano M.A., Monte M.J., Jimenez F., Gonzalez-San Martin F., Marin J.J.G.

Título: Protective effect of biliverdin and biliverdin reductase against bile acid-induced toxicity in liver cells

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: 22<sup>nd</sup> IUBMB & 37<sup>th</sup> FEBS Congress. Sevilla (2012)

Autores: **Gonzalez-Sanchez E.**, Blazquez A.G., Briz O., Ghanem C.I., Pérez M.J., Marin J.J.G.

Título: Effect of acetaminophen treatment on the role of export pumps ABC1, ABCC1-4 and ABCG2 in the placental barrier

Tipo de comunicación: Oral

Congreso: Falk Symposium 184. XXII International Bile Acid Meeting. Viena (2012)

Autores: Herraiz E., **Gonzalez-Sanchez E.**, Perez M.J., Nytofte N.S., Briz O., Serrano M.A., Monte M.J., Marin J.J.G.

Título: Protective effect of biliverdin and biliverdin reductase against bile acid-induced toxicity in liver cells

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: XXXVIII Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid (2013)

Autores: **González-Sánchez E.**, Hernández A., Revuelta I.E., Sánchez-Vicente L., Blázquez A.G., Jiménez F., González-San Martín F., Marin J.J.G.M, Perez M.J

Título: La apoptosis inducida por los ácidos biliares en células hepáticas depende de la integridad del genoma mitocondrial: papel de la ruta de supervivencia AKT/mTOR y la familia de proteínas Bcl-2.

Tipo de comunicación: Póster





## **AGRADECIMIENTOS:**

Todos estos años de trabajo y dedicación no hubieran dado sus frutos sin la ayuda de muchas personas a las que quiero expresar mi agradecimiento.

A mis directores de Tesis:

Al Dr. José Juan García Marín por permitirme formar parte de este magnífico equipo y por su confianza en mí. Me ha ofrecido su apoyo, sus consejos y su tiempo siempre que lo he necesitado.

A la Dra. M<sup>a</sup> José Pérez gracias por tener siempre un minuto para dedicarme, por tus sabios consejos, tu paciencia y por todo lo que he aprendido a tu lado. Por demostrarme día a día cómo se hace el buen trabajo, y por ser sin duda un referente para mí.

Al resto de miembros del grupo:

A la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Serrano por su apoyo, su cariño y sus buenos consejos, por hacerlo todo mucho más fácil. Por ser un ejemplo de discreción, elegancia y generosidad.

A la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Monte, por todos los consejos que me ha dado a lo largo de estos años, por seguir siempre de cerca mi trabajo, por estar siempre dispuesta a ayudar y por transmitirme ese entusiasmo personal y científico.

A la Dra. Rocío I. Rodríguez Macías por haberme abierto las puertas del grupo. Por su apoyo y su interés en mi trabajo todo este tiempo y por ofrecerme su ayuda cuando la he necesitado.

Al Dr. Óscar Briz por haber dirigido mis primeros pasos en el laboratorio. Por su indispensable ayuda en muchos momentos y porque es la persona a la que recurrir cuando algo falla.

A la Dra. Marta Rodríguez Romero, por su ayuda en cultivos celulares, por su simpatía y por todos sus ánimos a lo largo de este tiempo.

A la Dra. Alba García Blázquez gracias por todo su cariño y su apoyo, por los momentos que hemos compartido con nuestros animalitos, y sobre todo por ser una gran persona.

A la Dra. Elisa Herráez Aguilar, mi compañera de la Guardia Civil, por todos los grandes momentos que hemos pasado en “este nuestro laboratorio” y que no puedo resumir sólo en unas líneas. Gracias por compartir conmigo mis primeros días en el mundo de la investigación y por toda tu ayuda para asuntos oficiales y extraoficiales. Por tus sabios consejos para hacer que el sueldo de becario predoctoral te permita tener un gran fondo de armario y porque eres una de las personas más fuertes que conozco. Tu amistad es, sin duda, una de las mejores cosas que me llevo de mi paso por el grupo.

Al Dr. Javier Vaquero Rodríguez debería dedicarle una Tesis entera para poder agradecerle su apoyo incondicional. Gracias por estar a mi lado todos estos años. Por todo tu cariño y tu comprensión y por tener tanta paciencia conmigo. Gracias por no permitir que me rindiese y por hacer que mis resultados pareciesen siempre tan interesantes.

A Elisa Lozano Esteban que ha compartido conmigo los diez últimos años y las “sabias” elecciones de asignaturas optativas durante la carrera. Muchas gracias por todos los buenos ratos que hemos pasados juntas. Eres todo un ejemplo de dedicación al trabajo y una estupenda persona.

A Laura Sánchez, nuestra corresponsal en el S09, gracias por todo tu apoyo, por ofrecerme tu ayuda siempre que la he necesitado y por esa risa contagiosa que se escucha por todo el laboratorio.

Al resto de compañeros del grupo con los que he tenido la suerte de coincidir: Emma, Olivia, Pablo, Carmen, Raquel, Manu y Rubén por todos los buenos ratos pasados dentro y fuera del laboratorio.

A los nuevos tesinandos (Lawrence, Alex M., Alex P., Alex J., Lara, Laura Gómez, Andrés...) por su simpatía y sus enormes ganas de aprender y sobre todo por recordarme lo divertido que puede ser trabajar en un laboratorio.

Al departamento de Bioquímica por permitirme el uso de sus instalaciones.

A M<sup>a</sup> Isabel Hernández por su excelente trabajo en la secretaría. A los técnicos y auxiliares de laboratorio y personal de limpieza que han facilitado la elaboración de esta Tesis, en especial a Narci por su gran trabajo, su alegría y su sentido del humor. Al personal del Servicio de Experimentación Animal por formar un excelente equipo

Ha sido un placer trabajar con todos y cada uno de vosotros.

---

Y a todas las personas que fuera de este laboratorio han contribuido, quizá sin saberlo, a que este trabajo se complete.

A mi pequeña pero estupenda familia, en especial a mis padres y a mi hermana Teresa, pero también a Fer, Sara, Ana y Filo por su gran cariño y su confianza en mí, muchas gracias por todos los momentos que habéis compartido conmigo a lo largo de mi vida. A mis tías Conchi e Isa por todo su cariño y por su interés en mi trabajo y a Alberto, por su valiosa ayuda técnica.

A todos mis amigos, en especial a Mer, Ana, Alberto, Marta, Susana y Gloria por todo vuestro cariño y vuestro apoyo incondicional y por tener siempre en mente algún plan de distracción. Sois los mejores amigos que podría tener.

**¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!**



---

## DEDICADA A:

*Mis padres y mi hermana Teresa, porque gracias a ellos he llegado hasta aquí. Por su ayuda y su paciencia, y por demostrarme que cada sacrificio tiene siempre su recompensa. Porque son el mejor ejemplo para mí.*

*A mi tío Manolo, con quien me hubiese encantado compartir este trabajo.*



## ABREVIATURAS

**AB:** Ácido biliar  
**ABC:** “ATP Binding Cassette”  
**ADC:** Ácido desoxicólico  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**ADP:** Adenosín difosfato  
**ADNmt :** ADN mitocondrial  
**AEDT:** Ácido etilendiamino tetraacético  
**AGC:** Ácido glicocólico  
**AGQDC:** Ácido glicoquenodesoxicólico  
**AGUDC:** Ácido glicoursodesoxicólico  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**ARNm:** ARN mensajero  
**ARNr:** ARN ribosómico  
**ARNsa:** Ribonucleasa  
**ARNt:** ARN transferente  
**ATP:** Adenosín trifosfato  
**BCRP:** “Breast Cancer Resistance Protein”  
**BR:** Bilirrubina  
**BSEP:** “Bile Salt Export Pump”  
**BSP:** Bromosulfoftaleína  
**BV:** Biliverdina  
**BVR $\alpha$ :** Biliverdina reductasa  $\alpha$   
**cADN:** ADN complementario  
**CAR:** “Constitutive androstane receptor”  
**CIG:** Colestasis intrahepática gestacional  
**CMC:** Concentración micelar crítica  
**Ct:** Ciclo umbral  
**CYP:** Enzimas citocromo P450  
**DAPI:** 4,6-diamino-2-fenilindol  
**DCFH-DA:** Diclorofluoresceína diacetato  
**DEPC:** Dietilpirocarbonato  
**DHEAS:** Dehidroepiandrosterona sulfato  
**DMEM:** “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**dNTPs:** Desoxirribonucleótidos trifosfato  
**ECL:** “Enhanced ChemiLuminiscence”  
**EEM:** Error estándar de la media



**ENT:** “Equilibrative Nucleoside Transporter”  
**FAD:** Flavin adenín dinucleótido  
**FADH<sub>2</sub>:** Flavin adenín dinucleótido reducido  
**FTC:** Fumitremorgina C  
**FXR:** “Farnesoid X Receptor”  
**GAPDH:** Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa  
**GSH:** Glutati3n reducido  
**GST:** Glutati3n-S-Transferasa  
**HCC:** Carcinoma hepatocelular  
**Hepes:** 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulf3nico  
**HNF:** “Hepatocyte nuclear factor”  
**HO-1:** Hemoxigenasa-1  
**IP:** Ioduro de propidio  
**kb:** Kilobase  
**KDa:** Kilodalton  
**KEAP1:** Kelch-like ECH-Associated Protein 1  
**LDH:** Lactato deshidrogenasa  
**MAPK:** “Mitogen-activated protein kinases”  
**MDR:** Resistencia a m3ltiples drogas  
**MEM:** “Minimum essential m3dium eagle”  
**MOPS:** 3cido morfolino propansulf3nico  
**MPT:** Permeabilidad mitocondrial transitoria  
**MRP:** Prote3na asociada a resistencia a m3ltiples drogas  
**MTS:** Sal de tetrazolio  
**NADH:** Nicot3n aden3n dinucle3tido reducido  
**NADP:** Nicot3n aden3n dinucle3tido fosfato  
**NADPH:** Nicot3n aden3n dinucle3tido fosfato reducido  
**NAPQI:** N-acetil-p-benzoquinoneimina  
**ND:** NADH deshidrogenasa  
**NRF2:** Nf-E2 related factor 2  
**NTCP:** Polipeptido de cotransporte de taurocolato-sodio  
**OATP:** Polip3ptido transportador de aniones org3nicos  
**OCT:** “Organic cation transporter novel”  
**ORF:** “Open Reading Frame”  
**PAGE:** Electroforesis en gel de agarosa  
**pb:** Pares de bases  
**PBS:** Tamp3n fosfato salino  
**PCR:** Reacci3n en cadena de la polimerasa  
**PMM:** Potencial de membrana mitocondrial

---

**Pm:** Peso molecular  
**PPAR:** “Peroxisome proliferator-activated receptors”  
**PXR:** “Pregnane X receptor”  
**RAR:** “Retinoic X receptor”  
**RIPA:** “Radio immunoprecipitation assay”  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno  
**RNOS:** Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno  
**RT:** Transcripción reversa  
**SDS:** Dodecil sulfato sódico  
**SOD:** Superóxido dismutasa  
**SHP:** “Small Heterodimer Partner”  
**SNP:** “Single Nucleotide Polymorphism”  
**TAE:** Tampón Tris-Ácido acético-EDTA  
**TEMED:** N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina  
**Tris:** Trishidroximetilaminometano  
**UAF:** Unidades arbitrarias de fluorescencia  
**WT:** “Wild type”



# ÍNDICE

<b>1. OBJETIVOS</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1. LA MITOCONDRIA</b> .....	<b>7</b>
2.1.1. Características generales.....	7
2.1.2. Fosforilación oxidativa.....	8
2.1.3. El genoma mitocondrial.....	10
2.1.3.1. Estructura y función.....	11
2.1.3.2. Replicación, transcripción y traducción del genoma mitocondrial.....	13
2.1.3.3. Mutaciones en el genoma mitocondrial: papel en carcinogénesis.....	15
<b>2.2. SEÑALIZACIÓN RETRÓGRADA</b> .....	<b>18</b>
2.2.1. Concepto de señalización retrógrada.....	18
2.2.2. Señalización retrógrada en mamíferos: papel en carcinogénesis.....	18
2.2.3. Modelo de estudio en señalización retrógrada: células Rho.....	20
<b>2.3. ESTRÉS OXIDATIVO</b> .....	<b>22</b>
2.3.1. Especies reactivas de oxígeno.....	22
2.3.2. Agentes causantes de estrés oxidativo.....	24

2.3.2.1. Compuestos endógenos: ácidos biliares.....	24
2.3.2.2. Compuestos xenobióticos.....	30
<b>2.4. MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A COMPUESTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS.....</b>	<b>35</b>
2.4.1. Mecanismos de defensa antioxidante.....	35
2.4.1.1. Ciclo biliverdina/bilirrubina.....	35
2.4.1.2. Otros sistemas antioxidantes.....	38
2.4.2. Bombas exportadoras ABC.....	39
2.4.2.1. Superfamilia de proteínas ABC.....	39
2.4.2.2. Papel de las proteínas ABC en el transporte de ácidos biliares.....	44
2.4.2.3. Papel de las proteínas ABC en los procesos de detoxificación del paracetamol.....	48
2.4.2.4. Papel de las proteínas ABC en quimiorresistencia.....	48
2.4.2.5. Regulación de la expresión de proteínas ABC.....	50
2.4.3. Activación de rutas de supervivencia.....	54
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1. MATERIAL.....</b>	<b>59</b>
3.1.1. Material Biológico.....	59
3.1.2. Productos.....	60

---

3.1.3. Medios instrumentales.....	63
3.1.4. Soluciones comunes utilizadas.....	66
<b>3.2. MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
3.2.1. Análisis genético de muestras humanas.....	66
3.2.1.1. Obtención de muestras por raspado bucal.....	66
3.2.1.2. Extracción y purificación del ADN.....	66
3.2.2. Experimentos in vivo en ratas gestantes.....	66
3.2.3. Cultivos celulares.....	68
3.2.3.1. Medios y procedimiento de cultivo.....	68
3.2.3.2. Estudios de viabilidad celular.....	69
3.2.3.3. Estudios de expresión génica.....	70
3.2.3.4. Estudios de citometría de flujo.....	70
3.2.3.5. Experimentos de transfección.....	72
3.2.3.6. Determinación de la muerte celular por necrosis.....	73
3.2.4. RT-PCR cuantitativa.....	73
3.2.4.1. Análisis de los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa.....	73
3.2.4.2. Estudios de discriminación alélica mediante QPCR.....	76
3.2.4.3. Tarjetas microfluídicas (TLDAs).....	77

3.2.5. Detección de proteínas por Western blot.....	79
3.2.5.1 Obtención de las muestras.....	79
3.2.5.2. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	80
3.2.5.3. Inmunodetección.....	81
3.2.6. Detección de proteínas por inmunofluorescencia .....	82
3.2.6.1. Procesamiento de las muestras.....	82
3.2.6.2. Inmunodetección.....	82
3.2.7. Experimentos de citometría de flujo.....	82
3.2.7.1. Medida de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	82
3.2.7.2. Análisis del potencial de membrana mitocondrial (PMM).....	83
3.2.7.3. Estudios de funcionalidad de proteínas transportadoras.....	84
3.2.8. Métodos de clonación.....	85
3.2.8.1. Clonación por recombinación Gateway.....	85
3.2.8.2. Mutagénesis dirigida.....	87
3.2.9. Síntesis in vitro de ARNm de la BVR $\alpha$ .....	87
3.2.10. Experimentos en oocitos de <i>Xenopus laevis</i> .....	88
3.2.10.1. Extracción y selección de los oocitos.....	88



3.2.10.2. Microinyección del ARNm en los oocitos.....	89
3.2.10.3. Estudio de la actividad enzimática de la BVR $\alpha$ humana.....	89
3.2.11. Métodos analíticos.....	89
3.2.11.1. Determinación de ácidos biliares totales en suero.....	89
3.2.11.2. Valoración del ARN por el método del RiboGreen.....	89
3.2.11.3. Determinación de la viabilidad celular.....	90
3.2.11.4. Determinación de la muerte celular por necrosis. Medida de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).....	90
3.2.11.5. Determinación de proteínas totales.....	91
3.2.11.6. Determinación de radiactividad.....	91
3.2.11.7. Determinación de la actividad BVR $\alpha$ por HPLC-MS/MS.....	91
3.2.11.8. Electroforesis en gel de agarosa.....	92
3.2.12. Análisis estadístico.....	93
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
<b>4.1. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ABC EN SITUACIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR AGENTES ENDÓGENOS Y XENOBIÓTICOS EN DISTINTOS TEJIDOS. IMPLICACIÓN DEL GENOMA MITOCONDRIAL.....</b>	<b>97</b>
4.1.1. Estudio de los cambios en la expresión de proteínas ABC en respuesta al tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol.....	97
4.1.1.1. Toxicidad del paracetamol en distintas líneas celulares humanas.....	98

4.1.1.2. Efecto del tratamiento con dosis subtóxicas del paracetamol sobre la expresión de proteínas ABC en líneas celulares humanas.....	100
4.1.1.3. Efecto del tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol sobre la funcionalidad de proteínas ABC en líneas celulares humanas.....	102
4.1.1.4. Efecto del tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol sobre la expresión de proteínas ABC en ratas gestantes.....	104
4.1.1.5. Papel de NRF2 en la regulación de la expresión de proteínas ABC en respuesta al tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol.....	109
4.1.1.6. Efecto del tratamiento con dosis subtóxicas del paracetamol sobre la funcionalidad de la barrera placentaria de rata.....	111
4.1.2. Papel del genoma mitocondrial en la regulación de la expresión de proteínas ABC en situaciones de estrés oxidativo.....	114
4.1.2.1. Modelo experimental: Células desprovistas de ADN mitocondrial.....	114
4.1.2.2. Toxicidad del paracetamol en células Hepa 1-6 Rho <sup>-</sup> .....	116
4.1.2.3. Generación de ROS en células Hepa 1-6 Rho <sup>-</sup> tratadas con paracetamol.....	117
4.1.2.4. Estudio del potencial de membrana mitocondrial en células Hepa 1-6 Rho <sup>-</sup> tratadas con paracetamol.....	118
4.1.2.5. Estudio de la expresión de proteínas ABC en células Hepa 1-6 Rho <sup>-</sup> tratadas con paracetamol.....	119
4.1.2.6. Estudio de la expresión de proteínas ABC en células Hepa 1-6 Rho <sup>-</sup> tratadas con ácidos biliares.....	121
4.1.2.7. Regulación de la expresión de proteínas ABC en células Hepa 1-6 Rho <sup>-</sup> en situaciones de estrés oxidativo.....	124

4.1.3. Papel del genoma mitocondrial en la protección frente a la muerte celular inducida por ácidos biliares en células hepáticas.....	132
4.1.3.1. Sensibilidad de las células SK-Hep-1 Rho <sup>0</sup> a la muerte celular inducida por el ácido glicoquenodesoxicólico.....	133
4.1.3.2. Generación de ROS en células SK-Hep-1 Rho <sup>0</sup> tratadas con ácido glicoquenodesoxicólico.....	133
4.1.3.3. Estudio de los mecanismos de muerte celular inducidos por el ácido glicoquenodesoxicólico en células SK-Hep-1 Rho <sup>0</sup> .....	135
4.1.3.4. Activación de rutas de supervivencia en células SK-Hep-1 Rho <sup>0</sup> tratadas con ácido glicoquenodesoxicólico.....	137
<b>4.2. PAPEL DEL GENOMA MITOCONDRIAL EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA INDUCIDA POR FÁRMACOS ANTITUMORALES EN CÉLULAS HEPÁTICAS.....</b>	<b>141</b>
4.2.1. Sensibilidad de las células SK-Hep-1 Rho <sup>0</sup> a la muerte celular inducida por distintos agentes citostáticos.....	142
4.2.2. Producción de ROS en células SK-Hep-1 Rho <sup>0</sup> tratadas con distintos agentes citostáticos.....	143
4.2.3. Estudio de la expresión de genes implicados en resistencia a la quimioterapia en células SK-Hep-1 Rho <sup>0</sup> .....	144
4.2.4. Efecto del tratamiento con agentes citostáticos sobre la expresión de genes de resistencia en células SK-Hep-1 Rho <sup>0</sup> .....	147
4.2.5. Efecto del tratamiento con agentes citostáticos sobre la regulación de la expresión de genes de resistencia en células SK-Hep-1 Rho <sup>0</sup> .....	153
4.2.6. Análisis de la expresión de genes implicados en el fenotipo MDR en HCC mediante TLDA.....	159

<b>4.3. PAPEL PROTECTOR DE LA BILIVERDINA Y LA BILIVERDINA REDUCTASA α FRENTE AL EFECTO TÓXICO DE COMPUESTOS OXIDANTES ENDÓGENOS Y XENOBIÓTICOS EN CÉLULAS HEPÁTICAS.....</b>	<b>163</b>
4.3.1. “Screening” de la mutación c.214C>A en una muestra poblacional de individuos de etnia Inuit.....	164
4.3.2. Efecto de la mutación c.214C>A sobre la funcionalidad de la BVRα.....	165
4.3.3. Papel de la biliverdina en la protección frente a la toxicidad inducida por ácidos biliares.....	168
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>175</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>181</b>
<b>7. ENGLISH SUMMARY.....</b>	<b>215</b>
<b>7.1. AIMS.....</b>	<b>215</b>
<b>7.2. RESULTS.....</b>	<b>219</b>
7.2.1. Study of the expression of ABC transporters under oxidative stress situations induced by endogenous and xenobiotic compounds in different tissues: Role of mitochondrial genome.....	219
7.2.1.1. Effect of subtoxic doses of acetaminophen on the expression of ABC transporters in different tissues.....	219
7.2.1.2. Role of the mitochondrial genome in the regulation of the expression of ABC transporters under oxidative stress conditions.....	253
7.2.1.3. Role of the mitochondrial genome in the protective mechanisms against bile acid-induced cell death in liver.....	268
7.2.2. Role of mitochondrial genome in the regulation of the expression of genes involved in chemoresistance in hepatic tumor cells.....	304

7.2.2.1. Sensitivity of SK-Hep-1 Rho <sup>0</sup> cells to cytostatic drugs-induced toxicity.....	304
7.2.2.2. ROS generation.....	306
7.2.2.3. Changes in the expression of genes involved in chemoresistance in HCC.....	307
7.2.2.4. Effect of treatment with cytostatic drugs on the expression of genes involved in chemoresistance in HCC.....	308
7.2.2.5. Changes in nuclear receptors and transcription factors.....	311
7.2.2.6. Changes in the expression of genes involved in MDR phenotype.....	315
7.2.3. Protective effect of biliverdin and Biliverdin Reductase against bile acid- and potassium dichromate-induced toxicity in liver cells.....	321
7.2.3.1. Screening of the mutation c.214C>A in the Inuit population from Greenland.....	322
7.2.3.2. Protective effect of biliverdin and BVR $\alpha$ against bile acid- induced oxidative stress in human hepatic cell lines.....	322
<b>7.3. CONCLUSIONS .....</b>	<b>337</b>



---

*“Investigar es como avanzar en un bosque lleno de niebla. Nunca puedes saber dónde estás ni qué dirección tomar. Cuando haces un nuevo descubrimiento avanzas un poco, entras en un pequeño claro, pero enseguida estás rodeado de niebla de nuevo. A la gente le gusta pensar que los científicos nos metemos en un laboratorio, medimos cosas y hacemos progresos rápidamente. Yo nunca he tenido esa experiencia en mi vida”.*

*Tim Hunt*





# 1. Objetivos



La acumulación intracelular de compuestos endógenos o xenobióticos potencialmente tóxicos puede producir alteraciones en el equilibrio redox celular y desencadenar situaciones de estrés oxidativo que finalmente conduzcan a la muerte celular por apoptosis o necrosis.

En estas circunstancias se ponen en marcha distintos mecanismos de defensa celular entre los que se incluyen la activación de diversos sistemas antioxidantes, la inducción de mecanismos de biotransformación y eliminación de sustancias tóxicas, mediados por enzimas de fase I y fase II, así como por bombas exportadoras de la superfamilia ABC (“ATP-Binding Cassette”), y la potenciación de rutas de supervivencia celular. A pesar de la importancia de estos sistemas de defensa celular, los mecanismos implicados en su regulación no se conocen en profundidad.

La coordinación de la expresión de los genomas nuclear y mitocondrial es fundamental para la correcta ejecución de funciones celulares como la respuesta a situaciones de estrés químico y oxidativo. Así, existen vías de “señalización retrógrada”, mediante las que las señales procedentes de la mitocondria pueden modular la expresión de genes nucleares. Puesto que estos orgánulos presentan una gran sensibilidad a la toxicidad inducida por compuestos endógenos y xenobióticos, la activación de rutas de señalización retrógrada podría participar en la regulación de la expresión de genes implicados en mecanismos de defensa celular lo que da lugar a un fenotipo celular caracterizado por una mayor quimiorresistencia.

Por todo ello, en esta Tesis Doctoral nos planteamos como **objetivo global** analizar el papel del genoma mitocondrial en la regulación de la expresión de distintas proteínas y en la activación de rutas de señalización implicadas en los mecanismos de defensa frente al daño oxidativo y la muerte celular inducidos por compuestos endógenos y xenobióticos potencialmente tóxicos. Para alcanzar este objetivo se diseñaron los siguientes objetivos parciales:

**Objetivo primero:** Evaluar el efecto del tratamiento con concentraciones subtóxicas de paracetamol sobre la expresión de proteínas ABC a nivel hepático y de tejidos extrahepáticos de rata y en líneas celulares humanas.

**Objetivo segundo:** Determinar el papel del genoma mitocondrial en los mecanismos de regulación de la expresión de proteínas ABC en situaciones de estrés oxidativo inducido por compuestos potencialmente tóxicos endógenos, como los ácidos biliares, y xenobióticos como el paracetamol.

**Objetivo tercero:** Analizar el efecto de la ausencia de genoma mitocondrial sobre la regulación de los mecanismos de resistencia a la muerte celular inducida por acumulación de ácidos biliares.

**Objetivo cuarto:** Estudiar el papel del genoma mitocondrial en la regulación de la expresión de genes implicados en distintos mecanismos de resistencia a la toxicidad inducida por fármacos antitumorales incluidos en los regímenes de quimioterapia empleados en el tratamiento farmacológico del carcinoma hepatocelular.

**Objetivo quinto:** Determinar el efecto de la presencia de la mutación c.214C>A en el gen de la biliverdina reductasa  $\alpha$  (BVR $\alpha$ ) sobre su actividad y analizar el papel citoprotector de la biliverdina, mediado por esta enzima, frente al estrés oxidativo inducido por ácidos biliares en líneas celulares humanas de origen hepático.

## 2. Introducción





## 2.1. LA MITOCONDRIA

### 2.1.1. Características generales

Las mitocondrias son orgánulos semiautónomos presentes en el citoplasma de las células eucariotas que tienen su propio genoma y su propio sistema de replicación, transcripción y traducción (Anderson *et al.*, 1981; Taanman, 1999). En estos orgánulos se produce aproximadamente el 90% del ATP celular mediante fosforilación oxidativa (Wallace, 1997). Además juegan un papel fundamental en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la muerte celular por apoptosis (Wallace, 2008).

El carácter procariota del sistema genético de las mitocondrias sugiere que estos orgánulos evolucionaron a partir de bacterias que establecieron una relación simbiótica. Según la hipótesis endosimbiótica, las células eucariotas ancestrales aparecieron en forma de organismos anaeróbicos que, hace aproximadamente 1500 millones de años, cuando la presencia de oxígeno en la atmósfera se hizo abundante, establecieron una relación endosimbiótica con algún tipo de  $\alpha$ -protobacteria que presentaba un sistema de fosforilación oxidativa y que evolucionó hasta originar las mitocondrias (Gray *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 1997; Margulis, 1981). Inicialmente, ambos endosimbiontes mantuvieron su independencia ya que contenían todo el material genético necesario para su correcto funcionamiento. Sin embargo, a lo largo del proceso evolutivo, un gran número de genes mitocondriales fue transfiriéndose al núcleo, entre ellos la mayor parte de los genes que codifican las distintas subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial (Burger *et al.*, 2003; Wallace, 2007).

Estos orgánulos tienen un diámetro entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$ , son móviles y presentan un gran dinamismo, ya que constantemente cambian su forma y estructura en respuesta a distintos estímulos y a las necesidades metabólicas de la célula. Nunca se sintetizan *de novo* sino que surgen por crecimiento y división (bien por bipartición o por tabicación) de mitocondrias ya existentes.

Cada mitocondria está delimitada por dos membranas, una externa y otra interna, altamente especializadas, que definen dos compartimentos mitocondriales distintos: la matriz y el espacio intermembrana.

Desde el punto de vista funcional, el principal compartimento mitocondrial es la *matriz* y la membrana interna que la delimita (Smoly *et al.*, 1970). La *membrana mitocondrial interna* juega un papel fundamental en el proceso de fosforilación oxidativa, que consiste en la obtención de ATP para almacenar la energía procedente de la oxidación de los compuestos orgánicos. Dentro de la matriz se encuentran: varias moléculas de ADN mitocondrial (ADNmt), ARN mensajero (ARNm) y ARN transferentes (ARNt) característicos de las mitocondrias, ARN ribosómicos (ARNr) que constituyen los mitorribosomas (70S), enzimas del ciclo de Krebs y de la  $\beta$ -oxidación y la superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial, Mn-SOD, distinta a la citoplásmica, Cu,Zn-SOD, que interviene en la eliminación de los radicales libres que se producen en gran cantidad dentro de la mitocondria.

### 2.1.2. Fosforilación oxidativa

Como se mencionó anteriormente, la función principal de la mitocondria es la de llevar a cabo la fosforilación oxidativa, un proceso que permite la síntesis de moléculas de ATP a partir de la energía liberada de los compuestos orgánicos mediante una serie de reacciones oxidativas. Para ello, en la mitocondria tienen lugar dos procesos fundamentales: el ciclo de Krebs y el transporte de electrones a través de la cadena transportadora localizada en su membrana interna.

#### A. El ciclo de Krebs

El ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs es una ruta bioquímica en la que convergen un gran número de metabolitos, de hecho, es responsable de la oxidación total de aproximadamente dos terceras partes de los compuestos de carbono. Este ciclo se lleva a cabo en la matriz mitocondrial y consiste en la oxidación de acetil-CoA a CO<sub>2</sub> y agua mediante una serie de reacciones de óxido-reducción.

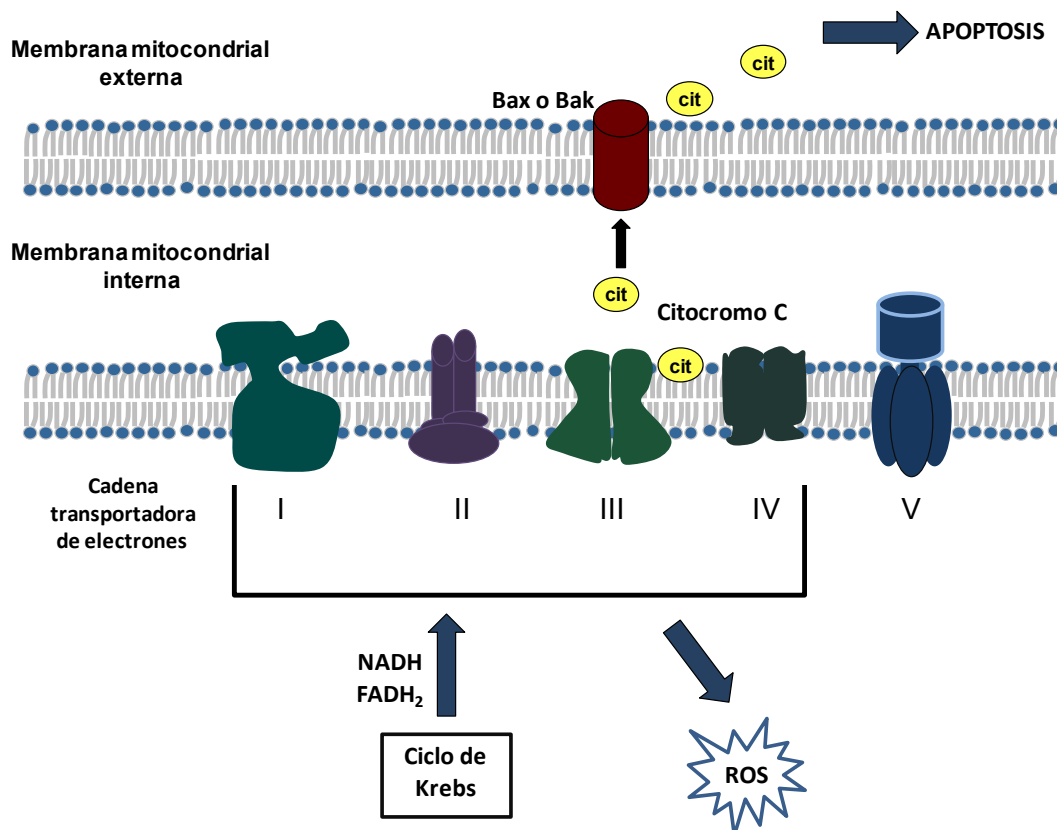
Las moléculas de acetil-CoA provienen fundamentalmente de dos fuentes: la descarboxilación del piruvato (procedente de la glucólisis citosólica) y la β-oxidación de los ácidos grasos, ambos procesos llevados a cabo en la matriz mitocondrial. Estos grupos acetilo se incorporan al ciclo de Krebs, donde reaccionan con el oxalacetato produciendo ácido cítrico. Posteriormente, por medio de siete reacciones de óxido-reducción consecutivas se eliminan dos átomos de carbono en forma de CO<sub>2</sub> y se regenera el oxalacetato. Durante este proceso se obtienen también moléculas de alto poder reductor, NADH y FADH<sub>2</sub>, que pasan a la cadena transportadora de electrones, situada en la membrana mitocondrial interna (Tzagoloff y Siekevitz, 1982).

#### B. La cadena transportadora de electrones

La cadena transportadora de electrones o cadena respiratoria mitocondrial es un conjunto macromolecular compuesto por 20 transportadores organizados en cuatro grandes complejos en la membrana mitocondrial interna. Su función es transportar los electrones cedidos por el NADH y el FADH<sub>2</sub> a través de los centros activos de los distintos complejos hasta llegar al aceptor final de electrones, el oxígeno, formándose una molécula de agua. En determinados puntos del transporte, la energía liberada es suficiente para bombear protones a través de alguno de estos complejos proteicos. Así, se genera un gradiente electroquímico que después se acopla a la síntesis de ATP en un quinto complejo formado por la ATP sintasa.

La mayoría de sus componentes se encuentran fijos en la membrana mitocondrial interna, formando parte de los siguientes complejos multienzimáticos: NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), complejo citocromo b-c1 (complejo III) y citocromo oxidasa (complejo IV), mientras que otros, como la ubiquinona o el citocromo c, pueden desplazarse para poner en contacto los componentes que se mantienen fijos.

Formando parte de este sistema encontramos dos flavoproteínas, la NADH deshidrogenasa localizada en el complejo I y la succinato deshidrogenasa localizada en el complejo II, encargadas de catalizar la etapa inicial de transporte de los electrones desde el NADH al complejo I y desde el  $\text{FADH}_2$  al complejo II. En el paso de estos electrones por los distintos centros activos se produce una caída progresiva del valor del potencial redox. Esta caída de energía en algunos puntos es gradual, suave y no se puede aprovechar, pero en otros (complejos I, III y IV) es más brusca y permite el bombeo de protones al espacio intermembrana (Casey, 1984). Según explica la Teoría quimiosmótica de Mitchell, la energía que se libera de los electrones de alta energía de los hidrógenos del NADH y  $\text{FADH}_2$  cada vez que pasan de una molécula transportadora a la siguiente de la cadena respiratoria, se utiliza para bombear protones desde la matriz al espacio intermembrana, generándose un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna cuyo flujo es utilizado por la enzima ATP sintasa para convertir el ADP y  $\text{P}_i$  en ATP (Mitchell, 1961) (Figura I1).



**Figura I1.** Principales funciones de la cadena respiratoria mitocondrial. Los electrones llegan a la cadena respiratoria mitocondrial en forma de NADH y  $\text{FADH}_2$  y son utilizados para la síntesis de ATP. Los complejos de la cadena transportadora de electrones se muestran en la figura marcados del I al V. Durante el transporte de electrones también se generan ROS, fundamentalmente en los complejos I y III. El citocromo c, uno de los componentes de la cadena respiratoria juega un papel fundamental en la apoptosis cuando se libera al citoplasma a través de poros constituidos por las proteínas proapoptóticas Bax o Bak. Tomado de Fogg *et al.*, 2011.

Durante el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria se producen también especies reactivas de oxígeno (ROS), fundamentalmente radical superóxido, a nivel de los complejos I y III (Murphy, 2009) y en circunstancias especiales también en el complejo II (Quinlan *et al.*, 2012) (Figura I1). El aumento en la generación de ROS incrementa el daño mitocondrial presente en distintos tipos de patologías y juega un papel fundamental en los procesos de señalización redox desde este orgánulo al resto de la célula (Murphy, 2009).

Otro de los mecanismos en los que está implicada la cadena respiratoria mitocondrial es en la ejecución de la muerte celular por apoptosis. Concretamente el citocromo c, uno de los elementos móviles de la cadena transportadora de electrones desempeña un papel fundamental en la vía intrínseca de apoptosis (Liu *et al.*, 1996) (Figura I1). Distintos estímulos proapoptóticos hacen que el citocromo c se libere al citosol donde favorece la activación de caspasas que participan en este proceso de muerte celular programada (Green, 2000; Wang, 2001).

### 2.1.3. El genoma mitocondrial

Todas las células eucariotas animales poseen dos genomas diferentes e interdependientes que constituyen un sistema genético dual: uno está localizado en el núcleo celular y codifica la mayoría de las proteínas de la célula y el otro se encuentra en las mitocondrias y codifica un número pequeño de proteínas determinantes para su correcto funcionamiento. La interacción entre estos dos genomas es fundamental para el proceso de fosforilación oxidativa implicado en la producción de la mayor parte de la energía necesaria para realizar las distintas funciones celulares (Falkenberg *et al.*, 2007).

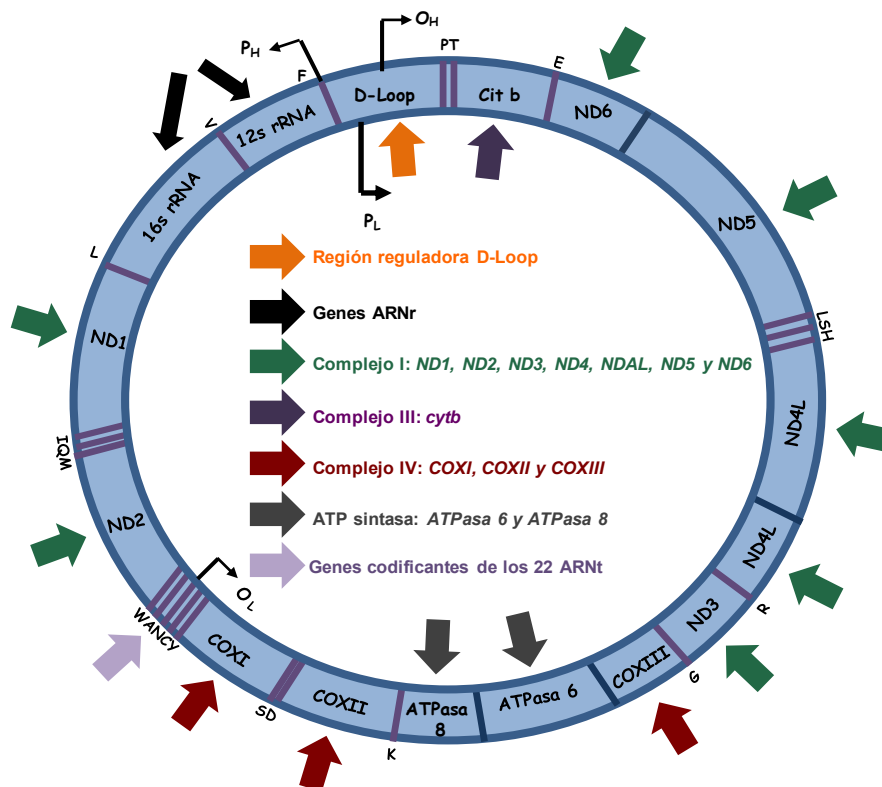
El posible origen endosimbiótico de las mitocondrias así como la transferencia de genes desde este orgánulo al núcleo durante el proceso evolutivo explicarían porqué las mitocondrias presentan su propio genoma con sus propios sistemas de transcripción, traducción y maquinaria de ensamblaje de proteínas que dependen de ciertos genes nucleares para su correcto funcionamiento

El ADNmt, cuya herencia se produce exclusivamente por vía materna, supone entre el 0,1-1% del total del ADN en la mayoría de células de mamíferos. Cada mitocondria contiene de 2-10 copias de moléculas de ADNmt y cada célula humana contiene más de 1000 copias de ADNmt (Wei, 1992). En células hepáticas de rata hay aproximadamente de 5 a 10 moléculas de ADNmt por orgánulo y unas 1000 mitocondrias por célula, lo que supone el 1% del ADN celular (Singh *et al.*, 1992).

### 2.1.3.1. Estructura y función

El ADNmt es una molécula superenrollada, de doble cadena, circular y de tamaño variable según la especie, al igual que el número de copias por mitocondria. Suele localizarse en una zona específica dentro de la matriz, menos densa a los electrones, llamada nucleoide mitocondrial. Cada cadena de la doble hebra presenta una proporción muy diferente de bases: la llamada cadena pesada o H (del inglés “heavy”), tiene una elevada proporción de bases púricas (guanina y adenina), mientras que la llamada ligera o L (del inglés “light”), es rica en bases pirimidínicas (citosina y timina). La nomenclatura ligera o pesada tiene que ver con la diferente movilidad que presentan las cadenas separadas en un gradiente desnaturalizante de cloruro de cesio.

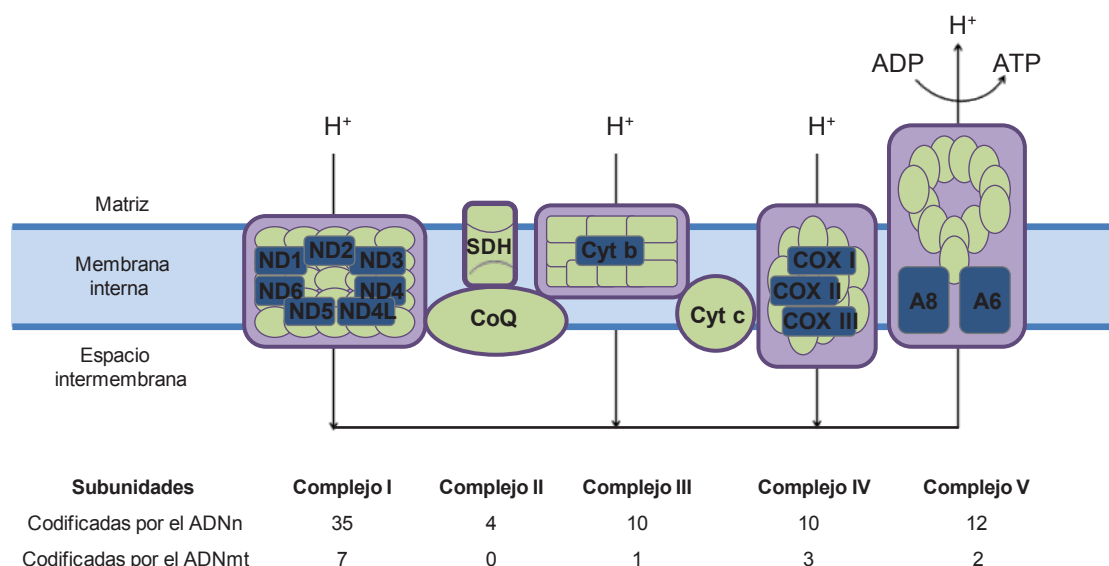
El genoma mitocondrial de mamíferos es pequeño, aproximadamente 16,5 kb. La mayor parte de la capacidad codificadora de este genoma se dedica a proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial, aunque también codifica los principales ARNr y ARNt (Figura I2) necesarios para el proceso de traducción. Todas las proteínas codificadas por este genoma son sintetizadas en los ribosomas mitocondriales.



**Figura I2.** Mapa del genoma mitocondrial humano. Los 37 genes mitocondriales codifican 13 proteínas de la cadena transportadora de electrones, 2 ARNr y 22 ARNt. La zona reguladora D-Loop es la única región no codificante de este genoma.  $O_H$ , origen de replicación de la cadena pesada.  $O_L$ , Origen de replicación de la cadena ligera.  $P_H$ , promotor de la cadena pesada.  $P_L$ , promotor de la cadena ligera. Tomado de Chatterjee *et al.*, 2011.

En 1981 se publicó la secuencia completa del genoma mitocondrial humano, que consta de 16569 pares de bases (Anderson *et al.*, 1981) y codifica 37 genes. En la cadena H se encuentran los genes que codifican para 13 proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial, 2 ARNr (16S y 12S) y 14 ARNt necesarios para la síntesis polipeptídica mientras que en la cadena ligera se encuentra codificada la información para 8 ARNt.

Los trece polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial, son subunidades proteicas constituyentes de los complejos multienzimáticos I, III, IV y V de la cadena respiratoria mitocondrial, mientras que el complejo II está constituido exclusivamente por proteínas codificadas por el genoma nuclear. En concreto, las proteínas codificadas por el genoma mitocondrial son las subunidades ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6 del complejo I, NADH deshidrogenasa, un citocromo b del complejo III, 3 subunidades citocromo c oxidasa (I, II y III) del complejo IV y dos ATPasas (6 y 8) del complejo V (Figura I3). Los otros polipéptidos de la cadena respiratoria son codificados por el genoma nuclear e importados a la mitocondria tras su traducción en el citosol (Figura I3).



**Figura I3.** Localización de las proteínas codificadas por el genoma mitocondrial en los complejos de la cadena transportadora de electrones. ND, NADH deshidrogenasa. SDH, succinato deshidrogenasa. CoQ, Coenzima Q. Cyt b, citocromo b. COX, citocromo c oxidasa. A, ATPasa.

El genoma mitocondrial humano presenta varias características que lo hacen diferenciarse del nuclear. Una de ellas es la ausencia de intrones en toda la molécula exceptuando la zona reguladora, conocida como D-loop, comprendida más o menos entre los nucleótidos 16160 y 570 (1112 nucleótidos). El resto de la molécula es codificante (Figura I2). Algunos de los genes proteicos están superpuestos, y parte de los codones de terminación no están codificados, pero son generados post-transcripcionalmente por poliadenilación de los ARNm (Schon, 1997). Además el código genético utilizado para su traducción presenta algunas diferencias con respecto al código universal (Osawa *et al.*, 1992).



### 2.1.3.2. Replicación, transcripción y traducción del genoma mitocondrial

#### A. Replicación

La síntesis del ADNmt es llevada a cabo por la ADN polimerasa  $\gamma$ , una enzima multifuncional que participa en la síntesis y la reparación del ADN por escisión de bases (de 3' a 5') y en la síntesis de ARN utilizando ADN como molde (Murakami *et al.*, 2003). A diferencia del ADN nuclear (ADNn), el ADNmt puede replicarse más de una vez en cada ciclo celular o no replicarse (Bogenhagen y Clayton, 1977). Además, el ADNmt puede replicarse en células que no estén en división (Wei, 1992).

En mamíferos la región D-loop es no codificante y contiene el origen de replicación para la síntesis de la cadena H, además de los promotores de la transcripción mitocondrial. Y, por tanto, está implicada en la regulación de la replicación y en la transcripción.

Actualmente existen dos modelos que explican el proceso de replicación del genoma mitocondrial: el modelo clásico o asimétrico (Clayton, 1982) y el modelo simétrico, mucho más parecido al del genoma nuclear (Holt *et al.*, 2000).

Modelo de replicación asimétrica (Brown *et al.*, 2005; Clayton, 1982) El genoma mitocondrial presenta dos orígenes de replicación, uno en la cadena pesada ( $O_H$ ) y otro en la cadena ligera ( $O_L$ ), separado del origen de la cadena pesada por dos terceras partes del genoma (Kasamatsu y Vinograd, 1974). La síntesis de ADN se inicia en el origen de replicación de la cadena H en el sentido de las agujas del reloj y continúa dos tercios del genoma. Una vez que la horquilla de replicación ha pasado sobre  $O_L$  empieza la síntesis de la cadena L en dirección opuesta a la síntesis de la nueva cadena H. Para comenzar la replicación de cada una de las cadenas se requiere la presencia de un cebador de ARN, sintetizado en ambos casos por la ARN polimerasa mitocondrial (POLRMT) (Clayton, 1991; Fuste *et al.*, 2010). La síntesis de las dos cadenas continúa en sentido contrario. A continuación, y con la ayuda de una topoisomerasa mitocondrial, se separan las cuatro cadenas, dando lugar a dos moléculas de ADNmt.

Modelo de replicación simétrica (Holt *et al.*, 2000): En el año 2000 Holt y colaboradores analizaron el modelo de replicación del genoma mitocondrial utilizando geles bidimensionales de agarosa en los que consiguieron separar productos intermediarios de replicación. Encontraron dos, uno resistente y otro sensible a la digestión por nucleasa S1, que degrada ADN de cadena sencilla. La presencia de este intermediario resistente contradecía el modelo de replicación asimétrica. Durante este estudio, los autores determinaron la existencia de un modelo de replicación muy similar al del genoma nuclear, con una cadena de replicación rápida y otra más lenta. Los autores concluyeron que los dos modelos coexisten y cada uno predomina en determinadas condiciones. El modelo asimétrico o clásico parece predominar en células en cultivo en condiciones basales, mientras que el modelo simétrico, análogo al nuclear, predomina en células que se están recuperando de una deficiencia de ADNmt o de otro tipo de estrés que pudiera afectar al número de copias de ADNmt (Holt *et al.*, 2000; Yasukawa *et al.*, 2005).

Estudios comparativos entre las secuencias de ADN de distintos organismos indican que la velocidad de sustitución de nucleótidos durante el proceso evolutivo ha sido 10 veces mayor en el genoma mitocondrial que en el nuclear. Este fenómeno podría atribuirse a la reducida fidelidad de los sistemas de replicación y/o reparación del genoma mitocondrial, ya que, aunque el ADNmt posee mecanismos de reparación, estos son mucho más simples y menos eficientes que los del ADNn. El principal y más estudiado es el sistema de reparación por escisión de base, utilizado para reparar el daño oxidativo en las bases del ADNmt (Pinz y Bogenhagen, 1998).

## B. Transcripción

El ADNmt humano tiene tres promotores para la transcripción de ARN, uno para la cadena L y dos para la cadena H (H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>). El origen de transcripción de la cadena L se localiza en la región D-loop, mientras que H<sub>1</sub> está situado al principio del gen F y H<sub>2</sub> está localizado justo antes del gen ARNr 12S (Montoya *et al.*, 1982) (Figura I2). Parece que H<sub>2</sub> está implicado en la transcripción de los genes que codifican los ARNr (Martin *et al.*, 2005; Montoya *et al.*, 1983).

Los 37 genes codificados por el ADNmt son inicialmente sintetizados en dos grandes transcritos policistrónicos, uno codificado por la cadena L, y otro codificado por la cadena H. Uno de los inconvenientes de la transcripción policistrónica del ADNmt es que, para la traducción de los ARNm se necesitan grandes cantidades de ARNr y ARNt, cuyos transcritos deberían ser mucho más abundantes. La capacidad del factor mitocondrial de terminación de la transcripción, MTERF, para estimular la producción de ARNr permite solucionar este problema ya que facilita que, además del transcrito policistrónico de 16kb, se sintetice otro transcrito más pequeño, de 3 kb, que incluye los dos ARNr, además de los ARNt que los flanquean y cuya tasa de síntesis es 25 veces superior a la del transcrito largo (Kruse *et al.*, 1989; Yakubovskaya *et al.*, 2010). De esta forma, la mitocondria puede producir una cantidad de ARNr suficiente para el funcionamiento de todos los ribosomas necesarios para el proceso de traducción.

Puesto que el genoma mitocondrial carece de intrones, el procesamiento de los transcritos es relativamente sencillo. Los genes que codifican los ARNt flanquean los dos genes ribosomales así como el resto de genes que codifican proteínas. Distintos estudios indican que esta distribución de los ARNt genera unas señales específicas que pueden ser reconocidas por endonucleasas (Ojala *et al.*, 1980), que cortan estos transcritos en los extremos 5' y 3' de los ARNt.

## C. Traducción

La traducción de los ARNm mitocondriales tiene lugar en los ribosomas mitocondriales, que están formados por los ARNr 5S, 12S, y 16S, codificados por el genoma mitocondrial, y por otras proteínas codificadas por el genoma nuclear (Magalhaes *et al.*, 1998).



Existen algunas diferencias entre la traducción de proteínas que tiene lugar en el citoplasma y la que tiene lugar en la mitocondria. Por ejemplo, los ARNm mitocondriales no tienen estructura CAP en la posición 5' y no tienen apenas secuencias UTR (del inglés "Untranslated Regions"). Además, el código genético mitocondrial presenta algunas variaciones en la lectura de los codones respecto al código genético universal, de modo que 5 de los 64 codones tienen distinto significado. Así, UGA que en todas las células es un codón de terminación, en las mitocondrias de mamíferos, hongos y protozoos codifica triptófano, AUA/AUU que codifican normalmente isoleucina, codifican metionina en las mitocondrias de mamíferos y AGG/AGA que codifican arginina, son codones de terminación en las mitocondrias (Osawa *et al.*, 1992).

También el sistema de reconocimiento de codones es inusual, ya que permite la lectura del código genético y síntesis proteica mitocondrial con sólo 22 ARNt, y se basa exclusivamente en las dos primeras bases del codón, lo que sugiere que en dicho código existe una variación al azar (Lagerkvist, 1978).

### 2.1.3.3. Mutaciones en el genoma mitocondrial: papel en carcinogénesis

La mayor susceptibilidad del genoma mitocondrial a la aparición de mutaciones no sólo se debe a la escasez de mecanismos de reparación del ADN en la mitocondria sino también a su proximidad a la cadena transportadora de electrones, que constantemente genera ROS, y a la ausencia de histonas que protejan su estructura (Croteau y Bohr, 1997; Maynard *et al.*, 2009; Wallace, 2005). Todos estos factores hacen que la tasa de mutación en el genoma mitocondrial sea entre 10 y 20 veces superior a la que afecta al genoma nuclear. Puesto que el ADNmt carece de intrones la mayor parte de las mutaciones aparecen en regiones codificantes.

Debido a que el genoma mitocondrial es clave para el proceso de fosforilación oxidativa, la acumulación de mutaciones en este genoma puede afectar a la obtención de energía, a los niveles de estrés oxidativo y a la supervivencia celular, contribuyendo al desarrollo de distintas enfermedades metabólicas y degenerativas, al proceso de envejecimiento y la carcinogénesis (Wallace, 2005).

El hecho de que en una misma célula existan múltiples copias de ADNmt hace que, las moléculas que contienen mutaciones puedan coexistir con aquellas de tipo silvestre, en una situación denominada heteroplasmia. El porcentaje de moléculas de ADNmt mutadas puede variar entre las mismas células de un mismo tejido y entre los distintos tejidos de un mismo individuo. Aquellos tejidos que presentan una mayor demanda energética como el tejido muscular esquelético o el tejido cardiaco son los más susceptibles a la presencia de mutaciones en este genoma. Como se mencionó anteriormente, la replicación del genoma mitocondrial no está ligada al ciclo celular, por lo que una molécula de ADNmt puede replicarse un gran número de veces o ninguna antes de la división celular. Este sistema de replicación hace que una mutación pueda expandirse o bien perderse durante el proceso de división celular. Este fenómeno es muy importante, ya que las mutaciones del ADNmt en

heteroplasmia sólo causan disfunciones en la cadena respiratoria mitocondrial si superan un determinado umbral que varía en función de la mutación.

La posible relación entre la alteración de la función mitocondrial y el desarrollo y la progresión del cáncer se ha estudiado durante mucho tiempo. Hace más de 50 años Otto Warburg comenzó a estudiar el papel de las alteraciones mitocondriales en cáncer y propuso que, a diferencia de las células sanas, las células tumorales utilizan la glucólisis en lugar de la fosforilación oxidativa para obtener la mayor parte del ATP, incluso en presencia de oxígeno (Warburg, 1956). Este fenómeno se conoce como “efecto Warburg” o “glucólisis aerobia”. Una de las hipótesis que podría explicar este efecto es la acumulación de mutaciones en el ADNmt, que producen alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial.

La elevada producción de ROS en la mitocondria se ha asociado con el desarrollo de un gran número de enfermedades, entre ellas el cáncer. Este aumento en la generación de ROS junto con la reducción de los sistemas de defensa antioxidante observada en células tumorales hace que aparezcan mutaciones en el ADNmt que a su vez alteran la funcionalidad de la cadena respiratoria generando más ROS. Esta situación de daño oxidativo persistente hace que se incremente el daño mitocondrial y contribuye al crecimiento de las células tumorales y al desarrollo de metástasis (Chatterjee *et al.*, 2011).

Durante las dos últimas décadas se han identificado numerosas alteraciones en el ADNmt en tumores primarios humanos. Estas alteraciones incluyen deleciones, mutaciones puntuales y cambios en el número de copias de ADNmt.

Aunque se ha detectado la presencia de deleciones de gran tamaño en distintos tumores humanos, como el carcinoma hepatocelular (HCC) (Fukushima *et al.*, 1995; Kotake *et al.*, 1999; Wheelhouse *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2004), distintos estudios indican que su acumulación en el tejido tumoral es inferior a la detectada en tejido sano. Esto podría deberse a la existencia de algún tipo de mecanismo para reducir o eliminar el número de copias de ADNmt con deleciones en estas células tumorales, o bien a la mayor sensibilidad a la apoptosis de las células tumorales con deleciones de gran tamaño. Sin embargo, se ha descrito la presencia de altos niveles de ADNmt con deleciones de pequeño tamaño (<1kb) en distintos tipos de tumores humanos. Así, se ha encontrado una deleción de 50 pb en la zona D-loop en pacientes con tumores gástricos (Burgart *et al.*, 1995) y HCC (Lee *et al.*, 2004). También se ha descrito la presencia de una deleción de 66 pb en el gen ND1 en más del 65% de los pacientes con HCC (Yin *et al.*, 2010).

Las primeras mutaciones puntuales en regiones codificantes del ADNmt en células tumorales se detectaron en 1998 en 10 líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos (Polyak *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos en distintos estudios indican que la mayoría de estas mutaciones aparecen en homoplasia (Fliss *et al.*, 2000; Polyak *et al.*, 1998). Esto podría deberse a que confieren algún tipo de ventaja en el crecimiento o la supervivencia celular o bien facilitan la replicación del ADNmt, favoreciendo así la expansión de este tipo de mutación hasta alcanzar la homoplasia y el crecimiento de las

células portadoras en el tumor.

Una de las zonas del genoma mitocondrial en la que las mutaciones son más frecuentes es la región reguladora D-loop. Además de mutaciones puntuales, en esta región aparecen también inserciones y deleciones que se han detectado en varios tipos de tumores, entre ellos el HCC (Hung *et al.*, 2008; Nishikawa *et al.*, 2001; Nomoto *et al.*, 2002; Wheelhouse *et al.*, 2005). De hecho, las inserciones y deleciones que aparecen en la región D310 del D-loop, una zona rica en citosinas entre los nucleótidos 303 y 309, son las mutaciones del ADNmt más frecuentes en tumores humanos (Lee y Wei, 2009). Distintos estudios indican que esta región es mucho más susceptible al daño oxidativo y electrofílico que otras regiones del ADNmt (Mambo *et al.*, 2003). Además, la baja eficacia de los mecanismos de reparación del ADNmt puede contribuir a aumentar la frecuencia de mutaciones homoplásmicas en esta región (Mambo *et al.*, 2003). En humanos, la limitada actividad correctora de errores de la ADN polimerasa y podría contribuir a la alta incidencia de este tipo de mutaciones (Graziewicz *et al.*, 2002; Wanrooij *et al.*, 2004). La presencia de mutaciones en el D-loop se ha asociado con un mal pronóstico y una reducción de la supervivencia en distintos tipos de tumores como el carcinoma colorrectal (Lievre *et al.*, 2005) o el cáncer de mama (Tseng *et al.*, 2006). En el caso del HCC la presencia de mutaciones en esta región se asocia con una menor diferenciación del tumor (Tamori *et al.*, 2004).

Las alteraciones en el número de copias de ADNmt también son frecuentes en tumores humanos aunque dependen del tipo de tumor (Lee *et al.*, 2005). En el HCC el tejido tumoral tiene menor número de copias de ADNmt que el tejido sano (Cuezva *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2004). Esta reducción en el número de copias de ADNmt se ha asociado con la presencia de mutaciones cerca de los orígenes de replicación que impedirían la replicación del genoma mitocondrial (Lee *et al.*, 2004). En el caso del HCC, esta alteración se ha asociado con una reducción en la esperanza de vida de los pacientes, un mayor tamaño del tumor y desarrollo de cirrosis hepática (Yamada *et al.*, 2006).

Además del papel de las alteraciones en el genoma mitocondrial en el desarrollo y progresión de esta enfermedad, estudios recientes sugieren su implicación en el desarrollo de resistencia frente a fármacos antitumorales. Varios estudios realizados utilizando híbridos (células generadas a partir de la fusión de células enucleadas que contienen la mutación de interés en el ADNmt con células desprovistas de genoma mitocondrial) indican que una mutación puntual en el gen de la ATPasa 6 confiere resistencia a la muerte celular por apoptosis inducida por cisplatino (Shidara *et al.*, 2005). También la reducción en el número de copias de ADNmt puede contribuir al desarrollo de resistencia a fármacos antitumorales, este fenómeno se ha observado en una línea celular derivada de cáncer de mama en la que la reducción en el contenido de ADNmt aumenta la resistencia al hidroxitamoxifeno (Naito *et al.*, 2008).

## 2.2. SEÑALIZACIÓN RETRÓGRADA

### 2.2.1. Concepto de señalización retrógrada

La coordinación de la expresión de los genomas nuclear y mitocondrial es fundamental para el correcto funcionamiento de la mitocondria y, por tanto, para el desarrollo de los distintos procesos celulares en los que este orgánulo está implicado. Además de las señales nucleares que regulan el funcionamiento de la mitocondria existe también un sistema de regulación en sentido opuesto, denominado “señalización retrógrada” que permite modificar la expresión de genes nucleares en respuesta a los cambios en la función respiratoria mitocondrial (Butow y Avadhani, 2004; Liu y Butow, 2006).

La mayor parte de los estudios sobre estos procesos de señalización se han llevado a cabo en levaduras, concretamente en *Saccharomyces cerevisiae*. En este organismo se han descrito varias rutas de señalización entre la mitocondria y el núcleo y se han identificado muchos de los genes implicados en ellas. En este modelo, los procesos de señalización retrógrada se han relacionado con el reajuste de las actividades metabólicas celulares en respuesta a las alteraciones mitocondriales (Liu y Butow, 2006) y con los procesos de envejecimiento (Kirchman *et al.*, 1999).

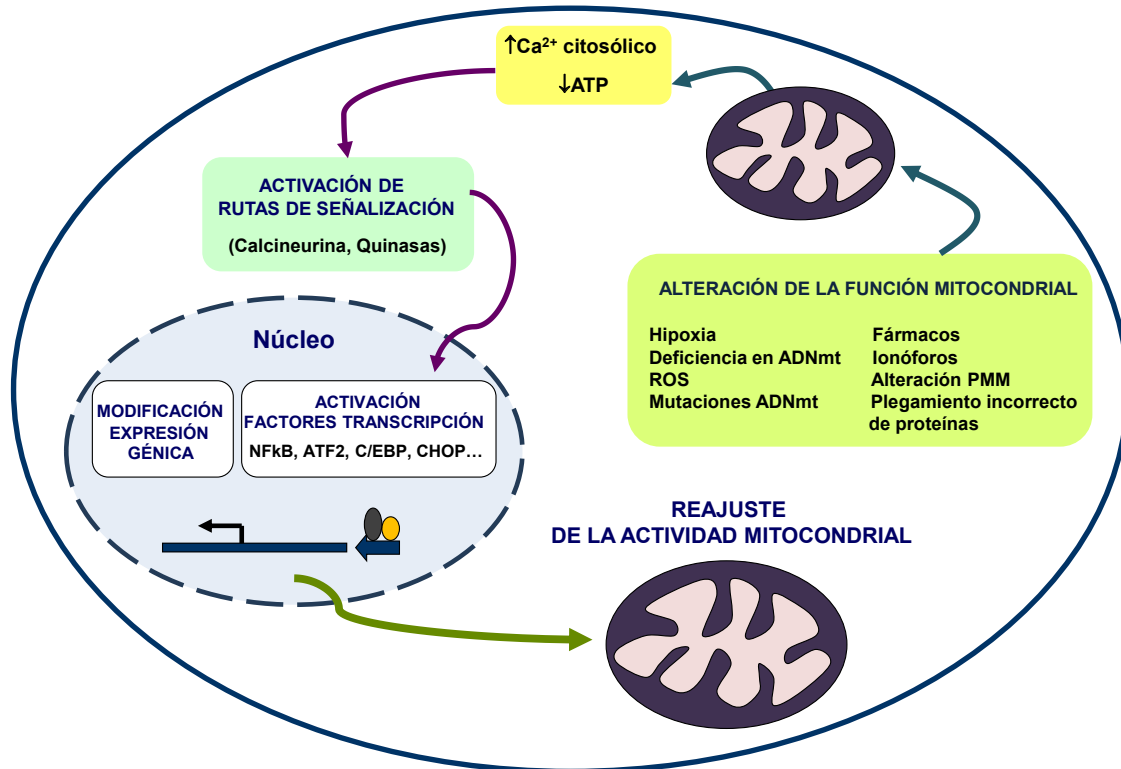
Aunque la existencia de estas rutas de comunicación entre la mitocondria y el núcleo se ha descrito también en células animales, los mecanismos moleculares implicados en los procesos de señalización retrógrada difieren entre los distintos organismos (Liu y Butow, 2006).

### 2.2.2. Señalización retrógrada en mamíferos: papel en carcinogénesis

Las primeras evidencias sobre el efecto de las alteraciones en la función mitocondrial sobre la expresión de genes nucleares en mamíferos se obtuvieron en varios estudios realizados en distintas líneas celulares desprovistas de ADNmt (células Rho) en las que se observó un aumento en los niveles de ARNm para distintas proteínas mitocondriales (Marusich *et al.*, 1997; Wang y Morais, 1997).

La existencia de una vía de señalización retrógrada o señalización por estrés mitocondrial, como también se denomina en mamíferos, se describió por primera vez en la línea celular C2C12, derivada de rdbomiocitos de ratón, y se confirmó en la línea celular A549, derivada de carcinoma de pulmón humano (Amuthan *et al.*, 2002; Biswas *et al.*, 1999). Para estudiar estos procesos de señalización, las células se trataron con Bromuro de Etidio (BrEt), que reduce los niveles de ADNmt, o con CCCP (del inglés “Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone”), un ionóforo específico para la mitocondria. De esta forma, las células se ven sometidas a una situación de estrés mitocondrial caracterizada por alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial (PMM) que impiden el almacenamiento de Ca<sup>2+</sup> en la mitocondria y por tanto hacen que aumente su concentración en el citoplasma.

Este aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico produce la activación de la calcineurina, que a su vez activa los factores de transcripción NFAT y NF $\kappa$ B, y de varias quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  como PKC, JNK, CamKIV y MAPK (Butow y Avadhani, 2004) que activan factores de transcripción como ATF2, C/EBP $\delta$  o CREB capaces de regular la expresión de los genes diana de estas vías de señalización retrógrada (Mellstrom *et al.*, 2008) (Figura I4) entre los que se encuentran varios marcadores tumorales como catepsina L y TGF- $\beta$  (Amuthan *et al.*, 2001).



**Figura I4.** Mecanismo de señalización retrógrada en mamíferos. Las alteraciones en la función mitocondrial provocadas por: inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial, hipoxia o modificaciones en el genoma mitocondrial conducen a una pérdida de PMM y de la capacidad para generar ATP. Esta situación de estrés mitocondrial desencadena una cascada de señalización mediante la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol. Esto hace que se activen distintas proteínas como calcineurina y quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediante estas rutas de señalización se activan diversos factores de transcripción que modifican la expresión de genes nucleares con el objetivo de recuperar la correcta actividad mitocondrial. Tomado de Ryan y Hoogenraad, 2007.

Además de esta ruta de señalización retrógrada, en la mitocondria también existe una vía de señalización similar a la respuesta frente a proteínas no plegadas (UPR) en el retículo endoplásmico (Mori *et al.*, 1993; Travers *et al.*, 2000). En mitocondrias, la activación de esta ruta UPR parece estar desencadenada por la acumulación en la matriz mitocondrial de proteínas plegadas de forma incorrecta y es mediada, al menos en parte, por los factores de transcripción CHOP y C/EBP $\beta$  que activan la expresión de chaperonas y proteasas específicas de la mitocondria, como Hsp60, Hsp10 y ClpP (Ryan y Hoogenraad, 2007; Zhao *et al.*, 2002).

Los cambios en la generación de ROS también podrían estar implicados en estos procesos de comunicación entre la mitocondria y el núcleo, ya que actúan sobre un gran

número de vías de señalización que permiten adaptar el funcionamiento celular a los cambios en sus niveles. Existe un gran número de factores de transcripción sensibles a los cambios en el estado redox de la célula como NFκB, AP-1, p53 (Finkel y Holbrook, 2000), que podrían estar implicados en estos procesos de señalización.

Además de todos los factores de transcripción mencionados anteriormente, distintos estudios indican que otros factores pueden estar implicados en estos procesos de señalización retrógrada en mamíferos. Este es el caso de TOR (Jacinto y Hall, 2003) y MYC, implicado en la regulación de muchas funciones celulares como la respuesta a estrés celular y apoptosis y que presenta homología con Rtg3, uno de los genes implicados en la principal ruta de señalización retrógrada descrita en levaduras (Miceli y Jazwinski, 2005).

Como se mencionó en el apartado 2.1.3.3, la presencia de mutaciones en el ADNmt es una característica común en células tumorales, por lo que los procesos de señalización retrógrada podrían jugar un papel destacado en el desarrollo de esta enfermedad.

Estudios realizados en células C2C12 (derivada de rhabdomiocitos de ratón) y A549 (derivada de carcinoma de pulmón humano) parcialmente deficientes en ADNmt indican que la activación de los procesos de señalización retrógrada aumenta la invasividad tumoral de estas células e induce la expresión de distintos marcadores tumorales específicos como, TGF-β, epirregulina o catepsina L (Amuthan *et al.*, 2002; Amuthan *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 1999). La expresión de este último marcador tumoral puede ser modificada a través de factores de transcripción activados por el aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el citosol como PKC (del inglés “Protein Kinase C”) (Amuthan *et al.*, 2002; Amuthan *et al.*, 2001). En algunos casos, la reducción parcial o total de los niveles de ADNmt confiere una mayor resistencia a la apoptosis, mediante la inducción de la proteína antiapoptótica Bcl2 y la reducción de la activación de Bid (Amuthan *et al.*, 2002). Por tanto, la inducción de la expresión de genes antiapoptóticos y genes implicados en tumorigénesis, dos factores fundamentales en el desarrollo tumoral, parecen estar regulados mediante rutas de señalización retrógrada.

Algunos estudios indican que estas rutas de señalización entre la mitocondria y el núcleo podrían estar implicadas en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia mediante la inducción de la expresión de proteínas de la superfamilia ABC (del inglés “ATP Binding Cassette”), implicadas en la expulsión de distintos fármacos. El aumento en los niveles de expresión de MDR1 (ABCB1) se ha descrito en varias líneas celulares deficientes en ADNmt como las SK-Hep-1, derivadas de hepatoma humano. En esta línea celular, el aumento de la expresión en MDR1 se ha relacionado con una mayor resistencia a los tratamientos con doxorubicina y cisplatino (Ling *et al.*, 2012).

### 2.2.3. Modelo de estudio en señalización retrógrada: células Rho

Uno de los modelos más utilizados para estudiar el efecto de las alteraciones en el genoma mitocondrial sobre la fisiología celular y los procesos de señalización retrógrada



es el uso de líneas celulares desprovistas parcial o totalmente de ADNmt, denominadas células Rho. Puesto que estas células son parcial ( $Rho^-$ ) o totalmente ( $Rho^0$ ) deficientes en ADNmt no pueden llevar a cabo de forma eficaz el proceso de fosforilación oxidativa por lo que requieren de ciertos suplementos nutricionales como el piruvato y la uridina para poder crecer en cultivo (King y Attardi, 1989; Morais *et al.*, 1994).

Aunque existen distintos métodos para la obtención de células Rho, el más extendido es el tratamiento con bajas concentraciones de BrEt (50-100 ng/ml) que, a largo plazo reduce los niveles de ADNmt, ya que inactiva la ADN polimerasa  $\gamma$ , enzima responsable de la replicación del ADNmt, por lo que el genoma nuclear no se ve afectado por el tratamiento (Nass, 1972). En 1978 Tarrago y colaboradores utilizaron por primera vez el BrEt para obtener una sublínea celular Rho a partir de la línea celular de carcinoma de mama de ratón EMT-6 en la que se inhibía más del 90% de la actividad enzimática de la ADN polimerasa  $\gamma$  (Tarrago-Litvak *et al.*, 1978). Desde entonces, el tratamiento con este compuesto se ha utilizado para obtener sublíneas celulares deficientes en ADNmt derivadas de distintas células tumorales humanas. En 2004, Park y colaboradores cultivaron las células de hepatoma humano SK-Hep-1 en presencia de BrEt, consiguiendo eliminar totalmente el ADNmt (Park *et al.*, 2004).

A diferencia de lo que ocurre con las células humanas, el tratamiento de células de ratón con BrEt sólo permite obtener una reducción parcial de los niveles de ADNmt (Hayashi *et al.*, 1990). Para conseguir la eliminación total del genoma mitocondrial en estas células se utiliza el ditercalinio, un agente intercalante originalmente utilizado como fármaco antitumoral capaz de inactivar la ADN polimerasa  $\gamma$  (Okamaoto *et al.*, 2003). Este compuesto permite eliminar completamente el ADNmt tanto en células humanas como en células de ratón (Inoue *et al.*, 1997a; Inoue *et al.*, 1997b). Parece que las diferencias en la eficacia de estos dos compuestos en la reducción de los niveles de ADNmt en células de ratón se debe a que el BrEt se acumula en menor cantidad y de forma más difusa en la mitocondria que el ditercalinio (Okamaoto *et al.*, 2003).

También se han utilizado distintos inhibidores análogos de nucleósidos de la transcriptasa reversa (NRTI), como la azidotimidina (AZT) (Collins *et al.*, 2004; Lewis y Dalakas, 1995), que impiden el correcto funcionamiento de la ADN polimerasa  $\gamma$  para reducir los niveles de ADNmt tanto en cultivos celulares como en modelos animales (Collins *et al.*, 2004; Pan-Zhou *et al.*, 2000).

Además de su utilidad para el estudio de los procesos de señalización retrógrada y el efecto de las mutaciones mitocondriales, las células Rho se han convertido en modelos celulares para estudiar funciones importantes de la mitocondria como la fosforilación oxidativa, la producción de ATP, el transporte de electrones y la generación de ROS. Este modelo celular también se ha utilizado en estudios de los procesos de muerte celular en los que se demostró que la carencia de ADNmt en las células SK-Hep-1 Rho confería resistencia frente a la apoptosis inducida por p53, de forma dependiente a la producción de ROS (Park *et al.*, 2004).

## 2.3. ESTRÉS OXIDATIVO

### 2.3.1. Especies reactivas de oxígeno

Las ROS son moléculas altamente reactivas que contienen algún átomo de oxígeno en su estructura. Muchas de ellas son radicales libres cuya reactividad viene dada por la presencia de electrones desapareados en su orbital más externo. Esto hace que sean moléculas muy inestables y reactivas ya que tienden a donar o recibir electrones para poder estabilizarse.

Estas moléculas se generan en la célula como resultado de la reducción parcial del oxígeno, el principal aceptor de electrones en las reacciones del metabolismo aeróbico, aunque también pueden derivar de fuentes exógenas, bien por captura directa por parte de la célula de su medio extracelular o bien como consecuencia de la exposición de la célula a un daño exterior.

Aunque las ROS pueden generarse en distintos orgánulos como el retículo endoplásmico, los lisosomas y los peroxisomas, la mitocondria es considerada la principal fuente celular de ROS, ya que, es en este orgánulo donde se produce la mayor parte del radical superóxido como consecuencia del funcionamiento de la cadena transportadora de electrones (Bartosz, 2009). También existen distintos sistemas enzimáticos que contribuyen a la generación de ROS como la xantina oxidoreductasa, la ciclooxigenasa o las NADPH oxidasas consideradas como la principal fuente extramitocondrial de ROS (Nauseef, 2008).

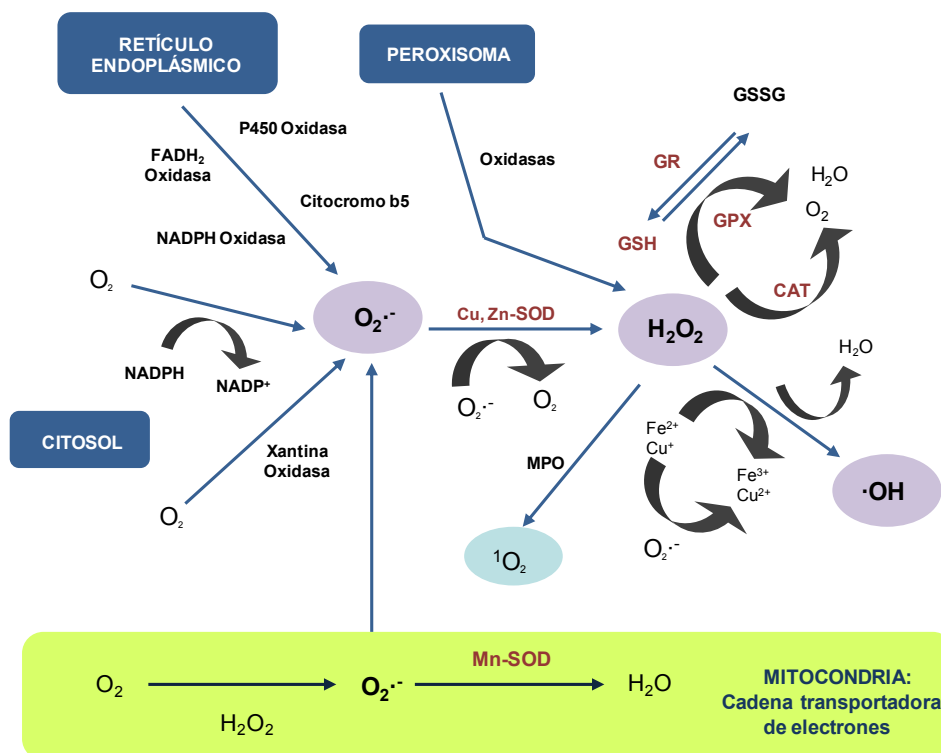
Las principales ROS producidas a nivel celular son (Figura I5):

- **Radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ):** puede generarse en los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial, en el retículo endoplásmico por el citocromo P450 y en algunas células, como los leucocitos, por la acción de la NADP-oxidasa. El radical superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico (NO) generando peroxinitrito y otras especies reactivas de nitrógeno (RNOS) que también participan en los procesos de estrés oxidativo.
- **Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ):** se genera principalmente en los peroxisomas. Si no es reducido a agua puede dar lugar a la formación del radical hidroxilo.
- **Radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ):** es el agente oxidante más potente que se conoce.

A pesar de que tradicionalmente la generación de ROS se ha asociado con la aparición de alteraciones a nivel celular, diversos estudios llevados a cabo en los últimos años confirman que, a bajas concentraciones, las ROS juegan un papel fundamental en procesos de señalización celular y de regulación de la expresión génica (Bartosz, 2009). Para poder mantener los niveles de ROS dentro de los parámetros fisiológicos, las células cuentan con un gran número de mecanismos de defensa antioxidante que limitan su acumulación, entre ellos se incluyen moléculas de bajo peso molecular como el ácido



ascórbico, la vitamina E o el glutatión (GSH) y sistemas enzimáticos como tioredoxina, la SOD, la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) (Deavall *et al.*, 2012). Sin embargo, en respuesta a determinados estímulos como la exposición a compuestos tóxicos o la radiación, o como resultado de distintos procesos patológicos puede producirse un incremento en la generación de ROS que supera la capacidad reguladora de los sistemas antioxidantes, dando lugar a una situación de estrés oxidativo. Este desequilibrio entre los sistemas prooxidantes y antioxidantes hace que se acumulen ROS que interactúan con distintos componentes celulares como ADN, proteínas y lípidos, alterando su actividad. Si la situación se prolonga en el tiempo, los daños acumulados pueden conducir a la muerte celular.



**Figura 15.** Representación esquemática de las vías de síntesis y degradación de las principales especies reactivas de oxígeno (ROS).

La oxidación del ADN produce un gran número de lesiones en esta molécula, como la oxidación de bases (purinas y pirimidinas), la aparición de sitios abásicos y la rotura del ADN de cadena doble o sencilla. La guanina es la base nitrogenada más sensible ya que presenta un potencial de oxidación muy bajo, lo que hace que existan un gran número de productos procedentes de la oxidación de esta base (Neeley y Essigmann, 2006). Si la presencia de lesiones en el ADN supera la capacidad de los sistemas de reparación comienzan a aparecer mutaciones que finalmente conducen a la muerte celular por apoptosis. Así, las células que presentan daños intensos en su ADN se eliminan, manteniendo la integridad genética de la población celular.

En una situación de estrés oxidativo, las ROS pueden interactuar con un gran número de proteínas, incluyendo fosfatasa, quinasas, factores de transcripción y enzimas

implicadas en el metabolismo celular. Por tanto, la oxidación proteica, tiene un gran impacto sobre la homeostasis celular ya que altera procesos de señalización y reacciones metabólicas y daña la estructura celular. La sensibilidad de las distintas proteínas al daño oxidativo está condicionada por distintos factores como la presencia de sitios de unión a metales, su localización celular, su conformación y su tasa de degradación (Avery, 2011). Entre los aminoácidos más sensibles al daño oxidativo en las proteínas se incluyen la histidina, la prolina, la arginina, la lisina y la cisteína, a partir de los que se forman productos de carbonilación. Las lesiones oxidativas más frecuentes son agregación, fragmentación, rotura y modificaciones de grupos funcionales.

La acción de los radicales libres sobre las membranas celulares hace que se desencadene un proceso de peroxidación lipídica mediante el cual los lípidos de membrana, especialmente los ácidos grasos insaturados, se transformen en radicales libres que amplifican el daño oxidativo. Debido a la presencia de dobles enlaces en su estructura, los ácidos grasos poliinsaturados son moléculas muy sensibles al ataque de los radicales libres, que inician el proceso de peroxidación lipídica con la extracción de un electrón del carbono contiguo al doble enlace. Se forma así un radical alquil ( $L^{\cdot}$ ) que por adición del oxígeno se convierte en peroxil ( $LOO^{\cdot}$ ). Tras varias reacciones se reduce formando un hidroperóxido ( $LOOH$ ) que a su vez genera a su lado otro radical alquil ( $L^{\cdot}$ ), propagándose así la reacción de peroxidación. Todas estas especies intermedias van a ser a su vez reactivas. El proceso termina cuando reaccionan entre sí dos radicales alquil ( $L^{\cdot}$ ) o cuando se produce la ruptura del ácido graso en múltiples productos, como el malondialdehído (MDA), que es tóxico por sí mismo. Este proceso de peroxidación lipídica altera el funcionamiento de la membrana, aumentando su fluidez, inactivando la unión de enzimas y receptores de membrana o aumentando la expulsión de solutos citosólicos (Avery, 2011).

Los daños celulares causados por el estrés oxidativo parecen estar implicados en el desarrollo de numerosas patologías como la arterioesclerosis, la diabetes, la hipertensión o el cáncer (Bartosz, 2009; Finkel y Holbrook, 2000) y enfermedades degenerativas como el Parkinson, el Alzheimer o la artritis, además de en el proceso general de envejecimiento (Finkel y Holbrook, 2000).

### **2.3.2. Agentes causantes de estrés oxidativo**

#### **2.3.2.1. Compuestos endógenos: ácidos biliares**

Los ácidos biliares (ABs) son ácidos carboxílicos que se sintetizan en los hepatocitos como resultado del metabolismo del colesterol. Son compuestos hidrosolubles, fácilmente excretables y con utilidad en los procesos digestivos. En su mayoría son compuestos anfipáticos con dos regiones diferenciadas, una hidrofílica y otra hidrofóbica, lo que les confiere propiedades detergentes. Esta particular estructura les permite asociarse entre sí y formar micelas a partir de una concentración determinada denominada concentración micelar crítica (CMC).

Respecto a su estructura química, los ABs son esteroides con 24 átomos de carbono, saturados, mono o polihidroxiados y con un grupo carboxilo en la cadena lateral que puede estar conjugado con glicina o taurina (Roger *et al.*, 1983). La Figura I6 muestra la estructura química de un AB típico, el ácido cólico (AC).

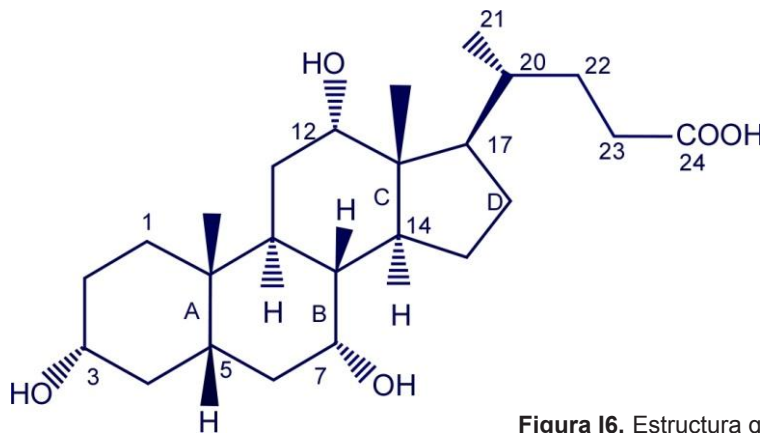


Figura I6. Estructura química del ácido cólico (AC).

Los ABs primarios son el ácido cólico (AC: 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -trihidroxi-5 $\beta$ -colanoico) y el ácido quenodesoxicólico (AQDC: 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico). Se sintetizan directamente en el hígado y a su paso por el intestino las bacterias de la flora intestinal los degradan dando lugar a los denominados ABs secundarios. Éstos carecen del grupo hidroxilo en posición 7 $\alpha$  y son el ácido desoxicólico (ADC), procedente del AC, y litocólico (ALC), procedente del AQDC. Además de ésta existen otras transformaciones minoritarias que producen una gran variedad de derivados de los ABs primarios. En los fluidos biológicos la mayoría de los ABs se encuentra en forma de sales, formas ionizadas solubles de estos compuestos (Hofmann, 1998).

Estos compuestos endógenos permanecen en su mayoría reclusos en la circulación enterohepática gracias a la existencia de proteínas transportadoras específicas localizadas en las membranas apical y basal de ileocitos y basolateral y canalicular de los hepatocitos. Los ABs son secretados a la bilis y concentrados en la vesícula biliar donde se almacenan hasta que la ingesta de alimentos, especialmente si son ricos en grasas, estimula su vaciamiento. Los ABs alcanzan entonces el duodeno donde llevan a cabo los procesos de digestión y absorción de las grasas y vitaminas liposolubles. La mayoría son reabsorbidos de forma activa en el íleon, aunque una alta proporción de ABs dihidroxilados conjugados con glicina se reabsorben pasivamente en el yeyuno (Angelin *et al.*, 1976) y los ABs libres (generalmente desconjugados por las bacterias intestinales durante el tránsito intestinal) se reabsorben de forma pasiva en el colon (Mekhjjan *et al.*, 1979). Los ABs reabsorbidos pasan en proporción de un 99,9% a las ramas de la vena porta, se transportan unidos principalmente a albúmina y a lipoproteínas (Kramer *et al.*, 1979) y son captados con gran eficacia por los transportadores de la membrana sinusoidal de los hepatocitos. Este ciclo se lleva a cabo unas 6-10 veces al día (3-4 veces por comida) con escasas pérdidas fecales (menos del 5% del "pool" total). Los ABs que se pierden son reemplazados por moléculas de nueva síntesis, que se mantiene inhibida por un mecanismo de retroalimentación negativa.

## A. Síntesis de ácidos biliares

Los ABs primarios se sintetizan a partir del colesterol a través de dos vías:

- La vía clásica o vía neutra, denominada así porque los compuestos intermediarios son esteroides neutros. Sus productos principales son el AC y el AQDC, y el paso limitante es la hidroxilación en el C7 del núcleo esteroideo llevada a cabo por la enzima microsomal colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (gen *CYP7A1*).
- La vía alternativa o vía ácida, en la que los compuestos intermediarios tienen carácter ácido. El producto mayoritario de esta vía es el AQDC (Bjorkhem, 1992), y el paso limitante es la hidroxilación en el C27 de la cadena lateral llevada a cabo por la enzima mitocondrial colesterol 27-hidroxilasa (gen *CYP27A1*).

La contribución relativa de estas dos vías a la biosíntesis global de los ABs no está muy clara, aunque parece que la vía clásica es la mayoritaria en la biosíntesis de ABs en humanos en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la vía alternativa puede adquirir un papel fundamental en ciertas patologías hepáticas, y parece ser la vía mayoritaria durante la vida fetal (Deleze *et al.*, 1978). Además, se ha comprobado que en cultivos de hepatocitos de rata, la vía alternativa produce aproximadamente un 50% de los ABs sintetizados (Stravitz *et al.*, 1996).

Una vez sintetizados, los ABs pueden sufrir distintas biotransformaciones, fundamentalmente procesos de conjugación con sulfato, ácido glucurónico, N-acetilglucosamina o con aminoácidos (glicina o taurina). A diferencia de la amidación con glicina o taurina, la glucuronidación o la sulfatación son vías minoritarias en individuos sanos. Sin embargo, en situaciones patológicas como la colestasis, la conjugación de los ABs con sulfato o ácido glucurónico se incrementa para formar especies más hidrosolubles (Hofmann, 1994).

## B. Papel fisiológico de los ácidos biliares

Los efectos fisiológicos de los ABs son muy diversos. En el hígado, su secreción genera el flujo biliar dependiente de los ABs por su efecto osmótico en la luz canalicular. Estos compuestos inducen la secreción de lípidos biliares, principalmente fosfolípidos y colesterol, y modulan la biosíntesis de este último. El flujo de ABs a través del hepatocito determina la cantidad de los receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL). En la bilis forman micelas que transportan sustancias hidrofóbicas (colesterol, protoporfirinas, etc) y actúan como tampones para el Ca<sup>2+</sup>.

A nivel intestinal estas micelas permiten emulsionar las grasas y vitaminas liposolubles (A, D, E y K) de la dieta facilitando así su absorción. También activan lipasas intestinales, modulan la actividad de proteasas, la motilidad intestinal, la secreción de hormonas gastrointestinales como la colecistoquinina (Combettes *et al.*, 1992; Izukura *et al.*, 1991), e inducen la secreción de agua y electrolitos.

Recientemente, se ha descrito que los ABs participan en la homeostasis energética, ya que intervienen en la regulación del metabolismo de lípidos y de la glucosa (Houten, 2006). También se ha confirmado que los ABs inhiben la obesidad inducida por la dieta y previenen el desarrollo de resistencia a la insulina (Ikemoto *et al.*, 1997).

En los últimos años se ha descrito que los ABs son moléculas señalizadoras, con funciones sistémicas endocrinas. Son capaces de activar cascadas de proteína quinasas activadoras de mitógenos (MAPK, del inglés “Mitogen-Activated Protein Kinases”) (Qiao *et al.*, 2003), son ligandos del receptor acoplado a proteínas G TGR5 y activan receptores hormonales nucleares como FXR (del inglés “Farnesoid X Receptor”) (Houten, 2006). También, se ha demostrado su participación en el control de la proliferación y apoptosis en los tejidos en los que estos compuestos se encuentran en concentraciones elevadas (Marin *et al.*, 1993).

Por otro lado, se ha estudiado la capacidad genotóxica de los ABs, mayor en los ABs secundarios que en los primarios. Este poder genotóxico parece estar relacionado con el mayor o menor carácter hidrofóbico de las distintas especies de ABs (Rosignoli *et al.*, 2008). Sin embargo, un AB terciario como es el ácido ursodesoxicólico (AUDC), posee gran interés terapéutico. Este AB difiere del AQDC, mucho más tóxico, sólo en la orientación ecuatorial del grupo 7b-hidroxilo, pero esta propiedad permite que el AUDC sea marcadamente más hidrofílico que otros ABs (Perez y Briz, 2009). Así, diversos estudios han confirmado su utilidad en la disolución de cálculos biliares en la vesícula (Portincasa *et al.*, 2009) y en el tratamiento de la cirrosis biliar primaria (Gong *et al.*, 2008).

### C. Colestasis

La colestasis se define como una retención del flujo biliar. Esta situación produce un acúmulo de los componentes de la bilis en el plasma, como la bilirrubina (BR), dando lugar a ictericia, y los ABs, alcanzándose valores superiores a 100  $\mu\text{M}$  (Fischer *et al.*, 1996), con predominio del AGC frente a los ABs secundarios (Carey, 1958).

Una característica común a las diversas patologías que cursan con colestasis es una regurgitación de los ABs desde el hepatocito a la sangre acompañada de una disminución de estos compuestos en bilis. Esta carencia puede producir una deficiente absorción intestinal de lípidos biliares, esteatorrea y síndromes variados por deficiencia de vitaminas liposolubles. La colestasis prolongada puede conducir a complicaciones por hipovitaminosis como puede ser hipoprotrombinemia, osteomalacia y ceguera nocturna.

La colestasis puede ser de origen intra o extrahepático: en el primer caso, esta patología aparece como resultado de alteraciones hepatocelulares, de los canalículos biliares o de los pequeños conductillos microscópicos, mientras que en la colestasis extrahepática la lesión obstructiva se encuentra en los conductos biliares grandes.

Un tipo particular de colestasis intrahepática es la colestasis gravídica o colestasis intrahepática gestacional (CIG), una enfermedad que aparece generalmente durante el

último tercio de la gestación en mujeres sanas y que desaparece pocos días después del parto. Aunque ha sido diagnosticada mundialmente, su prevalencia varía mucho de unos países a otros. En España, su prevalencia es baja según se desprende de los estudios epidemiológicos realizados (Pascual *et al.*, 2002).

Su etiología es compleja, ya que en ella están implicados factores genéticos, endocrinos y ambientales. Aproximadamente en el 10% de los casos se han identificado mutaciones en diversos genes que codifican transportadores de ABs (Dixon *et al.*, 2009; Mullenbach *et al.*, 2005) y en el receptor de ABs FXR (Van Mil *et al.*, 2007). Además se considera que el polimorfismo p.V444A en el gen *ABCB11*, que codifica BSEP, constituye un factor de riesgo en la CIG (Dixon *et al.*, 2009). Esta predisposición metabólica hereditaria afectada por distintos factores desencadenaría la enfermedad y modularía su intensidad.

Los estrógenos parecen tener un papel destacado en el desarrollo de la CIG, ya que esta patología suele aparecer en el tercer trimestre del embarazo, cuando la producción de estrógenos es más elevada. Distintos estudios demuestran que tanto el etinilestradiol, como el 17 $\beta$ -glucurónido de estradiol (17 $\beta$ GE) pueden afectar al flujo biliar (Crocenzi *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2006), reduciendo la expresión de transportadores de ABs (Geier *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2006). Además, el 17 $\beta$ GE puede afectar al eflujo de ABs mediado por Bsep (Crocenzi *et al.*, 2003; Vallejo *et al.*, 2006). Sin embargo, el papel de la progesterona no está muy claro. La concentración plasmática de los derivados glucuro o sulfoconjugados de progesterona está aumentada en CIG con respecto a un embarazo normal y el perfil de sus derivados sulfatados está modificado y es característico de estas pacientes. En un estudio realizado por nuestro grupo (Pascual *et al.*, 2002) se encontró una relación inversa entre los niveles séricos de progesterona y la aparición de hipercolanemia gestacional subclínica. Así, en el caso de la progesterona y sus derivados aún no se ha determinado si su elevada concentración plasmática y urinaria es la causa o la consecuencia de la enfermedad (Meng *et al.*, 1997; Pascual *et al.*, 2002).

En cuanto a los factores exógenos que pueden condicionar una mayor prevalencia de la CIG, se han estudiado la estación del año, el ácido erúxico (ácido graso presente en algunas variedades de aceite de colza de consumo humano durante los años 70), dietas bajas en selenio o la administración de progesterona natural vía oral para prevenir el riesgo de parto prematuro.

La sintomatología de la CIG se caracteriza por la presencia de prurito (60% de los casos) con o sin ictericia, anorexia, náuseas, a veces hepatomegalia, malabsorción de grasas, esteatorrea, malnutrición de la madre, incapacidad de ganar peso normalmente, y una incidencia elevada de formación de cálculos en la vesícula. Desde el punto de vista analítico, se observa una elevación de los niveles plasmáticos de transaminasas, fosfatasa alcalina y ABs primarios fundamentalmente. Aunque es una enfermedad benigna para la madre, suele acompañarse de trastornos graves en el feto: peso fetal reducido, parto prematuro, alteraciones hepáticas del recién nacido, aparición de deformaciones graves, asfixia y muerte perinatal. Estas alteraciones se han correlacionado con niveles



plasmáticos maternos de ABs, de 10 a 100 veces superiores a los normales y, como ha podido demostrarse en ratas, son debidas a la elevada capacidad teratogénica de los ABs secundarios (Zimber y Zusman, 1990; Zusman y Zimber, 1990).

Hasta hace poco el objetivo del tratamiento farmacológico de la CIG era reducir el prurito y corregir los parámetros bioquímicos maternos. Sin embargo, el tratamiento debería mantener bajo control el balance de los ABs, ayudando así a la madre a llegar al final del embarazo y a tener un parto por vía vaginal sin sufrimiento para el feto. Hasta el momento, los fármacos utilizados han sido la colestiramina, el carbón vegetal, la dexametasona y la S-adenosil metionina. El tratamiento de la CIG con AUDC, mejora notablemente el prurito y los parámetros bioquímicos de las pacientes y no produce aparentes efectos adversos en los fetos.

Desde el punto de vista experimental, la colestasis obstructiva inducida en ratas gestantes durante el último tercio de la gestación es una situación, como en el caso de la CIG, en la que no se superponen otras alteraciones graves (hepatitis, cirrosis, etc.) que dificulten la interpretación del papel primario de los ABs en las repercusiones fetales. Es por lo tanto, un buen modelo para el estudio de la importancia del control de la homeostasis de los ABs en el binomio madre-feto y de lo peligroso que puede ser para el feto un desequilibrio en el pool materno-fetal de estas moléculas.

#### **D. Colestasis y estrés oxidativo**

La acumulación de ABs hidrofóbicos (fundamentalmente AQDC y ADC) en los hepatocitos durante la colestasis es la principal causa de daño hepático en pacientes con esta patología (Attili *et al.*, 1986).

Uno de los mecanismos implicados en la alteración de la funcionalidad hepática mediada por estos ABs es su capacidad para inducir la generación de ROS, que pueden dañar distintos componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y que parecen jugar un papel destacado en la aparición de daño hepático asociado a colestasis tanto en ratas (Sokol *et al.*, 1991) como en humanos (Togashi *et al.*, 1990). La capacidad de los ABs para inducir estrés oxidativo ha sido ampliamente estudiada en ratas, tanto en cultivos de hepatocitos (Sokol *et al.*, 1993; Sokol *et al.*, 1995) como en hepatocitos *in vivo* (Sokol *et al.*, 1998). Los estudios realizados en hepatocitos en cultivo indican que la exposición a altas concentraciones de ABs hidrofóbicos provoca su necrosis (Galle *et al.*, 1990; Sokol *et al.*, 1995), mientras que, a bajas concentraciones, induce alteración de la replicación del ADN (Gumprich *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 1994) y desencadena mecanismos de apoptosis. También se ha demostrado que las sales biliares más hidrofóbicas pueden estimular a las células de Kupffer aumentando así la producción ROS. Éstos, a su vez, pueden aumentar la peroxidación de los lípidos de la membrana de los hepatocitos induciendo su apoptosis (Ljubuncic *et al.*, 1996).

Las mitocondrias hepáticas parecen ser la principal fuente de ROS producidas por los ABs. Estos compuestos pueden alterar el funcionamiento de la cadena respiratoria

mitocondrial modificando la actividad de los complejos I, III y IV (Krahenbuhl *et al.*, 1994) y generar peroxidación lipídica en las mitocondrias del hepatocito (Sokol *et al.*, 1991; Sokol *et al.*, 1998).

Los ABs hidrofóbicos también pueden inducir la permeabilidad mitocondrial transitoria (MPT) (Botla *et al.*, 1995; Sokol *et al.*, 1995; Yerushalmi *et al.*, 2001) implicada en la muerte celular de los hepatocitos por necrosis y apoptosis (Lemasters *et al.*, 1998). La alteración en la permeabilidad de este orgánulo se ha asociado con una pérdida del PMM, una reducción en el proceso de fosforilación oxidativa, la rotura de la membrana mitocondrial externa, la liberación de citocromo c y la generación de ROS (Lemasters *et al.*, 1998). En hepatocitos de rata y en mitocondrias aisladas la MPT inducida por los ABs hidrofóbicos se ha asociado con un aumento en la generación de ROS (Rodrigues *et al.*, 1998; Sokol *et al.*, 2001). Parece que el aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico inducido por los ABs puede ser un importante factor en la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial y la posterior inducción de la producción de ROS (Anwer *et al.*, 1988).

Estudios realizados en ratas colestáticas confirman que el aumento en la generación de ROS mediado por los ABs también puede conducir a la reducción en los niveles celulares de antioxidantes, incluyendo la pérdida total de las reservas hepáticas y mitocondriales de GSH, y a la disminución de la concentración de distintos componentes de la cadena transportadora de electrones como la ubiquinona-9 y la ubiquinona-10 (Scheuer, 1980).

### 2.3.2.2. Compuestos xenobióticos

La generación de ROS en las células no sólo se produce en respuesta a estímulos endógenos, sino que también puede deberse a la interacción con distintos agentes exógenos. Estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* indican que la generación de ROS puede estar inducida por diversos factores exógenos entre ellos la radiación o distintos compuestos xenobióticos (Ziech *et al.*, 2010).

El tratamiento con un amplio número de fármacos puede desencadenar situaciones de estrés oxidativo (Deavall *et al.*, 2012). Este incremento en los niveles de ROS puede ser consecuencia del propio mecanismo de acción del fármaco o bien puede producirse como consecuencia del metabolismo del mismo. Puesto que el hígado juega un papel fundamental en el metabolismo de distintos fármacos es también uno de los principales tejidos afectados por el potencial efecto tóxico de los distintos intermediarios generados durante este proceso (Park *et al.*, 1995).

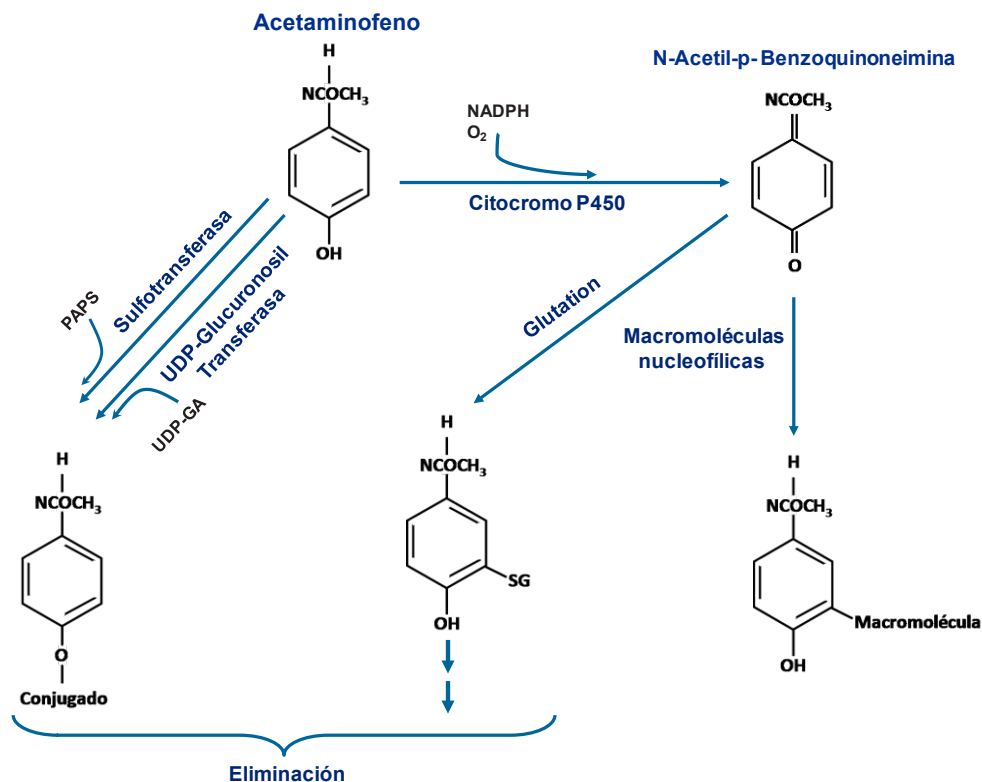
#### A. Paracetamol

El paracetamol o acetaminofeno es un analgésico y antipirético muy utilizado y seguro a dosis terapéuticas. Sin embargo, su uso en dosis superiores a las recomendadas produce una severa necrosis centrolobulillar en el hígado (Prescott, 1980), que constituye la principal causa de fallo hepático en distintos países occidentales (Jaeschke *et al.*, 2012). De hecho, el daño hepático producido por sobredosis de paracetamol es el modelo más



utilizado para estudiar los mecanismos de hepatotoxicidad inducida por fármacos (David Josephy, 2005).

A dosis terapéuticas el paracetamol es eliminado mediante glucuronidación o sulfatación y sólo una pequeña proporción es metabolizada por el citocromo P450 formándose un metabolito reactivo, N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI), que se elimina eficazmente mediante conjugación con GSH (Figura 17). Sin embargo, tras una dosis tóxica, la producción de NAPQI se incrementa superando la capacidad de detoxificación del GSH y se une covalentemente a distintas proteínas (Nelson, 1990) (Figura 17), causando un deterioro de la función hepática.



**Figura 17.** Esquema representativo del papel del metabolismo del paracetamol en su toxicidad. Tomado de James *et al.*, 2003.

Uno de los mecanismos más destacados en la toxicidad inducida por paracetamol parece ser la alteración de la función mitocondrial. El metabolito reactivo del paracetamol, NAPQI, se une a un gran número de proteínas mitocondriales (Cohen *et al.*, 1997; Qiu *et al.*, 1998) alterando su funcionalidad. Esta situación hace que se inhiba la respiración mitocondrial (Meyers *et al.*, 1988) y por tanto la producción de ATP (Jaeschke, 1990), y se incremente la producción de ROS y RNOS (Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno) (Cover *et al.*, 2005). Esta situación de estrés oxidativo puede conducir a la apertura del poro de MPT (Kon *et al.*, 2004), que produce la pérdida del PMM (Bajt *et al.*, 2004; Kon *et al.*, 2004). El aumento en la permeabilidad mitocondrial provoca finalmente la rotura de este orgánulo y hace que se liberen al citoplasma distintas proteínas, entre ellas el factor inductor de la apoptosis (AIF) que se transloca al núcleo, donde induce la fragmentación del ADN (Bajt *et al.*, 2006). Finalmente, la alteración del metabolismo aeróbico, la reducción

masiva de los niveles de ATP y el daño al ADN nuclear conducen a la muerte celular por necrosis (Gujral *et al.*, 2002).

Los mecanismos implicados en la toxicidad del paracetamol se han estudiado *in vivo* en roedores o bien en cultivos primarios de hepatocitos de ratón (Nelson, 1990). Sin embargo, existen pequeñas diferencias en cuanto al daño hepático producido por este fármaco en roedores y en humanos (Knight *et al.*, 2001; Singer *et al.*, 1995). Un estudio reciente llevado a cabo en una línea celular hepática humana tratada con dosis tóxicas de paracetamol, indica que la exposición a este fármaco reduce los niveles intracelulares de GSH, aumenta la formación de aductos de proteínas, estimula la producción mitocondrial de radical superóxido y peroxinitrito y conduce a la pérdida de la función mitocondrial, llegando a producir la muerte celular por necrosis en estas células. Estos resultados confirman que, a pesar de las diferencias en el desarrollo de las lesiones hepáticas, los mecanismos de toxicidad por paracetamol observados en células humanas son iguales a los descritos previamente en roedores (McGill *et al.*, 2011).

Aunque el efecto tóxico del paracetamol ha sido estudiado fundamentalmente a nivel hepático, este fármaco también puede producir toxicidad en otros tejidos. La alteración a nivel renal tras la exposición a dosis tóxicas de paracetamol se ha descrito tanto en animales de experimentación como en humanos, ya que entre el 1 y el 2% de los pacientes por sobredosis de paracetamol presentan cuadros de insuficiencia renal (Mazer y Perrone, 2008). En ratones, la toxicidad del paracetamol también afecta a otros tejidos como la mucosa nasal o el pulmón (Genter *et al.*, 1998; Jeffery y Haschek, 1988; Placke *et al.*, 1987). Parece que la toxicidad extrahepática del paracetamol está relacionada con el efecto de distintos metabolitos tóxicos generados a nivel hepático (Gu *et al.*, 2005).

## B. Fármacos antitumorales

Como ya se mencionó en el apartado 2.1.3.3, una característica frecuente en las células tumorales es la elevada presencia de ROS. Esta situación de estrés oxidativo permanente hace que estas células sean más vulnerables a la generación de ROS inducida por distintos agentes exógenos (Pelicano *et al.*, 2004). Por tanto, la manipulación de los niveles celulares de ROS podría utilizarse para inducir la muerte de estas células tumorales sin que aparezca toxicidad en células sanas (Schumacker, 2006).

Muchos fármacos antitumorales pueden inducir la generación de ROS en células cancerosas, entre ellos se incluyen agentes alquilantes, antraciclinas, derivados de platino y camptotecinas (Block *et al.*, 2008) y también inhibidores de tirosina quinasas como el sorafenib (Chiou *et al.*, 2009). Sin embargo, en la mayoría de los casos, este aumento en los niveles de ROS se ha relacionado con la aparición de distintos efectos secundarios tras el tratamiento farmacológico (Fuchs-Tarlovsky, 2013).

La doxorubicina es un antibiótico perteneciente al grupo de las antraciclinas que se ha utilizado en el tratamiento frente a distintos tumores sólidos y hematológicos. Su

actividad antineoplásica se basa fundamentalmente en su capacidad para intercalarse en la molécula de ADN, interfiriendo con su replicación y con el proceso de síntesis proteica, y en su actividad como agente inhibidor de la actividad de la topoisomerasa II (Fortune y Osheroff, 2000; Gewirtz, 1999). El metabolismo de la doxorubicina puede generar ROS mediante varios mecanismos. En presencia de NADPH, la acción de distintas reductasas mitocondriales sobre la doxorubicina hace que se formen metabolitos reactivos que a su vez interactúan con el oxígeno molecular generando radical superóxido (Malhi *et al.*, 2012). Además, esta antraciclina puede reaccionar con el hierro haciendo que se genere radical hidroxilo mediante reacciones de Fenton (Myers *et al.*, 1977). Aunque la generación de ROS derivada de su metabolismo se ha asociado fundamentalmente con la aparición de cardiotoxicidad en los pacientes durante el tratamiento, recientemente también se ha observado que el aumento en la generación de ROS a nivel mitocondrial mediado por la doxorubicina puede utilizarse como una estrategia para inducir la muerte selectiva de células tumorales (Malhi *et al.*, 2012).

El cisplatino es un potente fármaco citostático utilizado en el tratamiento de un gran número de tumores, entre los que se incluyen el cáncer testicular, el cáncer de ovario, el cáncer de vejiga, el cáncer de cuello de útero, varios cánceres gastrointestinales o el cáncer de pulmón (Deavall *et al.*, 2012). A pesar de su importancia clínica, su uso está limitado al tratamiento de ciertos tumores, ya que algunos, como el cáncer colorrectal o el cáncer de pulmón de células no pequeñas presentan resistencia a dicho fármaco y otros como el cáncer de ovario o el cáncer de pulmón de células pequeñas lo desarrollan durante el tratamiento (Cepeda *et al.*, 2007). Otra de las limitaciones para su uso en clínica es la aparición de efectos secundarios en numerosos tejidos, siendo los más destacados ototoxicidad, neurotoxicidad y nefrotoxicidad (Deavall *et al.*, 2012). El mecanismo de acción de este fármaco se basa fundamentalmente en su capacidad para unirse al ADN, especialmente a los residuos de guanina y adenina situados en el surco mayor de la molécula, y a otros componentes celulares, fundamentalmente proteínas. Las alteraciones producidas en los distintos componentes celulares hacen que el cisplatino induzca la muerte celular por apoptosis o por necrosis (Cepeda *et al.*, 2007). Distintos experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* indican que el tratamiento con cisplatino induce la formación de radical superóxido,  $H_2O_2$  y radical hidroxilo, mediante varios mecanismos (Itoh *et al.*, 2011; Masuda *et al.*, 1994; Tsutsumishita *et al.*, 1998). Este aumento en la producción de ROS junto con la capacidad de este fármaco para unirse al GSH (Ishikawa y Ali-Osman, 1993; Kasherman *et al.*, 2009), conducen a la célula a una situación de estrés oxidativo que se ha relacionado con la aparición de sus efectos secundarios más destacados (Deavall *et al.*, 2012). Estudios recientes indican que el estrés oxidativo derivado del tratamiento con cisplatino puede jugar un papel fundamental en su efecto citotóxico sobre las células tumorales induciendo la muerte celular por apoptosis, especialmente cuando se administra en dosis elevadas (Berndtsson *et al.*, 2007).

El irinotecán es un análogo semisintético de la camptotecina que se utiliza para el tratamiento de distintos tipos de tumores sólidos como el cáncer colorrectal o el cáncer de ovario que presentan metástasis (Ramesh *et al.*, 2010). Su principal mecanismo de acción

es la inhibición de la topoisomerasa I, que hace que se produzcan roturas en la doble cadena de ADN, desencadenado un estrés genotóxico que finalmente conduce a la muerte celular por apoptosis (Liu *et al.*, 2000). En humanos, el irinotecán es metabolizado por carboxiesterasas endógenas en una reacción que genera un metabolito altamente reactivo, el SN-38. Aunque existen estudios que indican que las camptotecinas pueden inducir la generación de ROS (Block *et al.*, 2008), poco se sabe sobre el estrés oxidativo asociado al tratamiento con irinotecán. Un estudio reciente llevado a cabo en ratones indica que, tras el tratamiento con este fármaco, se produce un aumento de los marcadores de peroxidación lipídica y daño oxidativo en el ADN en suero. En estos animales también se observa una reducción en los niveles séricos de GSH. Todas estas evidencias sugieren que el efecto genotóxico del irinotecán podría estar mediado por un mecanismo de inducción de estrés oxidativo (Attia, 2012).

El sorafenib es una bi-arilurea que puede inhibir distintas proteínas quinasas, fundamentalmente Raf serina/treonina quinasas y receptores tirosina quinasas. Recientemente la FDA (“Food and Drug Administration”) ha autorizado su uso para el tratamiento del carcinoma renal (Bracarda *et al.*, 2007) pero también para el HCC, ya que mejora la supervivencia de los pacientes con HCC en estadio avanzado y no resecable (Llovet *et al.*, 2008). Debido a su reciente incorporación al grupo de fármacos antitumorales sus mecanismos de acción no se conocen con exactitud. Estudios llevados a cabo recientemente indican que, además de su actividad como inhibidor de quinasas, el sorafenib puede incrementar los niveles de estrés oxidativo en células tumorales estimulando la muerte celular por apoptosis (Chiou *et al.*, 2009). En células de HCC se ha observado que el tratamiento con sorafenib induce la generación de ROS en la mitocondria, reduce los niveles de GSH y aumenta la concentración de Ca<sup>2+</sup> en la mitocondria. Todos estos eventos alteran la funcionalidad mitocondrial y conducen a la muerte celular (Chiou *et al.*, 2009). En el suero de pacientes de HCC tratados con sorafenib se ha observado un aumento de la concentración de productos proteicos de oxidación avanzada que se han relacionado con una mayor efectividad del tratamiento (Coriat *et al.*, 2012).

## 2.4. MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A COMPUESTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS

### 2.4.1. Mecanismos de defensa antioxidante

Como se ha mencionado anteriormente, la célula presenta una amplia variedad de mecanismos que previenen y limitan el daño celular provocado por la acumulación de ROS. Entre ellos se encuentran el ciclo biliverdina (BV)/bilirrubina (BR) y otros mecanismos antioxidantes de diversa naturaleza.

#### 2.4.1.1. Ciclo biliverdina/bilirrubina

##### A. Síntesis de pigmentos biliares

El grupo hemo es el componente no proteico de varias proteínas de nuestro organismo, entre ellas la hemoglobina.

En mamíferos, la reacción de degradación del grupo hemo transcurre en dos pasos: en primer lugar, el grupo hemo es oxidado por la acción catalítica de la hemo oxigenasa (HO) en una reacción en la que se liberan ión ferroso, monóxido de carbono (CO) y biliverdina (BV) (Florczyk *et al.*, 2008); posteriormente, esta última es reducida a bilirrubina (BR) por la acción de la biliverdina reductasa (BVR).

Las HOs son unas enzimas altamente conservadas encontradas en bacterias, algas, plantas y animales. Hasta el momento se han identificado tres isoformas: HO-1, HO-2 y HO-3. La HO-1 es la isoforma inducible cuya expresión puede modificarse en respuesta a distintos estímulos como la presencia del grupo hemo, el óxido nítrico (NO) y/o el estrés oxidativo (Alam *et al.*, 1989; Alcaraz *et al.*, 2001; Durante *et al.*, 1997). Aunque se expresa de forma ubicua en tejidos de mamíferos, sus niveles de expresión son más elevados en hígado y bazo (Elbirt y Bonkovsky, 1999; Maines, 1997).

Aunque la rotura del anillo tetrapirrólico del grupo hemo puede ocurrir en cada uno de los cuatro meso puentes de carbono y generar cuatro isómeros de la BV (IX $\alpha$ , IX $\beta$ , IX $\gamma$ , IX $\delta$ ), las HOs presentan una alta selectividad por el puente  $\alpha$ , de forma que en vertebrados prácticamente toda la BV formada es del tipo IX $\alpha$ . En humanos también se producen pequeñas cantidades de los otros tres isómeros en condiciones normales y patológicas (Yamaguchi y Nakajima, 1995).

En aves, reptiles y anfibios, la BV se excreta directamente a la bilis y constituye el producto final de la degradación del grupo hemo. Sin embargo, en mamíferos, la BV se transforma en BR por acción de la enzima BVR citoplasmática en una reacción muy eficiente que hace que, en circunstancias fisiológicas, la concentración de BV en suero sea muy baja (Fevery, 2008).

En el individuo sano, la mayor parte de la BR se produce en las células del sistema retículo-endotelial localizadas en el bazo, en la médula ósea y en el hígado. En adultos, el isómero más abundante de la BR es el IX $\alpha$ , que presenta una baja solubilidad en soluciones acuosas. Así, la BR se transporta en sangre en su mayor parte unida a la albúmina junto a una fracción no unida que es minoritaria. Debido a su carácter lipofílico, debe ser glucuronidada para poder ser excretada por vía biliar (Florczyk *et al.*, 2008).

## B. Biliverdina reductasa

La BVR es una enzima altamente conservada desde el punto de vista evolutivo en diferentes organismos. No sólo está presente en el reino animal, sino que también se ha encontrado una enzima homóloga en algas rojas (Beale y Cornejo, 1984; Schluchter y Glazer, 1997).

La biliverdina IX $\alpha$  reductasa (BVR $\alpha$ ) es una enzima citosólica soluble, que presenta una elevada actividad en hígado, bazo, riñón y placenta (McDonagh, 1983), y que cataliza la adición regioespecífica de hidrógeno al grupo  $-\text{HC}(10)=\text{C}-\text{N}=\text{}$  de la BV IX $\alpha$ . Este cambio convierte una molécula conformacionalmente flexible y polar, la BV, en una altamente lipofílica y con una conformación más restringida, la BR. Esta enzima tiene la particularidad de que puede utilizar NADH o NADPH como cofactores en función del pH. De los cuatro isómeros de BV, la actividad enzimática es muy selectiva para el isómero IX $\alpha$  (Maines y Trakshel, 1993). La BVR $\alpha$ , que utiliza como sustrato la BV IX $\alpha$ , es la forma mayoritaria en el hígado adulto, lo que explica que el isómero IX $\alpha$  de la BR sea el más abundante durante la vida adulta.

La biliverdina IX $\beta$  reductasa (BVR $\beta$ ) cataliza la reducción de los isómeros IX $\gamma$  y IX $\delta$  además del IX $\beta$  que le da nombre. Su importancia metabólica es aparentemente marginal en adultos, pero alta durante el crecimiento fetal. La BR IX $\beta$  representa casi un 90% del total de la BR encontrada en la bilis fetal y, al contrario que el isómero IX $\alpha$ , no requiere glucuronidación para su excreción hepatobiliar (McDonagh, 2001; Pereira *et al.*, 2001).

## C. Ciclo BV/BR

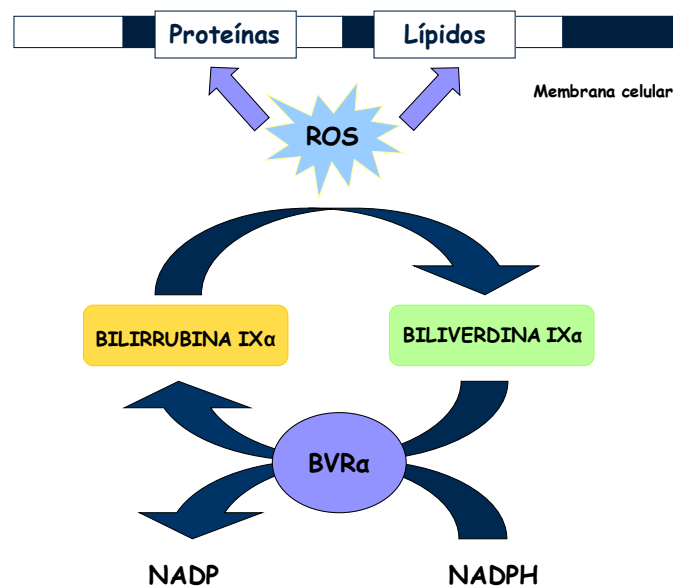
Las ventajas fisiológicas de la transformación del grupo hemo a BV y de BV a BR se han conocido recientemente, ya que durante muchos años se consideró simplemente un mecanismo de eliminación de productos de desecho mediante el que la BV, un producto inocuo y fácilmente excretable se transformaba en BR, una sustancia de baja hidrosolubilidad, neurotóxica, que forma cálculos biliares y que necesita ser metabolizada para su excreción. Sin embargo, esta biotransformación adquiere significado fisiológico si tenemos en cuenta que la BR es un potente antioxidante que protege frente al daño oxidativo celular (Baranano *et al.*, 2002).

Actualmente, se considera a la BR como una molécula protectora ya que presenta un alto potencial antioxidante frente a los radicales peroxilo (Stocker *et al.*, 1987). Además, la BR puede proteger a los componentes nucleares de la oxidación por su capacidad



antioxidante y por su actividad como inhibidor de la NADPH oxidasa encargada de la producción de superóxido (Fujii *et al.*, 2010).

Aunque la concentración sérica de BR es lo suficientemente elevada como para justificar una considerable fracción de la capacidad antioxidante total en suero (Belanger *et al.*, 1997; Gopinathan *et al.*, 1994), las bajas concentraciones tisulares de BR ( $\approx 20\text{-}50$  nM), casi 10.000 veces inferiores a las determinadas para el antioxidante GSH, sugieren en principio que la BR no es fisiológicamente relevante frente al estrés oxidativo intracelular. Sin embargo, se ha demostrado que concentraciones bajas de BR ( $\approx 10$  nM) pueden proteger tanto a células cerebrales como a células HeLa (de adenocarcinoma de cervix humano) frente a la toxicidad ocasionada por una concentración casi 10.000 veces superior de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que indica que la BR no actúa simplemente como un antioxidante estequiométrico (Baranano *et al.*, 2002; Dore *et al.*, 1999). Este potente efecto protector podría explicarse en base a la capacidad de reciclaje de la BR, que en presencia de ROS se oxida a BV. Posteriormente, la BV es de nuevo transformada a BR por acción de la enzima BVR $\alpha$ , estableciéndose así un ciclo redox que permitiría amplificar unas 10.000 veces los efectos antioxidantes de la BR (Figura I8), sin necesidad de que ésta se encuentre presente en los tejidos en elevadas concentraciones, ya que podría resultar tóxica (Baranano *et al.*, 2002). Además la BVR $\alpha$  puede actuar como factor de transcripción regulando la expresión de la HO-1 (Tudor *et al.*, 2008). Este eficiente sistema antioxidante que consiste en el control del ciclo redox y la inducción de la HO-1 por parte de la BVR $\alpha$  puede fortificar la capacidad de la BR como una de las moléculas de defensa fisiológica más eficiente frente al estrés oxidativo.



**Figura I8.** Ciclo de oxidación de la bilirrubina. Efecto antioxidante ejercido sobre los lípidos y proteínas integrantes de la membrana celular, y sobre las proteínas citoplasmáticas.

Además de su papel en el metabolismo del grupo hemo la BVR $\alpha$  también está implicada en distintos procesos de señalización celular, de regulación de la expresión génica, metabolismo, crecimiento celular y apoptosis (Kravets *et al.*, 2004; Lerner-Marmarosh *et al.*, 2005; Salim *et al.*, 2001).

## 2.4.1.2. Otros sistemas antioxidantes

### A. Sistemas no enzimáticos

El glutatión reducido, GSH, es uno de los principales antioxidantes del organismo. Está presente en casi todas las células animales, aunque predomina en el tejido hepático. A pesar de que se produce exclusivamente en el citoplasma, un 10-15% se almacena en la mitocondria gracias a un transportador específico (Fernandez-Checa *et al.*, 1991).

Estructuralmente, el GSH es un tripéptido formado por tres aminoácidos, el glutamato y la glicina, que determinan su disposición, y la cisteína que es la responsable de sus funciones. El grupo tiol (SH) presente en la cisteína es el que le confiere una alta reactividad frente a sustancias endógenas y exógenas e incluso consigo mismo (Meister y Anderson, 1983). Puede conjugarse directamente con gran variedad de compuestos tóxicos de forma espontánea (no enzimática) o mediante la acción de un grupo de enzimas tisulares conocidas como la glutatión-S-transferasa (GST).

También juegan un papel fundamental en este mecanismo de defensa antioxidante varias enzimas como la glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión reductasa (GR) (Inoue, 1994). Todas ellas necesitan el cofactor glutatión para poder llevar a cabo sus funciones.

La relación intracelular de GSH/GSSG es generalmente superior a 10:1, gracias a la acción de la enzima GR que cataliza la regeneración de GSH. Cuando un tejido se expone a una gran cantidad de radicales libres, puede producirse un desequilibrio en esta relación, que altera el estado redox intracelular.

También existen otros antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular, como la vitamina C (Wilson, 2005), la vitamina E, el ubiquinol y los carotenoides (Machlin y Bendich, 1987).

### B. Sistemas enzimáticos

Además de las enzimas relacionadas con el glutatión (GPX, GR y GST), también forman parte del sistema antioxidante enzimático celular, la SOD y la CAT (Inoue, 1994). Estas enzimas se encuentran distribuidas por todo el organismo, y su actividad depende del consumo de oxígeno, de la tasa metabólica, de la concentración de iones metálicos presentes y de la cantidad de ácidos grasos existentes.

La SOD dismuta los radicales superóxido, produciendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y singlete de oxígeno (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Existen dos formas de SOD en base al metal que contienen como cofactor, el homodímero que contiene cobre y zinc (Cu,Zn-SOD o SOD1), presente en el citosol y en la matriz nuclear, y un homotetrámero que contiene manganeso (MnSOD o SOD2) y que se encuentra principalmente en la matriz mitocondrial (Deby y Goutier, 1990). También se ha descrito la existencia de una forma Cu,Zn-SOD extracelular (SOD3) con diferente estructura a la SOD1 (Petersen *et al.*, 2003).



La enzima CAT controla la concentración intracelular de  $H_2O_2$  junto con la GPX, siendo la constante de Michaelis Menten ( $K_m$ ) mucho mayor para la primera enzima, por lo que a concentraciones elevadas de  $H_2O_2$  interviene la CAT y a concentraciones bajas, la GPX. De esta manera, ambos sistemas enzimáticos se complementan y constituyen un sistema reductor de  $H_2O_2$ . La CAT se localiza principalmente en los peroxisomas, o en el citoplasma en el caso de aquellas células que no poseen estos orgánulos.

#### 2.4.2. Bombas exportadoras ABC

La acumulación de compuestos endógenos potencialmente tóxicos o de xenobióticos en la célula puede alterar su correcto funcionamiento y conducir a la muerte celular por necrosis o apoptosis. Ante esta situación la célula pone en marcha una serie de mecanismos de defensa entre los que se incluye el reajuste de los niveles de expresión de distintas proteínas implicadas en el transporte de estos compuestos al exterior de la célula.

##### 2.4.2.1. Superfamilia de proteínas ABC

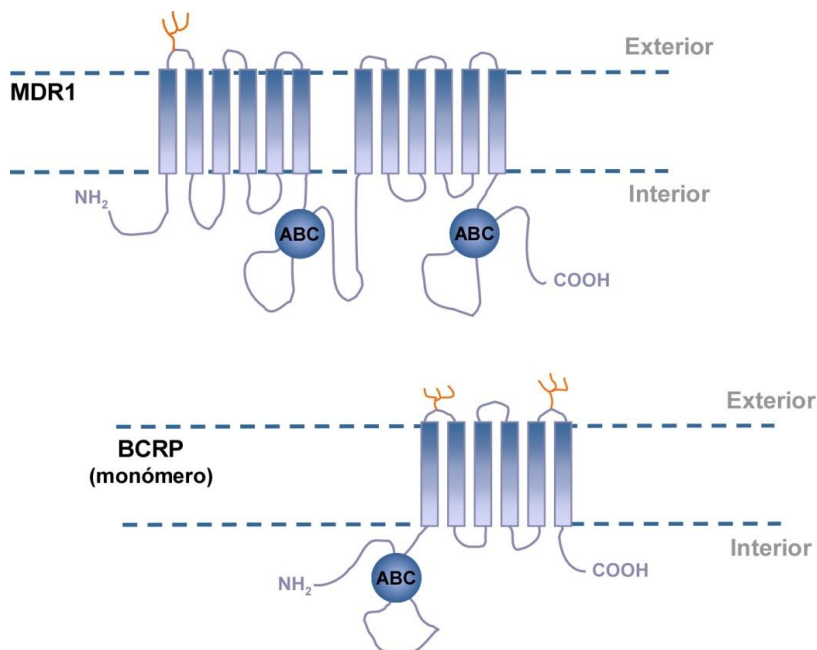
###### A. Características generales

La superfamilia de proteínas ABC está constituida por un amplio grupo de proteínas integrales de membrana presentes en todos los organismos y que tienen una gran relevancia clínica (Klein *et al.*, 1999). La mayoría son proteínas transportadoras que, gracias a la hidrólisis de ATP, obtienen la energía necesaria para exportar, a través de membranas extra e intracelulares, una amplia variedad de sustratos: glúcidos, aminoácidos, iones metálicos, péptidos, proteínas, así como un gran número de metabolitos endógenos y xenobióticos (Lage, 2003).

En tejidos sanos estos transportadores están implicados en una gran variedad de procesos fisiológicamente importantes. Su expresión es alta en la mayoría de los epitelios, especialmente en el plexo coroideo, la barrera hematoencefálica y el trofoblasto, donde mantienen la función de barrera al actuar como bombas de expulsión de compuestos potencialmente tóxicos (Klein *et al.*, 1999). En hígado, tracto gastrointestinal y riñón, las proteínas ABC participan en la mayoría de las vías que determinan la excreción de metabolitos y xenobióticos (Leslie *et al.*, 2005). Además, algunas proteínas ABC desempeñan un papel importante en el sistema inmune (Abele y Tampe, 2004) y participan en la homeostasis y transporte celular de lípidos (Albrecht y Viturro, 2007).

Estas proteínas están formadas por cuatro dominios: dos dominios transmembrana implicados en el transporte de sustratos a través de las membranas celulares, y dos dominios de unión a nucleótidos ("Nucleotide-Binding Domain" o "ATP-Binding Cassette Domains"), responsables de la unión e hidrólisis del ATP, y por tanto de generar la fuerza motriz para el transporte. Puesto que todas estas proteínas tienen un sustrato común, ATP, los dominios de unión a nucleótidos contienen varias regiones conservadas: las regiones Walker A y Walker B y la denominada "ABC signature", específica de cada familia. Por el contrario, los dominios transmembrana, habitualmente formados por seis  $\alpha$ -hélices,

presentan secuencias mucho más diversas que reflejan la gran variedad de sustratos transportados por estas proteínas (Seeger y van Veen, 2009). En función de su estructura, los transportadores ABC también se denominan “full transporters”, cuando contienen los cuatro dominios, o “half transporters”, cuando sólo están formados por un dominio de unión a ATP y un dominio transmembrana, por lo que necesitan formar homodímeros o heterodímeros con otro “half transporter” para dar lugar al transportador funcional con la estructura completa. Los primeros se localizan en la membrana plasmática mientras que los segundos se encuentran generalmente en membranas intracelulares (Litman *et al.*, 2001). La Figura I9 muestra un esquema de la topología en la membrana de un “full transporter” (MDR1) y un “half transporter” (BCRP).



**Figura I9.** Modelos topológicos de la estructura secundaria predicha para MDR1 (“full transporter”) y BCRP (“half transporter”). En naranja están representados los residuos glucídicos de estas glicoproteínas. ABC, dominio de unión a ATP o “ATP-binding cassette domain”.

El mecanismo de translocación de los sustratos de un lado a otro de la membrana es aún discutido. En general se acepta que el sustrato se une al sitio de máxima afinidad del transportador (bien desde el citosol o bien desde la membrana) y que tras la unión y/o la hidrólisis de 2 ATP (también denominado “ciclo catalítico de transportadores ABC”), la afinidad del sitio de unión al sustrato disminuye causando la liberación del mismo en el lado opuesto de la membrana (Seeger y van Veen, 2009).

## B. Clasificación

En humanos, se han caracterizado más de 48 genes ABC que se clasifican en siete familias atendiendo a sus características filogenéticas y su secuencia de aminoácidos (Dean, 2005).

## 1. Familia ABCA

Hasta la fecha se han identificado 12 miembros de esta familia en humanos (Albrecht y Viturro, 2007). Su papel principal parece ser el transporte de lípidos a través de la membrana plasmática y de orgánulos intracelulares. Además, se han encontrado líneas celulares resistentes a fármacos citostáticos que sobreexpresan alguno de los transportadores de esta familia, lo que sugiere que podrían participar en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia antitumoral, probablemente mediando el almacenamiento de los fármacos en lisosomas y promoviendo su metabolismo o su expulsión de la célula (Albrecht y Viturro, 2007).

## 2. Familia ABCB

Uno de los primeros transportadores ABC en ser caracterizado fue MDR1 (de "Multidrug resistance protein 1", gen *ABCB1*), también conocido como P-glicoproteína (Pgp) (Juliano, 1976). Inicialmente se la identificó como la proteína de membrana plasmática responsable del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR) en células tumorales (Bosch y Croop, 1996; Goldstein, 1996; Goldstein *et al.*, 1991). MDR1 se expresa en células sanas, como en el borde en cepillo de los túbulos renales apicales, en la membrana canalicular de los hepatocitos, en la membrana apical de los enterocitos, en las membranas lumenares de las células endoteliales capilares del cerebro (Cordon-Cardo *et al.*, 1990), en colangiocitos, en pulmón, en placenta y en testículo (Chan *et al.*, 2004). También se encuentra en muchos tumores de origen epitelial, en los que la sobreexpresión de esta proteína es uno de los mecanismos por los que las células tumorales desarrollan resistencia a múltiples fármacos (Marin *et al.*, 2009b).

Dada su característica distribución, MDR1 está implicada en los procesos farmacocinéticos de absorción, distribución y eliminación de fármacos (Fromm, 2004; Schinkel, 1998). A pesar de que se ha convertido en la proteína modelo en muchos de los estudios de caracterización del mecanismo de transporte de las bombas ABC (Seeger y van Veen, 2009), su papel en la formación de la bilis aún no se conoce con exactitud, aunque se sabe que contribuye a la excreción canalicular de fármacos y otros xenobióticos.

Participa principalmente en el transporte de cationes orgánicos hidrofóbicos (Muller *et al.*, 1994). Entre sus sustratos se incluyen multitud de fármacos como glucósidos cardiotrópicos, antihistamínicos, analgésicos, inmunosupresores o narcóticos (Chan *et al.*, 2004; Matheny *et al.*, 2001) y una amplia variedad de fármacos antitumorales como las campotecinas o el paclitaxel (Marin *et al.*, 2009a).

Otro miembro de esta familia involucrado en la secreción de compuestos colefílicos, es decir, sustancias que se excretan preferentemente por vía biliar, es MDR3 (gen *ABCB4*), también denominada Mdr2 en roedores (Smit *et al.*, 1993). Esta proteína está implicada en la translocación de fosfatidilcolina desde la cara interna a la cara externa de la bicapa lipídica de la membrana canalicular de los hepatocitos (Ruetz y Gros, 1994), un papel fundamental para neutralizar el efecto detergente de los ABs, presentes en la bilis a una

concentración elevada. La MDR3 también participa en el transporte de algunos xenobióticos, como paclitaxel y vinblastina, aunque con una eficacia menor que la de MDR1 (Smith *et al.*, 2000).

La bomba exportadora de sales biliares (BSEP; gen *ABCB11*) es el principal transportador de ABs monoaniónicos conjugados a bilis (Byrne *et al.*, 2002; Gerloff *et al.*, 1998) y participa en el transporte de algunos sustratos típicos de MDR1, como la vinblastina (Lecureur *et al.*, 2000). BSEP se expresa fundamentalmente en hígado, concretamente en las microvellosidades canaliculares y en vesículas subcanaliculares de los hepatocitos. Las mutaciones del gen *ABCB11* humano pueden determinar un subtipo de colestasis intrahepática familiar progresiva o PFIC2 (del inglés “Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis 2”) que cursa con prurito extremo, retraso en el crecimiento y progresión hacia la cirrosis en la primera década de vida.

### 3. Familia ABCC

A principios de los años 90 se descubrió en humanos una proteína que confería a las células tumorales el fenotipo MDR y era diferente a la P-glicoproteína. Se denominó proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos o MRP (del inglés “Multidrug Resistance-associated Protein”) (Krishnamachary y Center, 1993).

Hasta el momento se han clonado y caracterizado trece miembros de la familia de proteínas MRP (Sheps y Ling, 2007) cuya principal función es la protección frente a compuestos tóxicos, como metales pesados, toxinas y xenobióticos. Las isoformas 1, 4 y 5 se distribuyen ampliamente en el organismo, mientras que MRP2 y 3 aparecen principalmente en el hígado, el riñón y el intestino (Borst *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1998). MRP1, 3, y 6 se localizan en la membrana plasmática basolateral de células polarizadas, para impedir que las sustancias potencialmente dañinas accedan al interior de la célula, mientras que MRP2, y probablemente MRP5, aparecen en la membrana apical para secretarlas, por ejemplo, en bilis o en orina. El nivel de expresión de MRP1, 3 y 4 en hepatocitos sanos es muy bajo, lo que indica que en circunstancias fisiológicas su papel en el tráfico de diferentes compuestos en el hepatocito es minoritario.

De todos estos transportadores, MRP2 (gen *ABCC2*) es el que presenta una mayor expresión en hígado. Esta proteína se localiza en la membrana apical de células polarizadas, como los hepatocitos, el epitelio del túbulo proximal renal y el epitelio intestinal. Desempeña un papel fundamental en la detoxificación hepática mediando la excreción a la bilis de aniones orgánicos endógenos y xenobióticos (Jedlitschky *et al.*, 1997), contribuyendo a la fuerza motriz que genera el flujo biliar. Su especificidad de sustrato es amplia, aunque tiene una mayor afinidad para los conjugados de GSH, ácido glucurónico o sulfato y compuestos lipofílicos como leucotrieno C4, BR y algunos esteroides (Nies y Keppler, 2007). La MRP2 de rata tiene capacidad de transportar ABs dianiónicos sulfatados (Akita *et al.*, 2001) y glucuronidados (Keppler *et al.*, 1997). Entre los sustratos de este transportador se incluyen numerosos agentes antitumorales, como el cisplatino o las camptotecinas (Nies

y Keppler, 2007), esto hace que MRP2 tenga una gran relevancia clínica ya que puede conferir resistencia a numerosos agentes antineoplásicos en tumores sólidos como el HCC (Sandusky *et al.*, 2002). La deficiencia adquirida o hereditaria de MRP2 en humanos, como ocurre en el síndrome de Dubin-Johnson, provoca un incremento en la concentración de glucurónidos de BR en sangre, debido al reflujó de estos compuestos desde los hepatocitos hacia la sangre sistémica mediado principalmente por MRP3 (gen *ABCC3*), localizada en la membrana basolateral de los hepatocitos, como mecanismo compensatorio al deficiente eflujo apical mediado por MRP2 (Kartenbeck *et al.*, 1996).

Además de en hígado, MRP3 se expresa en intestino y, en menor medida en riñón (Kool *et al.*, 1997; Scheffer *et al.*, 2002). La contribución de MRP3 en la homeostasis de los ABs aún no está clara (Zelcer *et al.*, 2006), ya que en humanos sólo transporta AGC (Zeng *et al.*, 2000). MRP3 también interviene en el transporte de algunos fármacos antitumorales como etopósido, tenipósido, vincristina y metotrexato (Kool *et al.*, 1999).

Otro miembro de esta familia localizado en la membrana basolateral de los hepatocitos es MRP1 (gen *ABCC1*) que está implicado en el transporte de distintos compuestos hidrofóbicos. MRP1 transporta fármacos antitumorales, entre los que se incluyen los alcaloides de la vinca, las antraciclinas o las camptotecinas (Bakos y Homolya, 2007). En condiciones normales se encuentra poco expresada en hígado y transporta ABs dianiónicos como los ácidos taurosulfolitocólico (ATSLC) y tauroquenodesoxicólico (ATQDC). Sin embargo, cuando la ruta de excreción biliar no es funcional, como ocurre en colestasis o endotoxemia, se induce la expresión de MRP1 y MRP3 (Donner y Keppler, 2001; Soroka *et al.*, 2001; Vos *et al.*, 1998) que permite el transporte de sustancias colefilicas de vuelta a la circulación sistémica para su posterior eliminación por vía renal (Tanaka *et al.*, 2002).

MRP1 y MRP3, que comparten un 58% de su secuencia aminoacídica participan también en el transporte de glucurónidos y conjugados de GSH de distintos compuestos exógenos (Akita *et al.*, 2001).

MRP4 se expresa a bajos niveles en la membrana basolateral de los hepatocitos en condiciones normales (Kartenbeck *et al.*, 1996), y también en otros tejidos como yeyuno, riñón, cerebro, pulmón y vesícula biliar (Kool *et al.*, 1997). Esta proteína cotransporta ABs junto con GSH hacia el exterior del hepatocito (Rius *et al.*, 2006; Rius *et al.*, 2003), además de distintos fármacos como análogos de nucleótidos, como la lamivudina, y antitumorales, como el metotrexato (Borst *et al.*, 2000). Este transportador presenta una alta afinidad por los conjugados con glicina y taurina de los ácidos AQDC, AQC y AUDC, además del AC (Rius *et al.*, 2006; Rius *et al.*, 2003). Estudios de inhibición del transporte sugieren que los derivados sulfatados también podrían incluirse entre sus sustratos (Zelcer *et al.*, 2003).

Otros transportadores de esta familia cuya expresión también se ha encontrado en los hepatocitos son MRP6 (*ABCC6*), MRP7 (*ABCC10*) y MRP8 (*ABCC11*). MRP6 se ha caracterizado como un transportador basolateral y canalicular en hepatocitos de rata (Madon *et al.*, 2000). Aunque se han encontrado niveles elevados del ARNm de MRP6 en



hígado humano, su papel en el transporte de fármacos no está claro (Bergen *et al.*, 2007). Parece que MRP6 no está implicada en el transporte de productos de biotransformación de fase II como conjugados con ácido glucurónico, sulfato o GSH, aunque tiene capacidad para transportar cisplatino, doxorubicina o etopósido (Belinsky *et al.*, 2002). Menos conocidos son MRP7 y MRP8. El ARNm de MRP7 se ha encontrado en numerosos tejidos, incluyendo el hígado, y transporta algunos fármacos antitumorales como paclitaxel y vincristina (Hopper-Borge *et al.*, 2004). El ARNm de MRP8 se ha detectado a bajos niveles en el hígado y entre sus sustratos se encuentran fármacos como el metotrexato y el 5-fluorouracilo (Chen *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2003).

#### 4. Familia ABCG

Esta familia de proteínas ABC está constituida por “half transporters”, que necesitan formar dímeros para poder llevar a cabo su función. Muchos de ellos, como ABCG1, ABCG4, ABCG5 y ABCG8, son bombas exportadoras de colesterol (Kusuhara y Sugiyama, 2007). A nivel hepático, los más destacados son ABCG5 y ABCG8 que forman un heterodímero localizado en la membrana canalicular (Graf *et al.*, 2003), que promueve la excreción biliar de esteroides neutros (Wittenburg y Carey, 2002).

BCRP (de “Breast Cancer Resistance Protein”; gen *ABCG2*) presenta una amplia especificidad de sustrato, incluyendo una gran variedad de fármacos antitumorales. Desempeña un papel importante en la biodisponibilidad y eliminación hepática de fármacos y en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia antitumoral (Kusuhara y Sugiyama, 2007). Esta proteína está altamente expresada en la placenta (Allikmets *et al.*, 1998) y en menor grado en cerebro, hígado, próstata, intestino delgado y colon (Doyle *et al.*, 1998). Su estado de oligomerización en la membrana aún no se conoce con exactitud (Kage *et al.*, 2002; Litman *et al.*, 2002; McDevitt *et al.*, 2009). Inicialmente se sugirió que la unidad funcional mínima de BCRP era un homodímero (Kage *et al.*, 2002; Litman *et al.*, 2002). Sin embargo nuevas evidencias indican que BCRP podría formar oligómeros de mayor entidad en la membrana (McDevitt *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2004).

Entre los compuestos endógenos que son sustratos de BCRP se encuentran varios esteroides, principalmente derivados sulfatados, sobre todo estrona-3-sulfato y DHEAS (Imai *et al.*, 2003) (Janvilisri *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2004), porfirinas (Krishnamurthy *et al.*, 2004) y ABs (Blazquez *et al.*, 2012). El transporte de ABs mediado por BCRP es especialmente importante en placenta, donde los niveles de expresión de BSEP son muy bajos. Además, interviene en el transporte de numerosos fármacos antitumorales entre los que se incluyen la doxorubicina o las camptotecinas, (Kusuhara y Sugiyama, 2007).

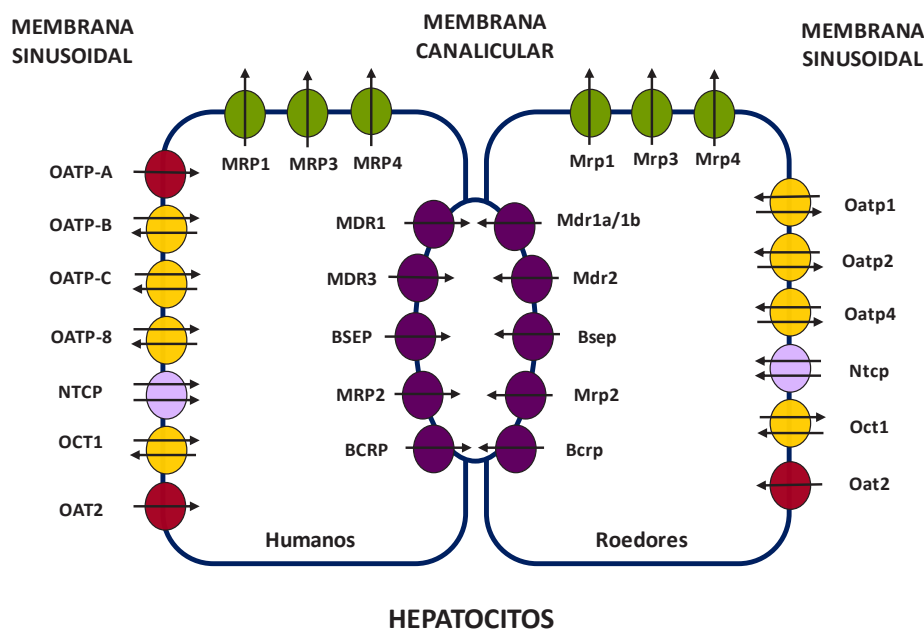
#### 2.4.2.2. Papel de las proteínas ABC en el transporte de ácidos biliares

##### A. Hígado

Los procesos de transporte en el hepatocito desempeñan un papel fundamental en la homeostasis hepática de los ABs, ya que a pH fisiológico, tanto en sangre como dentro de

las células, la mayoría de los ABs se encuentran en forma aniónica (Hofmann, 1998). En esta forma la difusión a través de las membranas lipídicas se dificulta; si bien algunos ABs con elevado pKa pueden atravesar las membranas, la mayoría requiere de transportadores específicos de membrana.

En el proceso de recaptación de ABs de la circulación sanguínea por el hepatocito participan principalmente dos grupos de proteínas (Figura I10): unas que pertenecen a la familia de transportadores SLC10A (del inglés "Solute Carriers") y que median la captación de ABs dependiente de  $\text{Na}^+$ , y otras, de la familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP), del inglés "Organic Anion Transporting Polypeptides", que llevan a cabo el transporte de ABs independiente de  $\text{Na}^+$ . La secreción canalicular de ABs tiene lugar gracias a transportadores miembros de la superfamilia ABC (Muller y Jansen, 1997) (Figura I10).



**Figura I10.** Localización de las principales proteínas implicadas en el transporte hepatobiliar en hepatocitos humanos y de roedores.

Dependiendo de su localización en la membrana plasmática de los hepatocitos, los transportadores ABC son responsables del eflujo de compuestos a la bilis, si se localizan en la membrana canalicular, o, si se encuentran localizados en la membrana basolateral, expulsan compuestos a la sangre. Dentro de los primeros destacan varios miembros de las familias de genes ABCB, ABCC y ABCG. Por el contrario, los transportadores sinusoidales más relevantes pertenecen únicamente a la familia ABCC (Marin *et al.*, 2008).

Los ABs recién sintetizados y los que retornan desde el intestino durante el transcurso de la circulación enterohepática son secretados activamente por los hepatocitos hacia el lumen canalicular por acción de la bomba exportadora de sales biliares BSEP. La secreción activa de ABs proporciona una importante fuerza impulsora para la formación de bilis

(Trauner y Boyer, 2003) y, por tanto, es de crucial importancia para la eliminación hepática de compuestos endógenos potencialmente tóxicos y xenobióticos a través de la vía hepatobiliar. Además, la secreción de ABs impulsa la secreción de fosfolípidos y colesterol a la bilis. La secreción de estos lípidos también depende de forma crucial de la actividad de transportadores de la superfamilia ABC, como, MDR3 (gen *ABCB4*), en el caso de los fosfolípidos, y el heterodímero ABCG5/ABCG8, para el transporte de colesterol (Elferink y Groen, 2002). La secreción conjunta de ABs, fosfolípidos y colesterol permite la formación de micelas mixtas en la bilis, que son determinantes para la protección del sistema biliar de las acciones detergentes provocadas por las altas concentraciones de ABs (Smit *et al.*, 1993). Además de BSEP, el transportador MRP2 juega un destacado papel en el transporte de ABs ya que secreta a bilis ABs sulfatados dianiónicos y glucuronidos de BR (Jedlitschky *et al.*, 1997).

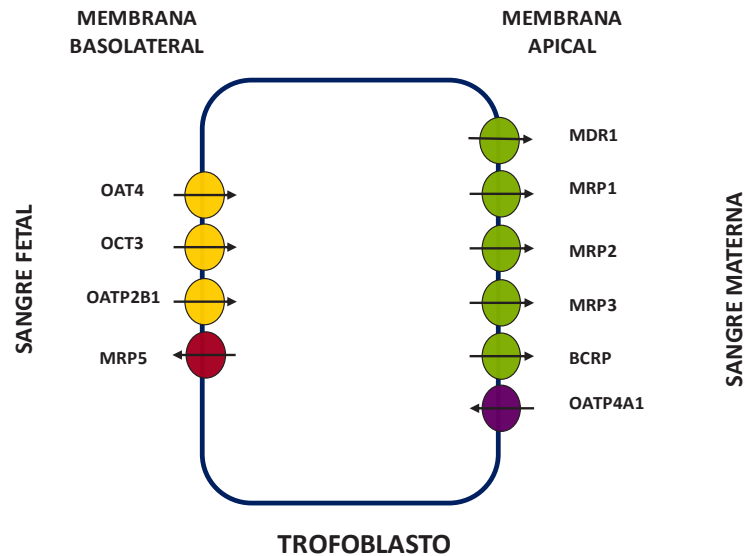
Cuando existe un fallo en los procesos de secreción biliar como ocurre en la colestasis, las proteínas transportadoras de ABs sufren también respuestas adaptativas con el fin de proteger al hígado de la retención de productos tóxicos facilitándose las rutas de excreción extrahepáticas. Bajo condiciones normales, la pérdida de ABs en orina es mínima mientras que, en situaciones de colestasis la eliminación renal se convierte en una vía mayoritaria para la eliminación de estos compuestos. Recientemente se ha demostrado que la expresión de MRP4 a nivel de ARNm y de proteína aparece incrementada en colestasis (Gradhand *et al.*, 2008), por lo que puede ejercer un papel importante en el eflujo de ABs hacia la sangre en esta situación. Otros miembros de la familia ABCC con localización también basolateral, MRP1 y MRP3 parecen estar implicados en la excreción de ABs a sangre, ya que su expresión, aumenta en colestasis (Donner y Keppler, 2001). Este hecho supone una respuesta adaptativa para reducir los efectos citotóxicos producidos por la acumulación de compuestos colefilicos, mediante su transporte de nuevo a la circulación sistémica y su posterior eliminación por vía renal (Tanaka *et al.*, 2002).

## B. Placenta

A diferencia de lo que ocurre en el adulto, en el que el sistema hepatobiliar en colaboración con el sistema renal son los responsables de la biotransformación y eliminación de ABs, pigmentos biliares y compuestos xenobióticos, durante la vida intrauterina la principal ruta de eliminación de estos productos es la transferencia placentaria de los mismos hacia la sangre materna. Una vez en la sangre materna, el principal responsable de su detoxificación es el hígado materno aunque también hay una pequeña contribución del riñón que participa en la eliminación de las especies sulfatadas y glucuronidadas (Frohling y Stiehl, 1976).

En esta función excretora de tipo hepatobiliar de la placenta, participan transportadores OATP y proteínas ABC (Figura I10), que en conjunto confieren al proceso de transferencia placentaria características de vectorialidad feto-maternas.





**Figura I11.** Representación esquemática de transportadores de compuestos colefilicos en el trofoblasto.

Estudios realizados en vesículas de membrana apical de trofoblasto humano y de rata (Bravo *et al.*, 1995; Marin *et al.*, 1995) revelan que la salida de los ABs hacia la sangre materna se lleva a cabo mediante un mecanismo dependiente de ATP, apuntando a la posible implicación de distintas proteínas ABC. Dentro de las proteínas ABC con capacidad para transportar ABs, MDR1 y algunas MRPs (MRP1, MRP2 y MRP3) son las candidatas más probables, ya que se han localizado en la cara apical del trofoblasto humano (St-Pierre *et al.*, 2000), así como en la placenta de rata (Serrano *et al.*, 2003). Un estudio reciente llevado a cabo en nuestro grupo de investigación indica que BCRP puede transportar ABs, por lo que juega un papel destacado en la eliminación de estos compuestos a través de la placenta (Blazquez *et al.*, 2012), donde los niveles de expresión de BSEP, principal transportador de ABs a la bilis, son muy bajos. En placenta, la expresión de BCRP se ha detectado en la membrana apical del trofoblasto y en los vasos fetales (Ceckova *et al.*, 2006).

Además de su papel en el transporte de ABs a través de la placenta, varios miembros de la superfamilia de proteínas ABC podrían participar en los procesos de eliminación de compuestos potencialmente tóxicos de este tejido. La localización de estos transportadores en la barrera placentaria (en la cara materna) es la óptima para proteger al feto de la entrada de xenobióticos o para facilitar su eliminación desde el compartimento fetal al materno (Marin *et al.*, 2004). Varios miembros de las subfamilias ABCB, ABCC y ABCG, relacionados con el desarrollo de resistencia a determinados fármacos, se expresan en este tejido y parecen ser los mejores candidatos para realizar el transporte activo dependiente de ATP de una gran variedad de compuestos a nivel de la barrera placentaria (Young *et al.*, 2003). En este sentido, recientemente se ha confirmado que la proteína BCRP puede transportar a través de la placenta gliburide, un fármaco administrado a pacientes diabéticas, reduciendo la exposición del feto a este fármaco (Gedeon *et al.*, 2008).

### 2.4.2.3. Papel de las proteínas ABC en los procesos de detoxificación del paracetamol

Como se mencionó en el apartado 2.3.2.2 los procesos de detoxificación del paracetamol implican su conjugación con ácido glucurónico, sulfato o GSH. Puesto que los procesos de detoxificación son iguales en roedores y en humanos, la mayoría se han estudiado en modelos animales. En ratas, la excreción de los metabolitos de paracetamol conjugados con GSH y ácido glucurónico se llevan a cabo fundamentalmente por vía biliar, mientras que los metabolitos conjugados con sulfato son transportados de vuelta al torrente sanguíneo para ser eliminados por vía renal (Gregus *et al.*, 1988). Distintos estudios llevados a cabo tanto *in vitro* como *in vivo* indican que Mrp2, Mrp3, Mrp4 y Bcrp pueden transportar una amplia variedad de fármacos, incluyendo los metabolitos del paracetamol. En hígado sano, la excreción mayoritaria de los metabolitos sulfoconjugados y glucuroconjugados así como de las formas unidas a GSH está mediada por Mrp2, mientras que Bcrp sólo participa en el transporte de los metabolitos sulfoconjugados (Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2005; Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2006b). En cuanto a la eliminación por vía renal, las proteínas Mrp3 y Mrp4, situadas en la membrana basolateral de los hepatocitos, son las responsables del transporte de los metabolitos conjugados con ácido glucurónico y sulfato a la sangre para su posterior eliminación a través de la orina (Manautou *et al.*, 2005; Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2006a)

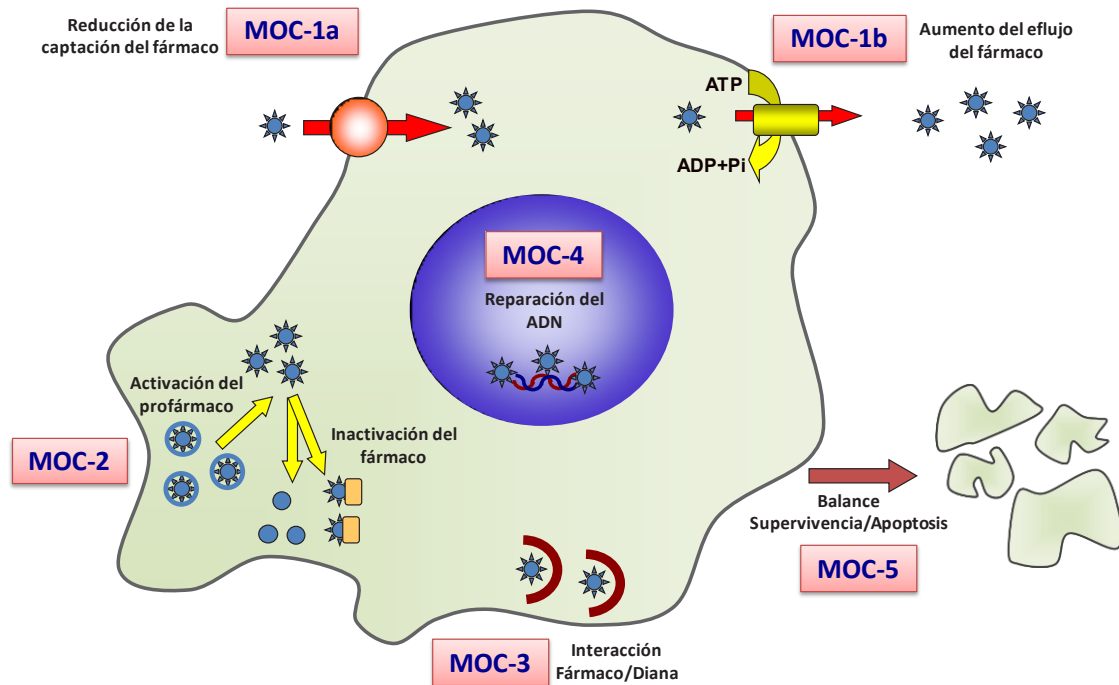
Tras el tratamiento con dosis tóxicas de paracetamol, se ha observado un aumento en los niveles de expresión de Mrp1, Mrp2, Mrp3, Mrp4 y Mdr1a/b en ratón (Aleksunes *et al.*, 2007; Aleksunes *et al.*, 2006; Aleksunes *et al.*, 2005; Champion *et al.*, 2008), y de Mrp2 y Mdr1 en rata (Ghanem *et al.*, 2004). En humanos, los niveles de ARNm de MRP1 y MRP4 se encuentran aumentados en el hígado después de la ingesta de dosis tóxicas de paracetamol. En estos pacientes también se ha observado un aumento en los niveles de proteína de MRP4, MPR5, BCRP y MDR1 (Barnes *et al.*, 2007).

### 2.4.2.4. Papel de las proteínas ABC en quimiorresistencia

Los tumores hepáticos ocupan el sexto lugar en frecuencia de diagnóstico y son la tercera causa de muerte relacionada con cáncer (Ferlay *et al.*, 2010). A pesar de la larga lista de fármacos que han sido utilizados en el tratamiento de estos tumores, la marcada refractariedad junto con la aparición de resistencia durante el tratamiento, suponen uno de los principales problemas a los que se enfrenta hoy en día la clínica a la hora de aplicar una terapia contra el cáncer.

La resistencia a la quimioterapia tiene un origen multifactorial en el que se engloban diferentes mecanismos (MOC del inglés "Mechanism Of Chemoresistance") que han sido clasificado en cinco categorías (Marin *et al.*, 2010) dependiendo de que impliquen cambios en la expresión de genes que codifican proteínas transportadoras de sustancias tóxicas (proteínas de captación catalogadas como MOC-Ia, o bombas de eflujo que se engloban en el MOC-Ib), cambios en proteínas celulares implicadas en procesos de detoxificación (MOC-II), disminución de la expresión de proteínas diana y aumento de la expresión de

vías metabólicas alternativas (MOC-III), cambios en las moléculas que participan en la reparación del DNA (MOC-IV), cambios de expresión y/o presencia de mutaciones en genes proapoptóticos (MOC-Va) o antiapoptóticos (MOC-Vb) que determinan una alteración de las vías que controlan el balance apoptosis/supervivencia (MOC-V) (Figura I11).



**Figura I12.** Mecanismos responsables del desarrollo de quimiorresistencia a la terapia antitumoral en células tumorales. MOC, "Mechanism Of Chemoresistance".

La sobreexpresión de proteínas transportadoras ABC (incluidas en el MOC-1b) en células tumorales es uno de los principales mecanismos responsables de la resistencia a múltiples fármacos o lo que se conoce como fenotipo MDR (Gillet *et al.*, 2007), que se caracteriza porque las células tumorales desarrollan resistencia a un amplio espectro de fármacos, con diferente estructura y mecanismo de acción, y a los que nunca habían sido expuestas (Lage, 2003). De todas ellas, merecen especial atención por su implicación con la resistencia a la quimioterapia antitumoral las familias B, C y G.

Como se mencionó en el apartado 2.4.2.1, MDR1 está implicada en el transporte de un gran número de fármacos antitumorales. Por ello, los cambios de expresión de MDR1 en HCC se han estudiado en profundidad, aunque aún existe controversia sobre su implicación en esta patología (Zollner *et al.*, 2005). La primera evidencia del papel de MDR1 como mecanismo detoxificante se obtuvo en las líneas celulares Caco-2, HT29 y T84, derivadas de adenocarcinoma de colon humano, en las que la expresión de MDR1 se acompañaba de un incremento en la capacidad de eflujo de vinblastina (Hunter *et al.*, 1993). Además, se ha propuesto que MDR1 es capaz de inhibir la apoptosis inducida en ciertos modelos *in vitro* (Smyth *et al.*, 1998). En ratones "knockout" para Mdr1, la biodisponibilidad de muchos fármacos administrados por vía oral se encuentra marcadamente aumentada (Schinkel *et*

*al.*, 1997). En humanos se ha propuesto una actividad similar para MDR1 (Drescher *et al.*, 2003).

En cuanto a BSEP, su papel en la resistencia a la quimioterapia en tumores hepáticos no está claro. Estudios llevados a cabo en células de mamífero transfectadas con Bsep de rata, se apreció un incremento en la resistencia a vinblastina pero no a otros fármacos que forman parte del fenotipo MDR. Esta resistencia se revierte por agentes capaces de inhibir MDR1, como la ciclosporina A y el verapamilo, lo que sugiere un cierto solapamiento entre MDR1 y BSEP en algunas funciones (Childs *et al.*, 1998). Aunque el HCC es una enfermedad poco frecuente en la infancia, el riesgo de desarrollo de estos tumores se incrementa en niños que presentan una deficiencia de BSEP, que causa colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 3 (PFIC-3) (Strautnieks *et al.*, 1998).

Aunque la mayor parte de los miembros de la subfamilia ABCC participan en el transporte fármacos antitumorales (apartado 2.4.2.1), sólo algunos de ellos parecen estar implicados en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia en HCC. Este es el caso de MRP2 cuya expresión se ha detectado en células de HCC en las que se ha relacionado con una menor acumulación distintos fármacos (Zollner *et al.*, 2005). Parece que en algunos casos, la resistencia a la quimioterapia en HCC podría deberse al aumento de expresión de MDR1 y MRP2 (Minemura *et al.*, 1999; Nies y Keppler, 2007). También la expresión de MRP3 se encuentra alterada en el HCC y, aunque generalmente se produce una reducción en sus niveles de expresión, existe una gran variabilidad interindividual (Zollner *et al.*, 2005). MRP4 participa también en la resistencia del HCC a los agentes antitumorales, de hecho, su expresión se ha encontrado aumentada unas 10 veces en células de HCC resistentes al tratamiento con cisplatino (Wakamatsu *et al.*, 2007).

La capacidad de BCRP de transportar ciertos fármacos antitumorales se ha demostrado mediante estudios llevados a cabo en células polarizadas derivadas de colon y estómago (Ross *et al.*, 1999). Existen evidencias, al menos *in vitro*, que sugieren que el aumento de la expresión de BCRP y MDR1 podría jugar un papel clave en la resistencia antitumoral observada en HCC (Li *et al.*, 2007). En líneas celulares derivadas de HCC en las que los niveles de expresión de BCRP son elevados, la inhibición de su actividad puede aumentar la sensibilidad al irinotecán (Takahata *et al.*, 2008). Algunas de las mutaciones identificadas en el gen *ABCG2* aparecen en células tumorales. Estas mutaciones pueden alterar la expresión, localización y actividad transportadora de la proteína, modificando el espectro de resistencia del tumor hacia los diferentes tratamientos utilizados en quimioterapia (Tamura *et al.*, 2007).

#### **2.4.2.5. Regulación de la expresión de proteínas ABC**

La regulación de la expresión génica, requiere la participación de un gran número de proteínas, que operan uniéndose específicamente a secuencias diana del ADN y forman, junto con la ARN polimerasa II, el complejo de iniciación de la transcripción.

Numerosos estudios llevados a cabo en los últimos años han permitido caracterizar un gran número de proteínas de unión a ADN implicadas en la regulación de la expresión de distintas proteínas transportadoras, así como las secuencias de ADN con las que interactúan. Estos receptores nucleares o factores de transcripción juegan un papel determinante en la regulación de la expresión de estos transportadores en respuesta al tratamiento con distintos fármacos o a diferentes procesos patológicos.

### A. Receptores nucleares

Los receptores nucleares son factores de transcripción que, por medio de su unión a un ligando, adquieren la capacidad de activar o inhibir la transcripción de genes. Llevan a cabo su acción mediante su unión en forma de monómeros, homodímeros o heterodímeros a zonas reguladoras específicas del gen diana, que reciben el nombre de elementos respuesta (Aranda y Pascual, 2001).

La unión de constituyentes de la bilis (como ABs o BR), de productos del metabolismo lipídico (como los oxisteroles) o de xenobióticos (como fármacos) a receptores nucleares regula la expresión de los transportadores y enzimas implicadas en el metabolismo de estos compuestos en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, aumentándola o disminuyéndola, o en ocasiones potenciando o reduciendo la respuesta a otro factor de transcripción, (Karpen, 2002).

En la regulación de la expresión de los transportadores hepatobiliares participan distintos receptores nucleares como CAR (del inglés "Constitutive Androstane Receptor") PXR (del inglés "Pregnane X Receptor"), PPAR (del inglés "Peroxisome Proliferator Activated Receptor"), FXR y AhR (del inglés "Aryl hydrocarbon Receptor"). Todos estos receptores, a excepción del AhR actúan formando heterodímeros con RXR, (del inglés "Retinoid X Receptor").

CAR es un receptor nuclear implicado en los procesos de detoxificación de distintos xenobióticos. Una de sus características más destacadas es que se encuentra constitutivamente activo en ausencia de ligando, aunque su actividad puede modularse mediante la unión a distintos agonistas. Tras la unión a su ligando, CAR se transloca al núcleo donde heterodimeriza con RXR $\alpha$ . Este heterodímero regula la expresión génica mediante su unión al sitio de respuesta a pentobarbital (Handschin y Meyer, 2003; Masahiko y Honkakoski, 2000). El tratamiento con este ligando de CAR activa la expresión de Mrp2 a Mrp6 en hígado de ratón y rata, mientras que en muestras hepáticas humanas este fármaco induce la expresión de BSEP, BCRP, MRP2, MRP3 y MDR1 (Jigorel *et al.*, 2006; Olinga *et al.*, 2008; Richert *et al.*, 2009).

Al igual que CAR, PXR heterodimeriza con RXR $\alpha$  para poder regular la expresión de distintas proteínas implicadas en rutas de detoxificación y en sistemas de transporte (Staudinger *et al.*, 2001). En ratones tratados con ligandos de PXR se ha observado un aumento en los niveles de ARNm de Mrp3, Mdr1a y Mdr1b en hígado y Mrp2 en intestino delgado (Cheng y Klaassen, 2006; Maglich *et al.*, 2002). En hepatocitos y células intestinales humanas, PXR



es capaz de inducir la expresión de MDR1 (Synold *et al.*, 2001). Además, el tratamiento con rifampicina, un ligando típico de PXR, puede inducir la expresión de MRP2, MRP3, BCRP y MDR1 en hígado humano (Jigorel *et al.*, 2006; Olinga *et al.*, 2008; Richert *et al.*, 2009).

La actividad coordinada de CAR y PXR en la regulación génica parece jugar un papel clave en los mecanismos de protección hepática desencadenados durante distintas situaciones patológicas como la toxicidad inducida por la acumulación de ABs (Stedman *et al.*, 2005; Uppal *et al.*, 2005).

FXR se ha considerado tradicionalmente un receptor nuclear específico de ABs y se expresa principalmente en hígado, intestino, riñón y glándulas adrenales (Huber *et al.*, 2002). Entre sus principales funciones se encuentra la regulación de la homeostasis de lípidos y glúcidos, aunque está involucrado en muchas otras funciones, como la regeneración hepática o la tumorigénesis (Modica *et al.*, 2010). Para activar la transcripción de sus genes diana, FXR heterodimeriza con RXR $\alpha$  y, tras la activación por un agonista, se une a los elementos de respuesta localizados en los promotores de sus genes diana, entre los que se han descrito algunas proteínas de la familia ABC, como BSEP (Ananthanarayanan *et al.*, 2001) y MDR3 en humanos (Huang *et al.*, 2003), o Mrp2 en rata (Kast *et al.*, 2002).

Los PPARs son un grupo de receptores nucleares implicados fundamentalmente en la regulación de los procesos de diferenciación celular y en el metabolismo glucídico y lipídico. Su nombre viene dado por su capacidad para aumentar el número y el tamaño de los peroxisomas celulares, una vez que se encuentran activos tras la unión a sus ligandos (Dreyer *et al.*, 1992). Al igual que CAR y PXR, PPAR necesita heterodimerizar con RXR $\alpha$  para poder unirse a sus elementos de respuesta. Distintos ligandos de PPAR $\alpha$  pueden modificar la expresión de proteínas ABC, este es el caso del clofibrato, que induce la expresión de Mdr1a, Bcrp, Mrp3 y Mrp4 en ratón (Maher *et al.*, 2005; Moffit *et al.*, 2006), o del ciprofibrato, que induce la expresión de Mdr1a, Mdr1b y Mdr2 a nivel de ARNm y proteína pero que reprime la expresión de Bsep en ratón (Kok *et al.*, 2003).

El AhR en su forma inactiva se localiza en el citoplasma unido a distintas chaperonas inactivantes. En respuesta a la unión a sus ligandos, entre los que se encuentran distintos xenobióticos, la unión entre este receptor y las chaperonas se rompe, de forma que puede translocarse al núcleo, donde modula la expresión génica mediante su unión a elementos de respuesta a xenobióticos. Estudios llevados a cabo en ratones tratados con ligandos típicos de AhR indican que este receptor induce la sobreexpresión de distintos miembros de la familia ABCC (Maher *et al.*, 2005). Mientras que en hepatocitos humanos, el tratamiento con un ligando típico de este receptor induce la expresión de MDR1, pero reprime la transcripción de BSEP (Jigorel *et al.*, 2006).

## B. Factores de transcripción

Además de los receptores nucleares mencionados anteriormente, existen también otros factores de transcripción cuya participación es fundamental en la regulación de la expresión de las proteínas transportadoras de la superfamilia ABC.

Entre estos factores destaca Nrf2 (del inglés “Nf-E2 related factor 2”), que pertenece a la familia de factores de transcripción con dominios de cremallera de leucina y que se activa en situaciones de estrés oxidativo o electrofílico.

En situaciones basales, Nrf2 se encuentra en el citoplasma unido a la proteína Keap1 (del inglés “Kelch-like ECH-Associated Protein 1”) (Itoh *et al.*, 1999), que induce la ubiquitinación de Nrf2 y su posterior degradación proteasómica (Kobayashi *et al.*, 2004). Este mecanismo de degradación es altamente eficiente, y hace que la vida media de esta proteína en condiciones basales no supere los 20 minutos (Itoh *et al.*, 1999; McMahon *et al.*, 2003). Sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo o electrofílico, la unión entre Nrf2 y Keap1 se rompe, permitiendo la translocación de Nrf2 al núcleo (Li y Kong, 2009) donde interacciona con proteínas Maf (del inglés “small muscular aponeurotic fibrosarcoma”) antes de unirse a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) en el promotor de sus genes diana. La presencia de estos elementos de respuesta antioxidante se ha descrito en los promotores de varios genes de la superfamilia ABC como *Abcc1-4* (Hayashi *et al.*, 2003; Maher *et al.*, 2007; Vollrath *et al.*, 2006). Estudios llevados a cabo con distintos activadores de Nrf2 indican que este factor de transcripción induce la expresión de Mrp2 a Mrp6 en hígado de ratón (Maher *et al.*, 2005; Maher *et al.*, 2007), Mrp3, Mrp4 y Mdr1 en hígado de rata (Cherrington *et al.*, 2002; Merrell *et al.*, 2008) y MDR1, MRP2, MRP3 y BCRP en hepatocitos humanos (Jigorel *et al.*, 2006).

Además de Nrf2, los factores de transcripción pertenecientes a la familia HNF (del inglés “Hepatocyte Nuclear Factor”) juegan un papel fundamental en la regulación de la expresión de un gran número de genes ya que pueden actuar como reguladores de otros factores de transcripción y receptores nucleares.

Uno de estos factores es HNF1 $\alpha$ , que se expresa en hígado, riñón, intestino delgado y estómago y que participa en la regulación del metabolismo de ácidos grasos, ABs y fármacos. El papel de este factor de transcripción en la regulación de la expresión de proteínas transportadoras se ha estudiado en ratones knock-out en los que se ha observado un aumento en los niveles de ARNm de Mrp4 en hígado, Mrp3, Mrp4, Mdr1a, Mdr1b y *Abcg5* en riñón y Mdr1 en duodeno (Maher *et al.*, 2006). Parece que este incremento en la expresión de proteínas ABC en estos tejidos podría ser un mecanismo compensatorio frente a la alteración hepática presente en este modelo animal.

También HNF4 $\alpha$  participa en la regulación de la expresión de distintas proteínas transportadoras como indican los estudios realizados utilizando ARN de interferencia (ARNsi) frente a este factor de transcripción. El silenciamiento de su expresión en hepatocitos humanos reduce los niveles de ARNm de BSEP, MDR1 y MRP2 (Kamiyama *et al.*, 2007).

Por tanto, HNF1 $\alpha$  como HNF4 $\alpha$  juegan un papel destacado en la regulación del transporte hepático de ABs y distintos fármacos (Wortham *et al.*, 2007).

### 2.4.3. Activación de rutas de supervivencia celular

En las células existen distintas rutas de señalización que inducen la supervivencia y proliferación celular inhibiendo los mecanismos de muerte, especialmente la apoptosis. Estos mecanismos pueden ser activados por la exposición a distintos compuestos tóxicos. Entre las rutas de supervivencia más destacadas se incluyen: la ruta de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K), la ruta de la PKC y la ruta proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Estas vías de señalización pueden operar independientemente, de forma paralela o a través de interconexiones.

Las rutas de las MAPK y de la PI3K pueden ser estimuladas por receptores acoplados a proteínas G y por receptores con actividad catalítica tirosina quinasa (RTK). Aunque son dos rutas distintas, pueden interaccionar a nivel de Ras (Vivanco y Sawyers, 2002). La ruta de la serina/treonina quinasa, PKC, también puede ser activada por receptores acoplados a proteínas G.

Aunque en mamíferos existen distintos grupos de MAPK, las más estudiadas hasta el momento son las quinasas regulada por señales extracelulares, que constituyen la ruta de supervivencia denominada ERK1/2. Esta ruta puede promover la supervivencia celular reduciendo los niveles de expresión de distintos genes proapoptóticos y estimulando la expresión de proteínas antiapoptóticas, bien de forma directa o mediante la regulación de la actividad de factores de transcripción implicados en la modulación de distintos genes implicados en los procesos de apoptosis (Lu y Xu, 2006).

La ruta de la PI3K es activada por factores de supervivencia, que a su vez, activan la serina/treonina quinasa Akt. La PI3K cataliza la fosforilación de fosfatidilinositoles, produciéndose fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), el segundo mensajero de esta ruta. La proteína PTEN desfosforila PIP<sub>3</sub> y actúa por tanto como regulador de esta ruta de señalización (Miller *et al.*, 2002). La función de los fosfolípidos como mensajeros consiste en permitir el anclaje de proteínas quinasas a la membrana plasmática, con el fin de que éstas puedan interaccionar con sus sustratos y fosforilarlos. Así, PIP<sub>3</sub> va a reclutar a la membrana plasmática a 3 serina/ treonina quinasas citosólicas: PDK1, PDK2 y Akt. Las dos primeras son quinasas dependientes de PIP<sub>3</sub> que van a fosforilar, ya en la membrana plasmática, a Akt, también denominada proteína quinasa B (PKB). Akt se encuentra en principio como trímero inactivo pero, una vez fosforilada, forma un complejo activo independiente de fosfolípidos que puede disociarse de la membrana plasmática y viajar al citosol, al núcleo, o a otros orgánulos para fosforilar proteínas (Coffer *et al.*, 1998).

Entre las dianas de Akt se encuentran distintas proteínas proapoptóticas, factores de transcripción y proteínas quinasas. Así, Akt puede fosforilar directamente a las proteínas proapoptóticas, BAD (proteína de la familia Bcl-2) y la caspasa-9, inhibiendo su actividad proapoptótica, y promoviendo por tanto la supervivencia celular. Además, existen factores de transcripción que pueden ser activados o inhibidos tras la fosforilación por Akt. Así, esta serina/treonina quinasa puede activar los factores de transcripción NF-κB, HIF-1α y CREB,



que estimulan la transcripción de genes anti-apoptóticos. Por el contrario, Akt también puede inactivar los factores de transcripción FOXO y p53, reduciendo así la expresión de genes pro-apoptóticos. También la glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) es diana de Akt. La inhibición GSK3 mediada por Akt protege a las células de la apoptosis, pero el mecanismo exacto no se conoce.

La serina/treonina quinasa intracelular mTOR también que puede ser activada por Akt. Esta proteína participa en la regulación de destacadas rutas de señalización y está implicada en la organización del citoesqueleto de actina, la degradación de proteínas, el crecimiento y la progresión del ciclo celular. La activación de la ruta Akt puede promover la supervivencia y la proliferación celular mediante la activación de distintos procesos metabólicos como la glucólisis aeróbica, la captación de nutrientes y el metabolismo energético a través de la activación de mTOR (Manning y Cantley, 2007). Además, la activación de mTOR también induce mecanismos antiapoptóticos y de supervivencia (Hay y Sonenberg, 2004).



## 3. Material y Métodos



### 3.1. MATERIAL

#### 3.1.1. Material Biológico

##### Muestras humanas

- El ADN genómico se obtuvo a partir de muestras de raspado bucal de distintos pacientes de etnia Inuit que fueron cedidas por el Dr. Nikolaj Nytofte, del Hospital Dronning Ingrid de Groenlandia (Dinamarca). Las muestras utilizadas en este estudio se obtuvieron con el consentimiento informado y por escrito de todos los pacientes, de acuerdo con las normas establecidas por el Comité de Bioética del Hospital Dronning Ingrid, siguiendo los acuerdos de la Declaración de Helsinki de 1975. En todos los casos se garantizó la confidencialidad en el tratamiento de los datos derivados del estudio, de acuerdo con la normativa basada en la Ley 15/99 (R.D. 994/99).

##### Animales

- Se utilizaron ratas hembras gestantes de la raza Wistar procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales tenían libre acceso tanto al agua como al pienso granulado comercial (Panlab, Madrid) y se mantuvieron en habitaciones con temperatura y humedad controladas, dotadas de un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12 h/12 h) constante.
- Para la obtención de oocitos, se utilizaron ranas hembras *Xenopus laevis* (Regine Olig, Hamburgo, Alemania) preparadas para la producción espontánea de oocitos. Las ranas se mantuvieron en tanques con agua cuya calidad (pH, dureza, contenido en nitratos, nitritos y cloro) se controlaba periódicamente y se alimentaron con pienso *Xenopus* XE40 (Mucedola, Milán, Italia) e hígado de rata.

En todo momento los animales fueron tratados según las especificaciones de la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio" ("Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook", 2ª edición, 2002). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

##### Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- La línea celular Hepa 1-6 (HB-8065), de hepatoma de ratón, las líneas celulares humanas Caco-2 (HTB-37) y LS 174T (CL-188), de adenocarcinoma de colon, HepG2 (HB-8065), de hepatoblastoma, JAr (HTB-144) y Jeg-3 (HTB-36), de coriocarcinoma, SK-Hep-1 (HTB-52), de carcinoma hepatocelular y la línea celular inmortalizada humana HK-2 (CRL-2190), epitelial del túbulo proximal del riñón. Todas ellas se obtuvieron de la "American Type Culture Collection" (ATCC; LGC Standards, Barcelona).

- Las líneas celulares humanas Alexander o PLC/PRF/5 (85061113), de hepatoma, y BeWo (86082803), de coriocarcinoma, fueron proporcionadas por la “European Collection of Cell Cultures” (ECACC; Health Protection Agency, Salisbury, Reino Unido).
- La línea celular humana HuH-7, de carcinoma hepatocelular, fue amablemente cedida por el Dr. Pedro Majano, de la Unidad de Biología Molecular del Hospital Universitario de La Princesa (Madrid).

Las sublíneas celulares Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> y SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>, desprovistas parcial y totalmente de ADN mitocondrial, respectivamente, fueron obtenidas previamente por nuestro grupo de investigación (Gonzalez-Loyola, 2009; Revuelta, 2010).

## Bacterias

- Se utilizó la cepa DH5α de *Escherichia coli* proporcionada por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.
- Las bacterias *E. coli* “One Shot Mach1 T1” y “One Shot ccdB Survival T1” competentes, de elevada eficacia de transformación se compraron a Life Technologies (Madrid).

### 3.1.2. Productos

Los productos utilizados en este trabajo se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

- Abbot Laboratorios (Madrid): isoflurano (Forane<sup>®</sup>), pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Abcam (Cambridge, Reino Unido): anticuerpos primarios frente a BCRP BXP-21 (ab3380), MRP4 (ab15602) y Oct1 (ab66132).
- Air Liquide (Valladolid): CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>.
- Alexis Biochemicals (Lausana, Suiza): anticuerpo primario frente a MRP1 (ALX 801-007).
- Amershan Pharmacia Biotech (Friburgo, Alemania): anticuerpo secundario frente a rata marcado con peroxidasa.
- AppliChem (Madrid): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (Hepes), ácido morfolino propansulfónico (MOPS), agar, extracto de levaduras, formamida, leche descremada liofilizada y triptona.
- BD Biosciences (Madrid): fluido envolvente FACSTFlow para citometría de flujo.
- B. Braun (Melsungen, Alemania): sutura de seda.
- Biomers.net (Donau, Alemania): algunos cebadores o “primers”.

- Bio-Rad (Madrid): acrilamida, marcadores de peso molecular de proteínas (“High range”, “Low range” y “Kaleidoscope”), tampón Tris 0,5 M pH 6,8, tampón Tris 1,5 M pH 8,8, membranas de nitrocelulosa, persulfato de amonio, TEMED y rojo ponceau.
- Cell Signaling: anticuerpos primarios frente a Akt (9272), fosfo-Akt (Ser473) (9271), p44/42 MAPK (Erk1/2) (9102), fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (4370) y fosfo-mTOR (Ser2448) (2971).
- Dako (Barcelona): medio de montaje para fluorescencia “Fluorescent Mounting Medium”.
- Fermentas (Quimiganel, Madrid): T4 polinucleótido quinasa.
- Frontier Scientific (Newark, NJ, EE.UU.): hidrocloreuro de biliverdina (BV).
- GE Healthcare (Barcelona): ácido [<sup>14</sup>C]-glicocólico, [<sup>14</sup>C]-GCA, (actividad específica 56 mCi/mmol), algunas enzimas de restricción, “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit”, “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, “PlasmidPrep Mini Spin Kit” y reactivos de detección ECL (“Enhanced ChemioLuminiscence”) que incluyen los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y los reactivos de detección 1 y 2.
- Isogen (De Meern, Holanda): algunos cebadores o “primers”.
- Life Technologies (Madrid): acetato de amonio, anticuerpo secundario fluorescente anti-IgG de ratón marcado con Alexa® 488, BODIPY® FL-prazosina, calceína acetoximetil ester (calceína-AM), 4,6-diamidino-2-fenilindol (Dapi), “Enhanced AMV RT-PCR Kit”, enzima Accuprime® Pfx ADN polimerasa, marcadores de peso molecular de ADN (25, 100 y 500 pb y 1 kb plus) y de ARN (0,24-9,5 kb y 0,5-10 kb), Kit de ARN ribosómico 18S Taqman, “Lipofectamine™ LTX Reagent” y “Plus™ Reagent”, kit para transcripción *in vitro* “mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra”, medios de cultivo Opti-MEM, DMEM F-12 con glutamax y F-12K, mezclas enzimáticas “Gateway BP Clonase II”, “Gateway LR Clonase II”, los plásmidos pUC19, pcDNAGW47Cat y pcDNA3.1/Hygro(+), proteinasa K y los vectores pDONR207 y pcDNA6.2/V5-DEST para clonación Gateway, líquido estabilizador “RNA/later”, suero bovino fetal (FBS), “SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit”, SYBR Green I (“SYBR Safe”), “SYBR Green I PCR Master Mix” y “Taqman® Universal PCR Master Mix”.
- Lifespan Biosciences (Seattle, WA, EE.UU.): anticuerpo primario frente a MDR1 (LS B1448).
- Lonza (Basilea, Suiza): marcador de peso molecular de proteínas “ProSieve™ QuadColor™ protein marker”.
- Merck (Barcelona): acetato sódico anhidro, β-mercaptoetanol, etanol, formaldehído 37%, isopropanol, tartrato disódico y tris HCl.

- Menarini Diagnostics (Barcelona): portaobjetos Optiplus.
- MP Biomedicals LLC (Santa Ana, CA, EE.UU.): líquido de centelleo UniverSol™ ES.
- Panreac (Barcelona): dicromato potásico.
- Packard Bioscience (Groningen, Holanda): soluene.
- Parke-Davis (Barcelona): anestésico con ketamina (Ketolar).
- Promega Corporation (Madison, WI, EE.UU.): algunas enzimas de restricción y T4 ADN ligasa.
- Pronadisa (Hispalab, S.A., Madrid): agarosa normal, agarosa de alta resolución MS-8 y agarosa de bajo punto de fusión.
- Quiagen (Izasa, Barcelona): Kit para la extracción de ADN genómico “QIAamp DNA Blood Mini kit”.
- Roche (Barcelona): algunas enzimas de restricción, proteinasa K y tripsina de páncreas porcino.
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.): anticuerpos primarios frente GAPDH 6C5 (sc-32233), KEAP1 (sc-33569), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa H-300 (sc28800), NRF2 C-20 (sc-722), SHP H-16 (SC-30169), Survivina (sc-17779) y anticuerpo secundario frente a conejo marcado con peroxidasa.
- Sigma-Aldrich (Madrid): acetaminofeno (paracetamol), albúmina sérica bovina (fracción V), sal sódica de los ácidos desoxicólico (ADC), glicoursodesoxicólico (AGUDC) glicoquenesodesoxicólico (AGQDC) y taurocólico (TC), azul de bromofenol, azul de Tripán, ácido etilendiamino tetraacético (AEDT), ampicilina, bromuro de etidio, cis-diaminodicloroplatino II (cisplatino), ditioneitol (DTT), cóctel de inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil), bencenosulfonilfluoruro 104 mM, pepstatina A 1,5 mM, E-64 1,64 mM, bestatina 4 mM, leupeptina 2 mM y aprotinina 80 μM), colagenasa, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, dietilpirocarbonato (DEPC), dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato sódico (SDS), doxorubicina, D-glucosa, 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38), Igepal CA-630, Factor de Crecimiento Epitelial (Epidermal Growth Factor, EGF), fumitremorgina C (FTC), fluoruro sódico (NaF), ioduro de propidio (IP), medios de cultivo, “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” (DMEM), “Minimum Essential Medium Eagle” (MEM) y “RPMI 1640” mezcla de antibióticos y antimicótico (penicilina, estreptomina y anfotericina B), ortovanadato sódico, probenecid, piruvato sódico, “Ribo-Green RNA-Quantitation Kit”, rodamina 123, rojo neutro, sal de tetrazolio “Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide” (MTT), sulfato de gentamicina, tertbutilhidroquinona (TBHQ), trizma base, uridina y verapamilo.
- Sigma-Genosys (Cambridge, Reino Unido): algunos cebadores o “primers”.



- Stressgen Bioreagents (Victoria, Canadá): anticuerpo primario frente a BVR (OSA-400).
- Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.): Marcador de peso molecular de proteínas “PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder”.
- VWR Internacional (Barcelona): ácido acético, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, agua oxigenada al 30%, bicarbonato sódico, carbonato sódico, cloruro cálcico, cloruro magnésico, cloruro potásico, cloruro sódico, dihidrógeno fosfato potásico, etanol absoluto, fosfato disódico, glicerol, hidróxido sódico, indicador universal de pH, medio de montaje Entellan®, metanol, reactivo de Folin Ciocalteu, sulfato de magnesio y Tween® 20.
- Waters (Madrid): Cartuchos Sep-Pak Plus C18.
- Whatman (Madrid): hisopos “Omni Swabs” para la toma de muestras de raspado de la mucosa oral y papel Whatman para la detección de proteínas mediante Western blot.

El Tosilato de Sorafenib fue cedido amablemente por el Servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario de Salamanca.

Todos los demás reactivos utilizados fueron del grado requerido para cada caso.

### 3.1.3. Medios instrumentales

- Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid).
- Para la determinación de pH se utilizó un electrodo de marca Crison micro pH 2002 (Crison Instruments, Barcelona).
- El agua destilada y el agua ultrapura se obtuvieron con equipos de purificación de agua por ósmosis inversa Milli-Ro 10 Plus y Milli-Q (Millipore Ibérica, Madrid).
- Las centrifugaciones se realizaron en centrifugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hucoa-Erlöss, Madrid), Megafugue-1.0 R (Heraeus Sepatech, Hanau, Alemania) y L8-M Ultracentrifuge, rotor 70.1 Ti (Beckman, Brea, CA, EE.UU.). También se utilizó una picofuga Stratagene (VWR Internacional Eurolab, Barcelona).
- Para las medidas espectrofotométricas se emplearon los espectrofotómetros Hitachi U-2000 (Grupo Taper, Madrid) y “Nanodrop 1000” (Thermo Fisher Scientific) y un lector de placas ELISA modelo ELx808 Absorbance Microplate Reader (BioTek, Winooski, VT EE.UU.). Para la cuantificación fluorimétrica se utilizó un fluorímetro Hitachi F-4010 (Grupo Taper) y cubetas de cuarzo de la marca Hellma (DueroLab, Salamanca).
- Las filtraciones a vacío se realizaron con una bomba Millipore modelo XX5522050

(Millipore Ibérica). Para la esterilización de sólidos y líquidos se empleó un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Grupo Taper).

- Para la PCR analítica y para la transcripción reversa (RT) se utilizó un termociclador Mastercycler Pro marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real en tubos de 0,2 ml se realizaron en un aparato ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System, de Applied Biosystems. Para las tarjetas microfluídicas se utilizó el modelo ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System de la misma compañía. El sistema se controló desde un ordenador Intel Core 2 (modelo DELL OPTIPLEX 755) utilizando el software DataAssist versión 2.0.
- La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizó en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 de la casa Ecogen (Madrid), acoplados a una fuente Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad, Madrid).
- La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.
- Para la evaporación de pequeños volúmenes de solventes, se utilizó un “speed-vacuum” marca Savant modelo SPD121P, acoplado a una bomba de vacío modelo UVS400A (Hucoa-Erlöss).
- Las homogeneizaciones se realizaron con un homogeneizador Polytron Typ PT 10/35 Kinemática GMBH (Lucerna, Suiza) o un sonicador tipo baño Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab S.A., Barcelona).
- La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un sistema de electroforesis modelo Mini-Protean II Cell con fuente de alimentación modelo PowerPac 300. La transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa se realizó en un sistema Trans-Blot Cell II utilizando para ello la misma fuente de alimentación, todo procedente de la casa comercial Bio-Rad.
- El manejo de células se realizó en una campana de flujo laminar vertical modelo Telstar AV 30/70 (Telstar Industrial, Barcelona). Las células se mantenían a 37°C en una estufa en ambiente de CO<sub>2</sub> modelo Hepa Class 100 (Thermo Fisher Scientific), y se observaban a través de un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, DueroLab). Los viales de almacenamiento de las distintas líneas celulares se conservaban en un contenedor de N<sub>2</sub> líquido.
- Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostaticado LAUDA Ecoline Staredition RE 106 (Hucoa-Erlöss).
- Se utilizaron placas de cultivo y frascos Roux de cuello inclinado de la marca TPP (Biotech S.L., Madrid) en el cultivo de las líneas celulares. La esterilización de las soluciones se hizo mediante filtros Sterivex de 0,2 µm (Millipore Ibérica).

- Para visualizar la fluorescencia se utilizó un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-S o un microscopio confocal modelo TCS SP2 (Leica, Barcelona), perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca).
- Para el crecimiento de bacterias se utilizó una estufa termostatzada a 37°C modelo S-20 (Selecta, Barcelona).
- Los oocitos se incubaron en una estufa Selecta (Pacisa). La selección de los oocitos se realizó con la ayuda de una lupa ZOOM 2000 (Leica, Búfalo, EE.UU.) y una fuente de luz fría KL750 (Schott, Wiesbaden, Alemania). Para la microinyección de los oocitos de *Xenopus laevis* se utilizó un equipo Nanoliter 2000 (WPI, Hertfordshire, Reino Unido).
- La radiactividad del isótopo  $^{14}\text{C}$  se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6500 (Beckman Instruments, Madrid).
- También se utilizó un sistema cromatográfico acoplado a un detector de masas, HPLC-MS/MS, de la casa Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.). Este sistema se compone de un equipo de HPLC serie 1200 formado por: una bomba cuaternaria con desgasificador de vacío (modelo G12354A); un inyector de 20  $\mu\text{l}$  de capacidad (modelo G1328B); un detector ultravioleta/visible (modelo G1314B) de longitud de onda variable y programable y una columna de fase reversa Zorbax C18 column 30 mm x 2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro termostatzada a 35°C (Agilent Technologies). El Detector de Masas Triple Cuadrupolo (modelo G6410A) está acoplado a una fuente de ionización a presión atmosférica (API) serie 6000 (modelo G1948B). Todo el sistema se controló desde un ordenador Pentium IV (modelo HP LP2065) utilizando el software Q-TOF, QQQ, TOF (Agilent Technologies) que permite tanto el control del HPLC como del detector de masas.
- Para las medidas por citometría de flujo se utilizó un modelo FACScalibur™ de la casa BD Biosciences (New Jersey, EE.UU.). Este equipo permite la detección simultánea de cuatro fluorocromos gracias un sistema de doble láser (488 nm y 635 nm). El citómetro se manejó desde un ordenador Macintosh (FACStation OSX5.2) utilizando el software CELL Quest V 3.1.
- Para la visualización de la fluorescencia de los geles de ácidos nucleicos y para la toma de medidas de quimioluminiscencia se utilizó un equipo de análisis de imagen LAS-4000 (TDI, Madrid). La captura de imágenes se llevó a cabo con una cámara refrigerada del equipo, sin filtros y con una apertura del diafragma del objetivo de f0,8. Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0.
- Las muestras se conservaron en un congelador -80°C marca Revco (Pacisa).
- Además se contó con pequeño equipamiento como agitadores magnéticos calefactores Selecta (Duerolab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Wilson (Prosisa, Salamanca).

### 3.1.4. Soluciones comunes utilizadas

- **Solución salina:** La solución salina se preparaba disolviendo NaCl en agua destilada hasta conseguir una concentración final de 150 mM.
- **Pentobarbital:** El pentobarbital sódico se disolvía en solución salina (5mg/ml)
- **Tampón MOPS 10x:** MOPS 0,2 M, acetato sódico anhidro 80 mM, AEDT 10 mM, pH 7,0.
- **Tampón TAE:** Trizma base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, AEDT 1 mM, pH 8.
- **Tampón TE 1x:** Tris 10 mM, AEDT 1 mM, pH 8,0.
- **Tampón fosfato salino (PBS):** NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,4.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Análisis genético de muestras humanas

#### 3.2.1.1. Obtención de muestras por raspado bucal

Las muestras de los distintos pacientes se obtuvieron utilizando “Omni Swabs”, hisopos estériles diseñados específicamente para la recogida de células epiteliales bucales. Las muestras se obtuvieron al menos 30 min después de haber ingerido cualquier alimento o bebida, raspando la parte interna de la mejilla 5 ó 6 veces durante aproximadamente 10 seg. Una vez finalizado el raspado, los hisopos se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

#### 3.2.1.2. Extracción y purificación del ADN

Para la purificación del ADN a partir de los raspados bucales de los distintos pacientes, las muestras se procesaron siguiendo las indicaciones del ensayo comercial “QIAmp Mini (Spin Protocol)”. El ADN se eluyó en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y se procedió a su valoración utilizando el “Nanodrop 1000”. Después de la valoración las muestras se almacenaron a -20°C hasta su utilización en los estudios de discriminación alélica mediante PCR (apartado 3.2.4.2.).

### 3.2.2. Experimentos *in vivo* en ratas gestantes

Todos los estudios se llevaron a cabo en ratas gestantes a término que se incluyeron en los siguientes bloques experimentales:

#### Bloque 1: Tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol

En este bloque que se incluyeron los siguientes grupos experimentales:

- **Grupo Control:** a estos animales se les administró por vía intraperitoneal la cantidad correspondiente del vehículo utilizado para disolver el paracetamol, que en este caso fue una disolución compuesta por solución salina y polietilenglicol 55-45% (v/v).
- **Grupo Paracetamol:** las ratas gestantes fueron tratadas con una dosis diaria de 0,4g/kg de paracetamol, que se administró por vía intraperitoneal los 3 días anteriores al parto.

En el día 21 de gestación, tras anestesiarse a las ratas con pentobarbital sódico administrado intraperitonealmente a la dosis de 50 mg/kg de peso corporal, se les realizó una incisión abdominal y se procedió a la obtención de muestras de distintos tejidos maternos y fetales. Estos tejidos se recogieron en “*RNAIate*” para su posterior análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-QPCR) o bien se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido para su análisis por Western blot. Todas las muestras de tejidos se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

## **Bloque 2: Tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol más colestasis obstructiva.**

La colestasis obstructiva se indujo mediante ligadura del conducto biliar mediante el siguiente procedimiento quirúrgico: tras anestesiarse el animal con isoflurano, se efectuó un afeitado del campo operatorio, desinfectándolo con tintura de yodo y se practicó una laparotomía ventral media de 4-5 cm desde el cartílago xifoides. Tras separar el conducto biliar común, se realizó una ligadura doble por encima de la desembocadura de los conductos pancreáticos y se cortó el conducto entre las dos ligaduras. A continuación, se cerró la cavidad abdominal por planos, con sutura continua en el peritoneo y músculo y con puntos individuales en “U” en el caso del plano cutáneo. La región abdominal se trató exteriormente con un aerosol de violeta de genciana para evitar posibles infecciones. Los animales se dejaban recuperar de la anestesia bajo una lámpara calefactora.

En este bloque que se incluyeron los siguientes grupos experimentales:

- **Grupo Sham (Sh):** a estos animales en el día 19 de gestación se les provocó estrés quirúrgico mediante manipulación del conducto biliar sin obstruirlo y se les administró el vehículo utilizado para disolver el paracetamol los tres días anteriores al parto.
- **Grupo Sham más tratamiento con paracetamol:** a estos animales en el día 19 de gestación se les provocó estrés quirúrgico mediante manipulación del conducto biliar sin obstruirlo y se les administró por vía intraperitoneal una dosis de 0,4g/kg de paracetamol los tres días anteriores al parto.
- **Grupo Colestasis (CM):** a estos animales en el día 19 de gestación se les impuso colestasis obstructiva mediante el procedimiento quirúrgico descrito anteriormente y se les administró el vehículo utilizado para disolver el paracetamol los tres días anteriores al parto.

- **Grupo Colestasis más tratamiento con paracetamol:** a estos animales en el día 19 de gestación se les impuso colestasis obstructiva quirúrgica, y se les administró por vía intraperitoneal una dosis de 0,4g/kg de paracetamol los tres días anteriores al parto.

Los animales pertenecientes a los grupos Sham y Colestasis recibieron, vía intraperitoneal, durante el mismo periodo de tiempo, la cantidad correspondiente del vehículo utilizado para disolver el paracetamol, y que en este caso fue una disolución compuesta por solución salina y polietilenglicol 60-40% (v/v).

Además, para algunos experimentos, en todos los grupos experimentales se llevó a cabo un marcaje del “pool” total de ácidos biliares siguiendo el protocolo que se detalla a continuación: se administró a las ratas gestantes una dosis de 22  $\mu$ Ci de [<sup>14</sup>C]-GCA por vía intraperitoneal el día 20 de gestación. El día 21 de gestación, tras anestésiar a las ratas con pentobarbital sódico se les realizó una incisión abdominal y se extrajo sangre de la madre por punción de la vena cava. Posteriormente se procedió a la obtención de muestras de distintos tejidos maternos y fetales que se congelaron inmediatamente por inmersión en N<sub>2</sub> líquido. En todos los casos se obtuvo sangre fetal por sección de la vena yugular que, al igual que las muestras de sangre materna, se utilizaron para determinar los niveles de ácidos biliares en suero.

Para determinar la radiactividad en los homogenados de los distintos tejidos, las muestras se trataron sucesivamente con soluene-350 (1:1) para digerir el tejido, durante 12 h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (1:1), al menos 24 h, e isopropanol (1:1) durante 24 h. Tras añadir 12 ml de líquido de centelleo y dejar estabilizar, se determinaron los niveles de [<sup>14</sup>C]-GCA en las distintas muestras analizadas.

### 3.2.3. Cultivos celulares

#### 3.2.3.1. Medios y procedimiento de cultivo

Los medios de cultivo estériles utilizados fueron los siguientes:

MEM suplementado con 110 mg/l de piruvato sódico y 2,2 g/l de bicarbonato sódico para las líneas celulares Alexander, Caco-2, HepG2, Jeg-3, LS 174T, SK-Hep-1 y SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>.

F-12K suplementado con 2 mM de L-glutamina y 26,2 mM de bicarbonato sódico para la línea celular BeWo.

DMEM suplementado con 3,5 g/l de glucosa, 293 mg/l de L-glutamina, 2,2 g/l de bicarbonato sódico, 2,38 g/l de Hepes y 110 mg/l de piruvato sódico para las líneas celulares Hepa 1-6, Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> y HuH-7.

RPMI 1640 suplementado con 293 mg/l de L-glutamina, 2,2 g/l de bicarbonato sódico, 4,5 g/l de glucosa, 2,38 g/l de Hepes y 110 mg/l de piruvato sódico para las líneas celulares HK-2 y JAr.



Los medios de cultivo de las células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> y SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> se suplementaron con 100 µg/ml de piruvato sódico y 50 µg/ml de uridina.

Para el mantenimiento del fenotipo Rho<sup>-</sup>, las células Hepa 1-6 se cultivaban en presencia de 100 ng/ml de bromuro de etidio.

Todos los medios se suplementaron con un 10% de FBS. Para el cultivo de todas las líneas celulares excepto HK-2, SK-Hep-1 y SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> se utilizó FBS inactivado. La inactivación del FBS se realizó a 56°C durante 30 min. A todos los medios de cultivo se les añadió un 1% de una mezcla de antibióticos y antimicótico que contenía penicilina (100 U/ml), estreptomina (0,1 mg/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml).

Tanto al recibir las células como al recuperarlas del N<sub>2</sub> líquido en el que se almacenaban, los criotubos se descongelaron en condiciones de esterilidad en baño maría a 37°C. Una vez descongeladas, se centrifugaron a 250 xg durante 10 min. El precipitado se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente y se pasó a frascos Roux donde se incubaron en la estufa a 37°C, en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad relativa del 80%.

El crecimiento de las células se produjo tras la adhesión a la superficie de la placa. Una vez que el cultivo alcanzaba la confluencia, las células se desprendían con una solución de 0,25% de tripsina y 20 mM de AEDT en PBS. Seguidamente, las células se centrifugaban a 300 xg durante 5 min para precipitarlas, se resuspendían en el medio de cultivo correspondiente y se contaban en una cámara Thoma. Durante el conteo se utilizaba una solución de azul de Tripán al 0,4% en PBS para determinar el número de células vivas. A continuación, se sembraban en placas para realizar los distintos tipos de experimentos o bien se congelaban alícuotas para su almacenamiento.

### 3.2.3.2. Estudios de viabilidad celular

#### A. Estudios de toxicidad del paracetamol en líneas celulares humanas

Para determinar la toxicidad del paracetamol en las distintas líneas celulares humanas se realizaron ensayos de viabilidad en los que las células fueron expuestas a dosis crecientes de este fármaco. Para ello, las distintas líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos en un volumen de 100 µl/pocillo. La densidad a la que se sembraron los cultivos dependía del tipo celular, tal y como se recoge en la Tabla MM1. 24 h después de la siembra se añadía el fármaco a la concentración deseada disuelto en 100 µl de medio fresco. En el caso particular de las células Caco-2, el tratamiento con dosis crecientes de paracetamol se inició 48 h después de la siembra. La viabilidad celular se determinó después de 48 h de incubación en presencia de paracetamol mediante el test de formazán como se indica en el apartado 3.2.11.3.

## **B. Estudios de toxicidad de compuestos xenobióticos en células desprovistas de ADN mitocondrial (Rho)**

Para determinar el efecto tóxico de distintos agentes xenobióticos en las células Rho se realizaron ensayos de viabilidad celular en presencia de dosis crecientes de los distintos compuestos tóxicos. Para ello, las líneas celulares Hepa 1-6 y SK-Hep-1, y las sublíneas desprovistas de ADNmt derivadas de ellas se sembraron en placas de 24 pocillos (1 ml/pocillo) a una densidad de  $4,0 \times 10^4$  células/pocillo en el caso de las células Hepa 1-6 y Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> y de  $2,5 \times 10^4$  células/pocillo en el caso de las células SK-Hep-1 y SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>. 24 h después de la siembra se añadían al cultivo los distintos agentes estudiados, paracetamol en el caso de las células Hepa 1-6, y doxorubicina, SN-38, cisplatino y sorafenib en el caso de las células SK-Hep-1, a la concentración deseada disueltos en 1 ml de medio fresco. La viabilidad celular se determinó 48 h después de la incubación con los compuestos xenobióticos mediante el test del rojo neutro tal y como se indica en el apartado 3.2.11.3.

### **3.2.3.3. Estudios de expresión génica**

Para determinar la expresión de diversos genes en las distintas líneas celulares empleadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, las células se sembraron en placas de 6 pocillos en un volumen final de 2 ml/pocillo a una densidad celular adecuada en función de la línea celular, tal y como se especifica en la Tabla MM1. 24 h después de la siembra se añadían al cultivo los distintos agentes estudiados a la concentración deseada disueltos en 2 ml de medio fresco y las células se incubaban a 37°C durante 30 min, 8h o 48 h. Transcurrido ese tiempo, las células se recogían y se procesaban para la obtención del ARN total (apartado 3.2.4.1), proteínas totales o crudo de membrana (apartado 3.2.5.1).

Para los estudios de translocación de Nrf2 desde el citoplasma al núcleo, las células Hepa 1-6 y Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> se sembraron en placas de 10 cm de diámetro en un volumen de 10 ml de medio y a una densidad de  $1,2 \times 10^5$  células/ml. 24 h después de la siembra se añadían al cultivo los distintos compuestos a ensayar a la concentración deseada disueltos en 10 ml de medio fresco y las células se incubaban a 37°C durante 0, 1, 3, 6, 12, 24 ó 48 h. Transcurrido ese tiempo las células se recogían y se procesaban para la obtención de las fracciones nuclear y citoplasmática tal como se indica en el apartado 3.2.5.1.

### **3.2.3.4. Estudios de citometría de flujo**

#### **A. Determinación del potencial de membrana mitocondrial (PMM) y de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Para determinar el efecto de los agentes potencialmente tóxicos a ensayar sobre la generación de ROS y el PMM, se sembraron las distintas líneas celulares en placas de 6 pocillos en un volumen final de 2 ml por pocillo. La densidad celular de los cultivos dependía del tipo celular, tal y como se indica en la Tabla MM1. 24 h después de la siembra, se añadían al cultivo los distintos agentes a ensayar a las concentraciones deseadas disueltos



en 2 ml de medio fresco. Tras 30 min, 8 h o 48 h de incubación, las células se recogían y procesaban tal y como se indica en los apartados 3.2.7.1. y 3.2.7.2.

## B. Estudios de funcionalidad de proteínas transportadoras

Para determinar la funcionalidad de las bombas exportadoras ABC mediante citometría de flujo, las células se sembraron en frascos Roux de 25 cm<sup>2</sup> en un volumen de 5 ml de medio y a una densidad variable en función del tipo celular, tal y como se especifica en la Tabla MM1. Después de 24 h, el medio de cultivo se sustituyó por medio fresco en el que se disolvió el paracetamol en la dosis requerida en función de la línea celular. Las células se incubaron 48 h en presencia del fármaco, tiempo tras el cual se recogieron y se procesaron según el protocolo recogido en el apartado 3.2.7.3.

**Tabla MM1.** Densidad de los cultivos celulares en función del tipo de soporte y experimento.

Tipo celular	Ensayo		
	Viabilidad celular	Expresión génica	Citometría de flujo
Alexander		1,5 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	1,5 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)
Hepa 1-6	4,0 x 10 <sup>4</sup> (placa 24 pocillos)	2,0 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	2,0 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)
Hepa 1-6 Rho <sup>-</sup>	4,0 x 10 <sup>4</sup> (placa 24 pocillos)	2,0 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	2,0 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)
HepG2	1,5 x 10 <sup>4</sup> (placa 96 pocillos)	8,0 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	1,6 x 10 <sup>6</sup> (frasco Roux 25 cm <sup>2</sup> )
		2,0 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	2,0 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)
Huh-7		2,0 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	2,0 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)
SK-Hep-1	2,5 x 10 <sup>4</sup> (placa 24 pocillos)	8,0 x 10 <sup>4</sup> (placa 6 pocillos)	8,0 x 10 <sup>4</sup> (placa 6 pocillos)
	5,0 x 10 <sup>3</sup> (placa 96 pocillos)	3,5 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	7,0 x 10 <sup>5</sup> (frasco Roux 25 cm <sup>2</sup> )
		1,4 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	1,4 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)
SK-Hep-1 Rho <sup>0</sup>	2,5 x 10 <sup>4</sup> (placa 24 pocillos)	8,0 x 10 <sup>4</sup> (placa 6 pocillos)	8,0 x 10 <sup>4</sup> (placa 6 pocillos)
		1,4 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	1,4 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)
Caco-2	1,2 x 10 <sup>4</sup> (placa 96 pocillos)	1,8 x 10 <sup>6</sup> (placa 6 pocillos)	3,0 x 10 <sup>6</sup> (frasco Roux 25 cm <sup>2</sup> )
LS 174T	1,5 x 10 <sup>4</sup> (placa 96 pocillos)	1,5 x 10 <sup>6</sup> (placa 6 pocillos)	3,6 x 10 <sup>6</sup> (frasco Roux 25 cm <sup>2</sup> )
JAr	1,2 x 10 <sup>4</sup> (placa 96 pocillos)	2,0 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	5,0 x 10 <sup>5</sup> (frasco Roux 25 cm <sup>2</sup> )
Jeg-3	1,2 x 10 <sup>4</sup> (placa 96 pocillos)	2,0 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	7,0 x 10 <sup>5</sup> (frasco Roux 25 cm <sup>2</sup> )
BeWo	5,0 x 10 <sup>4</sup> (placa 24 pocillos)	7,5 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	1,5 x 10 <sup>6</sup> (frasco Roux 25 cm <sup>2</sup> )
HK-2	3,5 x 10 <sup>3</sup> (placa 96 pocillos)	1,2 x 10 <sup>5</sup> (placa 6 pocillos)	2,4 x 10 <sup>5</sup> (frasco Roux 25 cm <sup>2</sup> )

### 3.2.3.5. Experimentos de transfección

La adquisición del transgén de interés por parte de una célula puede ser transitoria o estable. En el primer caso, el plásmido recombinante es extracromosómico y se pierde durante la división, mientras que en el segundo caso se integra en el genoma de la célula y se replica en cada división celular. En este trabajo, se utilizó la transfección transitoria de líneas celulares con “Lipofectamine™ LTX Reagent” y “Plus™ Reagent”.

En trabajos previos de nuestro grupo se han determinado las condiciones óptimas para realizar la transfección de las células utilizadas en esta Tesis Doctoral con el lípido catiónico Lipofectamina LTX, siendo la mezcla catiónica lipídica que conseguía mayor eficacia de transfección y menor toxicidad sobre las células la que contenía 5 µl de Lipofectamina LTX y 1 µl de Reactivo Plus por cada µg de ADN.

La transfección se llevaba a cuando la confluencia del cultivo estaba en torno al 60%, siguiendo las indicaciones del ensayo comercial. El ADN se diluía con medio OptiMEM a temperatura ambiente hasta un volumen determinado en función del tipo de placa. A continuación se añadía la cantidad requerida de Reactivo Plus y se incubaba la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadía la Lipofectamina LTX y se incubaba la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo se sustituía el medio de cultivo de los pocillos por medio fresco completo y pasados los 30 min se añadía el volumen requerido de la mezcla catiónica lipídica final a cada uno de los pocillos. Las células se incubaban a 37°C en la estufa durante 24 h, momento en el que se aspiraba el medio para retirar los complejos lípido-ADN y se añadía medio de cultivo fresco a los pocillos.

#### Localización de BVR $\alpha$ por inmunofluorescencia

Las células Alexander se sembraron sobre cubreobjetos estériles dentro de pocillos de placas de 24 pocillos con 500 µl de medio de cultivo. La densidad de la siembra fue de  $2,5 \times 10^4$  células/pocillo. Pasadas 24 h tras la siembra se procedía a realizar la transfección. Transcurridas 24 h ó 72 h desde el momento de la transfección, se procesaban los cubres como se explica en el apartado 3.2.6.2.

#### Determinación de la expresión de BVR $\alpha$ por Western blot

Las células Alexander se sembraron en placas de 6 pocillos en un volumen final de 2 ml por pocillo. La densidad de la siembra fue de  $1,25 \times 10^5$  células/pocillo. Pasadas 24 h tras la siembra se procedía a realizar la transfección. Transcurridas otras 24 h desde el momento de la transfección, las células se recogían y se procesaban para la obtención de proteínas totales como se indica en el apartado 3.2.5.1.

### 3.2.3.6. Determinación de la muerte celular por necrosis

Para determinar los niveles de necrosis en células SK-Hep-1 y SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> tratadas con AGQDC, ambas líneas celulares se sembraron en placas de 6 pocillos en un volumen final de 2 ml/pocillo a una densidad de  $1,4 \times 10^5$  células/pocillo. 24 h después de la siembra se añadía al cultivo el AGQDC a las concentraciones deseadas disuelto en 2 ml de medio fresco y las células se incubaban a 37°C durante otras 8 h. Tras este tiempo las células se recogían y se procesaban según el protocolo recogido en el apartado 3.2.11.4.

### 3.2.4. RT-PCR cuantitativa

#### 3.2.4.1. Análisis de los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa

Para determinar los niveles de expresión de distintos genes se utilizó una variante de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986), la PCR cuantitativa a tiempo real. La PCR cuantitativa (QPCR) se realizó en el termociclador ABI Prism 7300 (Applied Biosystem), utilizando como sistemas de detección SYBR Green I (componente de la mezcla de reacción “SYBR Green PCR Master Mix”) o sondas Taqman<sup>®</sup> según el caso.

#### A. Extracción del ARN total

Para extraer el ARN total a partir de homogenados de tejido o de extractos celulares, se utilizó el kit comercial “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit” (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron aproximadamente 30 mg de tejido o  $5,0 \times 10^6$  células, según el caso.

La integridad del ARN extraído se comprobó mediante la visualización de las bandas del ARNr 18S y 28S, tras ser sometido a electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1% (apartado 3.2.6.7). Se consideró que el ARN extraído no se había degradado si eran visibles, de forma nítida y localizada, las bandas correspondientes al ARNr 18S y 28S.

#### B. Transcripción reversa (RT)

Para sintetizar el ADNcopia (ADNc), que se usaría como molde en la PCR, se realizó una RT de 2 µg del ARN total extraído, utilizando los métodos comerciales “Enhanced AMV RT-PCR Kit” o “SuperScript<sup>®</sup> VILO™ cDNA Synthesis Kit” (Life Technologies) según el caso.

#### C. Diseño de cebadores

Los cebadores o “primers” específicos para el ADNc de cada una de las proteínas a estudiar se diseñaron con el programa “Primer Express” o mediante la aplicación “on-line” “Integrated DNA Technologies” (IDT). Los cebadores se diseñaron, en la medida de lo posible, a caballo entre dos exones codificantes utilizando como secuencia de referencia la secuencia del ARNm publicada en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) específica para cada gen.

Una vez diseñados, los cebadores fueron suministrados, liofilizados, por las casas comerciales Sigma-Genosys, Isogen o Biomers.net. Antes de su uso, se reconstituyeron en agua ultrapura y se valoraron por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

En las Tablas MM2-MM4 se recogen las secuencias de nucleótidos de los cebadores y las sondas Taqman<sup>®</sup> utilizados para la cuantificación relativa de la abundancia del ARNm de las diferentes proteínas estudiadas en esta Tesis Doctoral. El tamaño de los amplicones y los números de acceso de las secuencias diana para cada gen, publicadas en la base de datos GenBank, también se recogen de forma detallada en estas tablas.

**Tabla MM2.** Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes de ratón por RT-QPCR.

Proteína	Gen	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Amplicón (pb)	Nº Acceso
Car	<i>Nr1l3</i>	GGGAAACAGGAGACCATGACAGCTA	TGACTGTTGCTCTGAAGAAGCCCT	163	NM_009803
Fxr	<i>Nr1h4</i>	TGAGGGCTGCAAAGGTTTCTTCC	TACATGTCCATCAGCAGTTGCC	90	NM_009108
Nrf2	<i>Nfe2l2</i>	TACAGTCCCAGCAGGACATGGATT	TCTGGAGTTGCTCTTGCTCTCCT	159	NM_031789
Pxr	<i>Nrli2</i>	CTGCTCACAGTTCTGTTCTCT	CACTCAGCCATCTGTGCTGCTAAA	158	NM_010936
Shp	<i>Nr0b2</i>	CCTCTTCAACCCAGATGTGCCA	TACCAGAAGGGTGCCTGGAATGTT	181	NM_011850
16S*	<i>ARNr 16S</i>	AACCCCGCCTGTTACCAA	CGTTCATGCTAGTCCCTAATTAAGG	150	AY675564

\*Sonda TaqMan<sup>®</sup> (5'-3') utilizada para determinar la expresión del ARNr 16S, TTTAACGGCCGCGGTATCCTGACC

**Tabla MM3.** Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes de rata por RT-QPCR.

Proteína	Gen	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Amplicón (pb)	Nº Acceso
Bcrp	<i>Abcg2</i>	TTATGTGGTTCAAGATGACGTTGTG	TTCCAACCTTGGAACTGCTACTTT	173	NM_181381
Mdr1	<i>Abcb1</i>	ATGGGCTCCTGGGACACAAT	ACCCCATGGCTGGAACA	100	NM_012623
Mrp1	<i>Abcc1</i>	ATCCGCTCTGGGATTGGAAT	AGAGGTAGAACAAGGCACCCA	102	NM_022281
Mrp2	<i>Abcc2</i>	TTCTACCTTGCCAAGCAGGTGTT	AGCCATGTGCACAGGTAGAGGATT	146	NM_012833
Mrp3	<i>Abcc3</i>	AAGGAGTCTTGCAACATGCAAAT	CAAGGAGCTCATCTCTCATGAA	134	NM_080581
Mrp4	<i>Abcc4</i>	TGTCAATCATACCTCAGGAACCTGT	TGTACCTCTCTAGGGCTTTCCA	112	NM_133411
Nrf2	<i>Nfe2l2</i>	TACAGTCCCAGCAGGACATGGATT	TCTGGAGTTGCTCTTGCTCTCCT	159	NM_031789

Tabla MM4. Cebadores utilizados para cuantificar la expresión de genes de humanos por RT-QPCR.

Proteína	Gen	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Amplicón (pb)	Nº Acceso
Akt-1	<i>AKT-1</i>	AGCTGGTGCATCAGAGGCT	AAGTGCCATCATTCTTGAGGAGG	197	NM_005163
Bax-α	<i>BAX</i>	ATGGAGCTGCAGAGGATGATTGC	GTTCTGATCAGTCCGGCACCTT	185	NM_138761
Bcl-2	<i>BCL2</i>	GGAGGCTGGGATGCCTTTGT	AGGCATGTTGACTTCACTTGTGGC	157	NM_000633
BCRP	<i>ABCG2</i>	CCCAGGCCTCTATAGCTCAGATCATT	CACGGCTGAAACACTGCTGAAACA	83	NM_004827
BVRα	<i>BVRα</i>	AGAGGTGGAGGTGCCTATATCT	GGACGTGCTTCCAGCAT	86	U34877
CAR	<i>NR1I3</i>	TGGCATGAGGAAAGCATGATACTGT	GGAGGCCTAAACTGCACAACT	192	BC069651
CYP1A2	<i>CYP1A2</i>	ACCTGCCTCTACAGTTGGTACAGA	CTCAAACCTTGAGCACCCAGAAT	118	NM_000761
ENT2	<i>SLC29A2</i>	CCGCCATCCCGTACTTCCA	TGTTGAAGTTGAAGGCATCCTCGG	105	NM_001532.2
FXR	<i>NR1H4</i>	ACAGAAACAAGTGGCAGGTC	CTGAAGAAACCTTACACCCCTC	368	NM_005123
GAPDH	<i>GAPDH</i>	TGAGCCCGCAGCCTCC	TACGACCAATCCGTTGACTCC	138	NM_002046
HO-1	<i>HMOX1</i>	GACAGCATGCCCCAGGATTTGT	GGTCACCTGGCCCTTCTGAAA	111	NM_002133
KEAP1	<i>KEAP1</i>	CTACAGCCAAGTCCCTGAGT	ACTCAGTGGAGCGGTACATCAC	170	NM_203500
c-Kit	<i>KIT</i>	CGTCCAGACAGGCTCTTCTCAA	GACAAAGCCGGATCAGTCATAA	136	NM_001093772
MDR1	<i>ABCB1</i>	GCGCGAGTCCGAATGGAT	CCATGGATGATGGCAGCCAAAGTT	198	NM_000927
MRP1	<i>ABCC1</i>	CCGCTCTGGGACTGGAATGT	GTGTCATCTGAATGATGACCTCGGT	166	NM_004996
MRP1*	<i>ABCC1</i>	CCGCAGATCTAAAGTTGCTCA	TGCCACTGACGAAGCAGATG	151	NM_004996
MRP2	<i>ABCC2</i>	TGAAGAGGAAGCCACAGTCCATGA	TTCAGATGCCTGCCATTGGACCTA	171	NM_000392
MRP3	<i>ABCC3</i>	CCAAGTTCTGGGACTCCAACCTG	ATGATGTAGCCACGACAATGGTGC	160	NM_003786
MRP3*	<i>ABCC3</i>	TCTGTCTGGCTGGAGTGC	TCAGCTTGATGCCGCGATC	121	AF085690
MRP4	<i>ABCC4</i>	TGCAAGGTTCTGGGATAAAGA	CTTTGGCATTCTCTCAATTAACG	141	NM_005845
MRP5	<i>ABCC5</i>	GTTCAGGAGAACTCGACCCTTGG	TTTGGAGTAGTCCGGATGGGCTT	178	NM_005688
MT-ND1*	<i>MT-ND1</i>	CCTTCGCTGACGCCATAAA	TCATAGTAGAAGAGCGATGGTGAGAG	115	AJ842751
NRF2	<i>NFE2L2</i>	CGTCCAGCAGGACATGGAT	AGCTCATACTTTCCGTCGCTGA	75	NM_006164
OATP1B1	<i>SLCO1B3</i>	TGCAATGGATTGAAGATGTTCTGGCA	CAACCTTTTCCCACTATCTCAGG	416	NM_006446
OCT1	<i>SLC22A1</i>	TGCAGACAGTTTGGCCGT	GCCCGAGCCAAACAATTCTGTGAT	187	NM_003057
OCTN1	<i>SLC22A4</i>	CCGTCGTGACCGAGTGAATC	GTACAGCCATGGTTGCCAAGAGA	160	NM_003059
OCTN2	<i>SLC22A5</i>	ACCATTGTGACCGAGTGGAACT	CAACAGCACACCCACGAAGAACA	87	NM_003060
PDGFRA	<i>PDGFRA</i>	GCTGTCTCTCACAGGGCTG	GCTCATTCTCTCTGTCTGAGTGTG	300	NM_006206
PXR	<i>NR1I2</i>	GCCCAGTGTCAACGCAGAT	GGCCCTCCTGAAAAGCC	127	NM_003889
p21	<i>CDKN1A</i>	GAGGAGCGCCATGTCAGAA	ATTAGCGCATCACAGTCGCGG	124	NM_000389
p27	<i>PSMD9</i>	AAAGAGGCCATGAGCCGCAA	ATCATCCACTTGACAGCCGCG	123	NM_002813
TOPO-IIa	<i>TOP2A</i>	GCTACATCCAAGGGTGGCAGA	ATACCACAGCCAATGGCAGCTTTG	269	NM_001067
Survivina	<i>BIRC5</i>	CCAGATGACGACCCCATAGAGGAA	GCACCTTCTCCGAGTTTCTCTCA	190	NM_001168
TYMP	<i>TYMP</i>	GTGGCTGCAAGTGCCAAAT	CTCTGGGCTCTGGATGACATTGAA	107	NM_001113755
TYMS	<i>TYMS</i>	GCTGTGGTTTATCAAGGGATCCACAA	TCCACTGGAAGCCATAAAGTGGG	155	NM_001071
UP1	<i>UPP1</i>	GTTTGAGATGTAAGTTGTGTGTGTG	CCAGAAGTGCCAATGCGGATGATA	282	NM_003364
VEGFR	<i>KDR</i>	GCCTCTGTGGTTTGCCTAGT	TCCCTCTGCCCTGCAAGTAAT	116	NM_002253
16S*	<i>16S rRNA</i>	CACGAGGGTTCAGCT GTCTCT	TCTCGTCTGCTGTGCATGC	83	AJ842751

\*Sondas TaqMan® (5'-3') utilizadas para determinar la expresión de ABCC1, ACCGCTGCTGTTTGTCACTGCC; ABCC3, TGGCCGTGAAGATGCGC; MT-ND1, TCACCAAGAGCCCCTAAAACCCGC y ARNr 16S, TTTACGGCCGCGGTATCCTGACC.

## D. Realización de la QPCR

Las condiciones de temperatura para la QPCR fueron las mismas en todos los casos. Las muestras se incubaron primero 2 min a 50°C, seguidos de 10 min a 95°C, y por último, se sometieron a 40 ciclos de 15 seg a 95°C y de 1 min a 60°C.

La abundancia del ADN problema se corrigió por la de un gen normalizador, GAPDH o 18S, determinado paralelamente en cada muestra. Las determinaciones se realizaron siempre por duplicado y se incluyeron blancos de reacción, es decir, tubos en los que se sustituyó el ADNc por agua ultrapura.

## E. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se basa en el método de comparación de Ct. Se utiliza un control endógeno como elemento normalizador, de forma que la relación entre el Ct del gen diana y el Ct del gen control endógeno nos dará un valor de Ct normalizado del gen diana. Este valor sirve para normalizar la cantidad de ADN añadido a la reacción y corregir variaciones en la cantidad de ARN de partida en la muestra. Para poder llevar a cabo este método y comparar los resultados, es necesario designar una muestra como calibrador, es decir, una muestra que sirve como base para comparar los resultados a la que se le otorga el valor 1 de expresión. La cantidad de diana, normalizada frente al control endógeno y relativa al calibrador/muestra control, viene dada por:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Para conseguir este valor es necesario realizar los siguientes cálculos:

- Calcular el Ct promedio de cada muestra para cada una de las dianas y del control endógeno (en cada placa se dispone de cada muestra por duplicado).
- Calcular  $\Delta Ct$  como Ct diana - Ct control endógeno.
- Calcular  $\Delta\Delta Ct$  como  $\Delta Ct$  muestra -  $\Delta Ct$  calibrador/muestra control.

### 3.2.4.2. Estudios de discriminación alélica mediante QPCR

#### A. Fundamento

Para la detección de la mutación c.214C>A en el gen de la BVR $\alpha$  en muestras humanas se utilizó un método de discriminación alélica mediante QPCR multiplex utilizando sondas Taqman<sup>®</sup>.

La PCR multiplex permite la amplificación de varias secuencias de ADN de interés en el mismo tubo de reacción mediante el uso de sondas Taqman<sup>®</sup> específicas para cada una de las secuencias de interés. Para ello, estas sondas deben estar marcadas con distintos "reporters".

Por tanto, este sistema de discriminación alélica se basa en la emisión diferencial de fluorescencia proveniente de cada uno de los “reporters” que marcan el extremo 5’ de cada una de las sondas diseñadas para que hibriden de forma específica con el alelo normal y con el alelo que contiene el SNP (del inglés “Single Nucleotide Polymorphism”), mediante el proceso de amplificación génica por QPCR.

## B. Diseño de sondas específicas

Para conseguir valores altos de temperatura de anillamiento (AT) de los “primers” sin utilizar sondas muy largas, una variante de las sondas Taqman® utilizadas actualmente para reacciones de discriminación alélica son las sondas Taqman® MGB marcadas en su extremo 3’ con un “quencher” no fluorescente y en su extremo 5’ con el “reporter” 6-FAM o VIC, en función de su complementariedad específica con el alelo normal o mutado respectivamente. Se caracterizan por contener un grupo unido a un extremo que es capaz de unirse al surco menor de ADN, de ahí su denominación MGB (del inglés “Minor Groove Binder”) e incrementar la afinidad por el ADN aumentando también la AT.

Los resultados obtenidos en base a la fluorescencia detectada permiten establecer la discriminación alélica. Así, un incremento significativo de la fluorescencia emitida por 6-FAM indicará la presencia del alelo normal; mientras que, si existe un incremento significativo de la fluorescencia que proviene únicamente de VIC, se debe a la presencia del alelo mutado. La heterocigosidad vendrá indicada por la detección de ambas señales fluorescentes y la homocigosidad por la ausencia de una de ellas.

**Tabla MM5.** Cebadores y sondas utilizados para la detección de la presencia de la mutación c.214C>A en el exón 3 del gen de la BVR $\alpha$ . En azul se muestra el nucleótido correspondiente al SNP

Alelo	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Sonda Taqman
BVR $\alpha$ -wt	TCCATGAATTATGAAGCACAAAGAC	GGGCTTTCCATGAATTATGAAGCACA	6-FAM-CTTCGTGT <b>C</b> GAGCTG-MGB
BVR $\alpha$ c.214C>A	TCCATGAATTATGAAGCACAAAGAC	GGGCTTTCCATGAATTATGAAGCACA	VIC-GCTTCGTGT <b>A</b> GAGGT-MGB

## C. Amplificación por QPCR

Las condiciones de temperatura a las que se llevó a cabo la PCR multiplex para detectar la presencia de la mutación c.214C>A fueron: un ciclo de 10 min a 95°C, seguido de 60 ciclos de 15 seg a 92°C y 1 min a 64°C.

### 3.2.4.3. Tarjetas microfluídicas (TLDA)

Las tarjetas o placas microfluídicas (“Microfluidic Cards” o “Taqman Low Density Arrays”, TLDA) son placas de 384 pocillos, comercializadas por Applied Biosystems en diversos formatos. Esta tecnología se basa en la PCR a tiempo real con las sondas Taqman® de Applied Biosystems. Puesto que cada pocillo de la placa permite analizar una



muestra, pueden llevarse a cabo 384 reacciones de PCR al mismo tiempo. Las ventajas que presenta son que permite diseñar la placa a medida, en función de las necesidades que requiera el estudio, y que el volumen de ADNc que se utiliza para cada reacción de PCR es mucho menor que en la PCR convencional. Es un método sensible, fiable, y más barato que el uso de sondas Taqman<sup>®</sup> en reacciones individuales y, sobre todo, muy rápido.

Las sondas Taqman<sup>®</sup> vienen liofilizadas en cada uno de los pocillos y, en función del formato que se elija, se puede analizar la expresión de entre 12 y 384 genes diferentes. Por ejemplo, si se escoge el formato de 12, en la placa habrá 12 sondas y se podrán analizar 32 muestras por placa. En cambio, si se escoge el formato de 384, en la placa se tendrán 384 sondas diferentes y tan solo se podrá analizar una muestra por placa. En esta Tesis Doctoral se ha utilizado el formato de TLDAs de 96 genes, en el cual se incluyeron 90 genes de interés, 3 controles endógenos (ARNr 18S, GAPDH y  $\beta$ -actina) y 3 controles de las placas.

Repetición																										Puerto	
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	A	1	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	B		
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	C	2	
2	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	D		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	E	3	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	F		
3	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	G	4	
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	H		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	I	5	
4	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	J		
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	K	6	
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	L		
5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	M	7	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	N		
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	O	8	
6	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	P		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			

**Figura MM1.** Formato de las tarjetas microfluídicas utilizadas.

Como muestra la Figura MM1, cada placa tiene 8 puertos por los que se cargan las muestras (en nuestro caso, cargamos 2 muestras por duplicado en cada placa). Para la reacción de PCR se mezclan cada uno de los ADNc obtenidos en la reacción de retrotranscripción con la mezcla "Taqman Master Mix", y se cargan por cada uno de los puertos de la placa. A continuación, la placa se centrifuga 2 veces a 300 xg durante 1 minuto, para que toda la muestra se reparta entre los 48 pocillos que tiene cada puerto. Posteriormente se sella la placa y se lleva a cabo la reacción de PCR en el aparato AB Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems).

En estas tarjetas el análisis de los resultados únicamente se puede llevar a cabo mediante cuantificación relativa por comparación de Ct (apartado 3.2.4.1), utilizando los genes GAPDH y  $\beta$ -actina como controles endógenos. Para el análisis de expresión de los diferentes genes se utilizó una muestra de hígado humano sano como calibrador.



### 3.2.5. Detección de proteínas por Western blot

#### 3.2.5.1 Obtención de las muestras

##### A. Homogenados de tejidos

Las muestras de los distintos tejidos obtenidos de ratas gestantes se homogeneizaron con un politrón durante 1 min a mínima potencia y a 4°C. Posteriormente, el homogenado se incubó durante 30 min sobre hielo y a continuación, se centrifugó dos veces a 500 xg durante 10 min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante (homogenado tisular) se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

##### B. Lisados de células

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos tal y como se describe en el apartado 3.2.3.3. Una vez el cultivo alcanzó la confluencia deseada, se retiró el medio y la placa se lavó varias veces con PBS. A continuación se añadieron 200 µl de tampón RIPA frío suplementado con 1% (v/v) del cóctel de inhibidores de proteasas para cubrir toda la superficie del pocillo y se incubaron las células durante 25 min sobre hielo. Transcurrido este tiempo, la superficie de la placa se raspó utilizando un raspador de células, el lisado celular se transfirió a un tubo eppendorf y se incubó durante 20 min más sobre hielo. Ocasionalmente, se agitaba el tubo con el lisado en un vortex. Finalmente, el lisado se centrifugó durante 20 min a máxima velocidad a 4°C y el sobrenadante se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

En el caso de los lisados celulares destinados al análisis de la expresión de proteínas fosforiladas, las células se incubaron con un tampón de lisis frío suplementado con inhibidores específicos de fosfatasas, NaF y ortovanadato sódico, en lugar de con RIPA. El protocolo de obtención de estos lisados fue igual al detallado en el párrafo anterior.

##### C. Crudos de membrana

Para obtener el crudo de membrana, las distintas líneas celulares se cultivaron y tripsinizaron tal y como se describe en el apartado 3.2.3.3. Tras precipitar las células y eliminar los restos de tripsina, éstas se resuspendieron en 2 ml de tampón H frío suplementado con un 1% (v/v) de cóctel inhibidor de proteasas. Las muestras se homogeneizaron en el politrón durante 15 seg y se centrifugaron a 20.000 xg durante 90 min a 4°C. Los precipitados se resuspendieron en aproximadamente 200 µl de tampón H con inhibidores de proteasas, se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

##### D. Fracciones proteicas nucleares y citoplasmáticas

Tras el proceso experimental indicado en el apartado 3.2.3.3, las células Hepa 1-6, Hepa 1-6 Rho-, fueron procesadas para la obtención de las fracciones nuclear y citoplasmática. El método utilizado fue una modificación del descrito anteriormente por (Schonhoff *et al.*, 2006). Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C. Una vez finalizado el tiempo de incubación con los compuestos de interés, se retiró el medio de las placas y se lavaron con PBS. A continuación

se añadieron 1,5 ml de PBS, se raspó la superficie de las placas utilizando un raspador de células y las suspensiones de células se transfirieron a tubos de 5 ml. Seguidamente, se centrifugaron a 450 xg durante 10 min y los precipitados obtenidos se resuspendieron en 300 µl de tampón hipotónico a 4°C y se transfirieron a tubos eppendorf, que se incubaron durante 15 min en hielo. A continuación se añadió a cada muestra un volumen final del 0,05% de igepal CA-630, en el caso de las células Hepa 1-6 y Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>, y se agitaron en un vortex durante 10 seg. Las muestras se centrifugaron a 500 xg durante 2 min y se recogieron los sobrenadantes que contenían la fracciones citoplasmáticas. El precipitado de cada muestra, que contenía la fracción nuclear, se resuspendió en 300 µl de tampón hipotónico y se centrifugó a 500 xg durante 2 min. Cada precipitado se resuspendió en 30 µl de tampón de extracción a 4°C y se incubó en hielo durante 30 min. Ocasionalmente se agitaban en un vortex. Finalmente, se centrifugaron a 20.000 xg durante 5 min y se recogieron los sobrenadantes que contenían las fracciones nucleares de cada una de las muestras. Las fracciones nucleares y citoplasmáticas obtenidas se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **E. Proteínas heterólogas expresadas en oocitos**

El método utilizado para la obtención de muestras de proteínas expresadas de forma heteróloga en oocitos se basó en el descrito previamente por Bianchi (Bianchi y Driscoll, 2006). Tras el proceso experimental indicado en el apartado 3.2.10 se recogieron 20 oocitos de cada grupo experimental que se resuspendieron en 100 µl de una solución de sacarosa 0,3 M en PBS suplementado con un 1% (v/v) del cóctel de inhibidores de proteasas. Las muestras se homogeneizaron por sonicación durante 30 seg a 800 W en hielo y seguidamente se centrifugaron a 3.000xg durante 10 min a 4°C. A continuación se recogió el sobrenadante de cada muestra evitando arrastrar restos de yema que quedaban en la superficie. Los sobrenadantes obtenidos se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **3.2.5.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

#### **A. Preparación de los geles**

La electroforesis vertical se llevó a cabo en geles de poliacrilamida de distinto porcentaje, en función del tamaño de la proteína analizada, en Tris-HCl utilizando el soporte del sistema "Mini-Protean II Cell".

#### **B. Preparación de las muestras**

La concentración de proteínas de los lisados celulares se determinó por el método de Markwell (Markwell *et al.*, 1978) (apartado 3.2.11.5). Posteriormente se desnaturalizaron durante 5 min en un baño de agua hirviendo.

#### **C. Condiciones de la electroforesis y de la transferencia**

La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente, en una cubeta con tampón de migración y a un voltaje constante de 80 V para el gel concentrador, y de 100 V para el gel separador o de resolución.

La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó en una cubeta con tampón de transferencia, a una corriente de 250 mA durante 1 h y 30 min, en agitación constante y a 4°C.

### 3.2.5.3. Inmunodetección

La membrana se sometió al siguiente procedimiento a temperatura ambiente y en agitación continua: se realizaba el bloqueo durante 1 h con leche descremada al 5% (p/v) en PBS-T. A continuación, se incubaba durante 1 h con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla MM6) diluido en leche descremada al 1% (p/v) en PBS-T.

**Tabla MM6.** Anticuerpos primarios utilizados en la detección de proteínas por Western blot.

Antígeno	Nombre	Especie de origen	Dilución utilizada	Procedencia
AKT	9272	Policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling
p-AKT	9271	Policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling
BCRP	BXP-21	Monoclonal ratón	1:500	Abcam
BVR $\alpha$	OSA-400	Policlonal conejo	1:1000	Stressgen
ERK 1/2	9102	Policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling
p-ERK1/2	4370	Monoclonal conejo	1:1000	Cell Signaling
GAPDH	sc-32233	Monoclonal ratón	1:1000	Santa Cruz
KEAP1	sc-33569	Policlonal conejo	1:500	Santa Cruz
Mdr1	LS-B1448	Policlonal conejo	1:200	Lifespan Biosciences
Mrp1	MRPr1	Monoclonal rata	1:500	Alexis Biochemicals
Mrp4	ab15602	Monoclonal rata	1:500	Abcam
p-mTOR	2971	Policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling
Na <sup>+</sup> /K <sup>-</sup> ATPasa	M7-PB-E9	Monoclonal ratón	1:500	Abcam
Nrf2	sc-722	Policlonal ratón	1:500	Santa Cruz
Oct1	ab66132	Policlonal conejo	1:500	Abcam
Shp	sc-30169	Policlonal conejo	1:100	Santa Cruz
Survivina	sc-17779	Monoclonal ratón	1:500	Santa Cruz
V5	R961	Monoclonal ratón	1:5000	Life Technologies

Tras lavar la membrana con PBS-T, se incubó durante 45 min con el anticuerpo secundario. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo monoclonal adecuado marcado con peroxidasa. Para la detección se utilizó un método quimioluminiscente (ECL) y un equipo de análisis de imagen LAS-4000.

### 3.2.6. Detección de proteínas por inmunofluorescencia

#### 3.2.6.1. Procesamiento de las muestras

Para el marcaje por inmunofluorescencia, se sembraron las células en cubreobjetos estériles dentro de placas de cultivo de 24 pocillos y se mantuvieron en cultivo según se explica en el apartado 3.2.3.5.

#### 3.2.6.2. Inmunodetección

Las muestras se fijaron con metanol frío durante 1 min, y tras 3 lavados rápidos con PBS, se realizó un bloqueo con FBS al 5% en PBS durante 30 min.

La incubación con el anticuerpo primario frente al epítipo V5 (dilución 1:200) diluidos en PBS con 5% de FBS se realizó a temperatura ambiente durante 1 h.

A continuación se realizaron tres lavados de 10 min con PBS y se llevó a cabo la incubación, durante 1 h en oscuridad, con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa 488<sup>®</sup> (dilución 1:1000) y con DAPI para teñir los núcleos (dilución 1:5000).

### 3.2.7. Experimentos de citometría de flujo

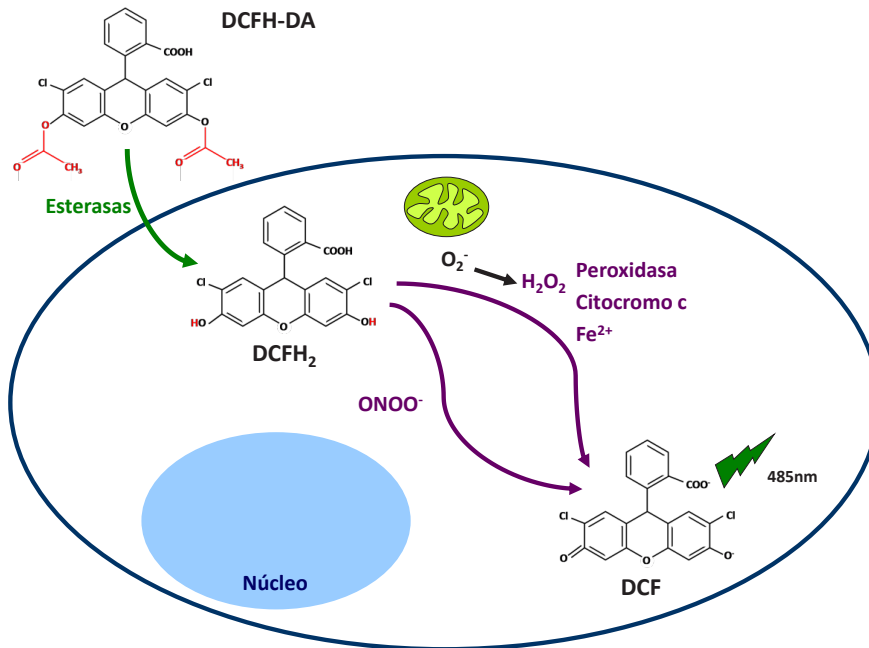
#### 3.2.7.1. Medida de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

##### A. Fundamento:

Para la determinación de la generación de ROS se utilizó el compuesto fluorogénico diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Figura MM2). Este compuesto difunde rápidamente a través de las membranas celulares y es posteriormente hidrolizado por esterasas intracelulares que lo transforman en diclorofluoresceína DCFH (Figura MM2), un compuesto no fluorescente, que se oxida en presencia de ROS dando lugar a su forma oxidada, DCF (Figura MM2), que es altamente fluorescente (Possel *et al.*, 1997).

##### B. Procedimiento:

Terminado el periodo experimental descrito en el apartado 3.2.3.4, las células se incubaron con 5 µg/ml de DCFH-DA en medio de cultivo sin FBS durante 30 min a 37°C en oscuridad. Para excluir del ensayo las células muertas, todas las muestras fueron tratadas con ioduro de propidio (IP) a una concentración de 0,5 µg/ml. El IP es incorporado por las células cuando se pierde la integridad de la membrana plasmática, una vez en la célula, este compuesto se intercala en la doble cadena de ADN y emite fluorescencia a una longitud de onda de 620 nm.

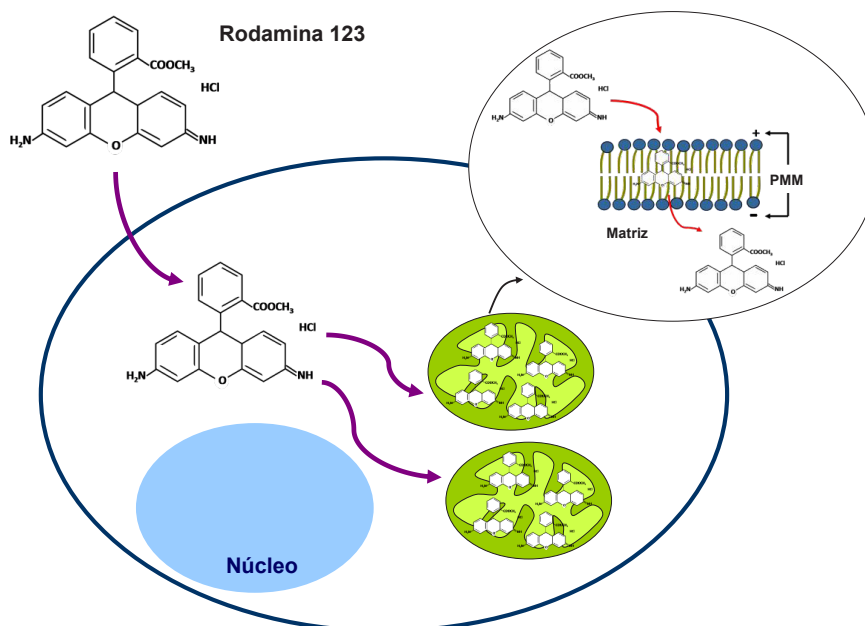


**Figura MM2.** Mecanismo de emisión de fluorescencia de la DCFH-DA, utilizada para la detección de los niveles de ROS.

### 3.2.7.2. Análisis del potencial de membrana mitocondrial (PMM)

#### A. Fundamento:

Para analizar la funcionalidad de la mitocondria se determinó el valor de su potencial de membrana, PMM. Estas medidas se llevaron a cabo analizando la fluorescencia de las células tras incubarlas con rodamina 123, un catión lipofílico que a bajas concentraciones se acumula de forma selectiva en la mitocondria (Figura MM3). La cantidad de rodamina 123 que se acumula en este orgánulo es proporcional al PMM (Davis *et al.*, 1985).



**Figura MM3.** Acumulación de rodamina 123 en función del potencial de membrana mitocondrial.

**B. Procedimiento:**

Terminado el periodo experimental descrito en el apartado 3.2.3.4, las células se incubaron durante 1 h con 5 µg/ml de rodamina 123 en medio de cultivo a 37°C en oscuridad. Para excluir del ensayo las células muertas, todas las muestras fueron tratadas con IP a una concentración de 0,5 µg/ml. A continuación, las distintas muestras se analizaron en el citómetro para determinar la fluorescencia media emitida a 553nm.

**3.2.7.3. Estudios de funcionalidad de proteínas transportadoras****A. Fundamento:**

El uso de fluorocromos en citometría de flujo también permite evaluar la funcionalidad de proteínas transportadoras, entre las que se incluyen los distintos miembros de la superfamilia ABC. Para ello, se utilizaron sustratos fluorescentes específicos para cada uno de los transportadores estudiados (Tabla MM7). Estos sustratos se acumulan en el interior celular dependiendo de la actividad de estas proteínas. Para completar estos estudios, las células se incubaron en presencia de estos sustratos y de inhibidores específicos de la actividad de estas proteínas transportadoras.

**Tabla MM7.** Sustratos e inhibidores específicos de transportadores ABC utilizados en los análisis de actividad transportadora por citometría de flujo.

Proteína	Sustrato	Concentración (µM)	λ emisión (nm)	Inhibidor	Concentración (µM)
BCRP	BODIPY-prazosin	1	530	Fumitremorgina C	5
MDR1	Rodamina 123	1	553	Verapamilo	10
MRPs	Calceína	1	517	Probenecid	500

**B. Procedimiento:**

Terminado el periodo experimental descrito en el apartado 3.2.3.4, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se centrifugaron durante 5 min. El precipitado de células se resuspendió en 100 µl de medio de captación (cloruro de sodio 96 mM, KCl 5,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y Hepes 50 mM; pH 7,4) que contenía 1 µM de sustrato y 50 µg/ml IP para marcar las células muertas. Esta suspensión celular se incubó durante 30 min a 37°C en oscuridad. Tras este tiempo, se añadió a la suspensión celular un volumen de 900 µl de medio de captación que contenía o no el inhibidor específico para cada transportador a la concentración indicada en la Tabla MM7. Las células se incubaron en esta solución durante 30 min a 37°C.

La captación se paró añadiendo 900 µl de medio de captación a 4°C y se determinó el valor de la fluorescencia media de cada una de las muestras analizadas en el citómetro de flujo.

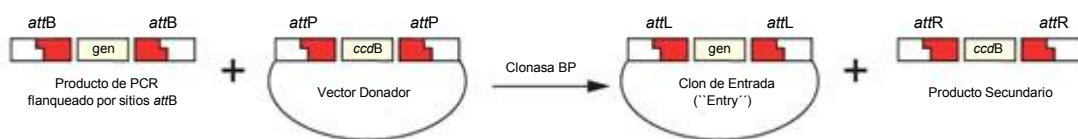
### 3.2.8. Métodos de clonación

#### 3.2.8.1. Clonación por recombinación Gateway

##### A. Fundamento

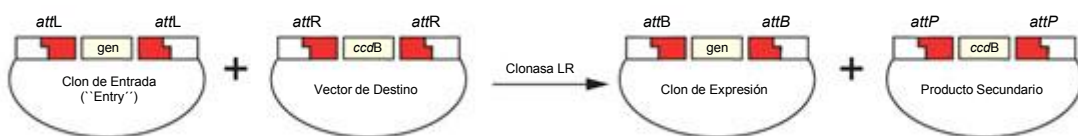
La Tecnología Gateway es un método de clonación altamente eficaz para clonar fragmentos de ADN de manera direccional (Hartley *et al.*, 2000). Las reacciones de recombinación Gateway son versiones *in vitro* de las reacciones de integración y escisión del fago lambda y permiten la transferencia de fragmentos de ADN entre diferentes vectores manteniendo la orientación y la secuencia de lectura con respecto a los tripletes. Este método de clonación es más rápido y eficaz que los procedimientos tradicionales que requieren reacciones de ligación o tratamiento con enzimas de restricción. Incluso permite la transferencia de varios fragmentos de ADN entre diferentes vectores en un sólo ensayo (Magnani *et al.*, 2006).

La reacción de recombinación BP (Figura MM4) es aquella en la que el fragmento de ADN de interés, flanqueado por sitios attB, reacciona con un vector donador (pDONR), con sitios attP, para dar lugar a un vector denominado "Entry", con sitios attL, y un producto secundario con sitios attR. Los sitios att confieren direccionalidad y especificidad a la reacción (Hartley *et al.*, 2000).



**Figura MM4.** Esquema de la reacción de recombinación BP.

La reacción de recombinación LR (Figura MM5) es aquella en la que un vector "Entry", con el ADN de interés flanqueado por sitios attL, reacciona con un vector de destino, con sitios attR, para dar lugar a un vector útil para ser empleado en el sistema de expresión correspondiente (Hartley *et al.*, 2000), y un producto secundario.



**Figura MM5.** Esquema de la reacción de recombinación LR.

El gen *ccdB* que contienen algunos productos intermedios impide el crecimiento de las bacterias que posean un vector donador o de destino no recombinado, o un producto secundario. El producto del gen *ccdB* interfiere con la girasa bacteriana, impidiendo la proliferación de las colonias que contienen dichos vectores, que se desean eliminar del



proceso de selección. La propagación y amplificación de los vectores que contienen el gen *ccdB* pueden llevarse a cabo en la cepa de bacterias “One Shot *ccdB* Survival T1”, resistente a la acción tóxica del producto de este gen.

## B. Adición de extremos attB al ADNc de interés por PCR de alta fidelidad

Los oligonucleótidos utilizados para añadir los extremos attB a la ORF (del inglés “Open Reading Frame”) de BVR $\alpha$  se diseñaron en base a la secuencia NM\_000712, de la base de datos GenBank, obteniéndose como mejores resultados las secuencias mostradas en la Tabla MM8. La secuencia attB1 se añadió en el extremo 5’ del cebador “forward” y la secuencia attB2 se añadió en el extremo 5’ del cebador “reverse”.

**Tabla MM8.** Cebadores utilizados para la clonación de la ORF del gen de la BVR $\alpha$  humana mediante la tecnología Gateway. Las secuencias attB1 y attB2 se muestran en azul.

Proteína	Cebador Forward (5’-3’)	Cebador Reverse (5’-3’)	Amplificación (pb)	Número de acceso
BVR $\alpha$	GGGGACAAGTTTGTACAAA AAGCAGGCTGCCAAGATGATG CAGAGCCCGA	GGGGACCACTTTGTACAAGA AAGCTGGGTGCTTCCTTGAA CAGCAATATTCTGGATTCTTCT	955	NM_000712

La PCR se llevó a cabo con la enzima AccuPrime Pfx ADN polimerasa de alta fidelidad. Los productos obtenidos tras la PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa y las bandas de los tamaños adecuados se purificaron por extracción del ADN del gel de agarosa.

## C. Obtención del “Entry clone” mediante recombinación BP

El producto de PCR, flanqueado por sitios attB, se clonó en el vector donador pDONR207 mediante una reacción de recombinación con la enzima clonasa BP II.

Se transformaron bacterias con el producto de reacción por choque térmico. Se sembraron en placas de medio LB con agar, suplementado con gentamicina 20  $\mu$ g/ml, el antibiótico de selección correspondiente al pDONR207. Se crecieron algunas de las colonias en medio LB líquido suplementado con antibiótico, de las que se extrajo el ADN plasmídico. La identidad de los clones seleccionados se confirmó con un estudio de restricción.

## D. Obtención del “Expression clone” mediante recombinación LR

El vector “Entry” generado en el paso anterior se hizo recombinar con el vector de destino pcDNA6.2/V5-DEST, que contiene la secuencia codificante del epítipo antigénico V5, para obtener un vector denominado “Expression clone”.

Se transformaron bacterias con el producto de reacción por choque térmico y se siguió el mismo protocolo que se ha explicado en el apartado anterior, utilizando ampicilina 100  $\mu$ g/ml como antibiótico de selección.



### 3.2.8.2. Mutagénesis dirigida

La introducción del SNP c.214C>A se realizó mediante un método de mutagénesis dirigida por amplificación del plásmido completo (Laible y Boonrod, 2009) utilizando como molde el “Expression clone” obtenido en el apartado 3.2.8.1. Los primers específicos para la mutagénesis se muestran en la Tabla MM9.

**Tabla MM9.** Cebadores utilizados para inserción de la mutación c.214C>A en la ORF gen de la BVR $\alpha$  humana mediante mutagénesis dirigida.

ORF	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')
BVR $\alpha$	GAGAAGGGAGCTCGGGAGC	TACACGAAGCCAATCAGGTTTCAGGAA

### 3.2.9. Síntesis *in vitro* de ARNm de la BVR $\alpha$

Para la síntesis *in vitro* del ARNm de las formas silvestre y mutada de la BVR $\alpha$  humana, se empleó el kit comercial “mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra” (Life Technologies), siguiendo las especificaciones del proveedor. En la Tabla MM10 se recogen los plásmidos que contienen las ORFs de estas proteínas correctamente orientadas para la transcripción *in vitro* a partir del promotor T7, así como también el tamaño del ARNm sintetizado.

**Tabla MM10.** Plásmidos recombinantes usados en la síntesis *in vitro* de ARNm

Plásmido recombinante	Tamaño del plásmido recombinante (pb)	Endonucleasa (linealización)	Tamaño del ARNm sintetizado (pb)
pEXP-BVR $\alpha$ -V5	6021	BgIII	930
pEXP-BVR $\alpha$ -C214A-V5	6021	BgIII	930

De acuerdo con las indicaciones del kit, el primer paso para la síntesis *in vitro* del ARNm a partir de ADN plasmídico fue la linealización del plásmido recombinante en el extremo 3' de la ORF con una enzima de restricción. De este modo se evita generar transcritos heterogéneos y extremadamente largos debido a la alta procesividad de la polimerasa del fago T7. En la Tabla MM10 se indica la enzima de restricción que se utilizó en cada caso para la linealización.

Una vez libre de contaminantes, se utilizó el ADN plasmídico linealizado para la síntesis *in vitro* del ARNm con caperuza de metil-GTP en 5'. Una vez finalizada la transcripción, se eliminó el ADN molde por tratamiento con ADNasa I. Para hacer más estable a los mensajeros y mejorar su tasa de traducción, el kit incorpora un último paso para la adición de la cola de poli(A) utilizando una polimerasa poli(A) de *E. coli* y ATP.

Para finalizar, el ARNm sintetizado se purificó y se cuantificó por el método del RiboGreen (apartado 3.11.2). Por último, el tamaño molecular de los productos de la transcripción *in vitro* (Tabla MM10) se confirmó por electroforesis en un gel desnaturalizante al 1% (p/v). Todo el material utilizado en este apartado estuvo libre de ARNasas.

### 3.2.10. Experimentos en oocitos de *Xenopus laevis*

Para el estudio de la actividad enzimática de la BVR $\alpha$  se utilizó el modelo de expresión heteróloga de proteínas en oocitos de rana *X. laevis*. Antes de la realización de los experimentos, los oocitos se extrajeron y se seleccionaron para su microinyección con el ARNm sintetizado *in vitro* de las proteínas objeto de estudio.

#### 3.2.10.1. Extracción y selección de los oocitos

Las ranas se anestesiaron por inyección intramuscular de 0,1 ml de una solución de ketamina (Ketolar). El animal se colocó sobre hielo, y se abrió una pequeña incisión de aproximadamente 1 cm en un lateral de la parte inferior del abdomen. Se extrajeron los racimos de oocitos con unas pinzas delgadas, se cortaron y se introdujeron en medio OR-2. Una vez finalizada la extracción, se cerró la incisión del abdomen con sutura continua en la capa muscular y con dos puntos individuales en “U” en la piel.

Tras disgregar los oocitos y eliminar la gelatina folicular, se seleccionaron los que se encontraron en el estadio 6 de maduración con ausencia de deformaciones. Los oocitos sanos seleccionados se incubaron a 18°C en medio Barth hasta que se realizó la inyección del ARN. La viabilidad de los oocitos se chequeaba mediante el test de formazán (apartado 3.11.3). En la Figura MM6 se muestra una imagen de oocitos de *X. laevis* en distintos estadios de maduración.

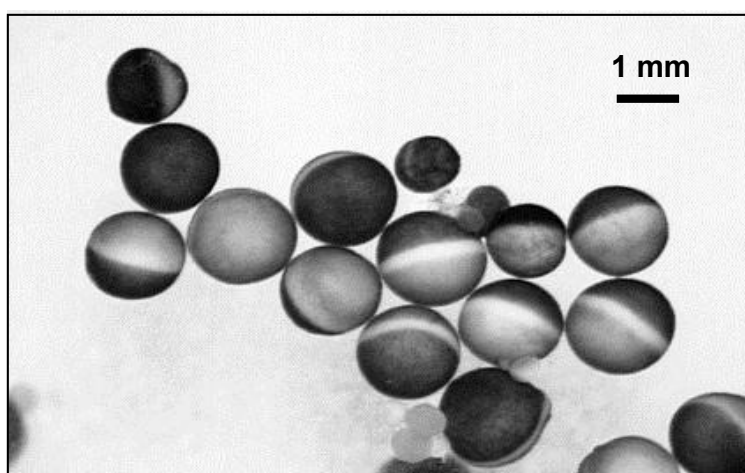


Figura MM6. Imagen de oocitos de *X. laevis* extraídos y disgregados.

### 3.2.10.2. Microinyección del ARNm en los oocitos

Los oocitos se inyectaron con microcapilares con el volumen necesario para conseguir en el interior del oocito la cantidad deseada de ARN cargado en el microinyector. El volumen de inyección se mantuvo constante entre los distintos grupos de oocitos y se ajustaron las diferencias de volumen con TE libre de ARNasas. Cada oocito se inyectó con 9,5 ng del ARNm sintetizado *in vitro*. Tras la inyección, los oocitos se incubaron en medio Barth durante 1 día, ya que en experimentos previos se comprobó que la expresión de esta proteína era óptima.

### 3.2.10.3. Estudio de la actividad enzimática de la BVR $\alpha$ humana

Antes de comenzar los experimentos, los oocitos se lavaron 3 veces con solución de captación sin sustrato y se separaron en grupos de 10 oocitos por condición experimental.

A continuación, los oocitos se inyectaron con 50 nl de una solución de captación que contenía o no 300 pmoles de BV y se incubaron durante una hora, en un baño a 25°C, con 100  $\mu$ l de la solución de captación. Un grupo de oocitos no inyectados se incubaba también en estas condiciones y se utilizaba como blanco.

Para parar la actividad enzimática de la BVR $\alpha$ , los oocitos se lavaron 4 veces sucesivas con solución de captación a 4°C. A continuación, los oocitos se procesaron y se digirieron tal y como se explica en el apartado 3.2.11.7. La determinación del contenido de biliverdina IX $\alpha$  y bilirrubina IX $\alpha$  en los oocitos se cuantificó por HPLC-MS/MS (apartado 3.2.11.7).

Un grupo de oocitos no inyectados con el ARNm se incubó en paralelo y se utilizó para determinar la producción inespecífica de bilirrubina.

Los experimentos se repitieron al menos tres veces, usando oocitos obtenidos de tres ranas diferentes.

## 3.2.11. Métodos analíticos

### 3.11.1. Determinación de ácidos biliares totales en suero

La extracción de los ácidos biliares del suero, para su posterior determinación por fluorescencia requería la separación por cromatografía en cartuchos Sep-Pak con relleno C18. Los ácidos biliares totales en suero se determinaron fluorimétricamente siguiendo el método de Talalay (Talalay, 1960) modificado por Mashige (Mashige *et al.*, 1976).

### 3.2.11.2. Valoración del ARN por el método del RiboGreen

El ARN total se valoró por fluorimetría utilizando el método comercial "RiboGreen RNA Quantitation Kit". La técnica se basa en la unión específica de un fluorógeno (RiboGreen) al ARN, el cual emite fluorescencia de forma proporcional a la cantidad de ARN presente en la muestra.

### 3.2.11.3. Determinación de la viabilidad celular

#### A. Test de Formazán

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar el número de células vivas en ensayos de proliferación o quimiosensibilidad celular. El formazán, soluble en medios acuosos, se forma a partir de sales de tetrazolio por la acción de deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas (Marshall *et al.*, 1995). En este estudio se utilizó el kit comercial “CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” que contiene metasulfato de fenazina (PMS) y sal de tetrazolio (MTS).

#### B. Test de Rojo neutro

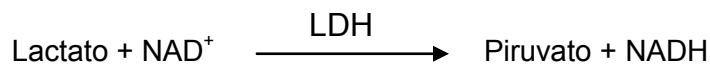
La determinación de la viabilidad celular se realizó por una modificación del método de Fautz (Fautz *et al.*, 1993), que está basado en la capacidad de las células vivas de captar el colorante rojo neutro (RN) por transporte activo e incorporarlo en sus lisosomas. Las células se incubaron durante 90 min a 37°C con una solución de RN 50 µg/ml en PBS. Transcurrido este tiempo las células se lavaron con PBS y se añadió medio de elución (ácido acético 50% v/v y etanol 1% v/v), para extraer el RN del interior de las células vivas que lo habían incorporado. La intensidad del color en el medio de elución se determinó en un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 540 nm.

### 3.2.11.4. Determinación de la muerte celular por necrosis. Medida de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)

#### A. Fundamento:

Durante la muerte celular por necrosis, se produce una liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio extracelular como consecuencia de la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. En cultivos celulares, la relación entre la concentración de LDH en el medio y en el interior de la célula se considera un indicador del índice de necrosis.

Esta enzima cataliza la oxidación reversible de lactato a piruvato:



Por ello, la medida espectrofotométrica de la variación en la concentración de NADH, permite terminar la actividad de esta enzima.

#### B. Procedimiento:

Una vez finalizado el proceso experimental indicado en el apartado 3.2.3.6, se determinó la actividad LDH tanto en lisados celulares (LDH intracelular), como en el medio de cultivo (LDH medio). En el caso de los lisados celulares la medida de la actividad LDH

se determinó en una solución que contenía 625  $\mu\text{l}$  de Tris/NaCl/NADH, 125  $\mu\text{l}$  de Tris/NaCl/piruvato y 12,5  $\mu\text{l}$  de lisado celular, mientras que la determinación en el medio de cultivo se llevó a cabo en una solución compuesta por 250  $\mu\text{l}$  de Tris/NaCl, 312,5  $\mu\text{l}$  de Tris/NaCl/NADH, 62,5  $\mu\text{l}$  de Tris/NaCl/piruvato y 250  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo. La disminución de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm se determinó durante 1 min, a 30 °C.

Los resultados se expresan como la relación entre la actividad LDH liberada por las células al medio y la actividad LDH total:

$$\text{LDH medio} / (\text{LDH medio} + \text{LDH intracelular})$$

### 3.2.11.5. Determinación de proteínas totales

Para medir la concentración total de proteínas se utilizó una modificación del método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) realizada por Markwell (Markwell *et al.*, 1978), basada en la reducción de las proteínas con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con las proteínas tratadas.

### 3.2.11.6. Determinación de radiactividad

La radiactividad del isótopo  $^{14}\text{C}$  se midió en un contador de centelleo líquido utilizando en cada medida 4 ml de líquido de centelleo.

### 3.2.11.7. Determinación de la actividad BVR $\alpha$ por HPLC-MS/MS

Para determinar la actividad de la BVR $\alpha$  se analizó la conversión de biliverdina IX $\alpha$  en bilirrubina IX $\alpha$  en oocitos que expresaban de forma heteróloga la BVR $\alpha$  humana.

El método utilizado se estableció a partir de protocolos para la medida de biliverdina IX $\alpha$  (Niittynen *et al.*, 2003) y bilirrubina IX $\alpha$  (De Matteis *et al.*, 2006) mediante HPLC-MS/MS previamente descritos

Para la separación cromatográfica se empleó una columna de fase reversa HPLC Zorbax C18, 30 mm x 2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , termostatazada a 35°C. Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol y agua en una relación 80:15 que contenía 5 mM de acetato amónico y 0,01% de ácido fórmico, pH 3,2. El flujo de trabajo fue de 0,3 ml/min y el volumen de inyección fue de 2  $\mu\text{l}$ , en todos los casos.

La determinación de los niveles de biliverdina IX $\alpha$  y bilirrubina IX $\alpha$  en el triple cuadrupolo se llevó a cabo utilizando ionización positiva. Las condiciones de trabajo para la fuente iónica fueron: temperatura del gas ( $\text{N}_2$ ) 350°C, flujo del gas 10 ml/min, presión del nebulizador 10 psi, voltaje 2.500 V. Se empleó el modo de trabajo MRM siguiendo la transición específica de los iones precursores (ión molecular -  $\text{H}^+$ ) 583,3 m/z para la biliverdina IX $\alpha$  y 585,3 m/z para la bilirrubina IX $\alpha$ , a los respectivos iones producto resultantes, 297,2 m/z y 299,2 m/z, para determinar la abundancia de estos dos pigmentos.

Se construyeron rectas patrón para cada uno de estos dos compuestos mediante inyección de soluciones metanólicas con concentraciones de 0,02 a 5  $\mu\text{M}$ . Los tiempos de retención de la biliverdina IX $\alpha$  y la bilirrubina IX $\alpha$  en este sistema fueron de 0,72 y 4,20 min respectivamente.

Se corrigió la concentración de cada uno de estos pigmentos a partir de su recta patrón por la recuperación obtenida para el estándar interno TC ( $84\pm 2\%$ ), que se detectó siguiendo la transición específica de 514,3 m/z a 80,2 m/z. El tiempo de retención de TC fue de 1,4 min.

### Preparación de las muestras

Para determinar el contenido de biliverdina IX $\alpha$  y bilirrubina IX $\alpha$ , los oocitos obtenidos siguiendo el protocolo indicado en el apartado 3.2.10.3 se procesaron individualmente en tubos eppendorf. Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de solución de lisis/extracción (metanol:agua, 9:1) que contenía TC 0,5  $\mu\text{M}$ , que se utilizó como estándar interno. Para su lisis, se sonicaron durante 3 min a máxima potencia y a 4°C. A continuación, se centrifugaron a 20.000 xg durante 5 min a 4°C y se recogieron 70  $\mu\text{l}$  del sobrenadante, que se analizaron mediante HPLC-MS/MS.

### 3.2.11.8. Electroforesis en gel de agarosa

#### Geles de agarosa desnaturalizantes

Para la preparación del gel se utilizó agarosa al 1% (p/v) con tampón MOPS 10x (10% v/v) y el formaldehído al 37% (18% v/v). La electroforesis se llevó a cabo en presencia de tampón MOPS 1x. Las muestras y el marcador de tamaños moleculares de ARN (0,5-10 kb) se mezclaron con un volumen de solución de carga desnaturalizante (formamida 95% (p/v), azul de bromofenol 0,025% (p/v), xileno cianol 0,025% (p/v), AEDT 18 mM y SDS 0,025% (p/v)) que contenía bromuro de etidio al 0,008% y se calentaron a 75°C durante 10 min.

#### Geles de agarosa no desnaturalizantes

Para la preparación del gel se utilizó agarosa disuelta en TAE 1x al 1 o 2,5% (p/v), en función de los tamaños moleculares de las muestras a analizar. Se añadía reactivo SYBR Green I hasta conseguir una concentración 1/10.000 (v/v). El gel se colocaba en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Las muestras se mezclaron con 0,1 volúmenes de solución de carga (sacarosa 40% (p/v), azul de bromofenol 0,25 % (p/v) y xileno cianol 0,25 % (p/v)) antes de depositarlas en el gel. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se emplearon los estándares de 25 pb, 100 pb, 500 pb o 1 kb plus, según los casos. El gel se visualizaba en el equipo de análisis de imagen LAS-4000.

### 3.2.12. Análisis estadístico

Para la expresión de los resultados se ha calculado la media y el error estándar de la media (EEM).

Para calcular la significación estadística de la comparación entre dos medias se utilizó el test de la  $t$  de Student o el test de  $t$  de Student de valores apareados, según el caso. Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las correlaciones lineales se obtuvieron por el método de los mínimos cuadrados.

El análisis estadístico se realizó en un ordenador Macintosh G5 (Apple Computer, Inc., Cupertino, EE.UU.).





## 4. Resultados y Discusión



#### 4.1. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ABC EN SITUACIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR AGENTES ENDÓGENOS Y XENOBIÓTICOS EN DISTINTOS TEJIDOS. IMPLICACIÓN DEL GENOMA MITOCONDRIAL

Las bombas ABC son proteínas integrales de membrana que transportan activamente sustratos de diversa naturaleza química. En mamíferos presentan un gran interés clínico, ya que se han encontrado alteradas en distintas patologías (Trauner *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 1998) y parecen jugar un papel destacado en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia (Lage, 2003).

Estos transportadores están también implicados en una gran variedad de procesos fisiológicamente importantes. Así, participan en la regulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la placenta, donde su expresión es especialmente alta (Klein *et al.*, 1999). En hígado, tracto gastrointestinal y riñón, las bombas ABC desempeñan funciones de protección excretando tóxicos endógenos y xenobióticos (Leslie *et al.*, 2005).

La expresión de estas proteínas está estrechamente regulada en condiciones fisiológicas y puede verse alterada en condiciones patológicas. En general, en este control intervienen múltiples factores como los niveles de constituyentes biliares, hormonas, metabolitos lipídicos, citoquinas pro-inflamatorias y muchos compuestos xenobióticos. Sin embargo, los mecanismos implicados responsables no se conocen en profundidad. A nivel transcripcional, la regulación parece estar controlada por distintos receptores nucleares como FXR, que actúa como sensor de ácidos biliares (ABs), y SHP que actúa como efector de FXR, mientras que PXR y CAR pueden ser activados por distintos fármacos y toxinas (Klaassen y Aleksunes, 2010). NRF2, un factor de transcripción que se activa en situaciones de estrés oxidativo, también está implicado en los cambios de expresión de proteínas ABC (Klaassen y Aleksunes, 2010). Además de la acción directa de receptores nucleares y factores de transcripción, los procesos de señalización retrógrada (ver apartado 2.2), participan en la regulación de la expresión de estos transportadores (Hallstrom y Moye-Rowley, 2000; Pillay *et al.*, 1998). De hecho, se ha sugerido que, puesto que las mitocondrias presentan una gran sensibilidad a la toxicidad inducida por compuestos endógenos y xenobióticos, estas rutas de señalización podrían jugar un papel fundamental en la activación de mecanismos de respuesta a situaciones de estrés químico (Erol, 2005), entre los que se incluye la modulación de la expresión de bombas exportadoras de la superfamilia ABC.

##### 4.1.1. Estudio de los cambios en la expresión de proteínas ABC en respuesta al tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol

El paracetamol es un analgésico y antipirético de uso muy extendido. Se considera un fármaco de baja toxicidad y por eso es uno de los pocos medicamentos cuya administración se autoriza durante la gestación ya que, dentro del rango terapéutico, no presenta ningún efecto adverso ni en la madre ni en el feto (Scialli *et al.*, 2010).

Este fármaco se metaboliza en el hígado mediante sulfatación y glucuronidación y sus metabolitos son eliminados por vía biliar y renal (James *et al.*, 2003). A dosis terapéuticas sólo una pequeña proporción de paracetamol se metaboliza por el citocromo P450 formándose un metabolito reactivo, la N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI), que se elimina eficazmente tras su conjugación con glutatión (GSH). Sin embargo, tras la exposición a una dosis tóxica, la producción de NAPQI se incrementa tanto que se supera la capacidad de detoxificación del GSH y se une covalentemente a distintas proteínas (Nelson, 1990), causando un deterioro de la función hepática (Prescott, 1980) y alteraciones en otros tejidos como consecuencia de la producción hepática de metabolitos tóxicos (Gu *et al.*, 2005).

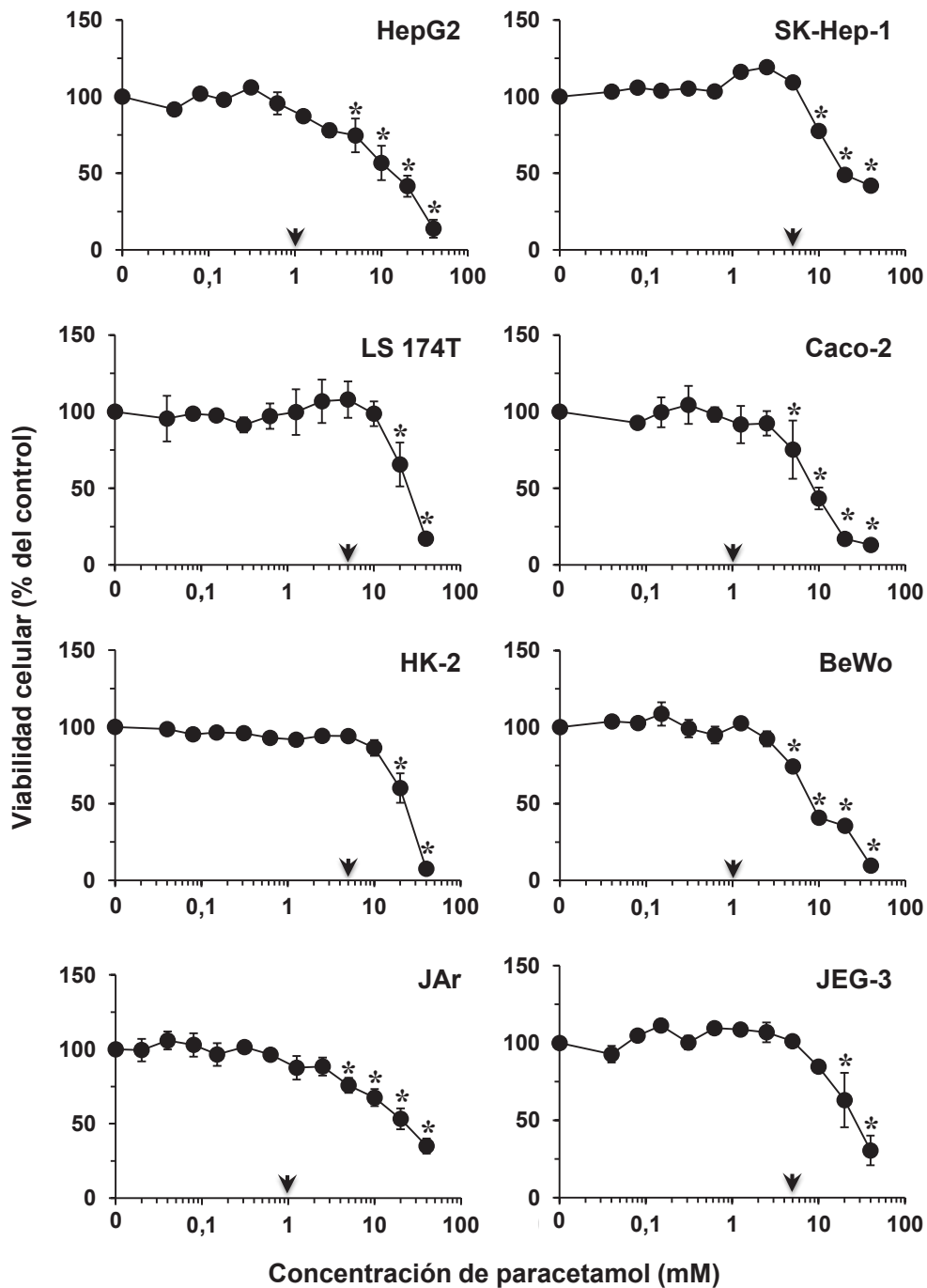
En los procesos de fase III de detoxificación de este fármaco participan varias proteínas pertenecientes a la superfamilia ABC, como Mrp2, Mrp3, Mrp4 y Bcrp, que pueden transportar metabolitos de paracetamol conjugados con GSH, sulfato o ácido glucurónico (Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2005; Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2006). Distintos estudios realizados en roedores y en humanos muestran que el tratamiento con dosis tóxicas de paracetamol induce la expresión de estas proteínas pero también de otros miembros de esta superfamilia como Mdr1/MDR1 y Mrp1/MRP1 (Aleksunes *et al.*, 2008b; Aleksunes *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2007; Ghanem *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta la importancia de los transportadores ABC en los procesos de detoxificación del paracetamol y la limitada disponibilidad de datos sobre el efecto del tratamiento con dosis no tóxicas de este fármaco en la expresión de estas proteínas, el primer objetivo de esta Tesis Doctoral fue evaluar el efecto del tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol sobre la expresión de proteínas ABC a nivel hepático y extrahepático en humanos y en rata.

#### 4.1.1.1. Toxicidad del paracetamol en distintas líneas celulares humanas

Para llevar a cabo estos estudios seleccionamos distintas líneas celulares humanas de origen hepático (HepG2 y SK-Hep-1) y de otros tejidos implicados en el metabolismo y detoxificación del paracetamol, como intestino (LS 174T y Caco-2), riñón (HK-2) o placenta (BeWo, JAr y JEG-3).

El efecto del paracetamol sobre la viabilidad se determinó tras la exposición de las distintas líneas celulares a dosis crecientes de este fármaco durante 48 h (Figura RD1). Puesto que nuestra intención era analizar el efecto del paracetamol sobre la regulación de estos transportadores en ausencia de toxicidad, definimos “dosis subtóxica” como aquella inmediatamente inferior a la primera dosis ensayada que reducía significativamente la viabilidad celular (Figura RD1). Dependiendo de la sensibilidad de cada una de las líneas celulares se seleccionó una dosis subtóxica de paracetamol, que fue 1 mM en el caso de las células HepG2, Caco-2, BeWo y JAr y 5 mM en el caso de las células SK-Hep-1, LS 174T, HK-2 y JEG-3, para llevar a cabo los experimentos posteriores.

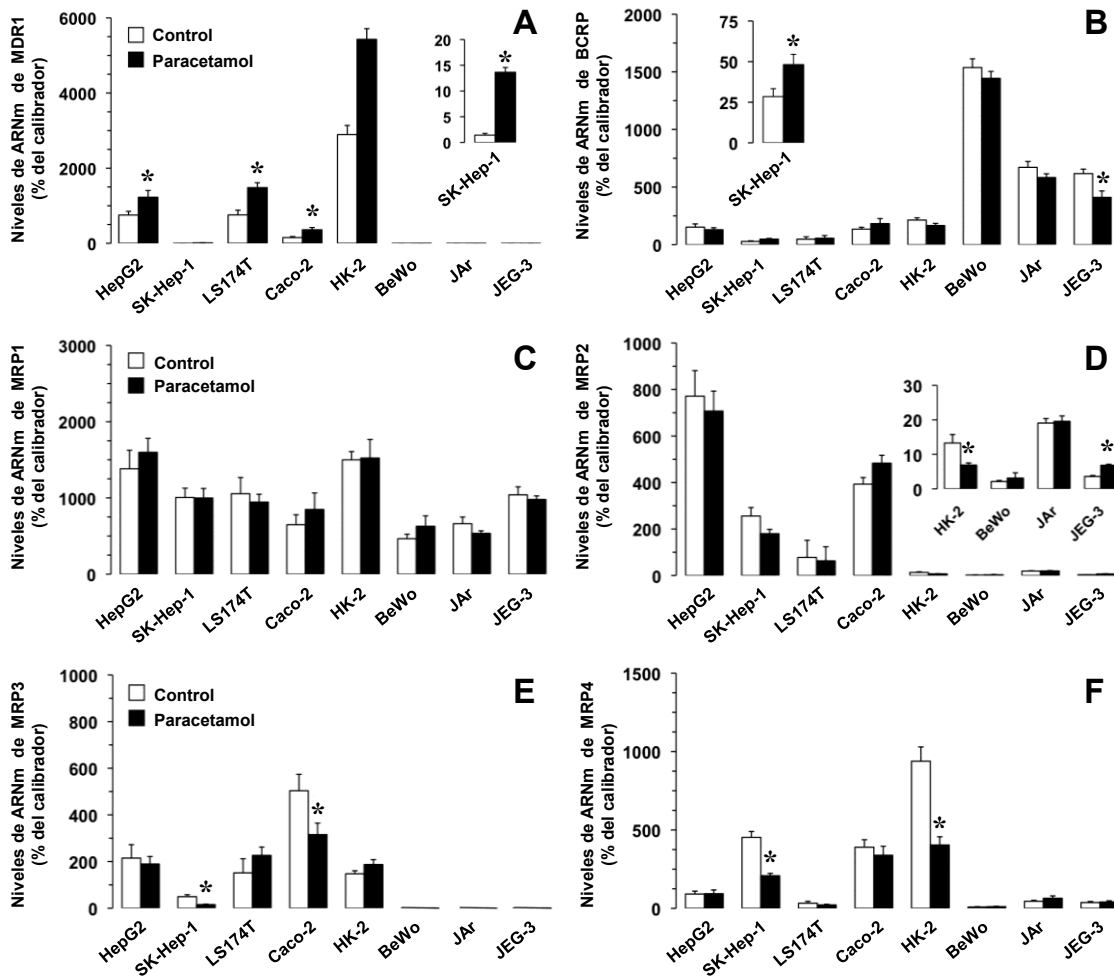


**Figura RD1.** Efecto del paracetamol sobre la viabilidad de distintas líneas celulares humanas derivadas de hepatoblastoma (HepG2), carcinoma hepatocelular (SK-Hep-1), adenocarcinoma de colon (LS174T y Caco-2), túbulo proximal del riñón (HK-2), y coriocarcinoma (BeWo, JEG-3 y JAr). La viabilidad se determinó mediante el test de formazán tras exponer las células al fármaco durante 48 h y se expresó como porcentaje de células vivas con respecto a las células no tratadas. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , comparando con la viabilidad de las células control mediante el test *t* de Student. Las flechas indican la concentración subtóxica seleccionada para cada una de las líneas celulares.

La mayor o menor sensibilidad de las distintas líneas celulares a la toxicidad inducida por el paracetamol podría deberse a diferencias en la actividad de las rutas metabólicas implicadas en los procesos de detoxificación, en los niveles de glutatión, o bien a los niveles de expresión de las distintas proteínas implicadas en el transporte de este fármaco.

#### 4.1.1.2. Efecto del tratamiento con dosis subtóxicas del paracetamol sobre la expresión de proteínas ABC en líneas celulares humanas

Una vez seleccionada la dosis subtóxica de paracetamol para cada una de las líneas celulares, nuestro siguiente paso fue determinar su efecto sobre la expresión de aquellas proteínas ABC cuya expresión puede modificarse en respuesta al tratamiento con dosis tóxicas de este fármaco (ver apartado 4.1.1). Para ello, las células se trataron durante 48 h con la dosis subtóxica seleccionada y los niveles de expresión de los transportadores se determinaron mediante RT-QPCR (Figura RD2).



**Figura RD2.** Niveles relativos de ARNm de MDR1 (A), BCRP (B), MRP1 (C), MRP2 (D), MRP3 (E) y MRP4 (F) en líneas celulares humanas derivadas de hepatoblastoma (HepG2), carcinoma hepatocelular (SK-Hep-1), adenocarcinoma de colon (LS 174T y Caco-2), túbulo proximal del riñón (HK-2), y coriocarcinoma (BeWo, JEG-3 y JAr) tratadas o no (control) con dosis subtóxicas de paracetamol durante 48 h, determinados mediante RT-QPCR. Los valores se expresan como porcentaje del calibrador utilizado, que fue hígado humano para MDR1 y MRP2, riñón humano para MRP3 y MRP4 y placenta humana para MRP1 y BCRP y son media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , comparando con las células control mediante el test *t* de Student.

En el caso de MDR1 (gen *ABCB1*) (Figura RD2-A), los niveles de expresión génica aumentaron con el tratamiento en las líneas celulares de origen intestinal, renal y hepático, siendo el cambio más llamativo la inducción de este transportador en la línea hepática SK-Hep-1, a pesar de que su expresión basal en esta línea celular es muy baja. Sin embargo,

no se encontraron cambios en ninguna de las líneas de origen placentario. La expresión de BCRP (gen *ABCG2*), se incrementó en las células SK-Hep-1 tras el tratamiento, mientras que se redujo en la línea de origen placentario JEG-3 (Figura RD2-B). En cuanto a los transportadores pertenecientes a la familia ABCC, los cambios observados fueron diversos. La expresión de MRP1 (gen *ABCC1*) (Figura RD2-C) no se modificó en ninguna de las líneas celulares estudiadas, mientras que los niveles de expresión de MRP2 (gen *ABCC2*) aumentaron en las células JEG-3 y disminuyeron en las células HK-2 tras el tratamiento (Figura RD2-D). Por otra parte los niveles de expresión de MRP3 (gen *ABCC3*) en células SK-Hep-1 y Caco-2 (Figura RD2-E) y los de MRP4 (gen *ABCC4*) en células SK-Hep-1 y HK-2 (Figura RD2-E) disminuyeron tras la exposición al paracetamol.

Diversos estudios realizados en roedores indican que la exposición repetida a dosis subtóxicas de este fármaco ejerce un efecto protector frente a su toxicidad tanto en hígado como en intestino. Este fenómeno de resistencia al paracetamol, conocido como autoprotección, también se ha descrito en humanos (Aleksunes *et al.*, 2008a; Dalhoff *et al.*, 2001; Ghanem *et al.*, 2009; Ghanem *et al.*, 2005; Shayiq *et al.*, 1999). Parece que entre los mecanismos que pueden estar implicados en el desarrollo de esta resistencia a la toxicidad del paracetamol se incluye el aumento de la expresión de proteínas transportadoras que participan en los procesos de detoxificación de este fármaco, previniendo así la acumulación de compuestos potencialmente tóxicos a nivel hepático (Aleksunes *et al.*, 2008a). Este es el caso de Mdr1, cuyos niveles de expresión en roedores aumentan tras la exposición a dosis tóxicas del paracetamol. En nuestro estudio, los niveles de ARNm de MDR1 aumentaron en las dos líneas celulares hepáticas estudiadas, pero también en las células derivadas de riñón e intestino, mientras que en el caso de las líneas de placenta, en las que se ha descrito que los niveles de expresión de este transportador son reducidos (Serrano *et al.*, 2007), no se observó ningún cambio significativo (Figura RD2-A). Aunque los estudios de toxicidad del paracetamol a nivel extrahepático son limitados, un trabajo reciente indica que el tratamiento con dosis subtóxicas de este fármaco induce la expresión de Mdr1 en el intestino de rata (Ghanem *et al.*, 2011), lo que concuerda con el aumento en los niveles de ARNm de este transportador detectado en las células LS 174T y Caco-2 (Figura RD2-A) en nuestro estudio. En el caso de la línea celular hepática SK-Hep-1 observamos además un aumento en los niveles de expresión de BCRP (Figura RD2-B), al igual que se ha descrito en muestras hepáticas de pacientes con sobredosis de paracetamol (Barnes *et al.*, 2007).

En cuanto a las proteínas pertenecientes a la familia ABCC sólo observamos un aumento en los niveles de expresión de MRP2 en una de las líneas derivadas de placenta, JEG-3, lo que sugiere que este transportador podría estar implicado en los procesos de eliminación de este compuesto desde el compartimento fetal a la sangre materna (Figura RD2-D). A pesar de que se ha descrito que la expresión de la mayor parte de los miembros de esta familia se induce en respuesta al tratamiento con dosis tóxicas de paracetamol (Klaassen y Aleksunes, 2010), los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que, el tratamiento con dosis subtóxicas de este fármaco en líneas celulares humanas no modifica los niveles de expresión, como es el caso de MRP1 (Figura RD2-C), o los reduce, como ocurre con MRP3 y MRP4 (Figura RD2-E y F). La expresión de estos dos últimos

transportadores, en la membrana basolateral de los hepatocitos, favorece la eliminación de los metabolitos de paracetamol por vía urinaria (Manautou *et al.*, 2005; Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2006), por lo que una reducción en sus niveles de expresión podría indicar que, el tratamiento con dosis subtóxicas de este fármaco, induce una reducción en los procesos de eliminación por vía renal. Esto podría explicar la disminución de la expresión de MRP2 en la línea celular HK-2 derivada de riñón que hemos encontrado en nuestro estudio.

#### 4.1.1.3. Efecto del tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol sobre la funcionalidad de proteínas ABC en líneas celulares humanas

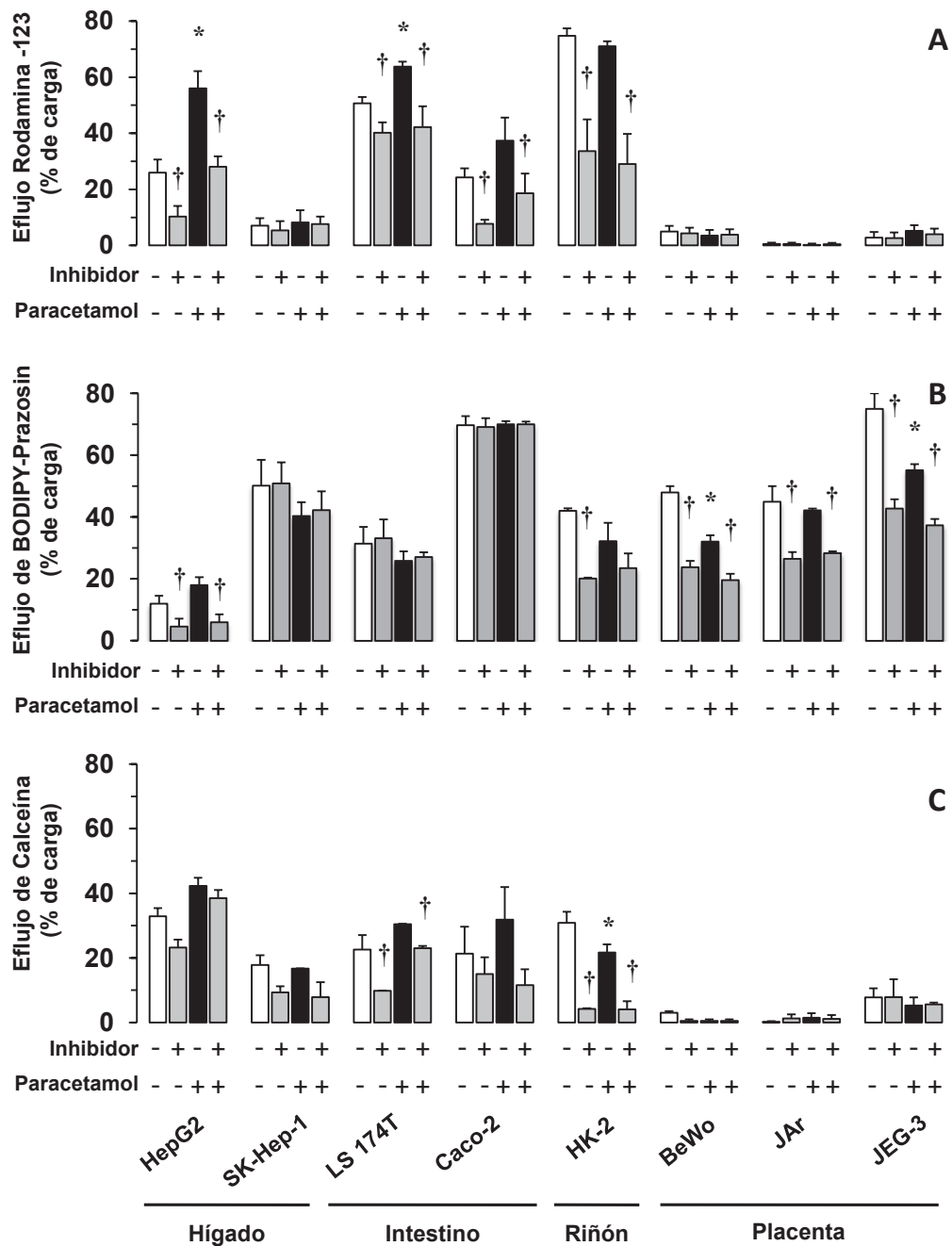
Para determinar el efecto de los cambios de expresión de las proteínas ABC, inducidos por el tratamiento con paracetamol, sobre su funcionalidad, se analizó mediante citometría de flujo su capacidad para exportar rodamina 123, un sustrato específico de MDR1, calceína, un sustrato compartido por las isoformas de ABCC MRP1-4 y BODIPY-prazosina, un sustrato específico de BCRP. El eflujo de estos sustratos fluorescentes se analizó en las distintas líneas celulares humanas en presencia o ausencia de verapamilo, funitremorgina C (FTC) o probenecid, inhibidores específicos del transporte mediado por estas proteínas (Figura RD3). Los resultados obtenidos en estos estudios funcionales concuerdan con los cambios de expresión detectados mediante RT-QPCR.

En el caso de las líneas celulares HepG2, LS 174T, Caco-2 y HK-2, en las que la expresión de MDR1 se inducía en respuesta al tratamiento con paracetamol, se observó un transporte específico de rodamina 123 mediado por MDR1 y por tanto sensible al efecto del verapamilo (Summers *et al.*, 2004; Syvanen y Hammarlund-Udenaes, 2010). Sin embargo, el transporte de este sustrato aumentó únicamente en las líneas HepG2 y LS 174T tras el tratamiento con paracetamol (Figura RD3-A).

La capacidad transportadora de BCRP se determinó mediante el estudio del eflujo del sustrato BODIPY-prazosina en presencia de un inhibidor específico del transporte mediado por esta proteína ABC, la FTC (Rabindran *et al.*, 1998; Rabindran *et al.*, 2000). El transporte de este sustrato se detectó en las líneas celulares HepG2, HK-2 y en las tres líneas celulares de origen placentario BeWo, JAr y JEG-3 (Figura RD3-B). Tras el tratamiento con paracetamol se observó una reducción en la actividad transportadora de BCRP en las líneas celulares placentarias y en las células HK-2, aunque sólo fue significativa en el caso de las células BeWo y JEG-3.

Finalmente, el transporte de calceína mediado por los transportadores pertenecientes a la subfamilia ABCC y por tanto sensible a la actividad inhibitoria del probenecid (Gollapudi *et al.*, 1997) se observó en las líneas celulares LS 174T y HK-2. En esta última línea celular, de origen renal, el eflujo de calceína se redujo tras el tratamiento con paracetamol (Figura RD3-C). El descenso de los niveles de expresión de MRP2 y MRP4 detectado mediante RT-PCR podría explicar la reducción en el eflujo de calceína detectada en esta línea celular. Estos resultados refuerzan la idea de que en humanos, el tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol podría reducir la eliminación de sus metabolitos por vía renal.





**Figura RD3.** Efecto del tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol durante 48 h sobre el eflujo de rodamina 123 (A), BODIPY-prazosina (B) y calceína (C), mediado por proteínas ABC, en líneas celulares humanas derivadas de hepatoblastoma (HepG2), carcinoma hepatocelular (SK-Hep-1), adenocarcinoma de colon (LS174T y Caco-2), túbulo proximal del riñón (HK-2), y coriocarcinoma (BeWo, JEG-3 y JAr). Después de 30 min de incubación a 37°C con los sustratos correspondientes, las células se incubaron en presencia o ausencia de los siguientes inhibidores específicos del transporte mediado por proteínas ABC: verapamilo 10  $\mu$ M (A, MDR1), fumitremorgina C 5  $\mu$ M (B, BCRP) o probenecid 500  $\mu$ M (C, MRPs) durante 30 min a 37°C y se analizaron mediante citometría de flujo. Los valores son la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado y reflejan los cambios en la fluorescencia media en comparación con los encontrados al final del periodo de incubación con los sustratos. \*,  $p < 0,05$ , comparando con las células control; †,  $p < 0,05$ , comparando con los valores de eflujo en ausencia de inhibidor mediante el método de Bonferroni.

#### 4.1.1.4. Efecto del tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol sobre la expresión de proteínas ABC en ratas gestantes

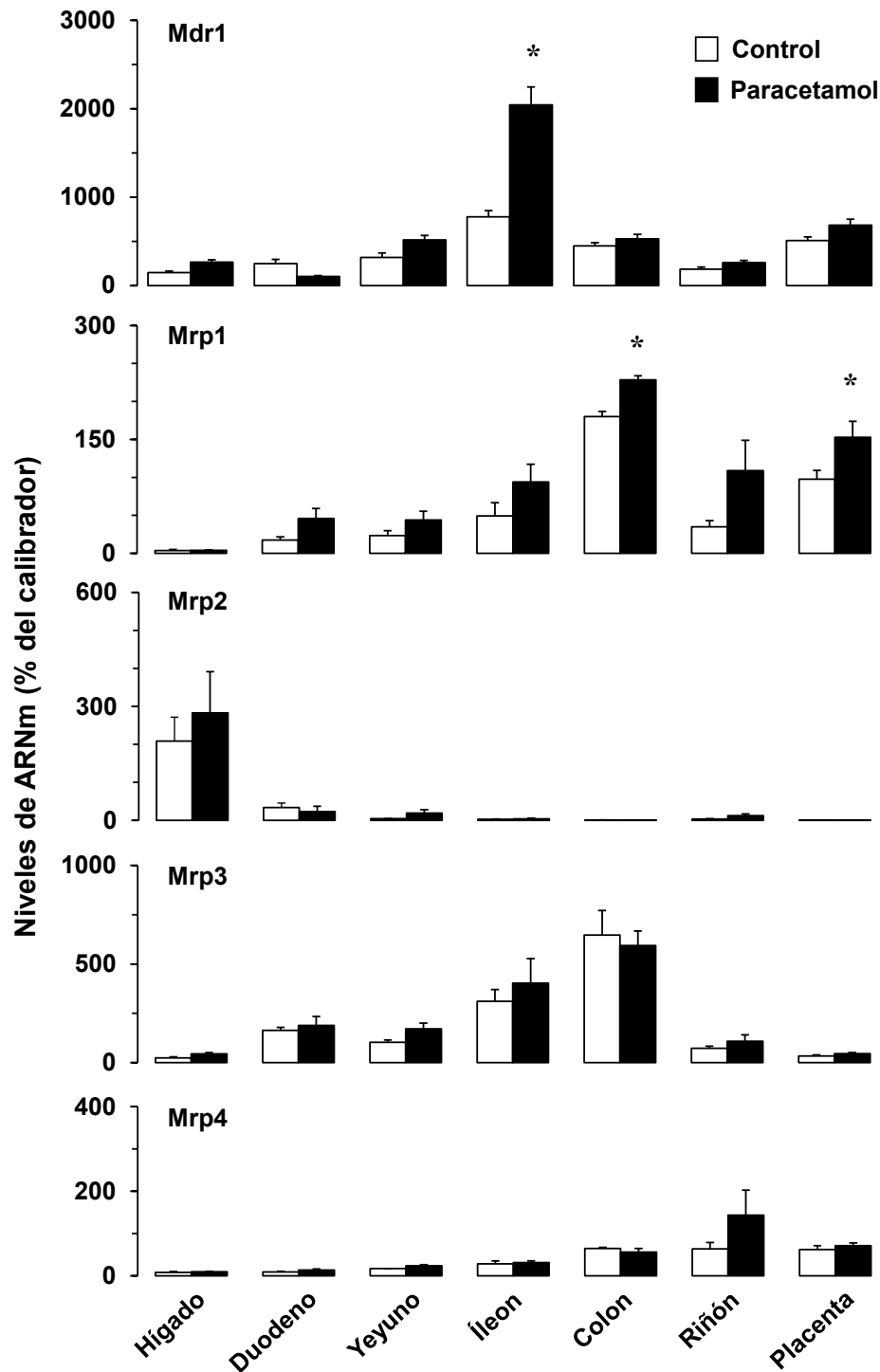
Puesto que el metabolismo y el efecto tóxico del paracetamol son muy similares en roedores y en humanos, la mayor parte de los estudios *in vivo* sobre la toxicidad de este fármaco se han llevado a cabo utilizando modelos animales de rata o ratón.

En nuestro caso, quisimos analizar si los resultados obtenidos en las líneas celulares humanas eran similares a los que se obtendrían utilizando ratas sometidas a un tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol.

Para ello, utilizamos ratas Wistar gestantes, en las que podíamos analizar el efecto del tratamiento con paracetamol sobre la expresión de proteínas ABC no sólo en tejidos implicados en el metabolismo de este fármaco sino también en placenta, donde estos transportadores participan en procesos de eliminación de sustancias potencialmente tóxicas para el feto. Para llevar a cabo este estudio, los animales se trataron durante los días 18, 19 y 20 de gestación con 0,4 g/kg/día de paracetamol, una dosis subtóxica en esta especie (Ghanem *et al.*, 2009). El día 21, una vez que la gestación llegó a término, se recogieron los distintos tejidos de interés para el análisis de la expresión génica mediante RT-QPCR.

En estos animales, los niveles de expresión de Mdr1 en hígado y en riñón no eran muy elevados, mientras que en íleon, colon y placenta su expresión era mayor (Figura RD4-A). Tras el tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol los tres últimos días de la gestación, los niveles de expresión de este transportador aumentaron ligeramente, aunque no de forma estadísticamente significativa, en hígado, yeyuno, riñón y placenta. El aumento en la expresión de Mdr1, detectado en el íleon de ratas tratadas con este fármaco, sí fue estadísticamente significativo. Sin embargo, en duodeno, se observó una ligera disminución en la expresión de Mdr1 tras el tratamiento.

El nivel basal de expresión de Mrp1 era especialmente elevado en placenta (razón por la que se seleccionó para su uso como calibrador en este caso) y en colon, tejidos en los que, además, el tratamiento con paracetamol indujo la expresión de este transportador (Figura RD4-B). En el resto de los tejidos estudiados, en los que los niveles basales de expresión eran mucho menores, el tratamiento indujo un ligero aumento en la expresión de este transportador, que en ningún caso llegó a ser estadísticamente significativo (Figura RD4-B). En hígado, el tratamiento con paracetamol no modificó la expresión de Mrp1 (Figura RD4-B). A excepción del tejido hepático, que se utilizó como calibrador para los estudios de expresión de Mrp2, el resto de tejidos analizados presentaba una limitada expresión de Mrp2 y en ningún caso se modificó por efecto del tratamiento.



**Figura RD4.** Niveles relativos de ARNm de Mdr1, Mrp1, Mrp2, Mrp3 y Mrp4 en hígado, intestino, riñón y placenta de ratas gestantes a término tratadas con dosis subtóxicas de paracetamol, determinados por RT-QPCR. Los animales se trataron o no (control) con una dosis subtóxica de paracetamol (0,4 g/kg) los días 18, 19 y 20 de la gestación. Los valores se expresan como porcentaje del calibrador utilizado, que fue hígado de rata para MDR1 y MRP2, riñón de rata para MRP3 y MRP4 y placenta de rata para MRP1 y BCRP y son media  $\pm$  EEM de, 4 ratas gestantes y 9 placentas por cada grupo. \*,  $p < 0,05$ , comparando con animales control no tratados mediante el test *t* de Student.

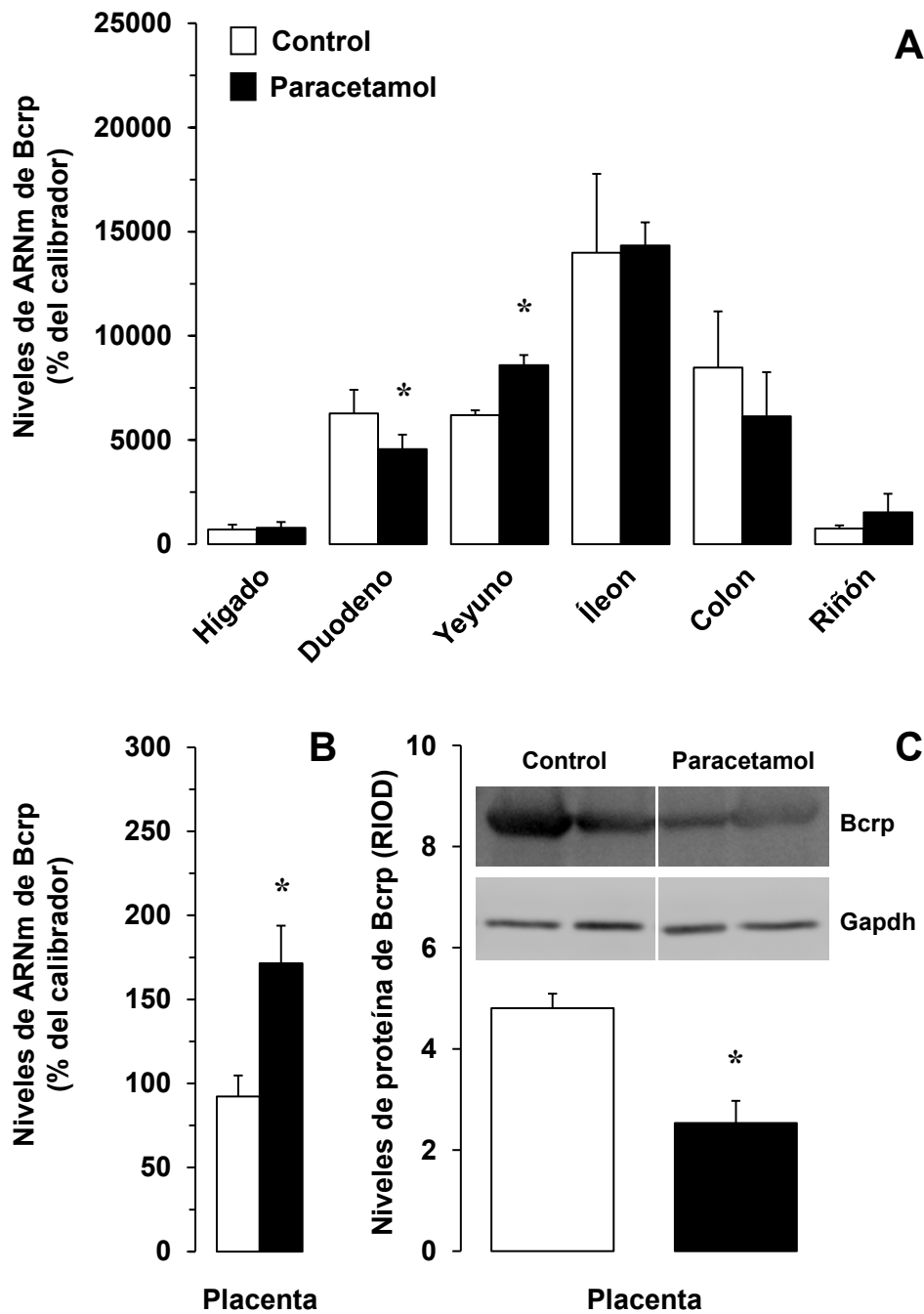
La administración de paracetamol tampoco modificó de forma estadísticamente significativa los niveles de expresión de Mrp3 y Mrp4 en ninguno de los tejidos estudiados, aunque sí indujo ligeramente la expresión de Mrp3 en hígado y yeyuno, y de Mrp4 en riñón.

En estudios previos realizados en ratas tratadas con dosis subtóxicas de paracetamol se ha observado una inducción de los niveles hepáticos de Mrp3, que se ha relacionado con el desarrollo de resistencia a la toxicidad inducida por este fármaco, ya que disminuye su recirculación en el sistema enterohepático (Ghanem *et al.*, 2009). Además de este cambio detectado a nivel hepático, también se ha descrito un incremento de los niveles de Mrp1 en el intestino (Ghanem *et al.*, 2011). Sin embargo, en nuestro estudio, sólo hemos observado un ligero aumento en los niveles de expresión de Mrp1 en intestino delgado, colon y riñón, que sólo fue estadísticamente significativo en estos dos últimos tejidos. La expresión de Mrp3 también aumentó en hígado aunque sólo de forma moderada. Estas discrepancias entre nuestros resultados y los datos existentes en la bibliografía pueden ser debidas al modelo de estudio utilizado, ya que, en los estudios realizados hasta el momento se han utilizado ratas macho, mientras que en nuestro estudio los animales eran ratas gestantes. Por tanto, estas diferencias podrían deberse a la distinta sensibilidad de los animales al efecto tóxico del paracetamol en función del sexo o del estado de gestación.

En este sentido, existen datos que indican que los niveles basales de expresión de Mrp2 en hígado y Mrp3 en hígado y riñón son mayores en ratas hembras que en machos (Lu y Klaassen, 2008). Estos dos transportadores están implicados en los procesos de excreción de los derivados glucuronados de paracetamol a través de la membrana canalicular de los hepatocitos, en el caso de Mrp2, y a través de la membrana sinusoidal en el caso de Mrp3 (Ghanem *et al.*, 2005). A pesar de que los conjugados de paracetamol con ácido glucurónico no son tóxicos, el aumento en la expresión de estos dos transportadores confiere una mayor protección frente a la toxicidad inducida por este compuesto. En ratones se ha observado una mayor resistencia a la hepatotoxicidad inducida por paracetamol en hembras que en machos (Masubuchi *et al.*, 2011).

El proceso de gestación también podría contribuir a las diferencias que hemos observado, ya que, en un estudio reciente llevado a cabo en ratones, se ha observado que la inducción de la expresión de distintas proteínas ABC mediada por el tratamiento con estreptozotocina no aparece o es muy limitada en animales gestantes (Aleksunes *et al.*, 2013).

Para completar nuestro estudio, analizamos los niveles de expresión de Bcrp, que resultaron ser especialmente elevados en intestino delgado y en colon. El tratamiento con paracetamol redujo sus niveles de expresión en duodeno, mientras que en íleon tuvo el efecto opuesto (Figura RD5-A). A pesar de que los niveles basales de expresión de Bcrp en placenta eran menores que los detectados en intestino delgado y colon, el cambio más destacado en su expresión se produjo precisamente en este tejido, en el que sus niveles prácticamente se duplicaron (Figura RD5-B).



**Figura RD5.** Efecto del tratamiento con paracetamol sobre los niveles relativos de ARNm de Bcrp en hígado, intestino y riñón (A) y placenta (B) de ratas gestantes a término determinados por RT-QPCR. Las ratas fueron tratadas o no (control) con una dosis subtóxica de paracetamol (0,4 g/kg) los días 18, 19 y 20 de la gestación. Los resultados se expresan como porcentaje del calibrador utilizado, placenta de rata (A). Western blot de Bcrp en placentas de rata tratadas o no con paracetamol (C). Los resultados se expresan como valores de densidad óptica relativa integrada (RIOD) después de normalizar con la Gapdh (100%) (C). Los valores son media  $\pm$  EEM de, 4 ratas gestantes y 9 placentas por cada grupo. \*,  $p < 0,05$ , comparando con animales control no tratados mediante el test  $t$  de Student. \*,  $p < 0,05$ , comparando con las células control mediante el test  $t$  de Student.

El transporte mediado por proteínas ABC es uno de los principales mecanismos implicados en los procesos de excreción de sustancias potencialmente tóxicas en la placenta. Por ello, no es extraño que distintos fármacos puedan modular la expresión de estos transportadores en este tejido. Así, se ha descrito que la dexametasona, que se administra en gestaciones con riesgo de parto prematuro, puede aumentar los niveles de ARNm de MRP1 en líneas celulares humanas derivadas de placenta (Pavek *et al.*, 2007). También el saquinovir, un antirretroviral utilizado en el tratamiento frente al VIH, induce la expresión de MDR1 en cultivos primarios de trofoblastos (Beghin *et al.*, 2010). En nuestro estudio, el tratamiento con paracetamol indujo la expresión de Mrp1 y Bcrp en placenta de rata (Figura RD4). En el caso de las líneas celulares humanas de origen placentario, este tratamiento modificó la expresión de algunos transportadores ABC sólo en las células JEG-3 (Figura RD2).

El aumento en los niveles de expresión de BCRP en hígado se ha descrito previamente en pacientes con sobredosis de paracetamol (Barnes *et al.*, 2007). Aunque en dicho estudio los niveles de ARNm de BCRP estaban aumentados, sólo se observaba un cambio significativo en los niveles de proteína. Por ello, decidimos confirmar el cambio en los niveles de expresión de Bcrp en placenta mediante Western blot (WB). Sorprendentemente, y a pesar de la inducción observada en los niveles de ARNm tras el tratamiento con paracetamol, la expresión de este transportador a nivel de proteína se reducía en este tejido (Figura RD5-C). Cabe destacar, que en la línea celular JEG-3 derivada de placenta también se observó una reducción en la expresión de BCRP tras el tratamiento con paracetamol (Figura RD2-B) y que, su actividad transportadora se redujo tras el tratamiento con este fármaco en esta línea celular y en las células BeWo, también de origen placentario. Esta disminución en los niveles de proteína de Bcrp podría deberse a un aumento en su tasa de degradación. En un estudio reciente se ha descrito que la reducción de los niveles de glutatión (GSH) puede aumentar el proceso de degradación proteica de Mrp2 en hígado de rata (Sekine *et al.*, 2012). Puesto que una de las principales consecuencias de la toxicidad del paracetamol es la reducción de los niveles intracelulares de GSH por el aumento de producción de NAPQI, este mecanismo también podría estar implicado en la reducción de los niveles de proteína de Bcrp en placenta de rata. En este sentido, hay que señalar que en placenta se ha detectado la expresión de la enzima CYP2E1 (Carpenter *et al.*, 1997), que contribuye a la generación de NAPQI en el hígado (Manyike *et al.*, 2000). Además, los niveles de GSH en placenta de rata son 10 veces inferiores a los encontrados en hígado materno (Perez *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2006), por lo que la producción de NAPQI en bajas cantidades podría disminuir los ya de por sí reducidos niveles de GSH y contribuir a los procesos de degradación proteica.

Un trabajo reciente llevado a cabo en nuestro grupo de investigación ha demostrado que Bcrp juega un papel fundamental en la barrera placentaria ya que está involucrada en el transporte de compuestos potencialmente tóxicos (Marin *et al.*, 2004), como los ABs (Blazquez *et al.*, 2012). Por ello, esta reducción en los niveles de expresión de Bcrp podría comprometer la funcionalidad de la barrera placentaria y permitir la acumulación de sustancias tóxicas en el compartimento fetal.

#### 4.1.1.5. Papel de NRF2 en la regulación de la expresión de proteínas ABC en respuesta al tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol

Puesto que en los estudios llevados a cabo en ratas gestantes los cambios más destacados se observaron en placenta, decidimos analizar los mecanismos que pueden estar implicados en la regulación de la expresión de las proteínas ABC en respuesta al tratamiento con paracetamol en este tejido.

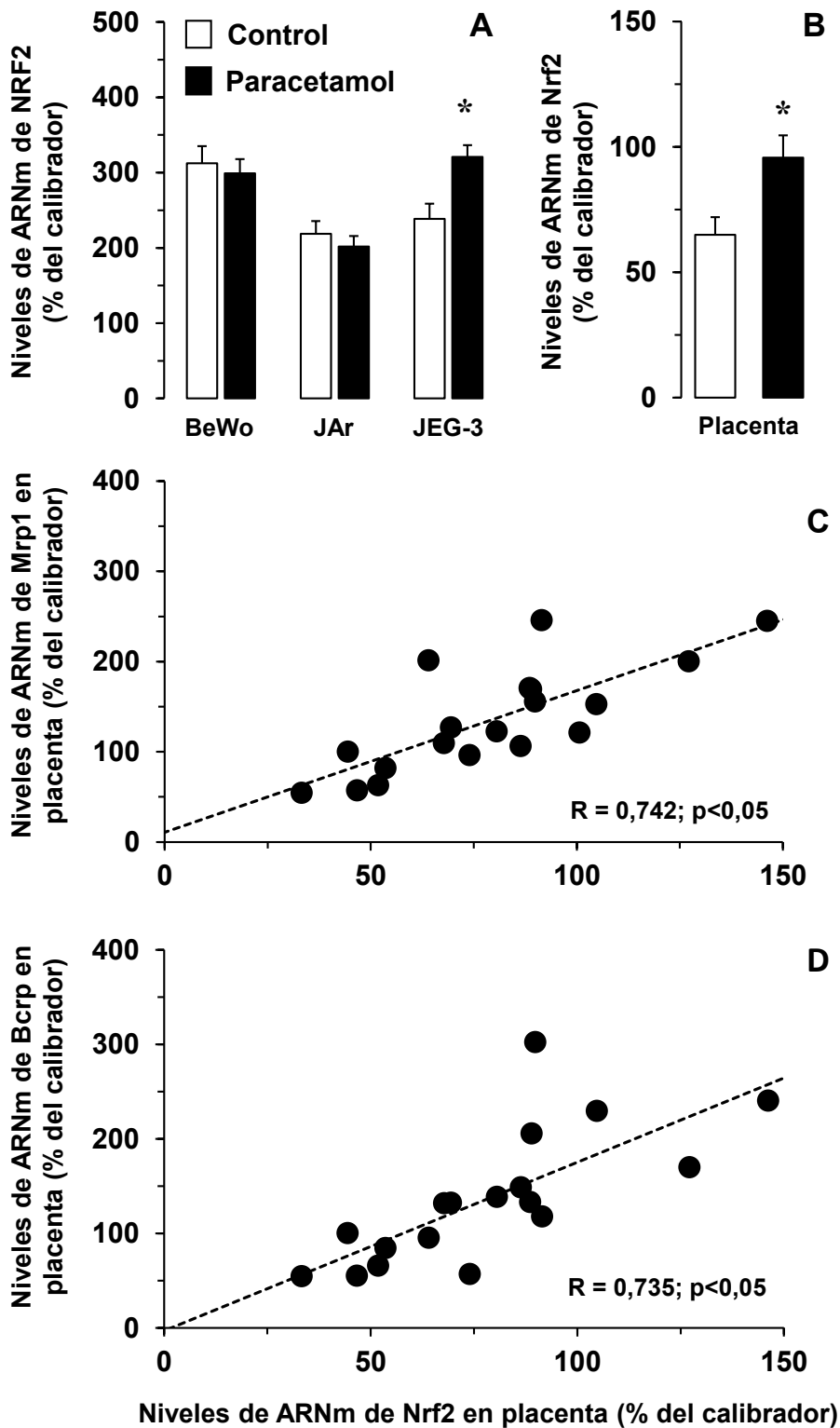
En la regulación de la expresión de las proteínas ABC están implicados distintos receptores nucleares y factores de transcripción (Klaassen y Aleksunes, 2010) que podrían jugar un papel fundamental en los mecanismos celulares de respuesta a la toxicidad inducida por paracetamol. Sin embargo, aún no se han identificado con exactitud los elementos reguladores que participan en la modulación de la expresión de estas proteínas en respuesta al tratamiento con este fármaco.

Aunque se ha propuesto la participación de los receptores nucleares PXR y CAR en los mecanismos de respuesta a la toxicidad inducida por este fármaco (Mottino y Catania, 2008), la expresión de estas proteínas reguladoras en placenta de rata es muy baja (St-Pierre *et al.*, 2004). Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que Nrf2, un factor de transcripción implicado en la modulación de la expresión de proteínas ABC en situaciones de estrés oxidativo y/o químico, entre las que se encuentra la intoxicación por paracetamol, sí se expresa en este tejido (Figura RD6-A y B).

En ratas gestantes, el tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol indujo la expresión del ARNm de Nrf2 de forma moderada pero estadísticamente significativa. Estos mismos resultados se observaron en las células JEG-3 de placenta humana, mientras que en las otras dos líneas de origen placentario, BeWo y JAr, el tratamiento no modificó los niveles de expresión de este factor de transcripción (Figura RD6-A).

A pesar de que en nuestros estudios hemos utilizado dosis de paracetamol que no tienen efectos tóxicos a nivel hepático, la activación de Nrf2 en la placenta podría indicar que en este tejido estas dosis sí producen una cierta agresión química. Esto podría deberse a los bajos niveles de GSH en la placenta de rata (Perez *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2006) que, como se comentó anteriormente, juega un papel fundamental en los procesos de detoxificación del NAPQI. Este aumento en los niveles de expresión de Nrf2 en placenta de rata podría estar implicado en la inducción de la expresión génica de Mrp1 y Bcrp (Figura RD6 B-C), ya que distintos estudios indican que este factor de transcripción puede modular la expresión de estas dos proteínas (Hayashi *et al.*, 2003; Jigorel *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010).





**Figura RD6.** Efecto del tratamiento con paracetamol sobre los niveles relativos del ARNm de NRF2 en células humanas de origen placentario (A) y en placenta de rata a término (B). Relación entre los niveles de expresión relativa de Nrf2 y Abcc1 (C) o Abcg2 (D) en placenta de rata. Las líneas celulares humanas derivadas de placenta se incubaron con una dosis subtóxica de paracetamol durante 48 h. Los animales fueron tratados o no (Control) con una dosis subtóxica de paracetamol (0,4 g/kg) los días 18, 19 y 20 de la gestación. Los niveles de ARNm se determinaron por RT-QPCR y los resultados se expresan como porcentaje del calibrador utilizado, que fue hígado humano o de rata (NRF2/Nrf2) o placenta de rata (Abcc1 y Abcg2). Los valores son media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado o 9 placentas por grupo. \*,  $p < 0,05$ , comparando con las células o animales control no tratados mediante el test *t* de Student. Las correlaciones entre los niveles de ARNm de Nrf2 y Abcc1 (C) o Abcg2 (D) se calcularon utilizando el método de mínimos cuadrados.



#### 4.1.1.6. Efecto del tratamiento con dosis subtóxicas del paracetamol sobre la funcionalidad de la barrera placentaria de rata

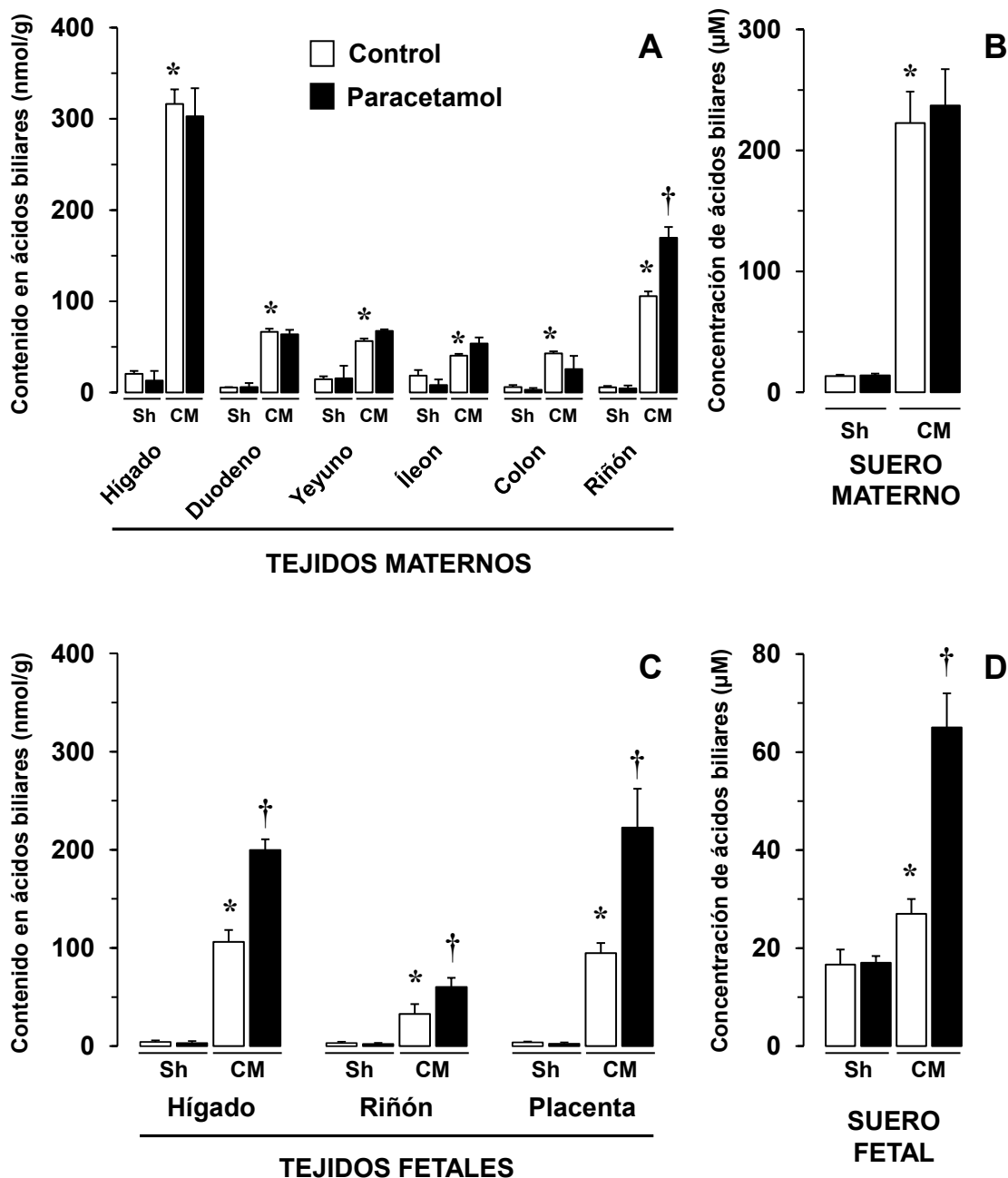
Como se ha mencionado anteriormente, una de las funciones de las proteínas ABC en la placenta es su participación en la barrera placentaria. Por otra parte, y como ya hemos mencionado, el paracetamol es el analgésico de elección durante la gestación, por su baja toxicidad (Scialli *et al.*, 2010) a pesar de su capacidad para atravesar la barrera placentaria (Wilkes *et al.*, 2005). Sin embargo, los datos obtenidos en nuestro estudio indican que este fármaco puede modificar la expresión de proteínas transportadoras en la placenta y por tanto podría limitar su función protectora. Este hecho podría ser especialmente importante en ciertas patologías en las que se produce un acúmulo de sustancias potencialmente tóxicas en el compartimento fetal.

Una de estas patologías es la colestasis materna, una enfermedad generalmente benigna para la madre, pero que puede tener graves consecuencias sobre el feto por la acumulación de ABs potencialmente tóxicos (Perez y Briz, 2009). Un estudio reciente llevado a cabo en nuestro grupo de investigación indica que Bcrp, una de las proteínas ABC con mayor importancia en la placenta, juega un papel fundamental en el transporte de ABs desde el compartimento fetal hasta la sangre materna (Blazquez *et al.*, 2012). La posterior eliminación de estos compuestos está mediada fundamentalmente por el hígado materno, con una pequeña contribución del riñón, que participa en la eliminación de las especies sulfatadas y glucuronidadas (Frohling y Stiehl, 1976).

Puesto que durante nuestro estudio hemos observado que el tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol reduce la capacidad transportadora de Bcrp en líneas celulares derivadas de placenta humana, y los niveles de expresión de esta proteína en la placenta de ratas gestantes, decidimos analizar el efecto del tratamiento con este fármaco sobre la acumulación de ABs en el compartimento fetal en una situación de colestasis gestacional.

Para ello, los animales, tratados con dosis subtóxicas de paracetamol los tres días anteriores al parto, fueron sometidos a una ligadura del conducto biliar común el día 19 de la gestación para simular una situación de colestasis obstructiva (Macias *et al.*, 2000). Para poder determinar la acumulación de ABs en los distintos tejidos fetales y maternos, el "pool" de ABs se marcó radiactivamente con  $^{14}\text{C}$ -AGC (ácido glicocólico) un día antes del parto.

Como se observa en la Figura RD7, la colestasis materna indujo la acumulación de ABs en el suero y en todos los tejidos maternos estudiados. Tras el tratamiento con paracetamol, la acumulación de ABs en el riñón materno se incrementó (Figura RD7-A). Durante la colestasis aumentan los procesos de excreción de ABs a través de la orina (Tanaka *et al.*, 2002), por lo que la mayor acumulación de estos compuestos tras el tratamiento con paracetamol podría indicar que de alguna forma este fármaco limita la excreción renal de estos compuestos. En el resto de los tejidos maternos, el tratamiento con este fármaco no modificó los niveles de ABs (Figura RD7-A), al igual que ocurrió en el suero materno (Figura RD7-B).

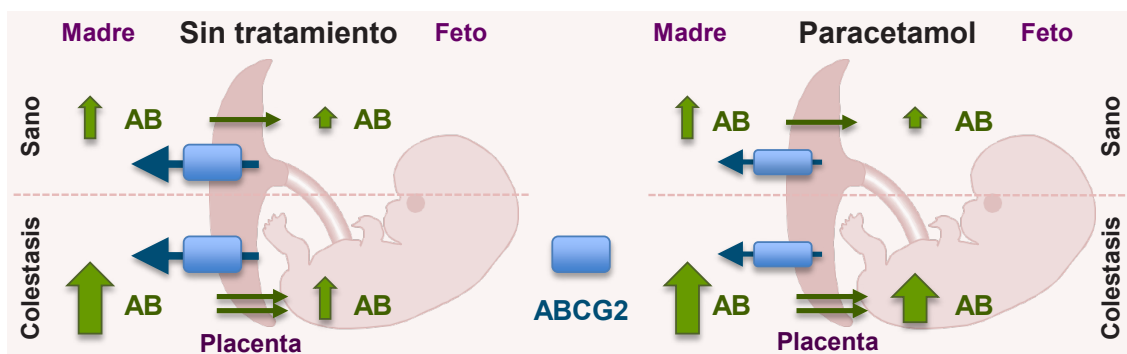


**Figura RD7.** Efecto del tratamiento con paracetamol sobre la distribución de ácidos biliares (ABs) en suero y tejidos maternos (A, B) y fetales (C, D) en ratas gestantes a término. Los animales fueron tratados o no (control) con una dosis subtóxica de paracetamol (0,4 g/kg) los días 18, 19 y 20 de la gestación. La inducción de colestasis obstructiva materna (CM) se llevó a cabo mediante ligadura y sección quirúrgica del conducto biliar común el día 19 de la gestación. A los animales del grupo sham (Sh) se les provocó estrés quirúrgico mediante manipulación del conducto biliar sin obstruirlo. Para marcar el "pool" de ABs materno se administró una dosis de [<sup>14</sup>C]- ácido glicocólico (AGC) de 400 nmol a las ratas gestantes el día 20 de la gestación. Los valores son la media  $\pm$  EEM de, 4 ratas gestantes y 12 placentas por cada grupo. \*,  $p < 0,05$ , comparando con animales control no tratados; †,  $p < 0,05$  comparando animales con colestasis materna (CM) con animales del grupo Sham (Sh) mediante el método de Bonferroni.

En cuanto a los fetos, la colestasis aumentó la concentración de ABs en todos los tejidos estudiados y también en suero (Figuras RD7-C y D). Este aumento fue aún mayor en los fetos de madres colestáticas tratadas con paracetamol, especialmente en hígado y placenta (Figuras RD7-C). Los niveles de ABs en el suero de los fetos de madres colestáticas tratadas con paracetamol también fueron superiores a los detectados en los

fetos de madres a las que no se les había administrado ningún tratamiento farmacológico (Figuras RD7-D). Este aumento en los niveles de ABs en los distintos tejidos fetales como consecuencia del tratamiento con paracetamol es de gran relevancia clínica puesto que de ocurrir en humanos podría favorecer la mayor incidencia de patologías fetales asociadas a la hipercolanemia materna. Estudios realizados en placenta e hígado fetal de rata indican que la acumulación de ABs hidrofóbicos en estos tejidos altera los mecanismos de defensa antioxidante generando daño oxidativo, que conduce a la activación de la ruta intrínseca de apoptosis (Perez *et al.*, 2005). Además, se ha descrito que la acumulación de ácido taurocólico puede alterar la funcionalidad cardiaca en fetos de ratas colestáticas produciendo arritmias, que se han propuesto como la principal causa de muerte fetal asociada a la colestasis gravídica (Williamson *et al.*, 2001). En un estudio reciente se ha demostrado que los ABs también pueden inducir daño pulmonar en niños recién nacidos hijos de madres colestáticas. En estas situaciones, los ABs acumulados en el suero de los recién nacidos pueden ser captados por el tejido pulmonar, donde podrían estar implicados en el desarrollo de distintos tipos de neumonía (Zecca *et al.*, 2008).

En resumen, durante la colestasis gravídica el aumento de los niveles de ABs en el suero materno o hipercolanemia, da lugar a la acumulación de estos compuestos en el compartimento fetal (Figura RD-8). En respuesta a esta situación se produce un aumento de la excreción de ABs en la placenta, mediado fundamentalmente por Bcrp (Figura RD-8). Sin embargo, en ratas tratadas con paracetamol, se produce una reducción de los niveles de expresión de este transportador en placenta, y como consecuencia, los niveles de ABs a los que se ve expuesto el feto aumentan (Figura RD7-C y D), lo que podría comprometer la salud del fetal.



**Figura RD8.** Esquema del efecto del paracetamol sobre el principal mecanismo de eliminación de ácidos biliares (ABs) desde el compartimento fetal hasta la sangre materna a través de la placenta.

Por tanto, durante la gestación, el tratamiento con dosis de paracetamol no tóxicas para la madre puede alterar la funcionalidad de la barrera placentaria y disminuir su capacidad para prevenir la acumulación de compuestos potencialmente tóxicos en el compartimento fetal. Este hecho puede ser especialmente importante en ciertas patologías que aparecen asociadas a la gestación como es el caso de la colestasis gravídica.

#### 4.1.2. Papel del genoma mitocondrial en la regulación de la expresión de proteínas ABC en situaciones de estrés oxidativo

Como se comentó anteriormente, la expresión de distintas proteínas ABC en la membrana plasmática de los hepatocitos es un factor clave en sus funciones de secreción y excreción.

La regulación de su expresión a nivel transcripcional, se debe en parte a la acción de distintos receptores nucleares y factores de transcripción (Klaassen y Aleksunes, 2010). Además, los procesos de señalización retrógrada, activados por la alteración de la función mitocondrial, también pueden participar en la regulación de la expresión de estas proteínas (Hallstrom y Moye-Rowley, 2000; Pillay *et al.*, 1998). Sin embargo, a pesar de que las mitocondrias presentan una gran sensibilidad a la toxicidad inducida por compuestos endógenos y xenobióticos, su papel en la modulación de la expresión de bombas exportadoras ABC en respuesta al estrés químico no se ha estudiado en profundidad.

La señalización retrógrada participa en la regulación de la expresión del transportador de membrana ABC Pdr5p implicado en el fenotipo MDR en levaduras, a través de los factores de transcripción Pdr1p y Pdr3p (Hallstrom y Moye-Rowley, 2000). Aunque en células humanas estas rutas de señalización no se han estudiado en profundidad sí se ha descrito un aumento de expresión de MDR1 y MRP1 en células de hepatoma desprovistas de su genoma mitocondrial (Ling *et al.*, 2012).

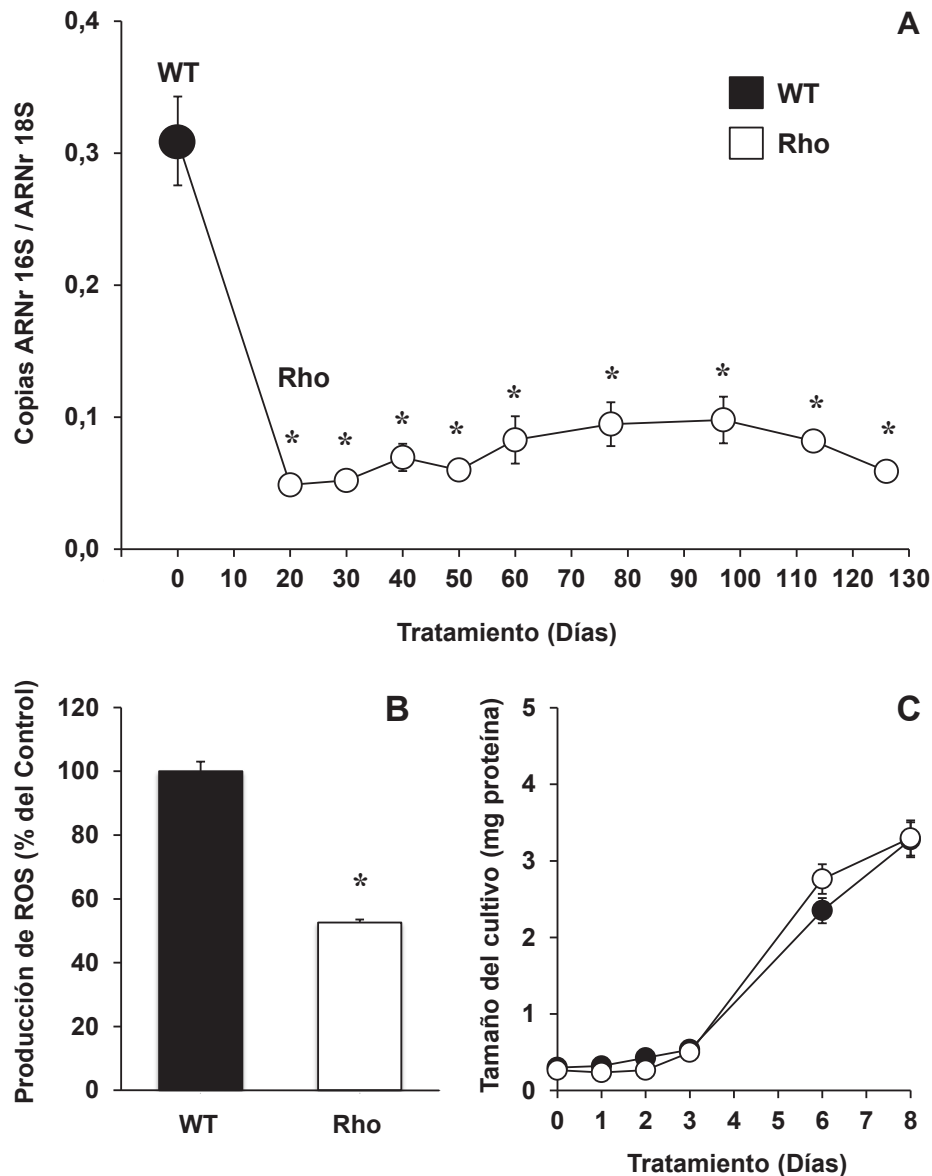
Por ello, el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral fue analizar el papel del genoma mitocondrial en los mecanismos de regulación de la expresión de proteínas ABC en situaciones de estrés químico y oxidativo inducido por compuestos endógenos potencialmente tóxicos, los ABs, y agentes xenobióticos, como el paracetamol.

##### 4.1.2.1. Modelo experimental: Células desprovistas de ADN mitocondrial

Para llevar a cabo este estudio, utilizamos la sublínea celular Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>, parcialmente desprovista de ADNmt, derivada de la línea de hepatoma de ratón Hepa 1-6, a la que a partir de ahora nos referiremos como “wild type” (WT).

Esta sublínea celular había sido obtenida previamente en nuestro laboratorio mediante el tratamiento a largo plazo con dosis bajas de bromuro de etidio (BrEt) (Gonzalez-Loyola, 2009). Como se observa en la Figura RD9, el tratamiento con este compuesto redujo los niveles de expresión del ARN ribosómico (ARNr) 16S, codificado por el genoma mitocondrial en comparación con los niveles de ARNr 18S, codificado por el genoma nuclear, que no se modificaron con el tratamiento (Gonzalez-Loyola, 2009). Estas células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>, presentaban también unos niveles basales de ROS inferiores a los detectados en las células WT (Gonzalez-Loyola, 2009), debido a que la cadena respiratoria mitocondrial, cuya funcionalidad depende de la integridad del genoma mitocondrial, es la principal fuente celular de ROS (Bartosz, 2009) (Figura RD9). Puesto que el tratamiento con BrEt no eliminó completamente el ADN mitocondrial en estas células Rho<sup>-</sup>, los niveles de ARNr

16S/ARNr 18S y los niveles de ROS se analizaron periódicamente durante nuestro estudio para confirmar su estabilidad (Figura RD9).



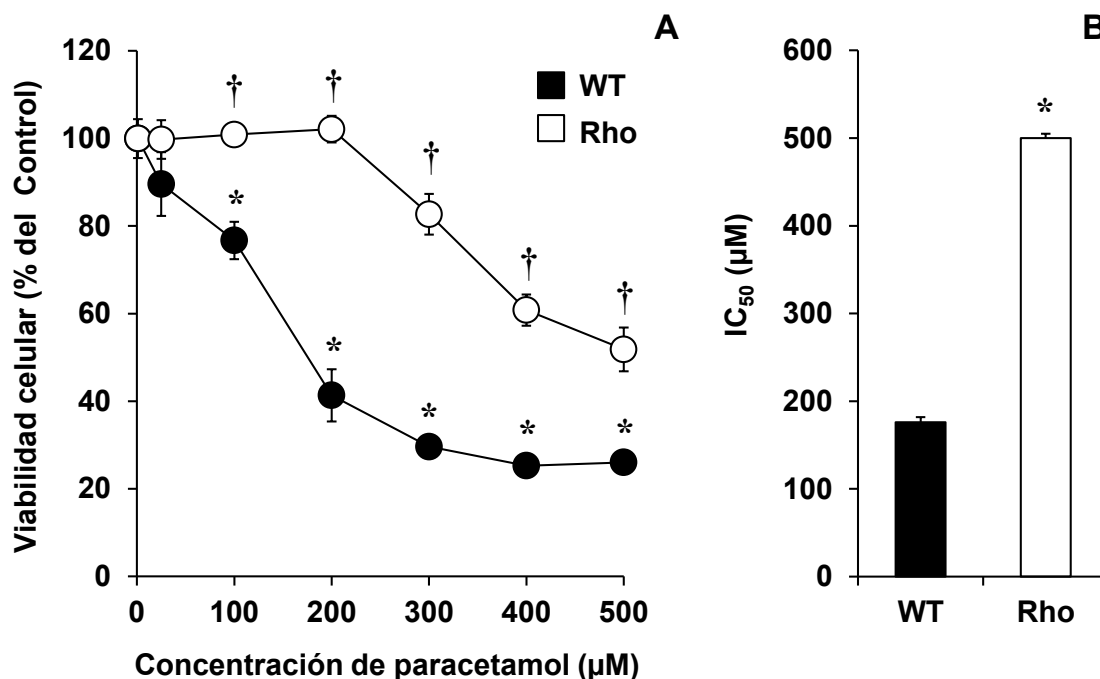
**Figura RD9.** Caracterización de la línea celular Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>. El efecto del tratamiento con Bromuro de Etidio (100 ng/ml), sobre los niveles de ADN mitocondrial se muestra como la relación entre los niveles de expresión del ARN ribosómico (ARNr) 16S, codificado por el genoma mitocondrial, y el ARNr 18S codificado por el genoma nuclear determinados mediante RT-QPCR a lo largo del tiempo (A). Generación basal de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup> determinada mediante citometría de flujo utilizando diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (B). Determinación de la tasa de crecimiento celular en células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup> mediante la cuantificación del contenido total de proteínas en el cultivo (C). Los valores representan la media ± EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*, p<0,05, respecto a las células WT mediante el test *t* de Student.

A pesar de la pérdida parcial del genoma mitocondrial y de la alteración en la funcionalidad de este orgánulo, las células Rho<sup>-</sup> presentaban una tasa de crecimiento en cultivo muy similar a las células Hepa 1-6 WT (Figura RD9-C), gracias en parte a la incorporación de piruvato y uridina al medio de cultivo (Apartado 2.2.3).

#### 4.1.2.2. Toxicidad del paracetamol en células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>

Para determinar el efecto del paracetamol sobre la viabilidad en células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup>, ambas líneas celulares se cultivaron en presencia de dosis crecientes de este fármaco durante 48 h y su viabilidad se determinó mediante el test de rojo neutro. Aunque en los estudios de viabilidad que se muestran en el apartado 4.1.1 de esta Tesis Doctoral se empleó el test de formazán, en el caso de las células Rho no es posible determinar este parámetro mediante este método que se basa en la actividad deshidrogenasa celular (Marshall *et al.*, 1995). Gran parte del NAD(P)H necesario para que las sales de tetrazolio se transformen en formazán se produce en la cadena respiratoria mitocondrial (Stockert *et al.*, 2012), que requiere de la correcta coordinación de los genomas nuclear y mitocondrial para su funcionamiento. Por tanto, en células Rho, en las que hay una reducción parcial o total del ADN mitocondrial, se producen alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial que modifican la actividad deshidrogenasa.

Los resultados obtenidos en estos estudios de viabilidad indicaban que las células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> eran más resistentes a la muerte celular inducida por el tratamiento con paracetamol a todas las dosis ensayadas (Figura RD10-A). Mientras que la IC<sub>50</sub> para este fármaco era aproximadamente 180 µM en la línea celular Hepa 1-6 WT, este valor prácticamente se triplicó, (500 µM) en las células Rho<sup>-</sup> (Figura RD10-B).



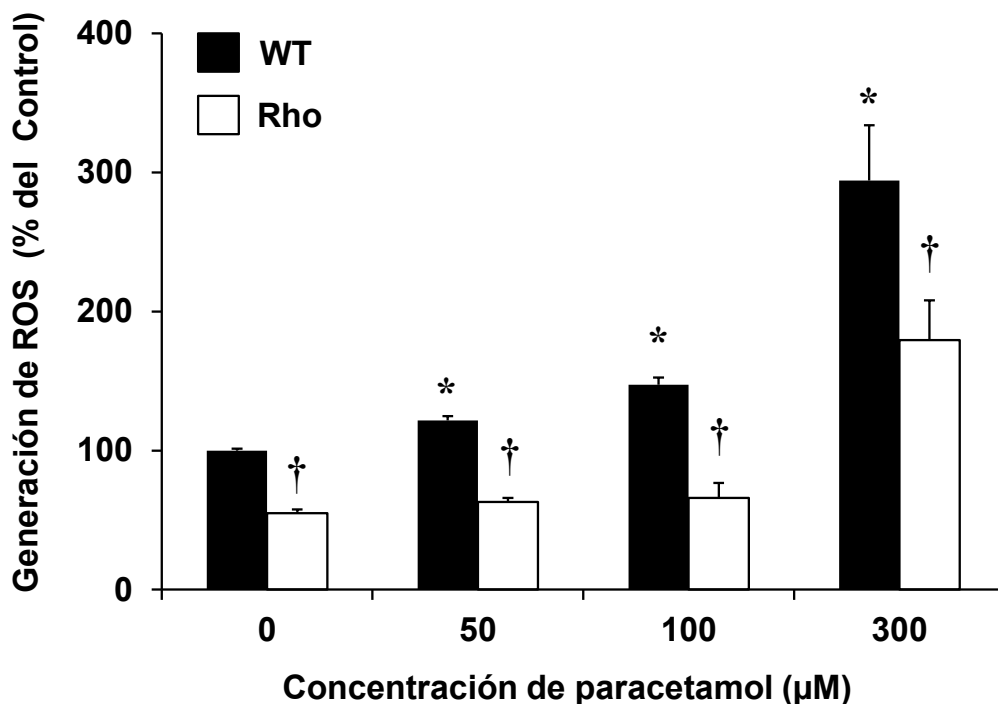
**Figura RD10.** Efecto del paracetamol sobre la viabilidad de células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup> tratadas con dosis crecientes de este fármaco durante 48 h. La viabilidad celular se determinó mediante el test del rojo neutro. La IC<sub>50</sub> se definió como la concentración de fármaco requerida para reducir la viabilidad celular al 50%. Los valores representan la media ± EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*, p<0,05, respecto a las células WT; † p<0,05 al comparar las células Rho<sup>-</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En un estudio previo realizado en nuestro grupo de investigación (Gonzalez-Loyola, 2009) también se observó que esta línea celular parcialmente desprovista de ADNmt presentaba una mayor resistencia a la muerte celular inducida por el AB glicoquenodesoxicólico (AGQDC).

#### 4.1.2.3. Generación de ROS en células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> tratadas con paracetamol

Uno de los mecanismos implicados en el daño hepático producido por la administración de dosis tóxicas del paracetamol es la inducción de estrés oxidativo. Por ello, decidimos analizar la generación de ROS en respuesta al tratamiento con paracetamol en las líneas celulares Hepa 1-6 WT y Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>.

Estas dos líneas celulares fueron tratadas con concentraciones crecientes de paracetamol durante 48 h y la generación de ROS se determinó mediante citometría de flujo utilizando diclorofluoresceína diacetato (Figura RD11). Los resultados obtenidos indicaban que, en las células Hepa 1-6 WT el tratamiento con este fármaco inducía la generación de ROS a todas las concentraciones analizadas de forma dependiente a la dosis, mientras que en las células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> sólo se observó un aumento significativo de los niveles de ROS a la dosis más alta ensayada, 300  $\mu$ M (Figura RD11).



**Figura RD11.** Efecto del tratamiento con paracetamol sobre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup>. Ambas líneas celulares fueron tratadas con dosis crecientes de paracetamol durante 48 h y la producción de ROS se determinó mediante citometría de flujo utilizando diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Los resultados se muestran como porcentaje de fluorescencia media de la DCF en las células Hepa 1-6 WT sin tratar (100%). \*  $p < 0,05$  respecto a las células WT sin tratamiento; †  $p < 0,05$  al comparar las células Rho<sup>-</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.



Una de las características más destacadas de la sublínea celular Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>, es la reducción de los niveles basales de ROS. Hasta el momento se han publicado diferentes trabajos con resultados contradictorios con respecto a los niveles basales de ROS en distintas líneas celulares sin ADNmt. Mientras algunos estudios sugieren que no existen cambios en los niveles de ROS de las células Rho con respecto a la línea celular a partir de la que se obtuvieron, otros estudios indican que se encuentran reducidos (Park *et al.*, 2004; Vergani *et al.*, 2004). En nuestro caso, los resultados sugieren que las alteraciones en la funcionalidad de la cadena respiratoria mitocondrial en células Rho<sup>-</sup> reducen la generación de ROS en este orgánulo. Esto podría deberse a que algunas de las proteínas que forman parte de los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial, los puntos de mayor generación de ROS en la mitocondria, están codificados por el genoma mitocondrial (Attardi y Schatz, 1988).

La alteración de la función mitocondrial parece ser uno de los eventos más destacados en la toxicidad inducida por paracetamol, ya que su metabolito tóxico, NAPQI, forma aductos con un gran número de proteínas mitocondriales, modificando así su actividad (Cohen *et al.*, 1997; Qiu *et al.*, 1998). Esta situación da lugar a la inhibición de la respiración mitocondrial (Meyers *et al.*, 1988) y, por tanto de la producción de ATP (Jaeschke, 1990), incrementándose la producción de ROS y RNOS (Cover *et al.*, 2005). Finalmente, la alteración del metabolismo aeróbico, la reducción masiva de los niveles de ATP y el daño al ADN nuclear conducen a la muerte celular por necrosis (Gujral *et al.*, 2002).

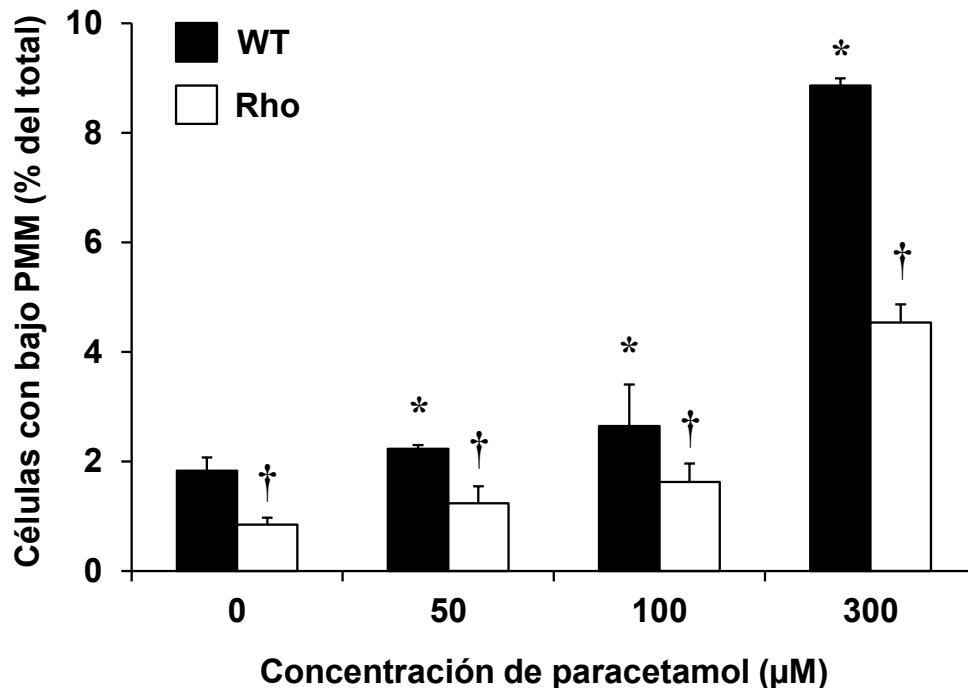
Por lo tanto, se puede sugerir que en las células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>, la falta de funcionalidad de la cadena respiratoria mitocondrial evita este aumento en la generación de ROS inducido por los metabolitos del paracetamol, previniendo el daño celular causado por el estrés oxidativo. Éste podría ser uno de los mecanismos responsables de la mayor resistencia de las células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> a la toxicidad inducida por paracetamol.

#### **4.1.2.4. Estudio del potencial de membrana mitocondrial en células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> tratadas con paracetamol**

La medida del potencial de membrana mitocondrial (PMM) se utiliza para determinar la alteración funcional de este orgánulo. Puesto que se sabe que el tratamiento con dosis tóxicas de paracetamol puede producir daños en la mitocondria, evaluamos este parámetro en células Hepa 1-6 WT y Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>. Para ello, estas dos líneas celulares se cultivaron durante 48 h en presencia de dosis crecientes de paracetamol, y el valor del PMM se determinó mediante citometría de flujo utilizando rodamina 123, un compuesto fluorescente que se acumula en la mitocondria de manera directamente proporcional al PMM. Los resultados obtenidos indicaron que, en ausencia de tratamiento, el número de células con bajo PMM era menor en la línea Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> (Figura RD12). En respuesta el tratamiento con paracetamol se observó un aumento en el número de células con bajo PMM en ambas líneas celulares pero siempre fue menor en las células Rho<sup>-</sup> (Figura RD12).



El aumento en la generación de ROS en la mitocondria tras el tratamiento con dosis tóxicas de paracetamol puede producir una pérdida del PMM (Bajt *et al.*, 2004; Kon *et al.*, 2004) que finalmente conduce a la destrucción de este orgánulo desencadenando la muerte celular (Gujral *et al.*, 2002). Por lo tanto, en nuestro estudio, la presencia de un menor número de células con bajo PMM en la línea Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> podría estar relacionada con la menor generación de ROS observada en estas células (Figura RD11). Esta reducción en los niveles del PMM se ha descrito en otras líneas celulares deficientes en ADNmt y se ha relacionado con una reducción en el transporte de proteínas desde el citoplasma hasta este orgánulo (Mercy *et al.*, 2005).

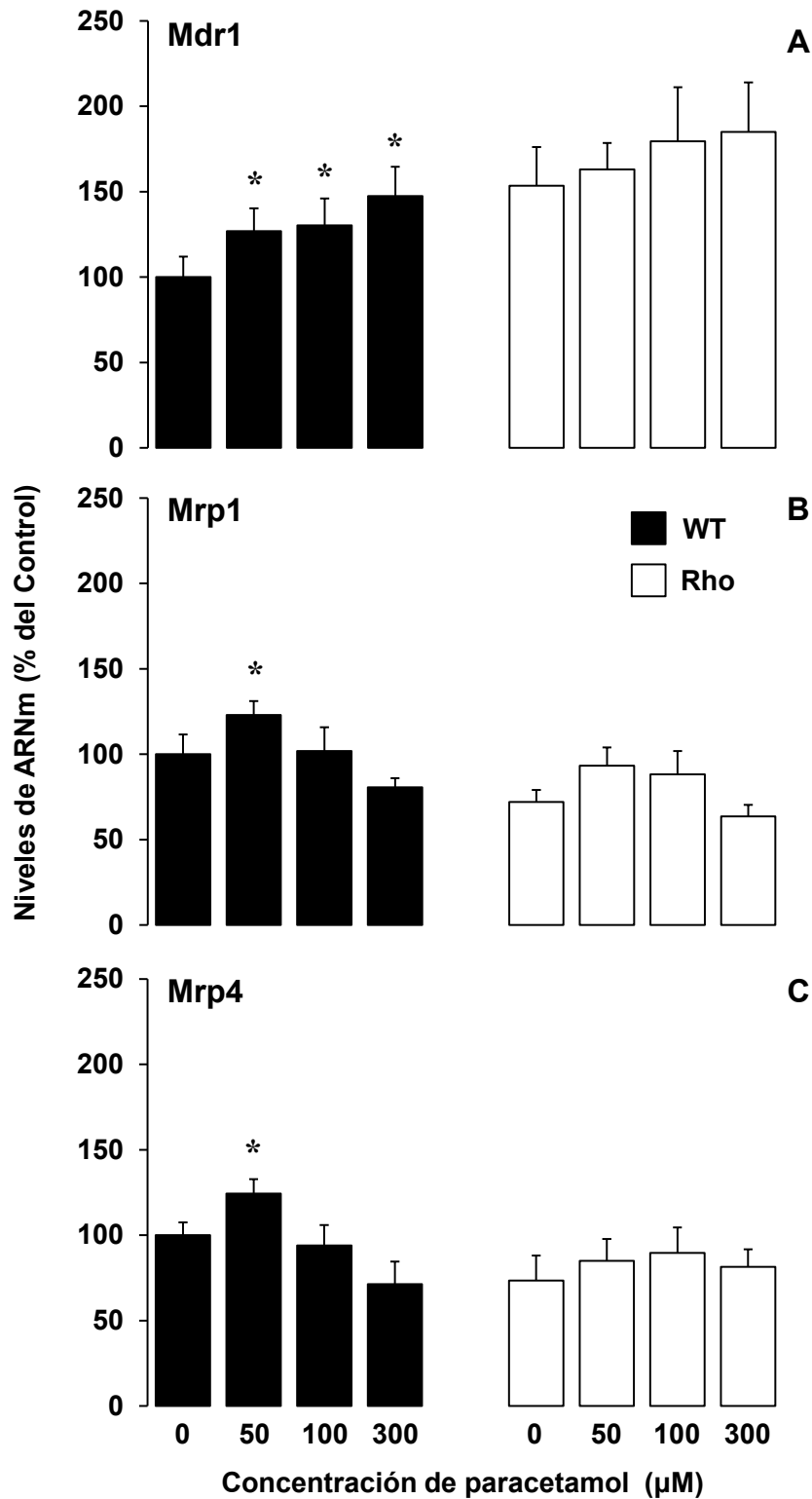


**Figura RD12.** Análisis del potencial de membrana mitocondrial (PMM) en las células Hepa 1-6 Control y Rho<sup>-</sup> tratadas con dosis crecientes de paracetamol durante 48 h. El PMM se determinó mediante citometría de flujo utilizando rodamina 123. Los resultados se muestran como porcentaje de células con baja fluorescencia para la rodamina 123. \*  $p < 0,05$  respecto a las células WT sin tratamiento; †  $p < 0,05$  al comparar las células Rho<sup>-</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

#### 4.1.2.5. Estudio de la expresión de proteínas ABC en células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> tratadas con paracetamol

Como se mencionó en el apartado 4.1.1, las proteínas ABC participan en los procesos de excreción de distintos metabolitos del paracetamol y su expresión puede modificarse en respuesta al tratamiento con este fármaco. Para analizar el papel del genoma mitocondrial en la regulación de la expresión de proteínas ABC en respuesta al tratamiento con paracetamol, las células Hepa 1-6 WT y Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> se cultivaron durante 48 h en presencia de dosis crecientes de este fármaco y la expresión génica se determinó mediante RT-PCRQ. Como demuestran nuestros resultados, el tratamiento con paracetamol indujo la expresión de Mdr1 en las células WT en todas las dosis estudiadas (Figura RD13), mientras que en el caso de Mrp1 y Mrp4 este aumento de expresión sólo se observó en células tratadas con paracetamol a la concentración más baja ensayada (50 µM) (Figura

RD13-B y C). Sin embargo, en las células Rho<sup>-</sup> el tratamiento con este fármaco no indujo la expresión de ninguna de estas tres proteínas ABC de forma estadísticamente significativa (Figura RD13).



**Figura RD13.** Niveles relativos de ARNm de Mdr1, Mrp1 y Mrp4 en células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup> tratadas con dosis crecientes de paracetamol durante 48 h. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-QPCR. Los resultados se expresan como porcentaje de expresión con respecto a células Hepa 1-6 WT sin tratamiento. \* p < 0,05 respecto a las células sin tratamiento mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Distintos estudios han demostrado que el tratamiento con paracetamol induce la expresión de Mrp1, Mrp2, Mrp3, Mrp4 y Mdr1a/b en ratón (Aleksunes *et al.*, 2007; Aleksunes *et al.*, 2006; Aleksunes *et al.*, 2005; Campion *et al.*, 2008). Este aumento en la expresión de proteínas ABC supone una adaptación celular dirigida a reducir la acumulación hepática de los metabolitos de este fármaco. Puesto que el tratamiento con paracetamol puede alterar la funcionalidad mitocondrial, se planteó la cuestión de si los procesos de señalización retrógrada podrían participar en la regulación de estas proteínas ABC.

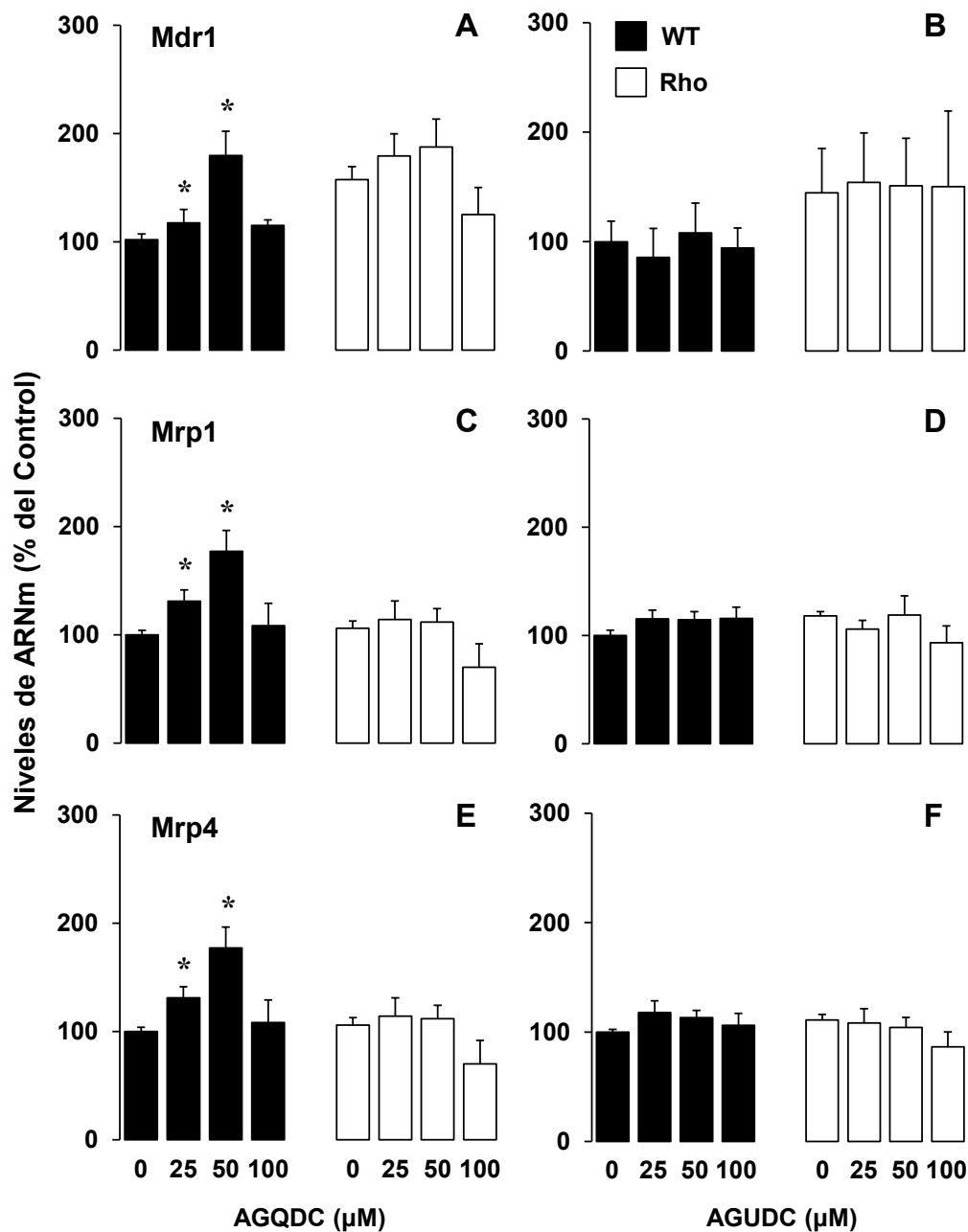
Puesto que en las células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup> los niveles de expresión de algunas de estas proteínas (Mrp2, Mrp3 y Bcrp) eran muy bajos sólo analizamos los cambios de expresión en Mrp1, Mrp4 y Mdr1. Al igual que se ha descrito en otras líneas celulares desprovistas de ADNmt (Lee *et al.*, 2008; Pillay *et al.*, 1998), los niveles basales de expresión de Mdr1 eran mayores en la línea celular Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> que en la Hepa 1-6 WT, sin embargo, su expresión no se modificó con el tratamiento en ninguna de las dosis estudiadas, al igual que ocurrió con los otros dos transportadores analizados, Mrp1 y Mrp4. La ausencia de cambios en la expresión de estos transportadores en la línea celular Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> sugiere que la mitocondria podría participar en los procesos de regulación de su expresión en respuesta al tratamiento con paracetamol.

#### 4.1.2.6. Estudio de la expresión de proteínas ABC en células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> tratadas con ácidos biliares

Para determinar si la implicación del genoma mitocondrial en la regulación de la expresión de proteínas ABC también tenía lugar en respuesta al tratamiento con otros agentes tóxicos, incluimos en nuestro estudio un AB potencialmente tóxico, el AGQDC. Se eligió este compuesto porque en un estudio previo de nuestro grupo de investigación se observó que las células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> presentaban una mayor resistencia a la muerte celular inducida por este AB (Gonzalez-Loyola, 2009).

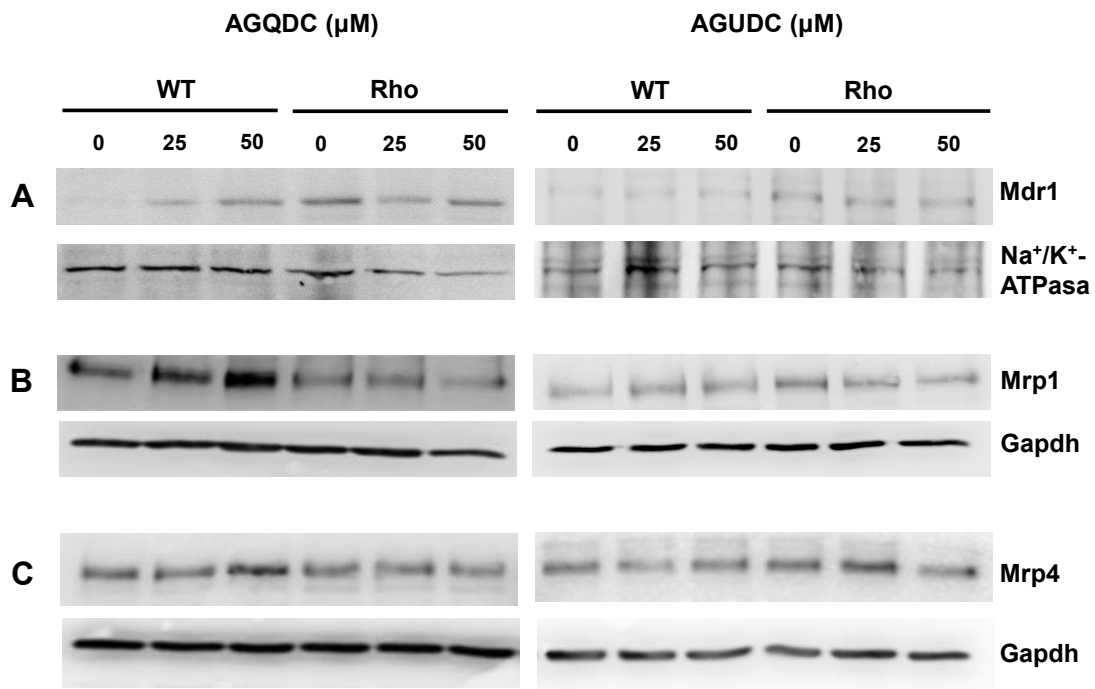
Datos preliminares obtenidos en el Trabajo de Grado de la Lda. Isabel Revuelta (Revuelta, 2010) indicaban que, la modificación de la expresión de algunas proteínas ABC presentaba un patrón diferente en células Hepa 1-6 WT y Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> tratadas con AGQDC. Para confirmar estos datos ambas líneas celulares se cultivaron durante 48 h en presencia de dosis crecientes de este AB y la expresión de los transportadores se analizó mediante RT-QPCR y WB.

Como se observa en las Figuras RD14 y RD15, el tratamiento con AGQDC indujo un aumento en los niveles de ARNm y proteína de Mdr1 (Figuras RD14-A y RD15-A), Mrp1 (Figuras RD14-C y RD15-B) y Mrp4 (RD14-E y RD15-C) a las dosis de 25 y 50  $\mu$ M en las células Hepa 1-6 WT. Sin embargo, la exposición a este AB no modificó la expresión de ninguno de estos transportadores en las células Rho<sup>-</sup> (Figuras RD14 y RD15).



**Figura RD14.** Niveles relativos de ARNm de Mdr1, Mrp1 y Mrp4 en células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup> tratadas con dosis crecientes de ácido glicoquenodesoxicólico (AGQDC) o ácido glicoursodesoxicólico (AGUDC) durante 48 h. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-QPCR. Los resultados se expresan como porcentaje de expresión con respecto a células Hepa 1-6 WT sin tratamiento. \* p < 0,05 respecto a las células sin tratamiento mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Para completar este estudio, comparamos estos resultados con los obtenidos en células tratadas con un AB epímero del AGQDC pero que carece de efectos tóxicos, el glicoursodesoxicólico (AGUDC). El tratamiento con este AB no modificó la expresión de estos transportadores ABC en ninguna de las dos líneas celulares estudiadas (Figuras RD14 y RD15).



**Figura RD15.** Estudio de la expresión de los transportadores Mdr1, Mrp1 y Mrp4 en células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup> tratadas con dosis crecientes de ácido glicoquenodesoxicólico (AGQDC) o ácido glicoursodesoxicólico (AGUDC) durante 48 h mediante Western blot. Como normalizadores se utilizaron la Gapdh, para la corrección de expresión proteica en lisados celulares totales, y la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa para crudo de membrana.

Al igual que ocurre con el paracetamol, el daño hepático inducido por la acumulación de ABs está asociado a la capacidad de estos compuestos para inducir la generación de ROS (Sokol *et al.*, 1995), fundamentalmente en la mitocondria. Además, existen distintos mecanismos mediante los cuales estos ABs pueden alterar la funcionalidad mitocondrial y acrecentar el daño hepático (Perez y Briz, 2009).

Por tanto, estos resultados y los obtenidos en células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> tratadas con paracetamol sugieren que los procesos de señalización retrógrada están implicados en la modificación de la expresión de proteínas ABC en respuesta al tratamiento con xenobióticos o compuestos endógenos potencialmente tóxicos, cuyos mecanismos de toxicidad producen alteraciones en la función mitocondrial. Estos cambios en el funcionamiento mitocondrial activan rutas de señalización hacia el núcleo que podrían modificar la expresión de distintos genes nucleares implicados en mecanismos de defensa celular.

#### 4.1.2.7. Regulación de la expresión de proteínas ABC en células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> en situaciones de estrés oxidativo

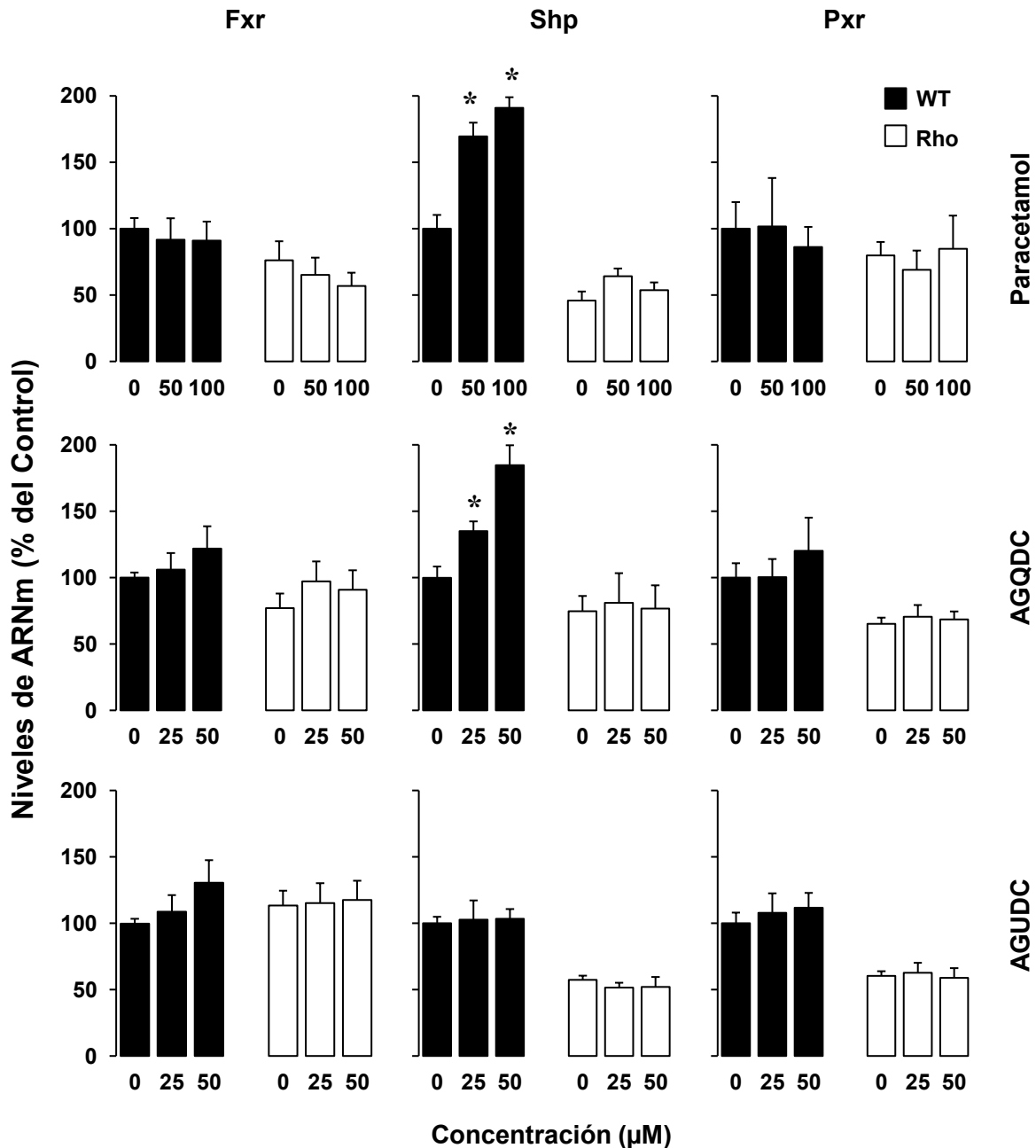
Como se mencionó en el apartado 2.4.2.5, numerosos receptores nucleares y factores de transcripción intervienen en la regulación de la expresión de proteínas ABC. Por tanto, decidimos analizar si la reducción de los niveles de ADNmt modificaba la expresión de estas proteínas reguladoras. Para ello, determinamos los niveles de expresión de los receptores nucleares, Pxr y Car, que pueden ser activados por distintos fármacos y toxinas (Klaassen y Aleksunes, 2010) y Fxr, que, aunque tradicionalmente se ha considerado como un sensor específico de ABs (Klaassen y Aleksunes, 2010) podría participar en la regulación de mecanismos de defensa frente al daño hepatocelular inducido por el paracetamol (Lee *et al.*, 2010). También incluimos en este estudio el factor de transcripción Nrf2, que participa en la regulación de distintos genes implicados en los mecanismos de defensa antioxidante y que se activa en respuesta a la toxicidad inducida tanto por el paracetamol (Aleksunes *et al.*, 2008b) como por los ABs (Nomoto *et al.*, 2009).

**Tabla RD1.** Estudio de los niveles basales de expresión de receptores nucleares (RN) y factores de transcripción (FT) en células Hepa 1-6 WT y Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>.

RN/FT	Hígado ratón (Ct)	Hepa 1-6 WT (Ct)	Abundancia de ARNm (% hígado de ratón)	
			WT	Rho
Fxr	20	31	0,15	0,12
Shp	23	30	1,24	0,81
Pxr	27	30	25,73	18,87
Car	27	38	<0,01	<0,01
Nrf2	25	27	45,46	45,68

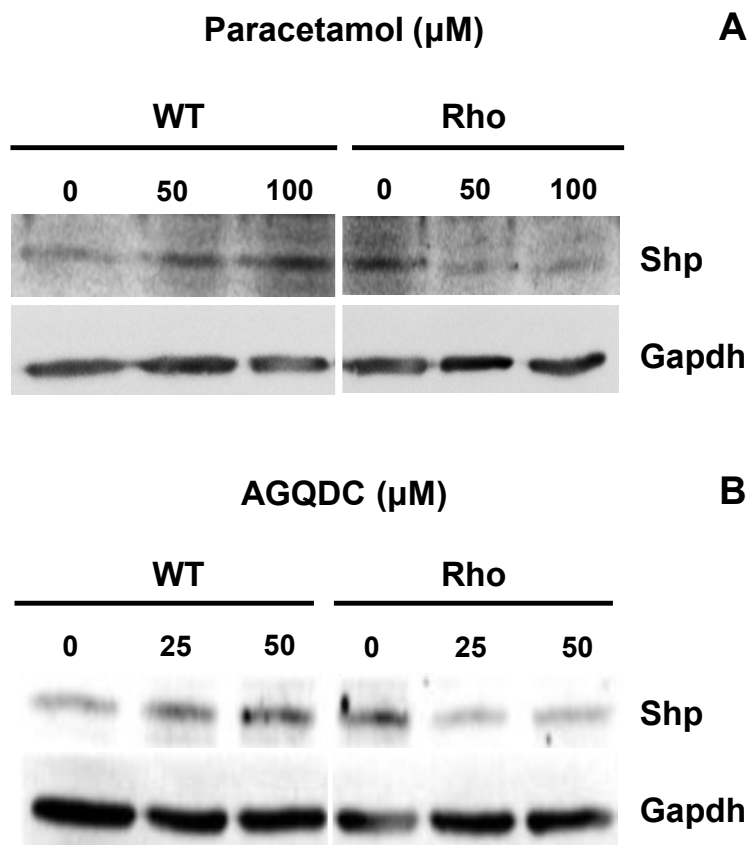
Los valores del ciclo umbral (Ct) de expresión y la abundancia de ARNm se determinaron mediante RT-QPCR.

Los niveles de expresión de Car eran indetectables en la línea celular Hepa 1-6, mientras que la expresión de Fxr y del represor de la transcripción activado por este receptor nuclear, Shp, aunque detectable, era mucho menor que la que detectamos en hígado de ratón (Tabla RD1). Sin embargo, tanto el receptor nuclear Pxr como el factor de transcripción Nrf2 presentaban buenos niveles de expresión en ambas líneas celulares, aunque menores a los detectados en hígado de ratón (Tabla RD1). De todas las proteínas reguladoras ensayadas, sólo la expresión de Pxr y Shp estaba ligeramente disminuida en la línea celular Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> en comparación con la que encontramos en células WT (Tabla RD1).



**Figura RD16.** Niveles relativos de ARNm de Fxr, Shp y Pxr en células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup> tratadas con dosis crecientes de paracetamol, ácido glicoquenodesoxicólico (AGQDC) o ácido glicoursodesoxicólico (AGUDC) durante 48 h. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-QPCR. Los resultados se expresan como porcentaje de expresión con respecto a células Hepa 1-6 WT sin tratamiento. \*  $p < 0,05$  respecto a las células sin tratamiento mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En vista de estos resultados, analizamos la expresión de Pxr, Fxr y Shp en células Hepa 1-6 WT y Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> incubadas durante 48 h en presencia de dosis crecientes de paracetamol, AGQDC o AGUDC. Los resultados obtenidos mediante RT-PCRQ indicaron que la expresión de Fxr y Pxr no se modificó en respuesta a los tratamientos en ninguna de las líneas celulares analizadas. Sin embargo, los niveles de ARNm de Shp aumentaron en las células Hepa 1-6 WT tratadas con paracetamol y AGQDC pero no en las células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> (Figura RD16). El aumento en los niveles de expresión de Shp también se comprobó a nivel de proteína mediante WB (Figura RD17).

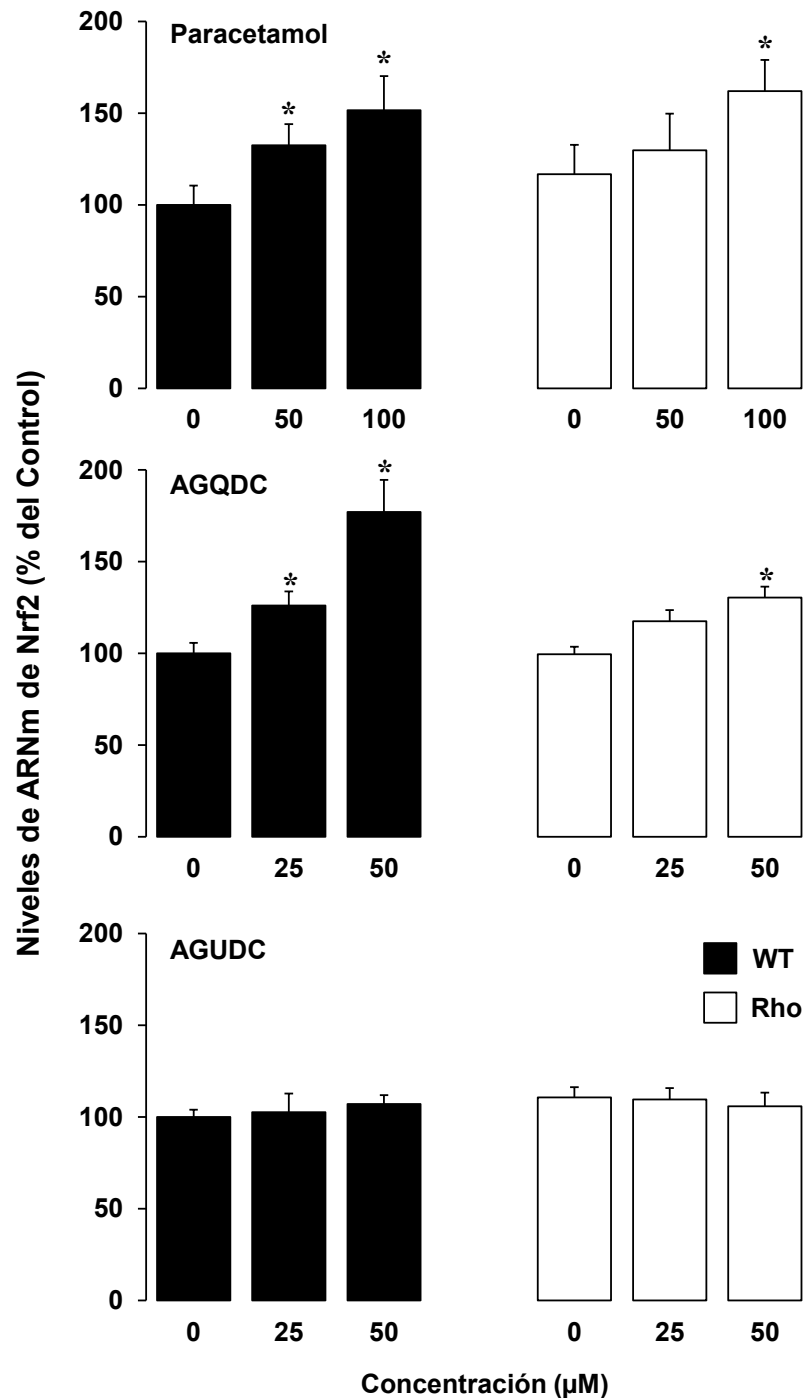


**Figura RD17.** Estudio de los niveles de expresión de Shp en células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-/-</sup> tratadas con dosis crecientes de paracetamol o ácido glicoquenodesoxicólico (AGQDC) durante 48 h mediante Western blot. Como normalizador se utilizó la Gapdh.

Tradicionalmente se ha considerado que la expresión de Shp está controlada exclusivamente por Fxr. Sin embargo, como se recoge en la Tabla RD1, los niveles de expresión de este receptor nuclear en células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-/-</sup> eran muy bajos y no se modificaron en respuesta a los distintos compuestos ensayados (Figura RD16). Estudios publicados recientemente indican que, además de Fxr, existen otras proteínas implicadas en la regulación de Shp, como p53 (Kim *et al.*, 2011). Por tanto, los cambios observados en Shp tras el tratamiento con paracetamol y AGQDC podrían estar mediados por la acción de alguna de estas proteínas reguladoras y no dependería de los niveles de expresión de Fxr.

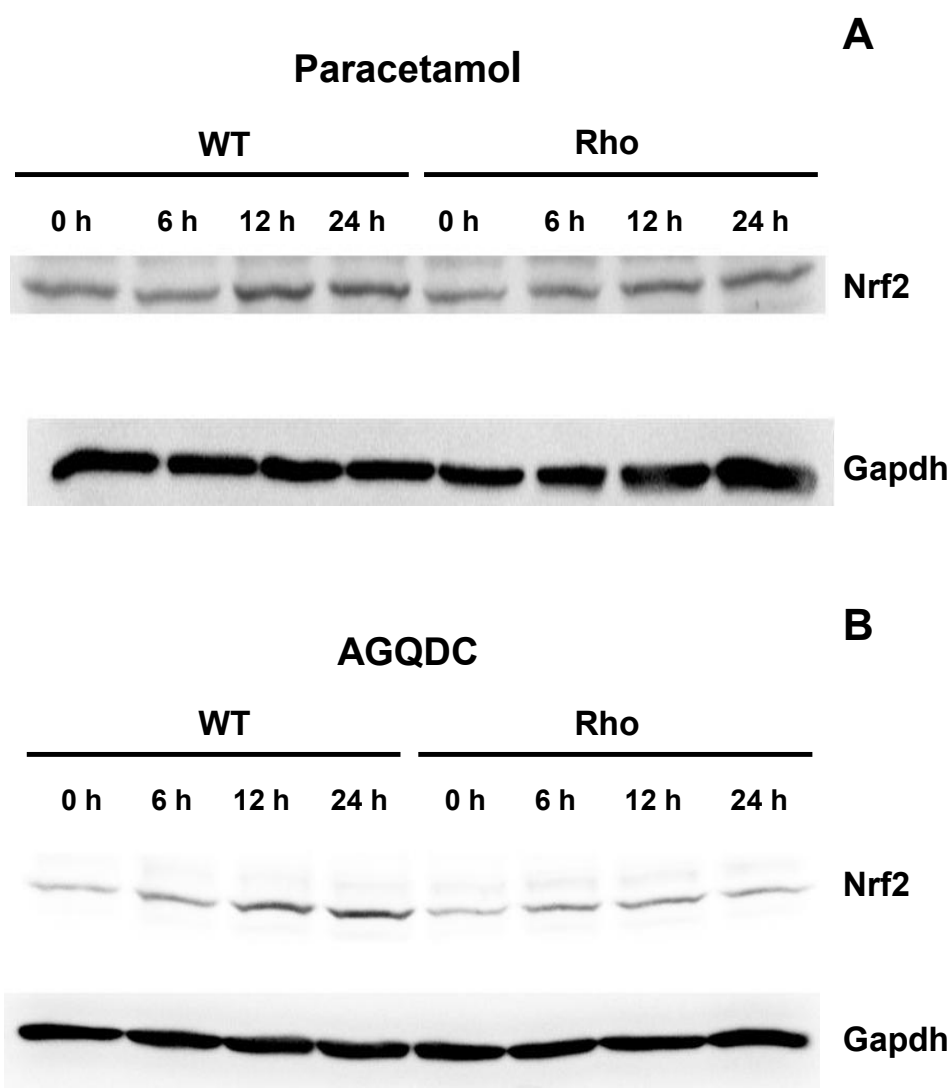
En cuanto al factor de transcripción Nrf2, los estudios realizados mediante RT-QPCR mostraron un aumento en su expresión en respuesta al tratamiento con paracetamol y AGQDC mientras que el AGUDC no produjo cambios (Figura RD18). El tratamiento con paracetamol y AGQDC indujo la expresión de Nrf2 en las células Hepa 1-6 WT de forma dosis dependiente, mientras que en las células Rho<sup>-/-</sup> este aumento sólo se observó en células tratadas con la dosis más alta ensayada para cada uno de estos compuestos (Figura RD18).





**Figura RD18.** Niveles relativos de ARNm de Nrf2 en células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup> tratadas con dosis crecientes de paracetamol, ácido glicoquenodesoxicólico (AGQDC) o ácido glicoursodesoxicólico (AGUDC) durante 48 h. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-QPCR. Los resultados se expresan como porcentaje de expresión con respecto a células Hepa 1-6 WT sin tratamiento. \*  $p < 0,05$  respecto a las células sin tratamiento mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Para confirmar el aumento en los niveles de Nrf2 en células Hepa 1-6 WT y Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> tratadas con paracetamol y AGQDC, determinamos los niveles de proteína de este factor de transcripción en ambas líneas celulares mediante WB. Por tratarse de un fenómeno dinámico y rápido, y para mejorar las probabilidades de observarlo con claridad, en estos estudios se incluyó un barrido de tiempos (Figura RD19).

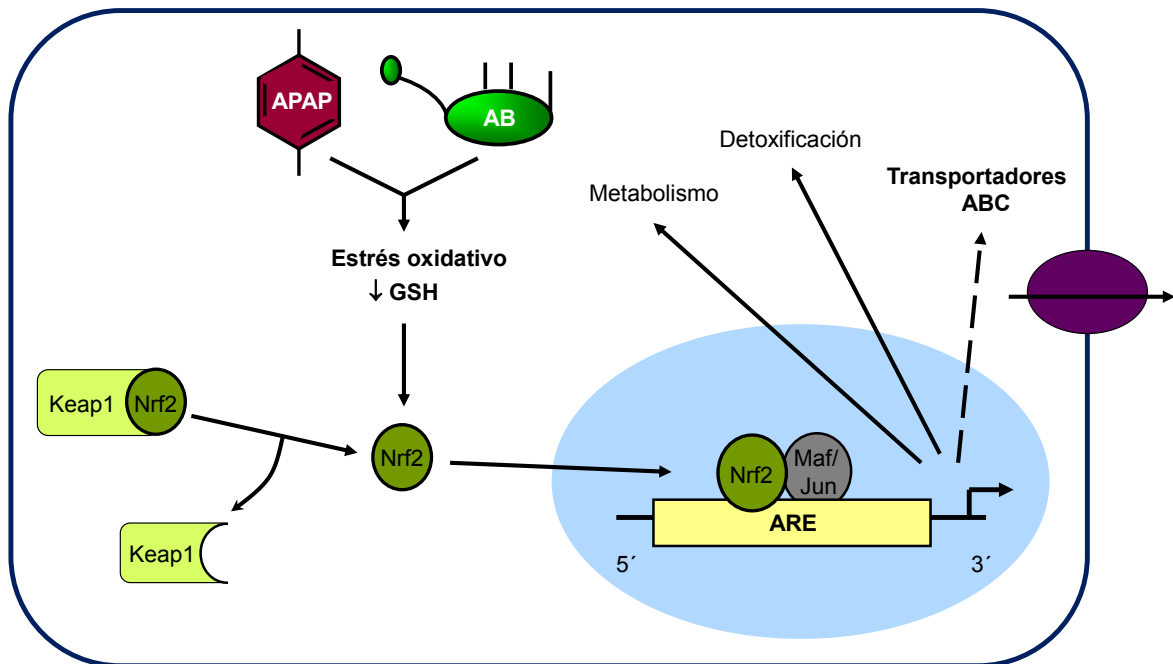


**Figura RD19.** Evolución temporal de la expresión de Nrf2 en células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup> tratadas con paracetamol 50  $\mu$ M y ácido glicoquenodesoxicólico (AGQDC) 50  $\mu$ M durante 0, 6, 12 y 24 h analizada mediante Western blot. Como normalizador se utilizó la Gapdh.

Los resultados obtenidos indicaban que el aumento en los niveles de Nrf2 podía detectarse tras 12 h de tratamiento en el caso de las células tratadas con paracetamol. Sin embargo, la inducción de la expresión de este factor de transcripción era mayor en las células Hepa 1-6 WT que en las células desprovistas de ADNmt tras 12 y 24 h de tratamiento (Figura RD19-A). En respuesta al AB, los niveles de Nrf2 aumentaron 6 h después de tratamiento y, los cambios observados en las células Hepa 1-6 WT también fueron mayores a los detectados en las células Rho<sup>-</sup> a todos los tiempos ensayados (Figura RD19-B). Estas diferencias en la inducción de la expresión de Nrf2 podrían deberse a la menor toxicidad y producción de ROS generada por estos compuestos en las células Rho<sup>-</sup>.

A diferencia de lo que ocurre con los receptores nucleares, en condiciones basales el factor de transcripción Nrf2 se encuentra en el citoplasma unido a su proteína represora, Keap1 (Itoh *et al.*, 1999). Sin embargo, ante una situación de estrés oxidativo, la unión entre Nrf2 y su proteína represora se rompe, permitiendo que este factor de transcripción se transloque al núcleo (Li y Kong, 2009). Una vez allí, participa en la regulación de la

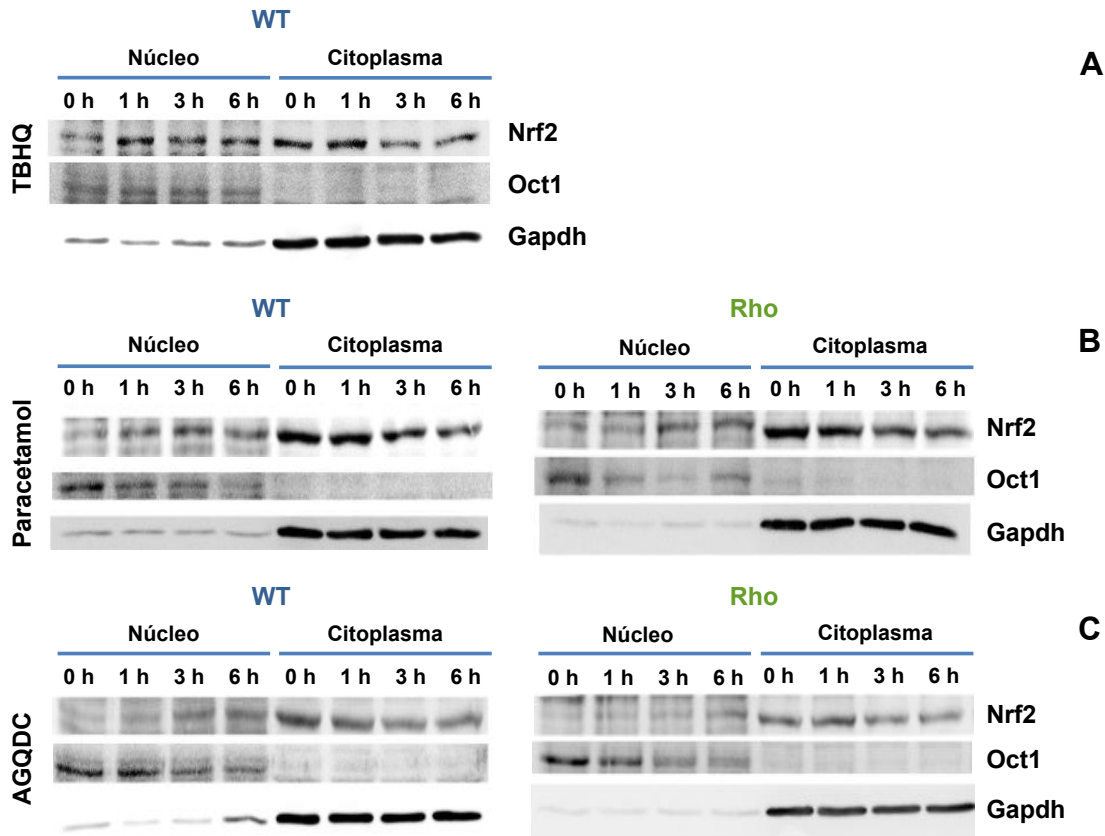
expresión de distintas proteínas involucradas en mecanismos de defensa antioxidante, entre las que se incluyen distintos miembros de la superfamilia ABC (Klaassen y Aleksunes, 2010) (Figura RD20).



**Figura RD20.** Esquema del mecanismo de translocación de Nrf2 desde el citoplasma al núcleo en situaciones de estrés oxidativo.

Para determinar si la reducción en los niveles de ADNmt podía modificar el mecanismo de translocación de Nrf2 al núcleo analizamos los niveles de proteína de este factor de transcripción en las fracciones citoplasmáticas y nucleares obtenidas a partir de células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup> tratadas con paracetamol y AGQDC durante distintos tiempos. Como control positivo para llevar a cabo estos estudios tratamos las células Hepa 1-6 WT con tertbutilhidroquinona (TBHQ), un agente inductor de la translocación de Nrf2 al núcleo (Kang *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en células WT tratadas con TBHQ mostraron un aumento de los niveles de Nrf2 en el núcleo que se acompañó de una reducción de los niveles de esta proteína en las fracciones citoplasmáticas en todas las condiciones estudiadas (Figura RD21-A).

En respuesta al tratamiento con paracetamol se produjo un aumento de los niveles de Nrf2 en el núcleo de las células Hepa 1-6 WT que podía observarse 1 h después de exponer las células a este fármaco, mientras que en el caso de las células Rho<sup>-</sup> este efecto no se observó hasta las 3 h de tratamiento. Además, el aumento de los niveles de Nrf2 en el núcleo de las células Rho<sup>-</sup> fue menor que el observado en las células WT (Figura RD21-A). El AGQDC también indujo la translocación de Nrf2 al núcleo a partir de las 3 h de tratamiento en las células WT. La deficiencia parcial de ADNmt afectó a la translocación de Nrf2 al núcleo de estas células de forma que ésta no se observó hasta 6 h después del tratamiento, y además fue de menor magnitud que la que se observó en las células WT (Figura 21C).

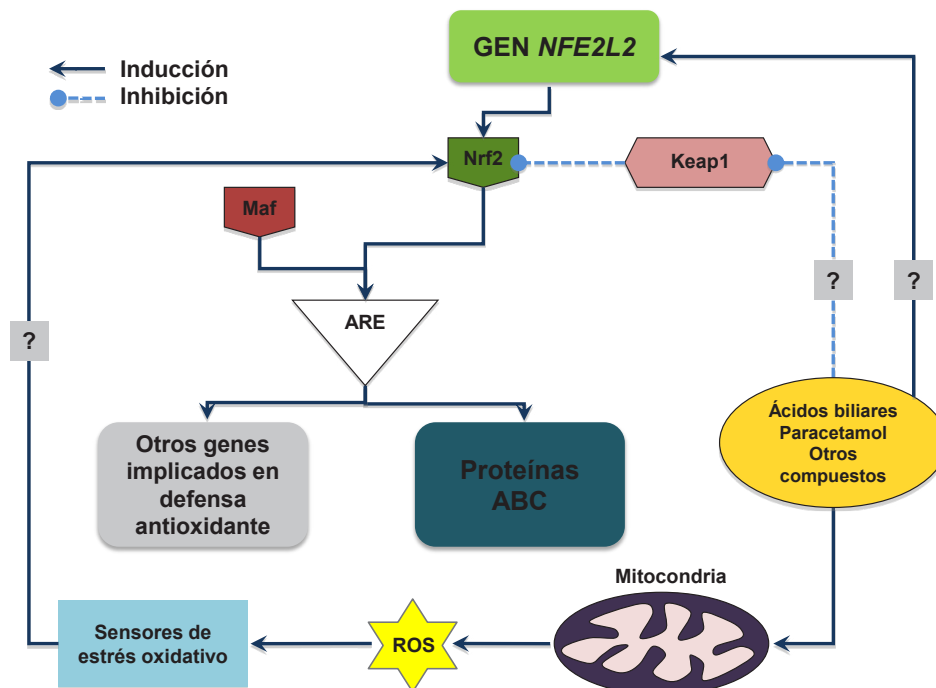


**Figura RD21.** Estudio de la translocación de Nrf2 desde el citoplasma al núcleo de células Hepa 1-6 WT y Rho<sup>-</sup> tratadas con terbutilhidroquinona (TBHQ) 60  $\mu$ M (A), paracetamol 50  $\mu$ M o AGQDC 50  $\mu$ M durante 0, 1, 3, y 6 h.

Nrf2 participa en la regulación de una amplia batería de genes implicados en mecanismos de defensa antioxidante. Para ello, este factor de transcripción se transloca al núcleo en situaciones de estrés oxidativo caracterizadas por un incremento en los niveles intracelulares de ROS. Como se mencionó en el apartado 4.1.2.3, las células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> presentan unos niveles basales de ROS inferiores a los detectados en la línea celular Hepa 1-6 WT y no se modifican en respuesta al tratamiento con paracetamol. Un resultado similar se obtuvo en el Trabajo de Grado de la Lda. Alejandra González-Loyola en el que se observó que el tratamiento con AGQDC tampoco inducía la generación de ROS en las células Rho<sup>-</sup> (Gonzalez-Loyola, 2009). A pesar de que la exposición de estas células a distintas dosis de estos compuestos no inducía un aumento la generación de ROS, sí se observó un incremento en la expresión de Nrf2, tanto a nivel de ARNm como de proteína (Figuras RD18 y RD19), y la activación de la translocación de este factor de transcripción al núcleo de las células Rho<sup>-</sup> (Figuras RD20). Sin embargo, tanto el aumento en los niveles de expresión de Nrf2 como su translocación al núcleo eran menores a los detectados en las células Hepa 1-6 WT y parecían estar retrasados en el tiempo. Estos resultados indican que, aunque en las células Rho<sup>-</sup> tratadas con paracetamol y AGQDC existe una alteración en la respuesta de Nrf2, este mecanismo no queda completamente bloqueado a pesar de que los niveles de ROS no se modifiquen. Por tanto, la activación de este factor de transcripción parece ser, al menos en parte, independiente de la generación de ROS. En este sentido, un trabajo publicado recientemente indica que la translocación de Nrf2

puede activarse en respuesta al tratamiento con ácido ursodesoxicólico (Arisawa *et al.*, 2009), un AB con conocidas propiedades antioxidantes y que no estimula la producción de ROS. La alteración de la activación de Nrf2 en estas células deficientes en ADNmt podría contribuir a la falta de respuesta de las distintas proteínas ABC analizadas en respuesta al tratamiento con estos compuestos.

Todos estos resultados indican que la reducción en los niveles de ADNmt en la línea celular Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> aumenta su resistencia a la muerte celular inducida por el paracetamol y el AGQDC. Puesto que ambos compuestos inducen estrés oxidativo como parte de su mecanismo de toxicidad (Cover *et al.*, 2005; Sokol *et al.*, 1993; Sokol *et al.*, 1995), la reducción de los niveles de ROS en esta línea celular podría ser uno de los factores implicados en esta quimiorresistencia, ya el aumento en la producción de estas moléculas interviene en los procesos de muerte celular desencadenados por la exposición a dosis tóxicas tanto de paracetamol (Gujral *et al.*, 2002) como de ABs (Lemasters *et al.*, 1998). Por otro lado, la alteración de la función mitocondrial podría modificar distintas rutas de señalización retrógrada implicadas en la regulación de genes nucleares que participan en mecanismos de defensa celular. Así, en la línea celular Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>, la reducción de los niveles de ADNmt previene parcialmente la translocación de Nrf2 al núcleo, donde participa en la regulación de distintos genes implicados en mecanismos de defensa antioxidante (Figura RD22). Sin embargo, la presencia de Nrf2 en el núcleo de estas células no conlleva un aumento de la expresión de las proteínas ABC que se han analizado y que son genes diana de este factor de transcripción. Estos resultados sugieren que la reducción de los niveles de ADNmt podría limitar la funcionalidad de distintos factores de transcripción o receptores nucleares, que actúan como sensores de estrés oxidativo y que podrían estar implicados en la regulación de proteínas ABC al igual que ocurre con Nrf2.



**Figura RD22.** Esquema representativo de los posibles mecanismos implicados en la regulación de la expresión de proteínas ABC en respuesta a la toxicidad inducida por el tratamiento con paracetamol y ácidos biliares.

#### 4.1.3. Papel del genoma mitocondrial en la protección frente a la muerte celular inducida por ácidos biliares en células hepáticas

Los resultados obtenidos en el apartado 4.1.2 de esta Tesis Doctoral indicaban que la reducción de los niveles de ADNmt en la línea celular de hepatoma de ratón Hepa 1-6 podía aumentar la resistencia de estas células a la toxicidad inducida por distintos compuestos potencialmente tóxicos, entre ellos los ABs. Según nuestros resultados, la menor sensibilidad de estas células a la muerte celular inducida por estos compuestos no depende de la expresión de las bombas exportadoras ABC, implicadas en su detoxificación, pero sí parece guardar relación con la menor generación de ROS observada en células Rho<sup>-</sup> en respuesta al tratamiento.

Como ya se mencionó en el apartado 4.1.2.6, uno de los mecanismos implicados en el daño hepático asociado a la exposición a altas concentraciones de ABs, como ocurre en condiciones de colestasis, es la generación de ROS (Sokol *et al.*, 1991) (Togashi *et al.*, 1990), que en su mayor parte se producen en la mitocondria, concretamente en la cadena transportadora de electrones. Estos orgánulos son especialmente sensibles al daño inducido por la acumulación de ABs, que puede alterar el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (Krahenbuhl *et al.*, 1994) e inducir la permeabilidad mitocondrial transitoria (MPT) implicada en la muerte celular de los hepatocitos por necrosis y apoptosis (Lemasters *et al.*, 1998). En estas condiciones, los cambios en la permeabilidad de este orgánulo se han asociado con una pérdida del potencial de membrana mitocondrial (PMM), una reducción en el proceso de fosforilación oxidativa, la rotura de la membrana mitocondrial externa, la liberación de citocromo c y la generación de ROS (Lemasters *et al.*, 1998).

A pesar de que la generación de ROS se ha asociado con la alteración de distintas estructuras celulares durante situaciones de estrés oxidativo, es importante señalar que, estas moléculas también pueden participar en la regulación de distintos procesos de señalización celular (Bartosz, 2009) y activar distintas rutas de supervivencia como ERK1/2 y Akt (Fang *et al.*, 2004).

Puesto que la mitocondria desempeña un papel fundamental en la toxicidad inducida por la exposición a altas concentraciones de ABs, y participa en los procesos de muerte celular mediante apoptosis y necrosis, nuestro siguiente objetivo fue profundizar en el estudio de los mecanismos de resistencia a la muerte celular inducida por la exposición al AGQDC, activados por la ausencia de genoma mitocondrial.

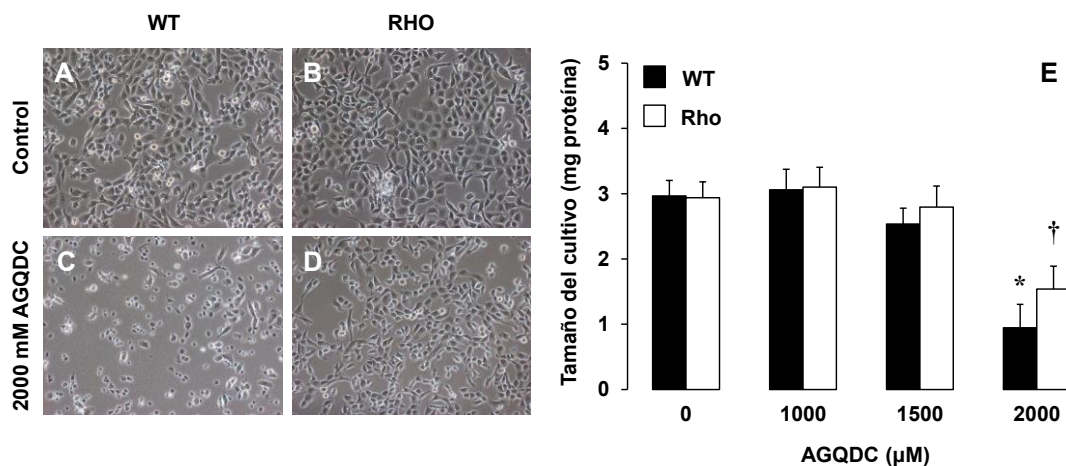
Como modelo de estudio seleccionamos una línea celular derivada de carcinoma hepatocelular (HCC) humano, SK-Hep1 totalmente desprovista de ADNmt (Rho<sup>0</sup>). A diferencia de lo que ocurría con las células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>, el tratamiento con dosis bajas de BrEt consiguió eliminar completamente el ADNmt en esta línea celular de origen humano, característica que se mantuvo incluso después de retirar el tratamiento con este compuesto, como se confirmó al analizar los niveles de ADNmt 85 días después de la retirada del BrEt mediante RT-QPCR. Mientras que los niveles de expresión del ARNr 18 y



la GAPDH, codificados por el genoma nuclear, no se modificaron en las células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>, la expresión del ARNr 16S y de la subunidad 1 del complejo NADH deshidrogenasa (MT-ND1), codificados por el genoma mitocondrial, pasó a ser indetectable en esta línea celular.

#### 4.1.3.1. Sensibilidad de las células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> a la muerte celular inducida por el ácido glicoquenodesoxicólico

Para determinar el efecto del AGQDC sobre la viabilidad de las líneas celulares SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup>, las células se cultivaron en presencia de dosis crecientes de este compuesto durante 8 h. En este caso se eligió este tiempo de incubación más corto con el objetivo de estudiar las distintas rutas de señalización implicadas en los mecanismos de muerte y supervivencia celular inducidos por los ABs. Tras este periodo de incubación, se observó que ambas líneas celulares eran muy resistentes a la muerte celular inducida por este AB, ya que sólo se apreció una reducción significativa en la viabilidad celular a la dosis de 2000  $\mu$ M (Figura RD24). Además, la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> presentaba una mayor resistencia a la toxicidad inducida por el AGQDC, ya que la caída en la densidad del cultivo fue menor en esta línea celular que la observada en las células WT (Figura RD24).

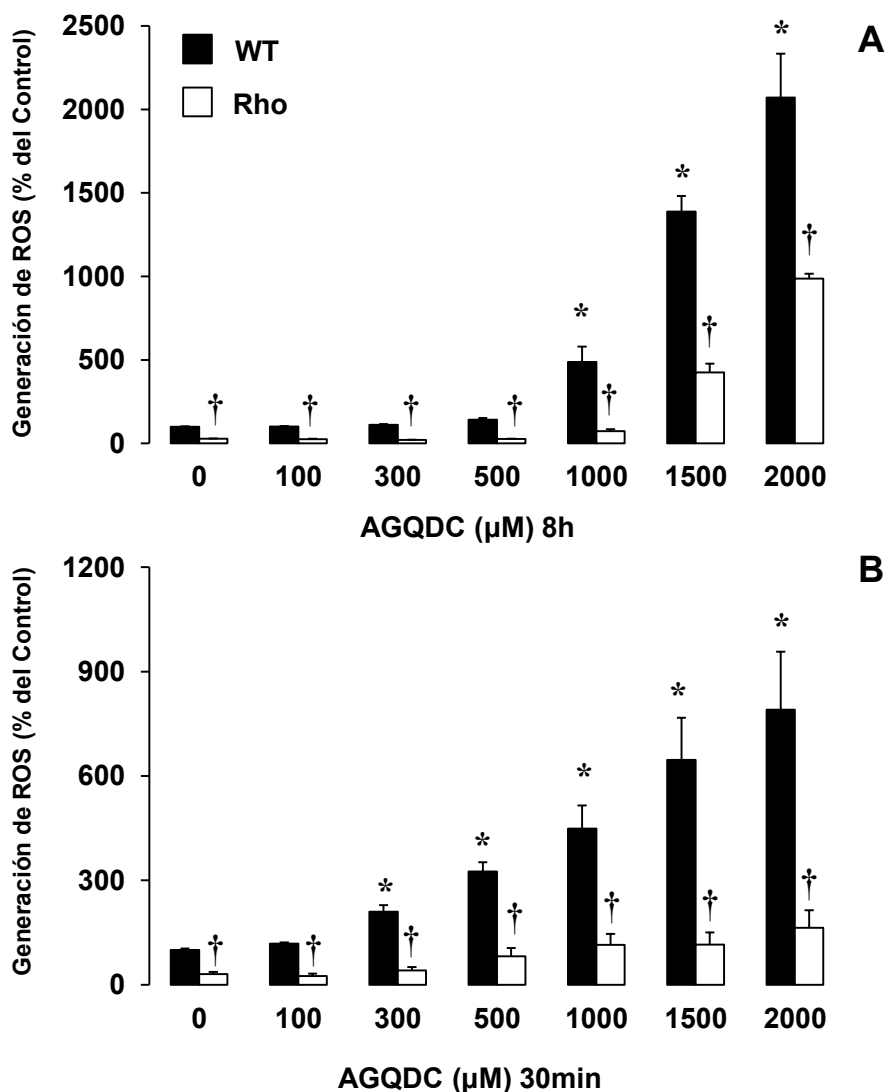


**Figura RD23.** Toxicidad inducida por el ácido glicoquenodesoxicólico (AGQDC) en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> tras 8 h de tratamiento. Fotografías representativas de los cultivos celulares obtenidas mediante microscopía de contraste de fases (A-D). Contenido total de proteína de los cultivos celulares (E). Los valores representan la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , respecto a las células WT sin tratar; †  $p < 0,05$  al comparar las células Rho<sup>0</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

#### 4.1.3.2. Generación de ROS en células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> tratadas con ácido glicoquenodesoxicólico

El estudio de los niveles de estrés oxidativo en las células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> expuestas a distintas dosis de AGQDC durante 8 h indicaba que, a las dosis más altas, este AB podía inducir la generación de ROS en ambas líneas celulares, aunque el aumento observado en las células desprovistas de ADNmt, cuyos niveles basales de ROS eran inferiores a los detectados en las células WT, fue menor a todas las dosis ensayadas (Figura

RD24-A). Estos resultados eran similares a los obtenidos por la Lda. Alejandra González Loyola en las células Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> tratadas con este AGQDC (Gonzalez-Loyola, 2009).



**Figura RD24.** Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> determinada mediante citometría de flujo tras 8 h (A) o 30 min (B) de tratamiento con ácido glicoquenodesoxicólico (AGQDC). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , respecto a las células WT sin tratar; †  $p < 0,05$  al comparar las células Rho<sup>0</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Como se explicó en el apartado 4.1.2.3, el limitado aumento de la producción de ROS podría deberse a la falta de funcionalidad de la cadena respiratoria mitocondrial en estas células Rho<sup>0</sup>. Esta menor generación de ROS podría ser uno de los mecanismos implicados en la mayor resistencia a la muerte celular inducida por el AGQDC observada en la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>, ya que la inducción del MPT debida a la generación de estas moléculas en la mitocondria participa en los procesos de necrosis activados por la presencia de dosis tóxicas de ABs (Rodrigues *et al.*, 1998).

Además de su papel en la alteración de distintos componentes celulares en situaciones de estrés oxidativo, las ROS pueden participar en procesos de señalización



celular. Por ello analizamos los cambios en los niveles de ROS en respuesta al tratamiento con AGQDC a tiempos aún más cortos, en concreto 30 min, en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup>. Estas condiciones experimentales nos permitían además descartar cualquier efecto potencial debido a los efectos producidos por la muerte celular. Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo indicaban que la exposición a este AB inducía la generación de ROS de forma dosis dependiente en ambas líneas celulares, aunque este aumento fue menor en las células Rho<sup>0</sup> en todas las condiciones estudiadas (Figura RD24-B). Tras este tiempo de incubación se observó la inducción de la generación de ROS a dosis más bajas del AGQDC que la observada tras 8 h de tratamiento tanto en las células WT como en las Rho<sup>0</sup>. Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos compensatorios que, después de un cierto tiempo, son capaces de contrarrestar la inducción de la generación de ROS activada por la exposición de las células a bajas concentraciones de este AB.

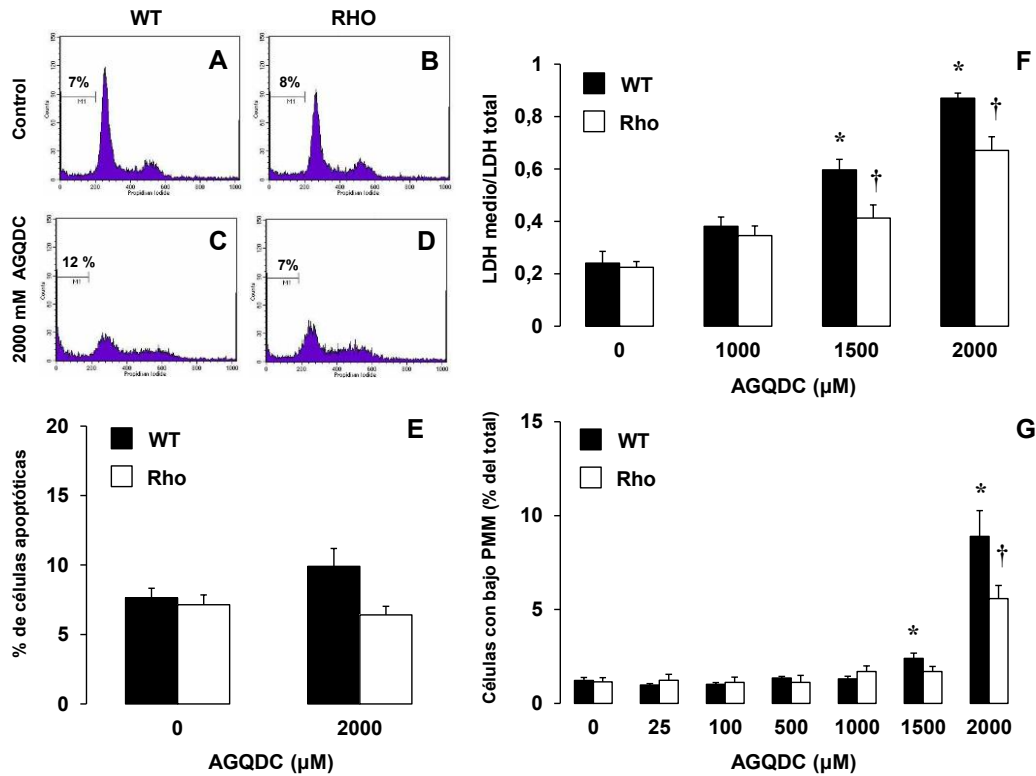
Estas diferencias en la generación de ROS en respuesta al AGQDC podrían conllevar cambios en la activación de rutas de señalización sensibles al estado redox que podrían contribuir a reducir la sensibilidad de las células Rho<sup>0</sup> a la toxicidad inducida por este AB.

#### **4.1.3.3. Estudio de los mecanismos de muerte celular inducidos por el ácido glicoquenodesoxicólico en células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>**

Los resultados obtenidos en nuestro estudio junto con los recogidos previamente en el Trabajo de Grado de la Lda. Alejandra González-Loyola indicaban que la ausencia total o parcial de ADNmt confería una mayor resistencia a la muerte celular inducida por el AGQDC. Sin embargo, se ha descrito que la acumulación de ABs en las células hepáticas puede inducir la muerte celular por apoptosis o necrosis (Lemasters *et al.*, 1998). Así, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el tipo de muerte celular inducida por el AGQDC en las células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup>.

El análisis del contenido celular de ADN realizado mediante citometría de flujo indicaba que el porcentaje de células hipodiploides, o células apoptóticas era muy bajo y similar en ambas líneas celulares en condiciones basales y no aumentó significativamente tras el tratamiento con el AB (Figura RD25-A-F). Por el contrario, los niveles de necrosis, determinados mediante la cuantificación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo, aumentaron tanto en células WT como en células Rho<sup>0</sup> tras el tratamiento. Sin embargo, los niveles de necrosis detectados fueron menores en las células Rho<sup>0</sup> (Figura RD25-F).

Para completar estos estudios analizamos también el número de células con bajo PMM en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> tratadas con AGQDC (Figura RD25-G). Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo indicaban que el número de células con bajo PMM era menor en las células Rho<sup>0</sup> que en las WT tras la exposición a las dosis de 1500 y 2000  $\mu$ M de AGQDC (Figura RD25-G).



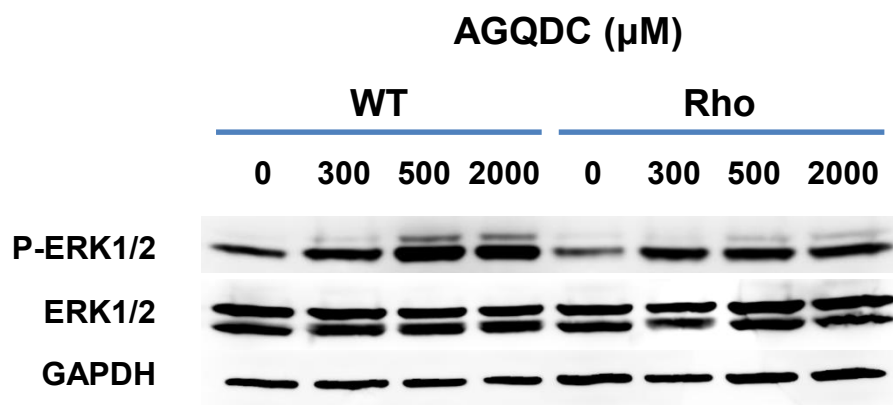
**Figura RD25.** Determinación de los niveles de apoptosis, necrosis y potencial de membrana mitocondrial (PMM) en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> tratadas con el ácido glicoquenodesoxicólico (AGQDC) durante 8 h. Histogramas representativos del análisis del contenido en ADN realizado mediante citometría de flujo (A-D). El porcentaje de células apoptóticas se recoge en la zona M1 de los histogramas. Porcentaje de células apoptóticas determinado mediante citometría de flujo (E). Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo. Los resultados se expresan como la relación entre la actividad LDH en el medio de cultivo y la actividad total (LDH medio + LDH lisados celulares) (F). Porcentaje de células con bajo PMM determinado mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media ± EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , respecto a las células WT sin tratar; †  $p < 0,05$  al comparar las células Rho<sup>0</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Nuestros resultados indicaban que las células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> eran altamente resistentes al daño inducido por la exposición a este AB, ya que la viabilidad sólo se redujo de forma significativa cuando estas células se expusieron a concentraciones muy elevadas de este compuesto. A estas dosis, se produjo un aumento en los niveles de muerte celular por necrosis mientras que el porcentaje de células apoptóticas no se modificó en ninguna de las líneas celulares. Estos resultados coinciden con los datos recogidos en la bibliografía, ya que distintos estudios indican que la exposición a altas concentraciones de ABs hidrofóbicos, como el AGQDC, induce la muerte celular por necrosis (Galle *et al.*, 1990; Sokol *et al.*, 1995; Spivey *et al.*, 1993), mientras que los niveles más reducidos de estos compuestos desencadenan mecanismos de apoptosis (Patel *et al.*, 1994). La pérdida del PMM se ha relacionado con los procesos de necrosis y apoptosis desencadenados por la acumulación de ABs en el hepatocito (Perez y Briz, 2009), por lo que, el hecho de que el porcentaje de células con bajo PMM sea menor en las células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> podría contribuir a su mayor resistencia a la necrosis inducida por la exposición a dosis tóxicas del AGQDC.

#### 4.1.3.4. Activación de rutas de supervivencia en células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> tratadas con AGQDC

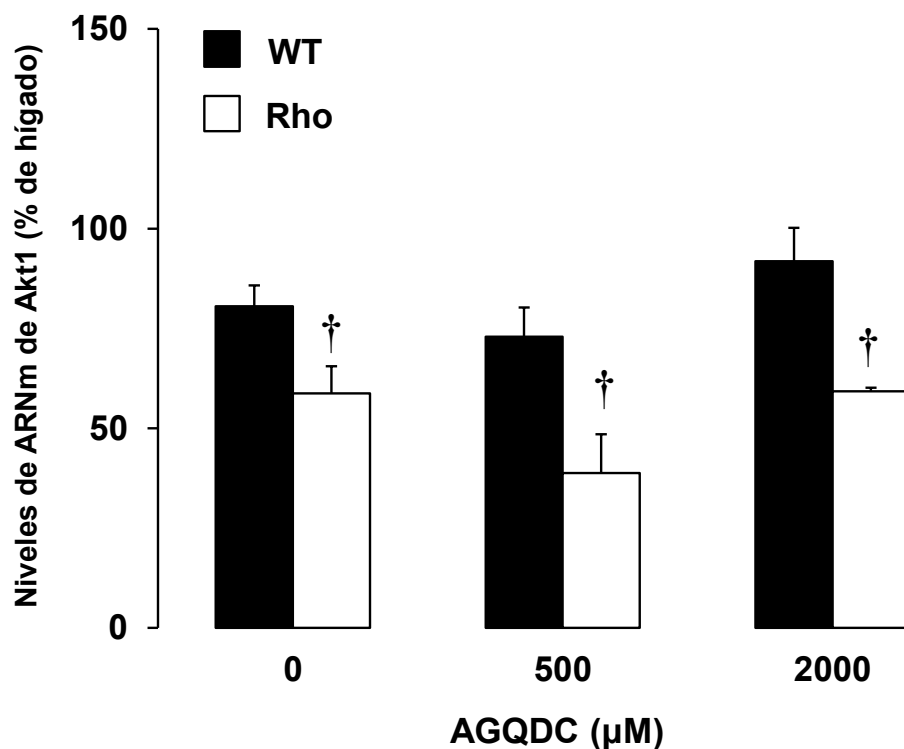
Uno de los factores que pueden desencadenar la activación de las rutas de supervivencia ERK1/2 y Akt en respuesta a la toxicidad de los ABs es el incremento en la generación de ROS (Fang *et al.*, 2004), cuyos niveles se encontraron aumentados de forma más acusada células SK-Hep-1 WT que en células Rho<sup>0</sup> en respuesta al tratamiento con AGQDC (Figura RD24-B).

El estudio de la activación de la ruta ERK1/2 se realizó mediante la determinación de la fosforilación de estas proteínas por WB. Como puede observarse en la Figura RD26, los niveles basales de expresión de ERK1/2 total fueron similares en ambas líneas celulares. Sin embargo, la fosforilación basal de ERK1/2 era más débil en las células Rho<sup>0</sup> que en las células WT. Tras la incubación de estas dos líneas celulares con dosis crecientes de este AB durante 30 min se detectó la activación de esta ruta en las células WT mientras que en las células Rho<sup>0</sup> este efecto fue menor. Estos resultados indican la existencia de una activación de ERK1/2 es dependiente de la generación de ROS. Este efecto se ha descrito en hepatocitos tratados con ABs (Dent *et al.*, 2005). Además según estos resultados, la activación de la ruta ERK1/2 no estaría implicada en el aumento de resistencia a la muerte celular inducida por la exposición al AGQDC en células Rho<sup>0</sup>.



**Figura RD26.** Activación de ruta de supervivencia ERK1/2 en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> tratadas con ácido glicoquenodesoxicólico (AGQDC) durante 30 min. ERK1/2 fosforilada (p-ERK1/2) y ERK1/2 total determinadas mediante Western blot. La GAPDH se utilizó como normalizador. Estos resultados se confirmaron en al menos dos experimentos adicionales.

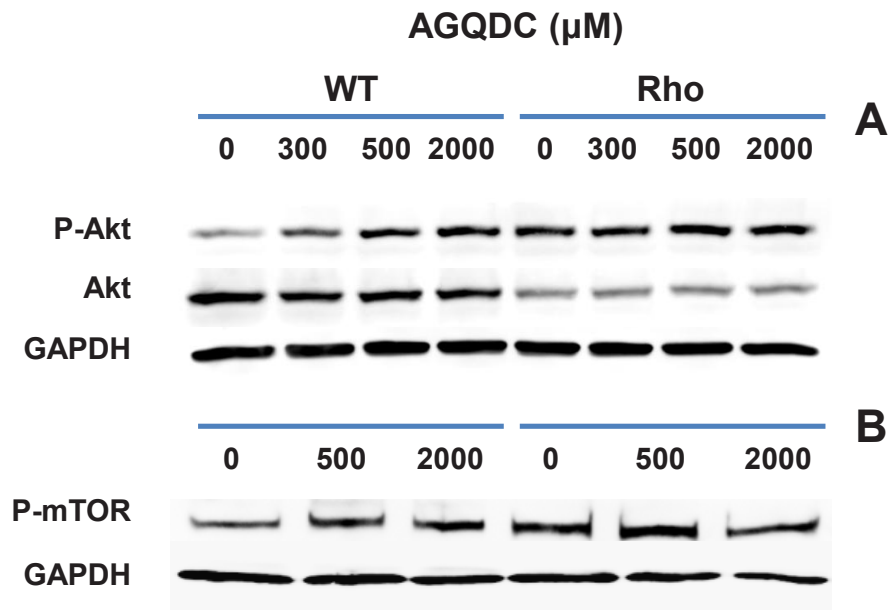
Respecto a la ruta de supervivencia Akt, al analizar los niveles de expresión de Akt-1 mediante RT-QPCR en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> tratadas con AGQDC durante 30 min se observó que sus niveles de expresión eran menores en células Rho<sup>0</sup> y que el tratamiento con este AB no modificaba la expresión de esta proteína en ninguna de las líneas celulares (Figura RD27). Estos mismos resultados se observaron al analizar los niveles totales de Akt mediante WB (Figura RD29).



**Figura RD27.** Determinación de los niveles de expresión de Akt-1 en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> tratadas con ácido glicoquenodesoxicólico (AGQDC) durante 8 h. La abundancia relativa de ARNm se determinó mediante RT-QPCR. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , respecto a las células WT sin tratar; †  $p < 0,05$  al comparar las células Rho<sup>0</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

A pesar de que los niveles de expresión de Akt en la línea celular Rho<sup>0</sup> eran inferiores a los detectados en las células WT, el estudio de los niveles de Akt fosforilada indicó que esta ruta de supervivencia se encontraba activada de forma constitutiva en esta línea celular (Figura RD29). El tratamiento con el AGQDC indujo la activación de esta ruta de supervivencia en las células WT mientras que en las células Rho<sup>0</sup>, los niveles de Akt fosforilada se mantuvieron altos pero no se modificaron (Figura RD28).

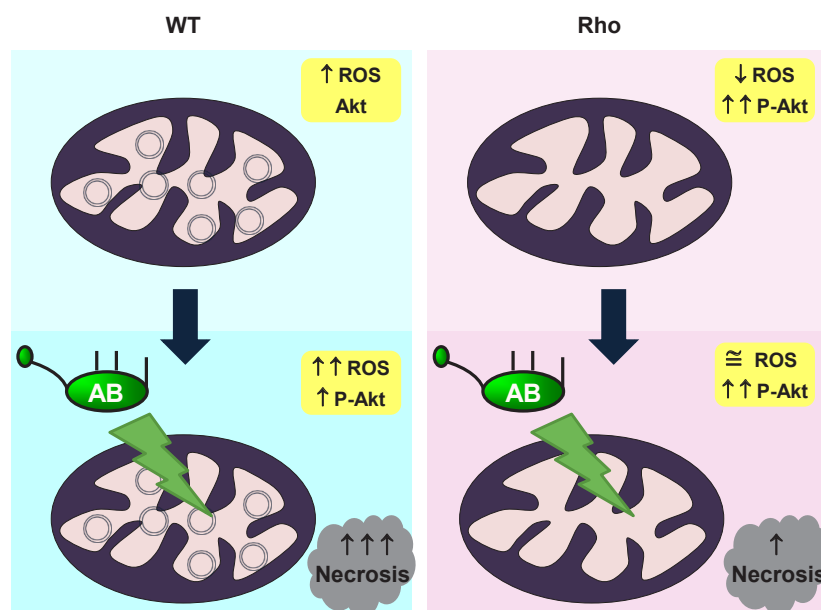
Para confirmar la activación de la ruta de supervivencia Akt, analizamos una de sus dianas, mTOR, que en su forma activa se encuentra fosforilada. Los resultados de WB indicaban que, al igual que en el caso de Akt, mTOR se encontraba activada en condiciones basales en la línea celular Rho<sup>0</sup>. El tratamiento con AGQDC indujo la activación de mTOR en las células WT, pero no en las células Rho<sup>0</sup> en todas las condiciones analizadas (Figura RD28). Esta activación constitutiva de la ruta Akt/mTOR podría contribuir a la resistencia a la muerte celular inducida por el tratamiento con altas dosis de AGQDC, aumentando la supervivencia y la proliferación celular mediante la activación de distintos procesos metabólicos como la glucólisis aeróbica, la captación de nutrientes y el metabolismo energético a través de la activación de mTOR (Manning y Cantley, 2007).



**Figura RD28.** Activación de la ruta de supervivencia Akt/mTOR en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>-/-</sup> tratadas con ácido glicoquenodesoxicólico (AGQDC) durante 30 min, determinada mediante Western blot. Akt fosforilada (p-Akt) y Akt total, (A). mTOR fosforilada (p-mTOR) (B). La GAPDH se utilizó como normalizador. Estos resultados se confirmaron en al menos dos experimentos adicionales.

A pesar de que tradicionalmente se ha relacionado la activación de rutas de supervivencia como Akt con la reducción de los niveles de apoptosis, recientemente se ha sugerido que su activación también puede reducir los niveles de necrosis (Ghosh y Sil, 2009; Shaik *et al.*, 2007), al igual que hemos observado en nuestro estudio.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> indican que la ausencia de ADNmt reduce los niveles de ROS e induce la activación de la ruta de supervivencia Akt/mTOR de forma independiente a la generación de ROS, contribuyendo así al aumento en la resistencia a la toxicidad inducida por el AGQDC (Figura RD29).



**Figura RD29.** Papel del genoma mitocondrial en la resistencia a la necrosis inducida por ácidos biliares (ABs).

Estos resultados sugieren que las modificaciones en la función mitocondrial asociadas con la presencia de alteraciones en el ADNmt, como ocurre en situaciones de colestasis prolongada, podrían activar mecanismos de supervivencia involucrados en el aumento de la resistencia de los hepatocitos a la muerte celular inducida por los ABs. Esto tiene gran relevancia, ya que estos mecanismos podrían explicar el hecho de que en situaciones de colestasis crónica, los hepatocitos desarrollan cierta resistencia a la muerte celular inducida por la acumulación de ABs como se ha descrito anteriormente (Attili *et al.*, 1986; Costa *et al.*, 2003; Fickert *et al.*, 2005; Schoemaker *et al.*, 2003).

## 4.2. PAPEL DEL GENOMA MITOCONDRIAL EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA INDUCIDA POR FÁRMACOS ANTITUMORALES EN CÉLULAS HEPÁTICAS

Los tumores hepáticos ocupan el sexto lugar en frecuencia de diagnóstico y son la tercera causa de muerte relacionada con cáncer a nivel mundial (Ferlay *et al.*, 2010). A pesar de la larga lista de fármacos que han sido ensayados para su tratamiento, la marcada refractariedad junto con la aparición de resistencia durante el mismo suponen uno de los principales problemas a la hora de aplicar una terapia efectiva frente a este tipo de tumores (Marin *et al.*, 2009b).

La resistencia a la quimioterapia tiene un origen multifactorial en el que se engloban diferentes mecanismos (MOC de “Mechanism Of Chemoresistance”) que han sido clasificado en cinco categorías (Marin *et al.*, 2010) dependiendo de que impliquen cambios en la expresión de genes que codifican proteínas transportadoras de sustancias tóxicas (proteínas de captación catalogadas como MOC-Ia, o bombas de eflujo que se engloban en el MOC-Ib), cambios en proteínas celulares implicadas en procesos de detoxificación (MOC-II), disminución de la expresión de proteínas diana y aumento de la expresión de vías metabólicas alternativas (MOC-III), cambios en las moléculas que participan en la reparación del DNA (MOC-IV), cambios de expresión y/o presencia de mutaciones en genes proapoptóticos (MOC-Va) o antiapoptóticos (MOC-Vb) que determinan una alteración de las vías que controlan el balance apoptosis/supervivencia (MOC-V).

La posible relación entre la alteración de la función mitocondrial y el desarrollo y la progresión del cáncer se ha estudiado durante mucho tiempo. Uno de los mecanismos que podrían estar implicados en estos procesos es la acumulación de mutaciones en el genoma de este orgánulo, que puede producir disfunciones de la cadena respiratoria mitocondrial. En los últimos años se han identificado un gran número de mutaciones en el ADNmt en diversos tipos de tumores primarios humanos, entre los que se incluye el HCC (Chatterjee *et al.*, 2011).

Estas alteraciones en el ADNmt podrían modificar también distintas rutas implicadas en procesos de señalización retrógrada y contribuir así al desarrollo de esta enfermedad. De hecho, estudios realizados en células tumorales desprovistas de ADNmt, derivadas de rhabdomiocitos de ratón y de carcinoma de pulmón humano, indican que la alteración de la función mitocondrial puede activar mecanismos de señalización retrógrada que favorecen la invasividad tumoral e inducen la expresión de distintos marcadores tumorales específicos (Amuthan *et al.*, 2002; Amuthan *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 1999). Algunos estudios indican también que estas rutas de señalización retrógrada podrían estar implicadas en la aparición de resistencia a distintos fármacos antitumorales (Ling *et al.*, 2012; Pillay *et al.*, 1998), por lo que la presencia de alteraciones en el ADNmt modificaría la respuesta al tratamiento con quimioterapia.

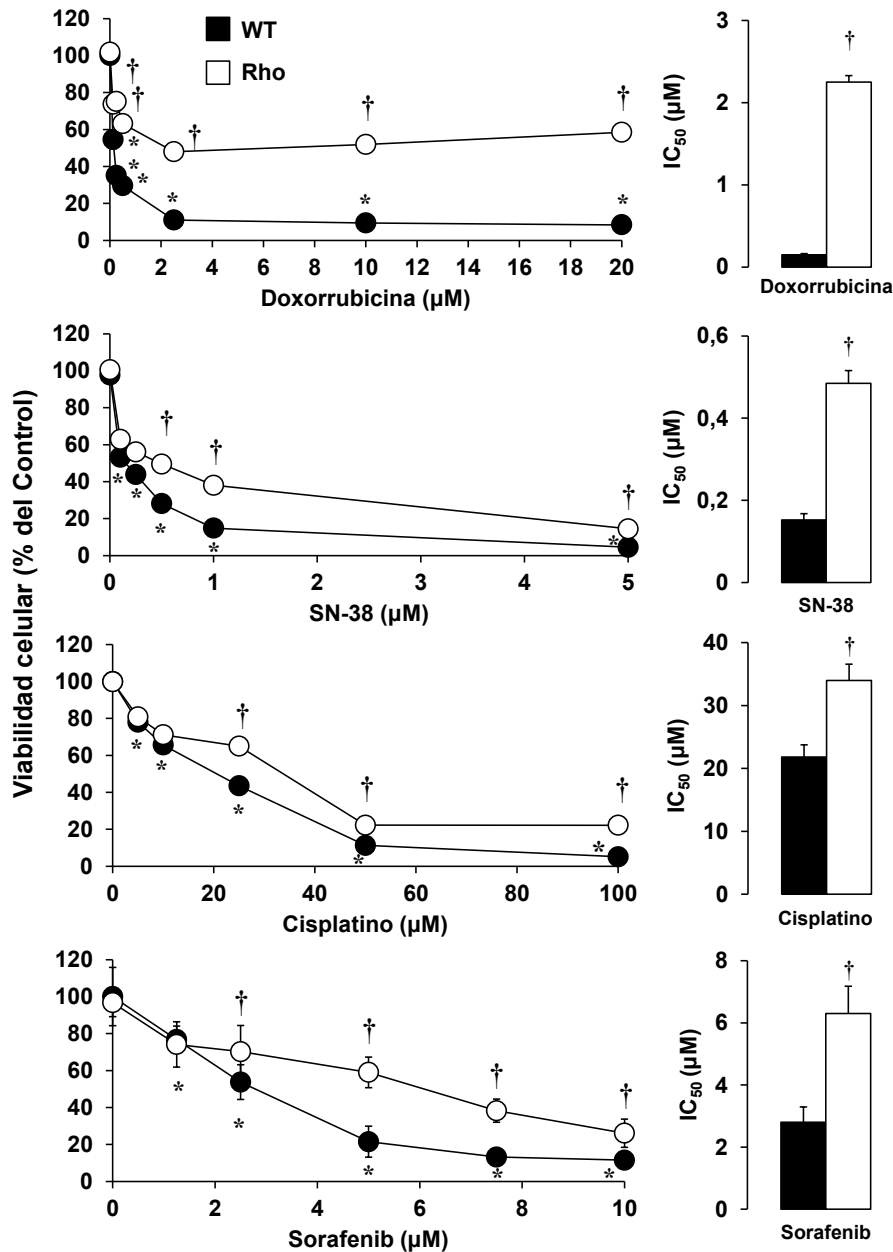
Ya que la alteración de la función mitocondrial, ocasionada por la presencia de mutaciones en el genoma de este orgánulo, puede modificar distintas rutas de señalización



retrógrada y favorecer el desarrollo de resistencia al tratamiento con fármacos antitumorales, nos planteamos como objetivo determinar el papel del genoma mitocondrial en la regulación de la expresión de diversos genes implicados en la resistencia a la quimioterapia en HCC.

#### 4.2.1. Sensibilidad de las células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> a la muerte celular inducida por distintos agentes citostáticos

Para analizar si la ausencia de ADNmt modifica la resistencia a la toxicidad inducida por distintos agentes antitumorales utilizamos la sublínea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> y su línea parental SK-Hep-1 derivada de HCC.



**Figura RD30.** Efecto de la doxorrubicina, el SN-38, el cisplatino y el sorafenib sobre la viabilidad de células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> tratadas con dosis crecientes de estos fármacos durante 48 h. La viabilidad celular se determinó mediante el test del rojo neutro. La IC<sub>50</sub> se definió como la concentración de fármaco requerida para reducir la viabilidad celular al 50%. Los valores representan la media ± EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*, p<0,05, respecto a las células WT sin tratar; † p<0,05 al comparar las células Rho<sup>0</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Entre los múltiples fármacos que se han investigado para el tratamiento del HCC seleccionamos cuatro: la doxorrubicina, el SN-38 (metabolito activo del irinotecán), el cisplatino y el sorafenib, atendiendo a su frecuente inclusión en los regímenes de quimioterapia utilizados frente a este tipo de tumores, (Marin *et al.*, 2010). Además, en el caso de la doxorrubicina y el cisplatino, estos fármacos cuentan con el interés adicional de que se ha descrito que su efectividad es menor en células deficientes en ADNmt (Ling *et al.*, 2012).

Tras la exposición a dosis crecientes de estos fármacos durante 48 h se observó que las células Rho<sup>0</sup> presentaban una mayor resistencia a la muerte inducida por todos estos compuestos (Figura RD30). Este efecto se vio reflejado en un aumento de la IC<sub>50</sub> de estas células frente a los distintos fármacos (Figura RD30).

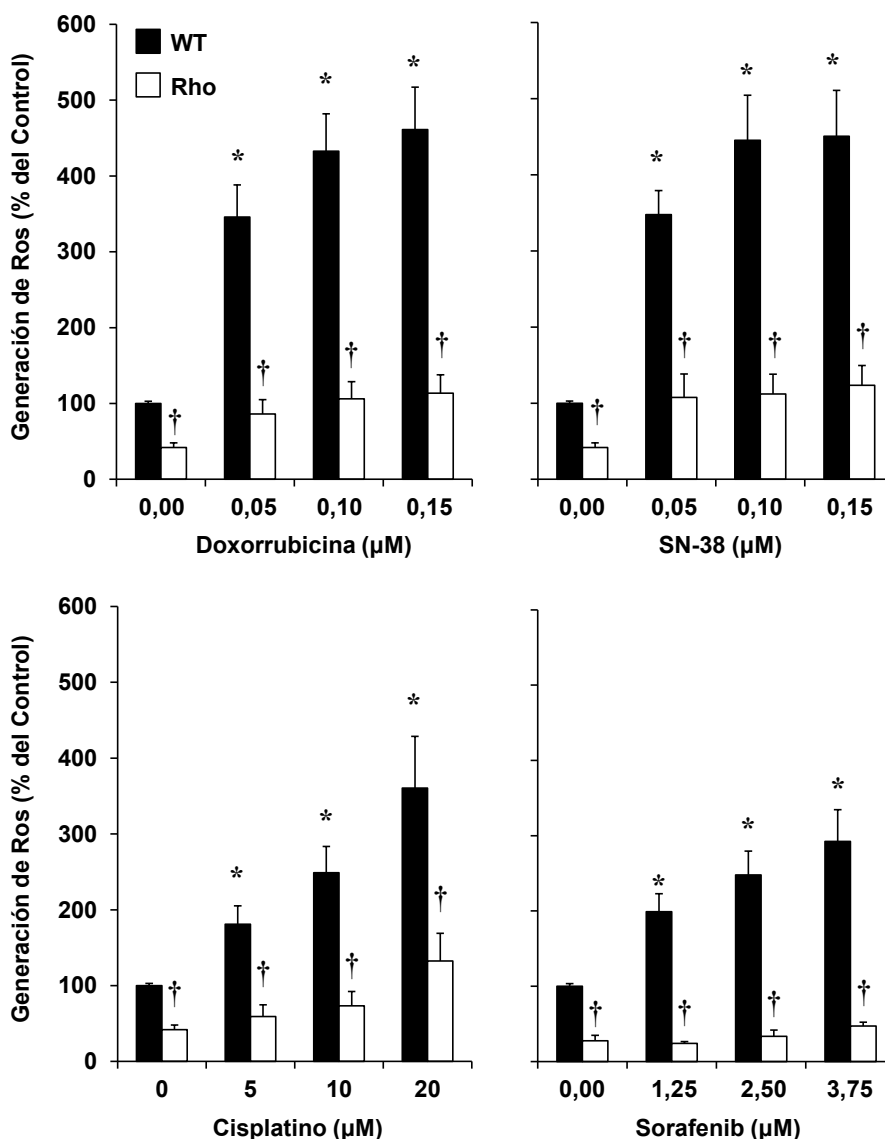
#### 4.2.2. Producción de ROS en células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> tratadas con distintos agentes citostáticos

A pesar de las diferencias en los mecanismos de acción de los fármacos antitumorales incluidos en este estudio, todos ellos tienen como característica común la capacidad para inducir situaciones de estrés oxidativo (Block *et al.*, 2008; Chiou *et al.*, 2009). Por ello, analizamos la generación de ROS en las células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> en respuesta al tratamiento con estos compuestos durante 48h.

Como se observa en la Figura RD31, el tratamiento con los distintos fármacos antitumorales indujo un aumento en la generación de ROS en ambas líneas celulares, aunque en todos los casos este aumento fue mayor en las células WT que en las Rho<sup>0</sup>. Especialmente destacado fue el aumento de los niveles de ROS en respuesta al tratamiento con doxorrubicina y SN-38.

Aunque tradicionalmente la generación de ROS promovida por estos agentes antitumorales se ha relacionado con la aparición de efectos secundarios no deseados, estudios recientes indican que también podría estar implicada en los procesos de muerte celular desencadenados por el tratamiento con estos fármacos. En el caso de la doxorrubicina, el cisplatino y el sorafenib, el aumento en los niveles de ROS se ha relacionado con un aumento en la tasa de apoptosis (Berndtsson *et al.*, 2007; Chiou *et al.*, 2009; Malhi *et al.*, 2012) mientras que en el caso del irinotecán parece aumentar el daño oxidativo en el ADN (Attia, 2012), que finalmente conduce a la muerte de las células tumorales.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que la menor generación de ROS detectada en las células Rho<sup>0</sup>, tanto en situaciones basales como en respuesta al tratamiento con los distintos agentes antitumorales, podría contribuir al aumento de la resistencia de esta línea celular a la muerte inducida por estos fármacos. Como se describe en otros apartados de este trabajo de Tesis Doctoral, hemos obtenido resultados muy similares con el AGQDC en esta misma línea celular y con este AB y paracetamol en las células Hepa 1-6 Rho<sup>0</sup>.



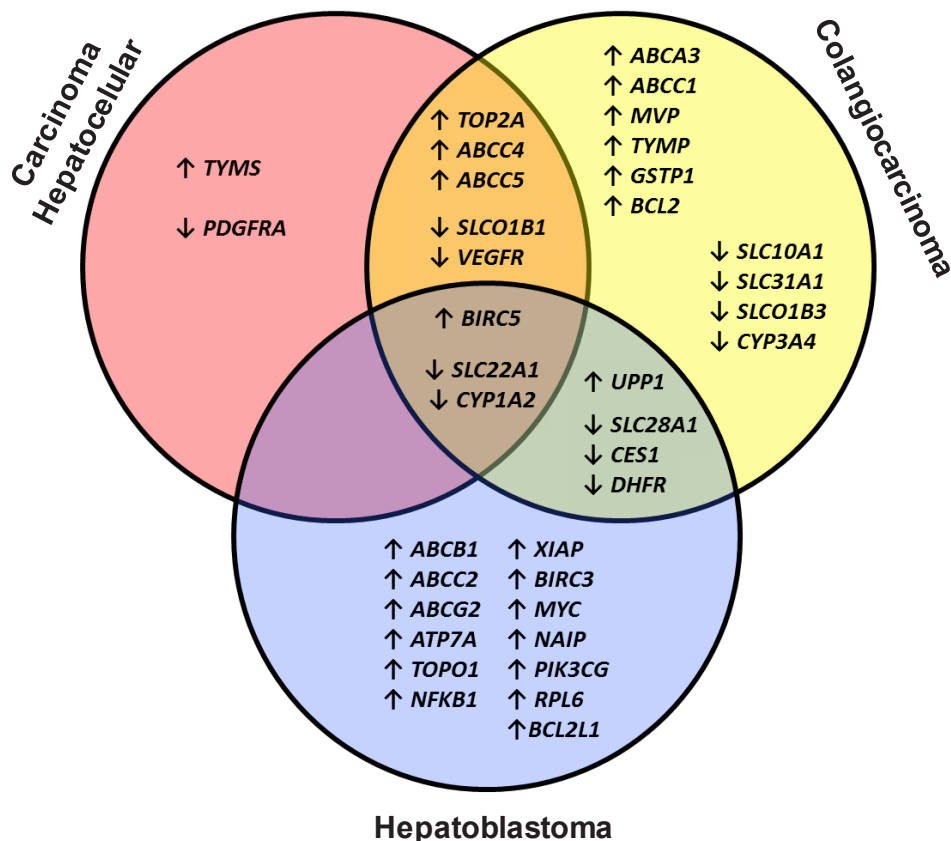
**Figura RD31.** Estudio de la generación de ROS en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> tratadas con dosis crecientes de doxorubicina, SN-38, cisplatino y sorafenib durante 48 h. Los niveles de ROS se determinaron mediante citometría de flujo utilizando diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Los valores representan la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , respecto a las células WT sin tratar; †  $p < 0,05$  al comparar las células Rho<sup>0</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

#### 4.2.3. Estudio de la expresión de genes implicados en resistencia a la quimioterapia en células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>

En un estudio reciente publicado por nuestro grupo de investigación (Martínez-Becerra *et al.*, 2012) se analizaron, mediante tarjetas microfluídicas (TLDA, del inglés “Taqman Low Density Arrays”), los niveles de expresión de 90 genes implicados en MOCs relacionados con tumores hepáticos, con el objetivo de desarrollar un test para predecir la falta de respuesta a la quimioterapia antitumoral. La expresión de estos genes se analizó en muestras pareadas de tejido sano y tejido tumoral, procedentes de pacientes con HCC, colangiocarcinoma y hepatoblastoma que no habían sido tratados previamente y a los que se hicieron biopsias con fines diagnósticos, y también en líneas celulares humanas derivadas de cada uno de estos tipos de tumores.

A pesar de que el análisis de estas muestras mostró una considerable heterogeneidad en la firma genética de los diferentes individuos, también se observaron ciertas tendencias a la sobreexpresión o represión de determinados genes, que se encontraron en todos los tipos de tumores hepáticos estudiados (Figura RD32).

En el caso concreto del HCC se detectaron cambios de expresión en 10 genes, que podrían contribuir al desarrollo de resistencia a la quimioterapia. Estos cambios incluían la reducción en los niveles de expresión de transportadores de captación (*SLC22A1* y *SLCO1B1*), el aumento de la expresión de proteínas ABC (*ABCC4* y *ABCC5*), la reducción de los niveles de expresión de la enzima implicada en la activación de profármacos *CYP1A2*, cambios en los niveles de expresión de dianas moleculares como *TOP2A* (topoisomerasa 2A), *PDGFRA* (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa), *VEGFR* (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular) y *TYMS* (timidilato sintasa), y una marcada sobreexpresión del gen antiapoptótico *BIRC5* (Figura RD31).



**Figura RD32.** Esquema de los perfiles de expresión de distintos genes implicados en el fenotipo MDR en diferentes tipos de tumores hepáticos

Basándonos en estos resultados, decidimos analizar los niveles de expresión de estos genes en la línea celular SK-Hep-1. Además, incluimos en nuestro estudio otros genes de resistencia como *ABCB1* (MDR1) y *ABCC1* (MRP1), cuya expresión se ha encontrado aumentada en estudios previos realizados en células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> (Ling *et al.*, 2012) y *ABCC2* (MRP2), uno de los genes más destacados en el desarrollo de resistencia al cisplatino (Nies y Keppler, 2007; Zollner *et al.*, 2005).

**Tabla RD2.** Estudio de los niveles basales de expresión de genes implicados en la resistencia a la quimioterapia en HCC en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup>.

Gen	Hígado humano	SK-Hep-1 WT	Abundancia de ARNm (% hígado humano)	
	(Ct)	(Ct)	WT	Rho
<i>ABCB1</i>	23	32	0,08	1,7
<i>ABCC1</i>	26	22	109	188
<i>ABCC2</i>	20	21	7,67	8,98
<i>ABCC4</i>	26	20	1265	875
<i>ABCC5</i>	24	24	9,35	8,72
<i>BIRC5</i>	31	19	39651	27748
<i>CYP1A2</i>	17	36	<0,01	<0,01
<i>PDGFRA</i>	24	32	0,05	0,03
<i>SLCO1B1</i>	23	33	0,01	0,01
<i>SLC22A1</i>	18	31	<0,01	<0,01
<i>TOP2A</i>	31	19	46504	49918
<i>TYMS</i>	28	19	4013055	4059377
<i>VEGFR</i>	23	ND	ND	ND

Los valores del ciclo umbral (Ct) de expresión y la abundancia de ARNm se determinaron mediante RT-QPCR.

Los resultados obtenidos indicaron que la ausencia de genoma mitocondrial indujo la expresión de *ABCB1* (MDR1) y *ABCC1* (MRP1), pero redujo los niveles de expresión de otro de los miembros de la subfamilia ABCC, en concreto *ABCC4* (MRP4), mientras que la expresión de *ABCC2* (MRP2) y *ABCC5* (MRP5) sólo se modificó ligeramente. Los niveles de expresión de los transportadores de captación analizados *SLCO1B1* (OATP1B1) y *SLC22A1* (OCT1), resultaron ser muy bajos en ambas líneas celulares, al igual que ocurría con la enzima *CYP1A2*.

Los niveles de expresión de *TOP2A* y *TYMS* eran muy superiores a los detectados en hígado, tanto en células SK-Hep-1 WT como en células Rho<sup>0</sup>, aunque la expresión de estos dos genes apenas difería en estas líneas celulares. La expresión de *VEGFR* no se detectó en ninguno de los dos tipos celulares, mientras que los niveles de expresión de *PDGFRA*, aunque detectables en ambas líneas celulares, eran muy inferiores a los detectados en hígado humano.

Sorprendentemente, la expresión del gen antiapoptótico *BIRC5* (que codifica la proteína survivina), cuyos niveles de expresión en las dos líneas celulares eran muy superiores a los detectados en hígado humano, parecía estar reducida en las células Rho<sup>0</sup>.

#### 4.2.4. Efecto del tratamiento con agentes citostáticos sobre la expresión de genes de resistencia en células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el apartado anterior decidimos analizar como afectaba el tratamiento con doxorrubicina, SN-38, cisplatino y sorafenib a la expresión de las proteínas transportadoras MDR1, MRP1 y MRP2, cuyos niveles de ARNm se encontraron aumentados en mayor o menor medida en las células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>. Además, analizamos el efecto del tratamiento con estos fármacos sobre la expresión de MRP4 y survivina ya que, a pesar de su implicación en mecanismos de quimiorresistencia, presentaban una menor expresión en esta línea celular

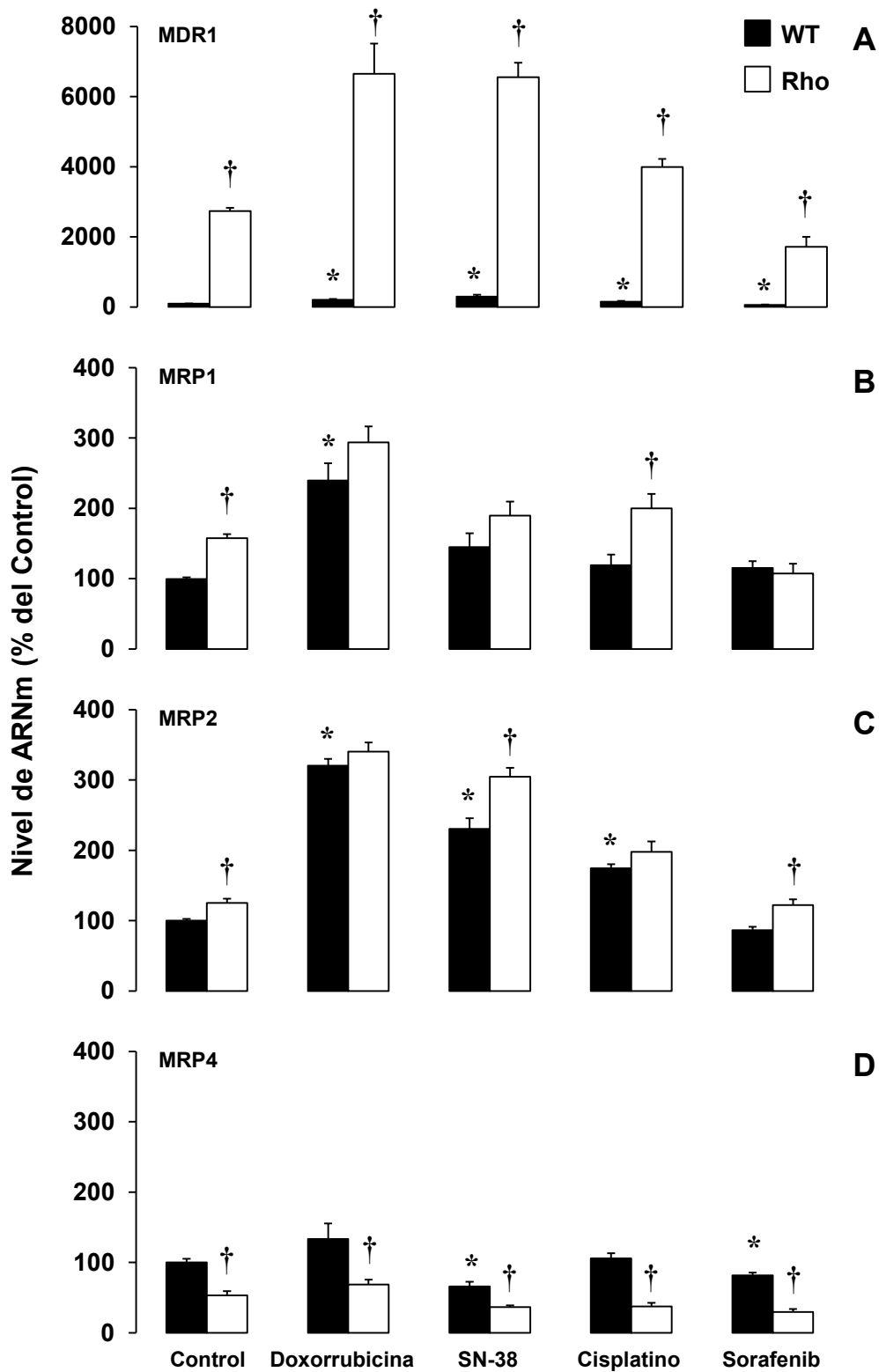
Para llevar a cabo este estudio, las células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> se incubaron en presencia de doxorrubicina (0,05  $\mu$ M), SN-38 (0,05  $\mu$ M), cisplatino (5  $\mu$ M) o sorafenib (1,25  $\mu$ M) durante 48 h y los niveles de expresión de las distintas proteínas de resistencia se determinaron mediante RT-QPCR. La dosis ensayada para cada uno de los fármacos antitumorales se seleccionó atendiendo a los resultados obtenidos en los apartados 4.2.2. y 4.2.3 que indicaban que, a pesar de que su efecto sobre la viabilidad celular no era muy marcado (ver Figura RD30), podían aumentar de forma significativa los niveles de ROS (ver Figura RD31) y probablemente desencadenar así la activación de mecanismos de defensa celular.

##### A. Proteínas ABC (MOC-I)

En primer lugar, analizamos la expresión de los distintos miembros de la superfamilia ABC seleccionados mediante RT-QPCR (Figura RD33).

Los resultados obtenidos indicaban que el tratamiento con doxorrubicina, SN-38 y cisplatino inducía la expresión de MDR1 en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup>, aunque en todos los casos la inducción fue mayor en las células desprovistas de ADNmt, en las que los niveles basales de expresión de MDR1 eran mayores a los detectados en las células WT (Figura RD33-A). El tratamiento con sorafenib no sólo no indujo la expresión de este transportador sino que redujo de forma significativa sus niveles de ARNm en las dos líneas celulares estudiadas (Figura RD33-A).

Al igual que ocurría con MDR1, la expresión basal de MRP1 era mayor en las células Rho<sup>0</sup> (Figura RD33-B). La expresión de este transportador aumentó de forma significativa en ambas líneas celulares en respuesta al tratamiento con doxorrubicina, mientras que la exposición a cisplatino sólo indujo un aumento en la expresión de MRP1 en las células Rho<sup>0</sup> (Figura RD33-B). El tratamiento con SN-38 no modificó los niveles de ARNm de MRP1 en ninguna de las dos líneas celulares, mientras que la exposición a sorafenib redujo la expresión de este transportador sólo en las células Rho<sup>0</sup> (Figura RD33-B).



**Figura RD33.** Niveles relativos de ARNm de MDR1, MRP1, MRP2 y MRP4 en células SK-Hep1 WT y Rho<sup>0</sup> tratadas con doxorubicina, SN-38, cisplatino y sorafenib durante 48 h. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-QPCR. Los resultados se expresan como porcentaje de expresión con respecto a células SK-Hep-1 WT sin tratamiento. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$  respecto a las células sin tratamiento; †  $p < 0,05$  al comparar las células Rho<sup>0</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.



Los niveles basales de MRP2 en las células Rho<sup>0</sup> también eran ligeramente superiores a los detectados en las células WT y aumentaron en respuesta a la doxorrubicina, el SN-38 y el cisplatino en ambas líneas celulares, siendo la respuesta al tratamiento con SN-38 mayor en las células Rho<sup>0</sup> (Figura RD33-C). En respuesta al sorafenib, la expresión de MRP2 se redujo ligeramente aunque no de forma significativa en las células WT, y no se modificó en las células Rho<sup>0</sup> (Figura RD33-C).

En cuanto a MRP4, los resultados obtenidos indicaban que en las células Rho<sup>0</sup> los niveles de expresión de este transportador eran menores a los detectados en las células WT y no se modificaron en respuesta al tratamiento con doxorrubicina, SN-38 o cisplatino aunque la exposición a sorafenib redujo aún más los niveles de expresión de este transportador en esta línea celular (Figura RD33-D). En las células WT, el tratamiento con SN-38 y sorafenib redujo de forma significativa los niveles de expresión de este transportador mientras que la doxorrubicina y el cisplatino no modificaron significativamente su expresión (Figura RD33-D).

Como se ha mencionado a lo largo de esta Tesis Doctoral, uno de los mecanismos de quimiorresistencia más importantes en tumores hepáticos es la sobreexpresión de proteínas ABC, implicadas en la reducción de la concentración intracelular del fármaco. El aumento en los niveles de expresión de estos transportadores da lugar al fenotipo MDR (“multidrug resistance”), caracterizado porque las células tumorales desarrollan resistencia a un amplio espectro de fármacos, con diferente estructura y mecanismo de acción, incluso a los que no habían sido expuestas anteriormente. En este sentido, un trabajo publicado recientemente indica que la sobreexpresión de proteínas ABC, en concreto MDR1 y MRP1, puede estar implicada en la resistencia a la muerte celular inducida por cisplatino y doxorrubicina en la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> (Ling *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que, además de la sobreexpresión de MDR1 y MRP1, la ausencia de ADNmt en esta línea celular puede inducir también la expresión de MRP2, aunque de forma moderada (Figura RD33-C), contribuyendo así al fenotipo MDR.

Aunque varios miembros de la superfamilia ABC participan en el desarrollo de resistencia a distintos fármacos antitumorales, MDR1 se ha considerado como el prototipo de proteína implicada en la aparición del fenotipo MDR. En su lista de sustratos se incluyen un gran número de fármacos antitumorales y el aumento de sus niveles de expresión se ha relacionado con el desarrollo de resistencia al tratamiento con doxorrubicina e irinotecán en HCC (Marin *et al.*, 2010). Como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión de este transportador se ha descrito en distintas líneas celulares tumorales deficientes en ADNmt y se ha relacionado con el desarrollo de resistencia a distintos fármacos (Ling *et al.*, 2012). Además del aumento en los niveles basales de expresión de MDR1 en la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>, nuestros resultados indicaban que la expresión de este transportador aumentaba en respuesta al tratamiento con doxorrubicina, SN-38 y cisplatino, en las células WT y de forma más acusada en las células Rho<sup>0</sup>. Este mayor aumento de los niveles de expresión de MDR1 detectado en las células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> podría ser uno de los mecanismos responsables de la reducción de la sensibilidad de esta línea celular a la toxicidad inducida por estos fármacos antitumorales.

Además de MDR1, distintos miembros de la subfamilia ABC desempeñan un papel destacado en la aparición de resistencia a la quimioterapia. Una de estas proteínas es MRP1 cuya sobreexpresión contribuye al desarrollo de resistencia a varios agentes antitumorales entre los que se incluyen la doxorubicina y el irinotecán (Marin *et al.*, 2010). El aumento en los niveles basales de este transportador en la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> también se ha relacionado con la resistencia de estas células a la toxicidad inducida por el tratamiento con cisplatino y doxorubicina (Ling *et al.*, 2012). Nuestros resultados obtenidos por RT-QPCR indicaban que la expresión de este transportador aumentaba de forma significativa en respuesta al tratamiento con doxorubicina en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup>. Aunque los niveles de MRP1 en las células Rho<sup>0</sup> tras el tratamiento con este fármaco eran mayores a los detectados en las células WT, esta diferencia no era significativa y no parecía contribuir a la resistencia de estas células a la toxicidad del tratamiento con doxorubicina. Sin embargo, el tratamiento con cisplatino indujo un aumento significativo en los niveles de expresión de este transportador en las células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> pero no en las WT. La inducción de MRP1 podría reducir de los niveles intracelulares de cisplatino en estas células deficientes en ADNmt y aumentar así su resistencia a la toxicidad inducida por este fármaco.

Otro de los miembros de la familia ABCC implicado en la resistencia a cisplatino, doxorubicina y SN-38 en pacientes con HCC es MRP2 (Marin *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en nuestro estudio indicaban que la exposición a estos tres fármacos antitumorales inducía la expresión de esta proteína transportadora en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup>, aunque sólo en respuesta al tratamiento con SN-38 los niveles de expresión de MRP2 fueron mayores en las células Rho<sup>0</sup> que en las WT. Por lo tanto, a pesar del destacado papel que MRP2 desempeña en el desarrollo de resistencia al tratamiento con cisplatino (Nies y Keppler, 2007; Zollner *et al.*, 2005), nuestros resultados indican que este transportador no parece estar implicado en la reducción de la sensibilidad a este fármaco antitumoral observada en la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>. Aunque MRP2 podría participar en los mecanismos de resistencia frente a la toxicidad del SN-38 en esta línea celular.

A pesar de que la expresión de MRP4 suele estar aumentada en pacientes con esta patología (Martinez-Becerra *et al.*, 2012), los niveles basales de expresión de este transportador en la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> eran menores a los detectados en su línea parental. Aunque se ha descrito que este transportador está asociado a la resistencia frente a SN-38 y cisplatino en HCC, la exposición de las líneas celulares SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> a estos agentes no estimuló la expresión de MRP4. En el caso de las células SK-Hep-1 WT el tratamiento con SN-38 redujo los niveles de ARNm de este transportador. Por tanto, estos resultados indicarían que MRP4 no participa en los mecanismos implicados en la quimiorresistencia de las células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> frente a la toxicidad de ninguno de estos fármacos.

El último de los fármacos analizados en nuestro estudio fue el sorafenib, un inhibidor de receptores tirosina quinasa cuya eficacia en el tratamiento del HCC se ha demostrado recientemente (Llovet *et al.*, 2008). Debido a su reciente incorporación al grupo de fármacos antitumorales, sus mecanismos de acción no se conocen con exactitud. Distintos estudios

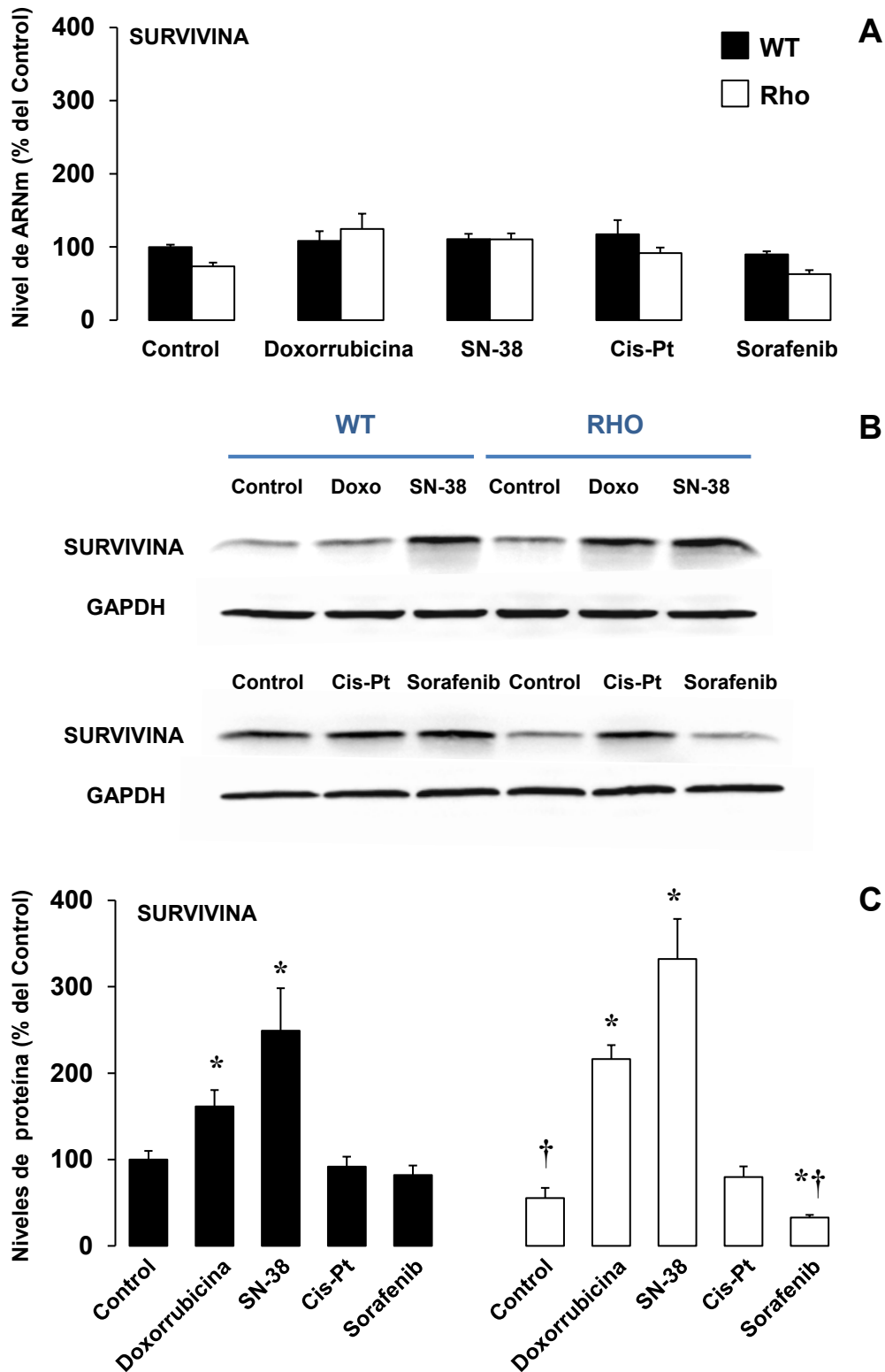
indican que parte de su eficacia en el tratamiento de este tipo de tumores podría deberse a su capacidad para revertir el fenotipo MDR, reduciendo la expresión de distintas proteínas ABC como MDR1 y MRP2 (Hoffmann *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2009). En nuestro estudio, el tratamiento con sorafenib redujo significativamente los niveles de ARNm de MDR1 y MRP4 en las células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> y MRP1 en las células Rho<sup>0</sup> (Figura RD33). Estos resultados sugieren que ninguna de estas proteínas ABC participa en los procesos de quimiorresistencia que contribuyen a reducir la sensibilidad de esta línea celular al tratamiento con este inhibidor de receptores tirosina quinasa.

## B. Survivina (MOC-V)

Además de la reducción de la concentración intracelular debida a la sobreexpresión de bombas de eflujo (MOCI-b), otro de los mecanismos más destacados en el desarrollo de resistencia a distintos agentes citostáticos es la modificación en el balance entre rutas de supervivencia y apoptosis. A menudo, este aumento en la supervivencia celular se debe a una disminución en la activación de la apoptosis. Entre los mecanismos que contribuyen a la reducción de la muerte celular por apoptosis se incluyen la activación de rutas de supervivencia, la pérdida de factores proapoptóticos o la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas entre las que se incluyen las IAPs (del inglés "Inhibitor of Apoptosis"). Una de estas IAPs es la survivina (gen *BIRC5*), cuyos niveles de expresión en hígado sano son muy reducidos pero que se encuentra sobreexpresada en HCC (Peroukides *et al.*, 2010). Este aumento en la expresión de survivina parece estar relacionado con un incremento en la capacidad proliferativa de este tipo de tumores. Puesto que el tratamiento con doxorubicina, SN-38, cisplatino y sorafenib puede inducir la muerte celular por apoptosis, la sobreexpresión de esta IAP podría contribuir a la resistencia frente a estos agentes antitumorales en la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>.

Para determinar el efecto del tratamiento con estos fármacos antitumorales sobre la expresión de survivina, sus niveles de ARNm se determinaron mediante RT-QPCR (Figura RD34-A). Los resultados obtenidos indicaban que en las células Rho<sup>0</sup> los niveles de expresión de esta proteína se encontraban ligeramente disminuidos. El tratamiento con los agentes citostáticos ensayados no modificó significativamente los niveles de ARNm de esta proteína.

En un estudio publicado recientemente, se ha descrito que el tratamiento con sorafenib no modifica los niveles de ARNm de survivina pero sí puede regular los niveles de proteína (Kim *et al.*, 2011). Por ello, decidimos analizar mediante WB los niveles de esta proteína en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> tratadas con doxorubicina, SN-38, cisplatino y sorafenib. Los resultados indicaban que los niveles basales de survivina se encontraban reducidos en las células Rho<sup>0</sup> y que el tratamiento con doxorubicina y SN-38 aumentaba los niveles de esta proteína en las dos líneas celulares estudiadas, aunque de forma más acusada en las células deficientes en ADNmt (Figura RD34-B y C). En las células Rho<sup>0</sup>, el tratamiento con cisplatino indujo de forma moderada la expresión de esta proteína mientras que la exposición a sorafenib la redujo (Figura RD34-B y C).



**Figura RD34.** Estudio de los niveles de expresión de Survivin en células SK-Hep1 WT y Rho<sup>0</sup> tratadas con doxorubicina, SN-38, cisplatino (Cis-Pt) y sorafenib durante 48 h. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-QPCR (A) y Western blot (B). Cuantificación de los niveles de proteína (C). Los resultados se expresan como porcentaje de expresión con respecto a las células SK-Hep-1 WT no tratadas de después de normalizar con la GAPDH. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$  respecto a las células sin tratamiento; †  $p < 0,05$  al comparar las células Rho<sup>0</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

El hecho de que la expresión de survivina se encuentre reducida en hígado sano y aumente en HCC la convierte en una posible diana terapéutica en este tipo de tumores. Por ello, se han desarrollado diversas estrategias dirigidas a reducir su expresión en células tumorales y aumentar así su sensibilidad al tratamiento con distintos agentes citostáticos. Estos estudios indican que la reducción en los niveles de expresión de survivina aumenta la sensibilidad de las células tumorales a la toxicidad inducida por el tratamiento con doxorubicina (Pyrko *et al.*, 2006), irinotecán (Pyrko *et al.*, 2006), cisplatino (Asechi *et al.*, 2010) y sorafenib (Kim *et al.*, 2011). Por tanto, de acuerdo con estos datos, nuestros resultados indicarían que el mayor aumento en los niveles de proteína de survivina detectado en la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> en respuesta al tratamiento con doxorubicina, SN-38 y cisplatino podría ser uno de los mecanismos responsables de la mayor resistencia a la muerte celular inducida por estos compuestos en las células Rho<sup>0</sup> aunque no contribuiría a reducir la sensibilidad de esta línea celular a la toxicidad inducida por la exposición a sorafenib.

Todos los resultados obtenidos en este apartado sugieren que la ausencia de genoma mitocondrial en la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> puede estimular distintos mecanismos de quimiorresistencia entre los que se incluyen la expresión de proteínas ABC y survivina, que reducen la sensibilidad a la muerte celular inducida por el tratamiento con doxorubicina, SN-38 y cisplatino. Sin embargo, ninguno de los mecanismos estudiados hasta el momento parece contribuir a la resistencia a la toxicidad inducida por el sorafenib observada en estas células.

#### **4.2.5. Efecto del tratamiento con agentes citostáticos sobre la regulación de la expresión de genes de resistencia en células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>**

Los resultados recogidos en el apartado anterior indican que la ausencia de genoma mitocondrial puede modificar la expresión de distintas proteínas transportadoras pertenecientes a la superfamilia ABC (Figura RD33). En la mayoría de los casos, los cambios de expresión observados podrían contribuir al aumento de la resistencia de las células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> a los agentes antitumorales ensayados mediante la reducción de su concentración intracelular. Por ello, quisimos profundizar en el estudio de los mecanismos mediante los que la alteración de la función mitocondrial puede contribuir a la modulación de la expresión de estas proteínas transportadoras en respuesta al tratamiento con fármacos antitumorales.

Puesto que los resultados obtenidos en el apartado 4.1.3 de esta Tesis Doctoral indicaban que la reducción de los niveles de ADNmt en la línea celular Hepa 1-6 modificaba la expresión y activación de algunos receptores nucleares y factores de transcripción implicados en procesos de quimiorresistencia, decidimos analizar como afectaba la ausencia total de ADNmt a la expresión de estas proteínas reguladoras.

**Tabla RD3.** Niveles basales de expresión de receptores nucleares (RN) y factores de transcripción (FT) implicados en quimiorresistencia en células SK-Hep1 WT y Rho<sup>0</sup>.

RN/FT	Hígado humano	SK-Hep-1 WT	Abundancia de ARNm (% hígado humano)	
	(Ct)	(Ct)	WT	Rho
CAR	24	ND	ND	ND
FXR	24	38,4	<0,01	<0,01
PXR	21	37,5	0,01	0,01
NRF2	23	21,33	43	57
KEAP1	28,6	25,5	69	32

Los valores del ciclo umbral (Ct) de expresión y la abundancia de ARNm se determinaron mediante RT-QPCR.

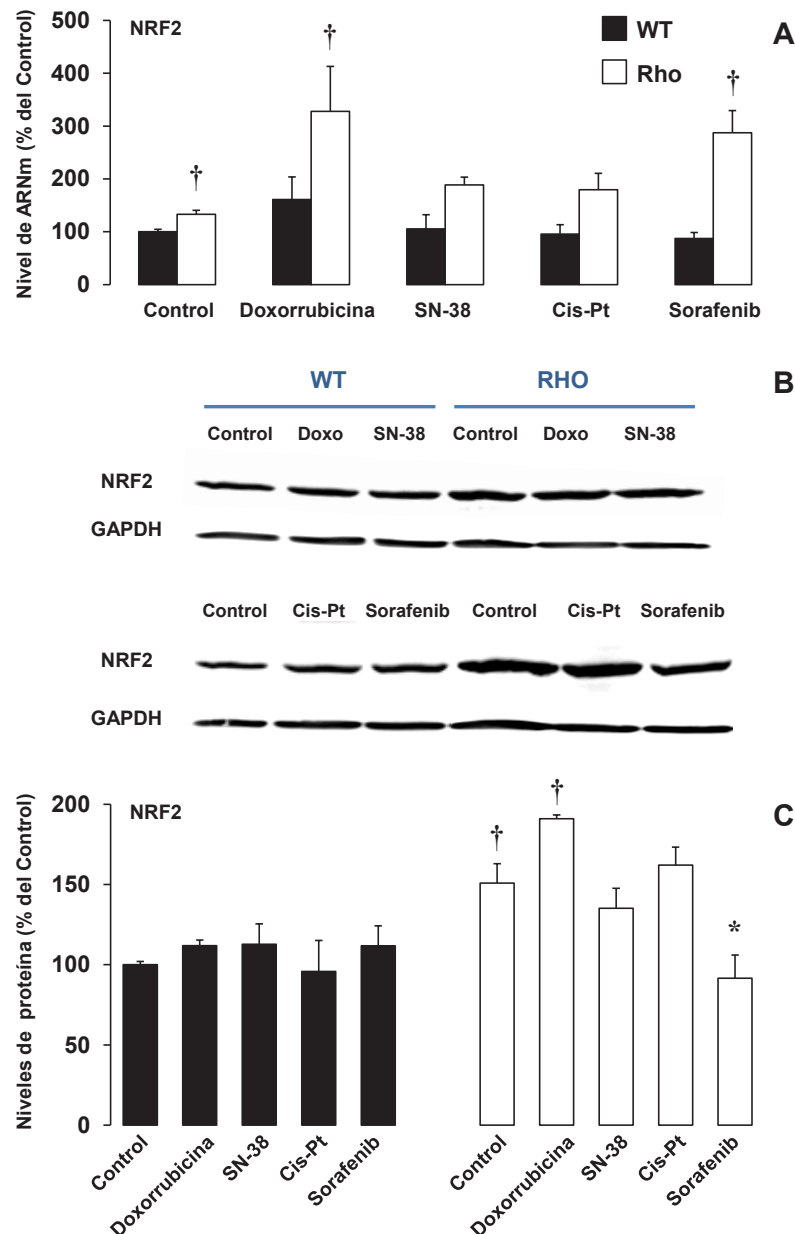
Los resultados obtenidos mediante RT-QPCR indicaban que la expresión del receptor nuclear CAR era indetectable tanto en las células SK-Hep-1 WT como en las Rho<sup>0</sup>, mientras que los niveles de expresión de PXR y FXR aunque detectables se encontraban muy reducidos en ambas líneas celulares en comparación con los niveles de hígado humano. Sin embargo, la expresión de NRF2 y su proteína represora KEAP1 era abundante en estas dos líneas celulares aunque menor que la detectada en hígado humano. En el caso de KEAP1 los niveles de expresión en las células Rho<sup>0</sup> eran menores a los detectados en las células WT, mientras que para NRF2 se observó el patrón opuesto.

Como se ha comentado a lo largo de esta Tesis Doctoral, NRF2 es un factor de transcripción que participa en la regulación de una amplia batería de genes implicados en mecanismos de defensa celular entre los que se encuentran distintas proteínas ABC. A pesar de su destacado papel en la activación de distintos mecanismos de protección celular, varios estudios publicados en los últimos años indican que NRF2 podría participar también en procesos de carcinogénesis (Bryan *et al.*, 2013). De hecho, su expresión se ha encontrado aumentada en distintos tipos de tumores en los que parece contribuir al desarrollo de esta enfermedad mediante la estimulación de la proliferación celular. Además, el aumento de su expresión en las células tumorales parece estar implicado en el desarrollo de resistencia al tratamiento con distintos agentes antitumorales (Sebens *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos analizar el efecto del tratamiento con doxorrubina, SN-38, cisplatino y sorafenib sobre la expresión de este factor de transcripción en las células SK-Hep1 WT y Rho<sup>0</sup> mediante RT-QPCR y WB (Figura RD35). Los resultados obtenidos indicaban que los niveles basales de ARNm y proteína de NRF2 estaban aumentados en las células Rho<sup>0</sup> (Figura RD35). Tras el tratamiento con los distintos fármacos antitumorales durante 48 h se observó un aumento de los niveles de ARNm de este



factor de transcripción en las células Rho<sup>0</sup>, especialmente en respuesta a la doxorrubicina y el sorafenib, mientras que en las células WT sólo se observó un aumento de la expresión de NRF2 tras la exposición a la doxorrubicina (Figura RD35-A) que además, fue menor al observado en las células Rho<sup>0</sup>. El análisis de los niveles de proteína de NRF2 mediante WB indicaba que la expresión de este factor de transcripción era mayor en las células Rho<sup>0</sup> que en las células WT tratadas con doxorrubicina, SN-38 y cisplatino. Sin embargo, mientras que en las células SK-Hep-1 WT el tratamiento con sorafenib apenas aumentó la expresión de esta proteína reguladora, la exposición a este fármaco la redujo marcadamente en las células Rho<sup>0</sup> (Figura RD35-B y C).



**Figura RD35.** Estudio de los niveles de expresión de NRF2 en células SK-Hep1 WT y Rho<sup>0</sup> tratadas con doxorrubicina, SN-38, cisplatino y sorafenib durante 48 h. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-QPCR (A) y Western blot (B). Cuantificación de los niveles de proteína (C). Los resultados se expresan como porcentaje de expresión con respecto a las células SK-Hep-1 WT no tratadas de después de normalizar con la GAPDH. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$  respecto a las células sin tratamiento;  $\dagger p < 0,05$  al comparar las células Rho<sup>0</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.



Los datos obtenidos tanto por RT-QPCR como por WB sugieren que la ausencia de ADNmt induce la expresión de NRF2, un factor de transcripción que durante mucho tiempo se ha incluido en el grupo de proteínas reguladoras cuya actividad podría estar modulada por mecanismos de señalización retrógrada.

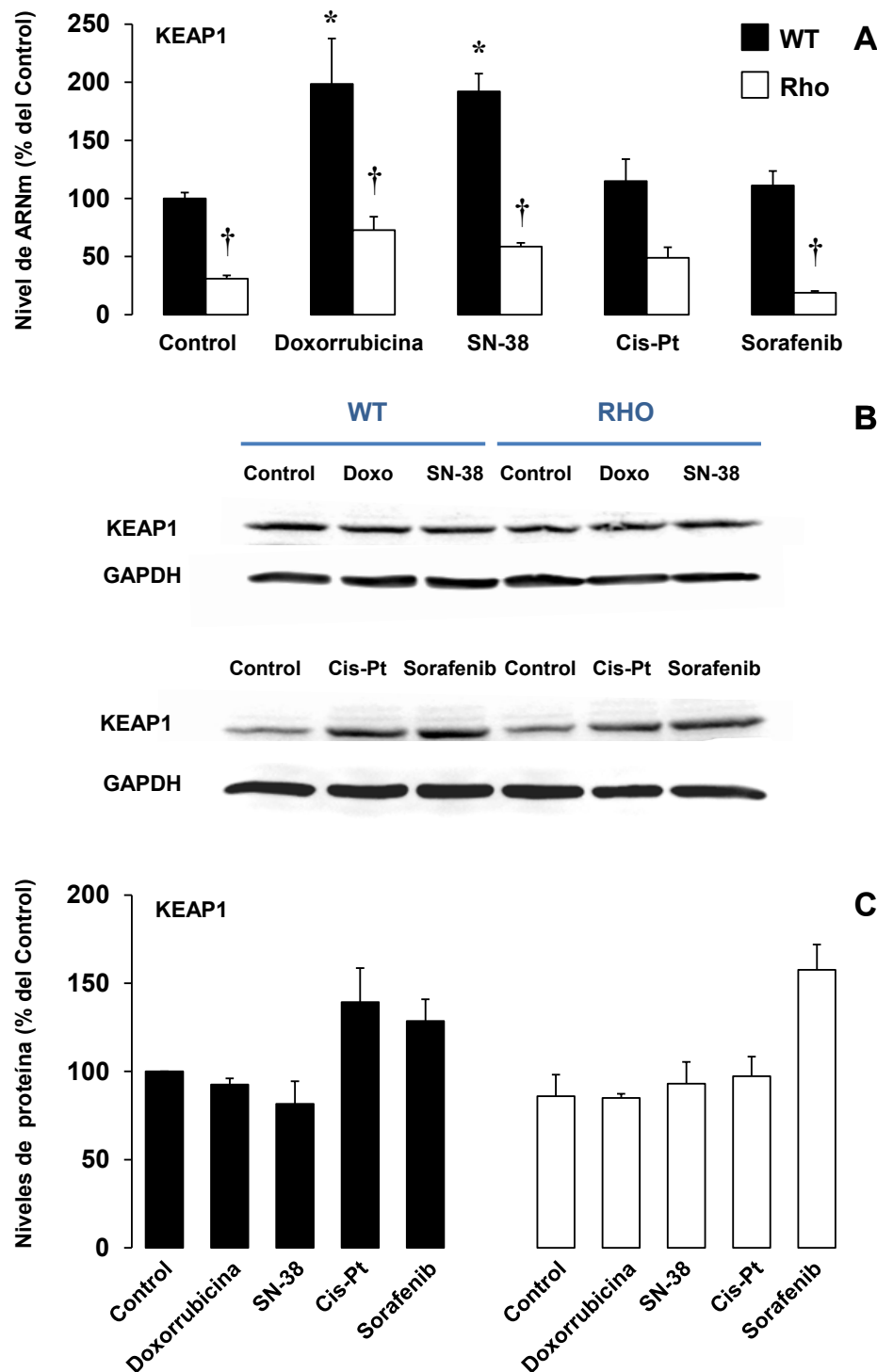
El aumento de los niveles de expresión de NRF2 observado en la línea celular Rho<sup>0</sup> podría ser uno de los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencia al tratamiento con los distintos fármacos incluidos en este estudio. Se ha descrito que la sobreexpresión de este factor de transcripción aumenta la resistencia a la muerte celular inducida por doxorubicina y cisplatino en células tumorales, mientras que la inhibición de su expresión mediante el uso de ARN de interferencia o la inducción de los niveles de expresión de su proteína represora KEAP1 aumenta la sensibilidad de las células al efecto tóxico de estos agentes citostáticos (Lee *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2008).

La mayor expresión de este factor de transcripción en las células Rho<sup>0</sup> también podría contribuir a la resistencia a la toxicidad inducida por el SN-38, ya que en un estudio reciente se ha descrito que la tasa de apoptosis inducida por el tratamiento con irinotecán es menor en células que sobreexpresan NRF2 (Sebens *et al.*, 2011).

En nuestro estudio, los resultados de RT-QPCR obtenidos en las células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> tratadas con sorafenib mostraban un aumento de los niveles de ARNm de este factor de transcripción. Sin embargo, los niveles de proteína eran menores a los encontrados en las células no tratadas. Nuestros resultados de WB coinciden con los datos recogidos en la bibliografía, que indican que el tratamiento con sorafenib puede reducir los niveles de expresión de NRF2 (Zhou *et al.*, 2013). Puesto que NRF2 participa en procesos celulares muy importantes, existen múltiples mecanismos implicados en la modulación de su expresión (Bryan *et al.*, 2013). En los últimos años se han descrito varios sistemas de regulación postranscripcional que reducen los niveles de proteína NRF2, como la acción de distintos micro ARNs o la fosforilación de ciertos residuos aminoacídicos de su estructura que hacen que aumente su tasa de degradación (Bryan *et al.*, 2013). La activación de estos mecanismos de regulación podría explicar la discrepancia entre los niveles de ARNm y proteína de NRF2 detectada en nuestro estudio.

Aunque existen distintos mecanismos que regulan los niveles de expresión de NRF2, el más conocido de todos ellos es la unión a la proteína KEAP1 (Itoh *et al.*, 1999), tras la cual este factor de transcripción queda retenido en el citoplasma y es posteriormente degradado en el proteasoma. Uno de los resultados más destacados obtenidos en nuestro análisis de los niveles basales de expresión de proteínas reguladoras en las células SK-Hep1 WT y Rho<sup>0</sup> (Tabla RD3) fue la marcada reducción de la expresión de KEAP1 en la línea celular desprovista de ADNmt. Este fenómeno podría dar lugar a una disminución de la degradación de NRF2 y podría explicar el aumento de los niveles de expresión detectado en estas células (Figura RD35).

Para analizar el efecto del tratamiento con agentes antitumorales sobre la expresión de este represor de NRF2, se analizaron sus niveles de ARNm y proteína en las células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> tras 48 h de exposición a doxorrubicina, SN-38, cisplatino y sorafenib.



**Figura RD36.** Estudio de los niveles de expresión de KEAP1 en células SK-Hep1 WT y Rho<sup>0</sup> tratadas con doxorrubicina, SN-38, cisplatino y sorafenib durante 48 h. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-QPCR (A) y Western blot (B). Cuantificación de los niveles de proteína (C). Los resultados se expresan como porcentaje de expresión con respecto a las células SK-Hep-1 WT no tratadas de después de normalizar con la GAPDH. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$  respecto a las células sin tratamiento; †  $p < 0,05$  al comparar las células Rho<sup>0</sup> con las células WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Como se observa en la Figura RD36-A el tratamiento con doxorubicina y SN-38 indujo la expresión de KEAP1 en células WT. En las células Rho<sup>0</sup>, en las que los niveles basales de ARNm de KEAP1 se encontraban reducidos, también se observó un aumento en su expresión en respuesta al tratamiento con doxorubicina, SN-38 y cisplatino. Sin embargo, en respuesta al tratamiento con sorafenib se produjo una caída en los niveles de ARNm de KEAP1 en esta línea celular.

A pesar de los resultados obtenidos mediante RT-QPCR, el análisis de los niveles de proteína de KEAP1 mediante WB indicaba que la reducción en los niveles basales de expresión de este represor en células Rho<sup>0</sup> no era tan marcada como la observada en ARNm (Figura RD36-B y C). Además, el tratamiento con doxorubicina y SN-38 no aumentó los niveles de expresión de KEAP1 en ninguna de las dos líneas celulares estudiadas, aunque sí lo hizo el tratamiento con cisplatino en las células WT (Figura RD36-B y C). La exposición de las células WT y Rho<sup>0</sup> a sorafenib aumentó los niveles de expresión de KEAP1 en ambas líneas celulares aunque el aumento fue mucho mayor en la línea celular desprovista de ADNmt (Figura RD36-B y C). La marcada inducción de la expresión de KEAP1 en respuesta a este fármaco podría explicar la caída en los niveles de expresión de NRF2 observada en las células Rho<sup>0</sup> tratadas con este inhibidor de receptores tirosina quinasa (Figura RD35).

Todos estos resultados sugerían que, a pesar del aumento en los niveles de ARNm de KEAP1 en respuesta al tratamiento con distintos fármacos antitumorales, sus niveles de proteína en las células Rho<sup>0</sup> eran ligeramente inferiores a los detectados en las células WT y apenas se modificaron en respuesta al tratamiento con doxorubicina, SN-38 y cisplatino. Esta reducción en la expresión de KEAP1, aunque moderada, podría contribuir a la resistencia de las células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> a la muerte celular inducida por estos fármacos, ya que aumentaría los niveles de expresión de NRF2.

Sin embargo, también existen otros mecanismos que podrían explicar el aumento de expresión de NRF2 observado en las células Rho<sup>0</sup> en nuestro estudio, de forma independiente a los cambios de expresión de KEAP1. Recientemente se ha descrito que la activación de las rutas de señalización de MAPK y Akt puede aumentar la estabilidad de este factor de transcripción reduciendo su degradación (Bryan *et al.*, 2013). Como se recoge en el apartado 4.1.3.4 de esta Tesis Doctoral, nuestros resultados indican que en la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> la ruta de señalización de Akt se encuentra activada de forma constitutiva, por lo que éste podría ser uno de los mecanismos responsables de la sobreexpresión de NRF2 en estas células.

En resumen, los resultados obtenidos en este bloque experimental indican que la resistencia a la muerte celular inducida por el tratamiento con doxorubicina, SN-38 y cisplatino observada en las células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> presenta un origen multifactorial. En esta línea celular la ausencia de genoma mitocondrial reduce la generación de ROS, aumenta los niveles de expresión de distintas bombas de eflujo implicadas en la disminución de la concentración intracelular de distintos fármacos antitumorales, entre los que se incluyen

antraciclinas, camptotecinas y derivados de platino (Marin *et al.*, 2010), y del factor de transcripción, NRF2, que participa en la regulación de distintos mecanismos de defensa celular. Además, la ausencia de ADNmt estimula la expresión de genes de supervivencia, como la survivina, en respuesta al tratamiento con estos fármacos. Todos estos cambios observados en las células Rho<sup>0</sup> se han relacionado con el desarrollo de resistencia a la terapia antitumoral (DeNicola *et al.*, 2011; Marin *et al.*, 2010; Peroukides *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2008).

#### 4.2.6. Análisis de la expresión de genes implicados en el fenotipo MDR en HCC mediante TLDAs

**Tabla RD4.** Se muestran los genes incluidos en el análisis, clasificados en base a su papel en los mecanismos de quimiorresistencia (MOCs).

MOC-Ia	MOC-Ib	MOC-II	MOC-III	MOC-IV	MOC-Va	MOC-Vb
<i>SLC10A1</i>	<i>ABCA2</i>	<i>CES1</i>	<i>DHFR</i>	<i>DUT</i>	<i>AEG1</i>	<i>AKT1</i>
<i>SLC10A2</i>	<i>ABCA3</i>	<i>CES2</i>	<i>ESR2</i>	<i>ERCC1</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>
<i>SLCO1B1</i>	<i>ABCA6</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>FRAP1</i>	<i>GADD45A</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>BIRC5</i>
<i>SLCO1B3</i>	<i>ABCA8</i>	<i>CYP1A2</i>	<i>KDR</i>	<i>MLH1</i>	<i>BIRC2</i>	<i>BIRC7</i>
<i>SLCO2B1</i>	<i>ABCB1</i>	<i>CYP3A4</i>	<i>KIT</i>	<i>MLH3</i>	<i>BIRC3</i>	<i>CFLAR</i>
<i>SLCO4A1</i>	<i>ABCC1</i>	<i>DPYD</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>MSH2</i>	<i>CDKN1</i>	<i>EGFR</i>
<i>SLC22A1</i>	<i>ABCC2</i>	<i>GSTA1</i>	<i>TOP1</i>	<i>MSH6</i>	<i>DIABLO</i>	<i>JUN</i>
<i>SLC22A2</i>	<i>ABCC3</i>	<i>GSTP1</i>	<i>TOP2A</i>	<i>PMS1</i>	<i>FAS</i>	<i>MAPK1</i>
<i>SLC22A4</i>	<i>ABCC4</i>	<i>TYMP</i>	<i>TYMS</i>	<i>PMS2</i>	<i>PSMD9</i>	<i>MYC</i>
<i>SLC22A5</i>	<i>ABCC5</i>	<i>UGT1A</i>		<i>UDG</i>	<i>TP53</i>	<i>NAIP</i>
<i>SLC28A1</i>	<i>ABCC6</i>	<i>UMPS</i>		<i>XPA</i>		<i>NFKB1</i>
<i>SLC28A2</i>	<i>ABCC10</i>	<i>UPP1</i>		<i>XPC</i>		<i>PIK3CG</i>
<i>SLC28A3</i>	<i>ABCG2</i>	<i>UPP2</i>				<i>RPL6</i>
<i>SLC29A1</i>	<i>ATP7A</i>					<i>XIAP</i>
<i>SLC29A2</i>	<i>ATP7B</i>					
<i>SLC31A1</i>	<i>LRP</i>					

A pesar de que la línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> también presenta una mayor resistencia a la muerte celular inducida por el tratamiento con sorafenib, ninguno de los mecanismos mencionados anteriormente, a excepción de la reducción de la generación de ROS, parece estar implicado en la disminución de la sensibilidad de estas células a la toxicidad de este fármaco. Estos resultados sugieren que, además de todos los mecanismos de quimiorresistencia que hemos encontrado activados en estas células, la ausencia de genoma mitocondrial podría modificar la expresión de otros genes diana del sorafenib y aumentar así la resistencia al tratamiento con este fármaco antitumoral.

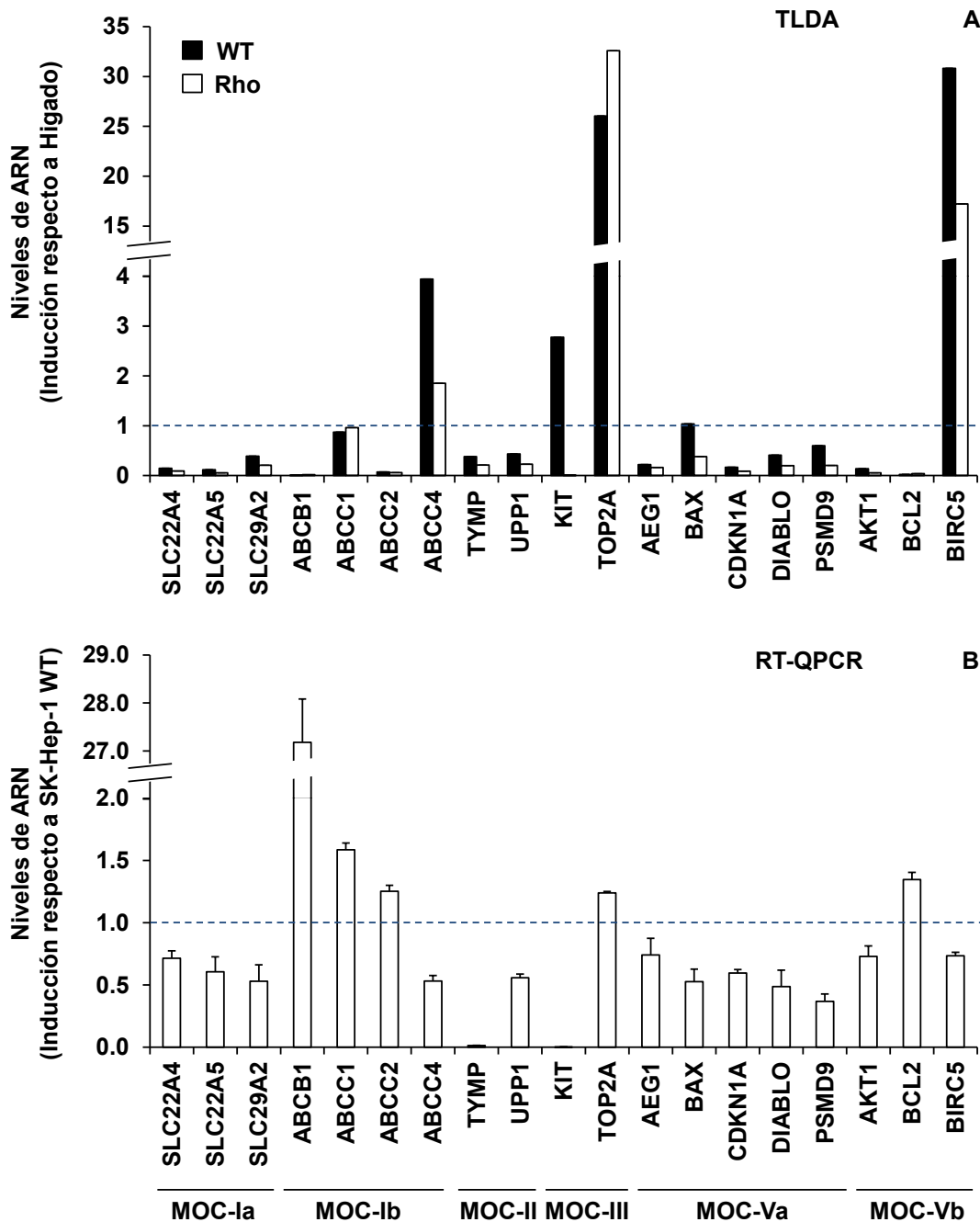
Para determinar qué mecanismos podrían estar implicados en la resistencia al sorafenib analizamos la expresión de 90 genes implicados en los distintos MOCs (Tabla RD4) en las células SK-Hep1 WT y Rho<sup>0</sup> mediante TLDA.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indicaron que, en las células Rho<sup>0</sup> la ausencia de ADNmt modificaba los niveles basales de expresión de varios genes implicados en estos MOCs. Además de confirmar los cambios encontrados en *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC4*, *BIRC5* y *TOP2A* (ver apartado 4.2.4), el análisis de los datos (Figura RD37) indicó que la expresión de los genes *SLC22A4*, *SLC22A5* y *SLC29A2*, incluidos en el MOC-Ia, *TYMP* y *UPP1*, pertenecientes al MOC-II, *KIT*, del MOC-III, y *AEG1*, *BAX*, *CDKN1A*, *DIABLO* y *PSMD9*, incluidos en el MOC-Va, se encontraba reducida en las células Rho<sup>0</sup>, mientras que los niveles de expresión de *BCL2*, incluido en el MOC-Vb eran superiores a los detectados en las células WT (Figura RD37). Todos estos cambios, que podrían contribuir a aumentar la resistencia de las células Rho<sup>0</sup> al tratamiento con distintos fármacos antitumorales, se comprobaron mediante RT-QPCR convencional (Figura RD37-B) en al menos tres experimentos.

Uno de los resultados más relevantes obtenidos en nuestro estudio fue la pérdida de la expresión de *KIT* en las células Rho<sup>0</sup>. Este gen codifica la proteína c-Kit, un receptor tirosina quinasa que promueve la activación de distintas rutas de señalización implicadas en supervivencia, migración y proliferación celular y cuya activación se ha relacionado con el desarrollo y la proliferación tumoral (Lennartsson y Ronnstrand, 2012). c-Kit es una de las principales dianas del sorafenib (Wilhelm *et al.*, 2006), ya que este fármaco inhibe su autofosforilación y por tanto la activación de las rutas de señalización en las que este receptor está implicado (Wilhelm *et al.*, 2006). Por ello, la pérdida de la expresión de este receptor tirosina quinasa en células Rho<sup>0</sup> podría contribuir a la resistencia a la toxicidad inducida por este fármaco en estas células.

Dado que el tratamiento con sorafenib puede inducir la muerte celular por apoptosis (Chiou *et al.*, 2009), la reducción de la expresión de los genes proapoptóticos *AEG1* (Metadherina), *BAX* (Bax- $\alpha$ ), *CDKN1A* (P21), *PSMD9* (P27) y *DIABLO* (Smac), junto con el aumento de la expresión del gen antiapoptótico *BCL2* (Bcl-2) detectados en las células Rho<sup>0</sup>, podrían modificar el balance apoptosis/supervivencia en estas células, contribuyendo así a reducir la sensibilidad de células Rho<sup>0</sup> a la muerte celular inducida por éste y otros fármacos antitumorales.

Recientemente se ha descrito que en células derivadas de HCC humano resistentes al sorafenib se observa una activación de la ruta de señalización PI3K/Akt (Chen *et al.*, 2011). En nuestro estudio, a pesar de la reducción de la expresión de *AKT1*, esta ruta de supervivencia se ha encontrado constitutivamente activada en las células Rho<sup>0</sup> (ver apartado 4.1.3.4), por lo que este mecanismo también podría contribuir a la resistencia a este fármaco antitumoral en esta línea celular.



**Figura RD37.** Estudio de los niveles basales de ARNm de genes implicados en quimiorresistencia en células SK-Hep-1 WT y Rho<sup>0</sup> determinados mediante TLDA (Taqman Low Density Arrays). Los valores se expresan como veces de inducción respecto a hígado sano (A). Confirmación de los resultados obtenidos mediante RT-QPCR convencional. Los valores se expresan como veces de inducción respecto a las células WT y son la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos (B). En ambas graficas se muestran únicamente los genes cuyos cambios de expresión podrían provocar un incremento de la quimiorresistencia de las células Rho<sup>0</sup>, o los genes que fueron medidos en experimentos previos del estudio.

Además de la identificación de distintos mecanismos que podrían explicar la resistencia al sorafenib en células Rho<sup>0</sup>, los resultados obtenidos en nuestro estudio también señalaron la presencia de cambios de expresión en genes que pueden participar en el desarrollo de resistencia a otros fármacos antitumorales. Así, en estas células la reducción de la expresión de las proteínas transportadoras OCTN1 (*SLC22A4*) y OCTN2 (*SLC22A5*), que participan en la captación de distintas antraciclinas (Marin *et al.*, 2010), podría contribuir a la resistencia a la toxicidad inducida por estos fármacos. Del mismo modo, la reducción de la expresión del transportador de nucleósidos ENT2 (*SLC29A2*) podría aumentar la resistencia de estas células al tratamiento con análogos de bases pirimidínicas (Marin *et al.*, 2010). La reducción de los niveles de expresión de los genes *TYMP* y *UPP1* que codifican la timidina fosforilasa y la subunidad 1 de la uridina fosforilasa, respectivamente, implicadas en la activación de profármacos, se ha relacionado con una mayor resistencia al tratamiento con 5-fluorouracilo (Marin *et al.*, 2010), por lo que la menor expresión de estas dos enzimas detectada en las células Rho<sup>0</sup> podría aumentar su resistencia a la toxicidad inducida por este fármaco.

En resumen, los resultados obtenidos en este bloque experimental indican que el genoma mitocondrial participa de forma destacada en la regulación de la expresión de un gran número de genes implicados en distintos MOCs. Por tanto, la presencia de alteraciones en el ADNmt puede activar varios mecanismos implicados en la resistencia a distintos agentes citostáticos, comprometiendo así el éxito de la terapia antitumoral.



### 4.3. PAPEL PROTECTOR DE LA BILIVERDINA Y LA BILIVERDINA REDUCTASA $\alpha$ FRENTE AL EFECTO TÓXICO DE COMPUESTOS OXIDANTES ENDÓGENOS Y XENOBIÓTICOS EN CÉLULAS HEPÁTICAS

La biliverdina (BV) se genera junto con hierro y monóxido de carbono (CO) en la degradación del grupo hemo en una reacción catalizada por la hemo-oxigenasa 1 (HO-1) (Ryter y Tyrrell, 2000). El principal producto de esta reacción es la BV IX $\alpha$ , que es convertida en bilirrubina (BR) IX $\alpha$  por la biliverdina reductasa  $\alpha$  (BVR $\alpha$ , gen *BLVRA*). Este proceso se lleva a cabo con una eficacia muy elevada, lo que hace que, en circunstancias fisiológicas, la concentración de BV detectada en suero sea muy baja (Feverly, 2008). Tras esta reacción, la BR, el producto final de la degradación de grupo hemo en la mayoría de los mamíferos, es captada por los hepatocitos y conjugada con ácido glucurónico para su posterior secreción a bilis (Feverly, 2008). Así, en situaciones de colestasis en las que se produce una reducción del flujo biliar y de la capacidad del hígado para eliminar la BR suele aparecer hiperbilirrubinemia.

Durante mucho tiempo la BV y la BR se han considerado meros productos de desecho del metabolismo del grupo hemo. Por lo que era un enigma que se hubiese seleccionado evolutivamente un proceso como la reducción de BV, un producto inocuo y fácilmente excretable, a BR, una sustancia de baja hidrosolubilidad, neurotóxica y que necesita ser metabolizada para su excreción, que supone un gasto de energía adicional y cuya ventaja fisiológica se desconocía. Sin embargo, esta biotransformación adquiere significado fisiológico si se tiene en cuenta que la BR a bajas concentraciones es un potente antioxidante que protege frente al daño oxidativo celular (Gourley, 1997). La existencia de un ciclo redox, mediado por la BVR $\alpha$ , en el que la BR se oxida a BV en presencia de ROS y luego se recicla a BR, podría explicar la elevada capacidad antioxidante de este pigmento (Baranano *et al.*, 2002). Además, recientemente se ha sugerido que la BVR $\alpha$  puede actuar como factor de transcripción regulando la expresión de la HO-1 (Kravets *et al.*, 2004). Este eficiente sistema antioxidante que consiste en el control del ciclo redox celular y la inducción de HO-1 por la BVR $\alpha$  puede fortificar la capacidad de la BR como una de las moléculas de defensa fisiológica más eficiente frente al estrés oxidativo celular. También existen estudios *in vitro* realizados recientemente que ponen en duda que este ciclo redox mediado por la BVR $\alpha$  juegue un papel importante como mecanismo de defensa antioxidante (Maghzal *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha demostrado que la BVR $\alpha$  también puede participar en procesos de señalización celular, la regulación de la expresión génica, el metabolismo, el crecimiento celular y la apoptosis (Kravets *et al.*, 2004; Lerner-Marmarosh *et al.*, 2005; Salim *et al.*, 2001).

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (Sanchez Vicente, 2009) en colaboración con el Dr. Nytofte, del Hospital Dronning Ingrid de Groenlandia, se describió la presencia de una mutación homocigótica sin sentido en la posición 214 del exón 3 (c.214C>A; pSer44X) del gen *BLVRA* en dos pacientes que habían sufrido episodios de colestasis obstructiva. Estas dos mujeres no estaban relacionadas entre sí y procedían de dos áreas geográficas diferentes de Groenlandia. La característica fenotípica más evidente

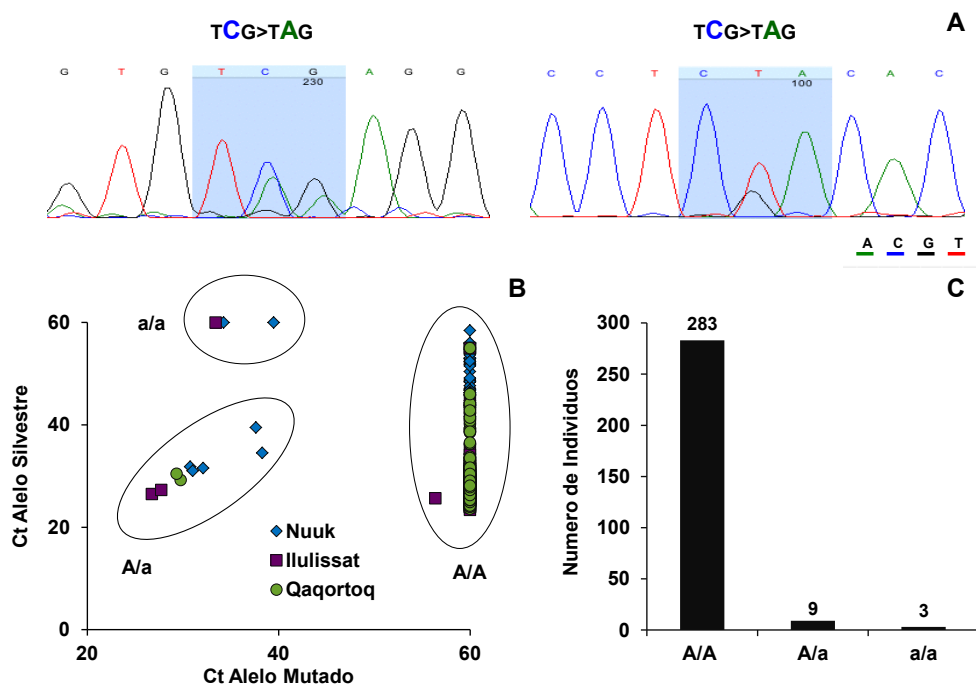
en ambas pacientes era la aparición de tinción verde de las mucosas y fluidos corporales (ictericia verdínica) debida a la acumulación de BV durante episodios de colestasis que se restauró completamente a concentraciones normales tras la corrección quirúrgica de la obstrucción biliar.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes nos planteamos como último objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral evaluar el efecto de la presencia de la mutación c.214C>A sobre la actividad de la BVR $\alpha$  así como el papel de la BV en la activación de los mecanismos de defensa antioxidante frente a la toxicidad inducida por ABs.

#### 4.3.1. “Screening” de la mutación c.214C>A en una muestra poblacional de individuos de etnia Inuit

Las dos pacientes homocigóticas para la mutación c.214C>A, procedían de Groenlandia, una región con una baja densidad poblacional distribuida en núcleos urbanos muy reducidos y aislados en los que la tasa de endogamia es elevada. Al igual que estas dos mujeres, la mayor parte de los habitantes de esta región pertenece a la etnia Inuit.

Teniendo en cuenta las características de esta región y de sus habitantes decidimos analizar la frecuencia de aparición de la mutación c.214C>A en estas poblaciones. Para ello, y de nuevo en colaboración con el Dr. Nytofte, analizamos la secuencia del exón 3 del gen *BLVRA* en 295 individuos de etnia Inuit procedentes de Nuuk, Ilulissat y Qaqortoq, tres poblaciones situadas en distintas regiones de Groenlandia.



**Figura RD38.** Estudio de la frecuencia de aparición de la mutación c.214C>A en el exón 3 del gen *BLVRA* en una muestra poblacional de 295 individuos. Electroferogramas representativos obtenidos para un individuo heterocigótico para esta mutación. El triplete de bases afectado se marca en azul (A). Determinación de la presencia de la mutación de interés mediante el uso de sondas Taqman (B). Histograma de frecuencia de aparición de la mutación (C).

La presencia de la mutación se analizó mediante PCR multiplex utilizando sondas Taqman específicas para el SNP (del inglés “Single Nucleotid Polymorphism”) de interés (Figura RD38-B), y los resultados positivos se confirmaron mediante secuenciación. El análisis de las secuencias de ADN (Figura RD38) indicaba que aproximadamente el 3% de los individuos incluidos en este estudio portaban la mutación en heterocigosis. En la figura RD38 también se puede observar la presencia de tres individuos homocigóticos para la mutación, que corresponden a las dos pacientes colestáticas y a la hermana de una de ellas.

#### 4.3.2. Efecto de la mutación c.214C>A sobre la funcionalidad de la BVR $\alpha$

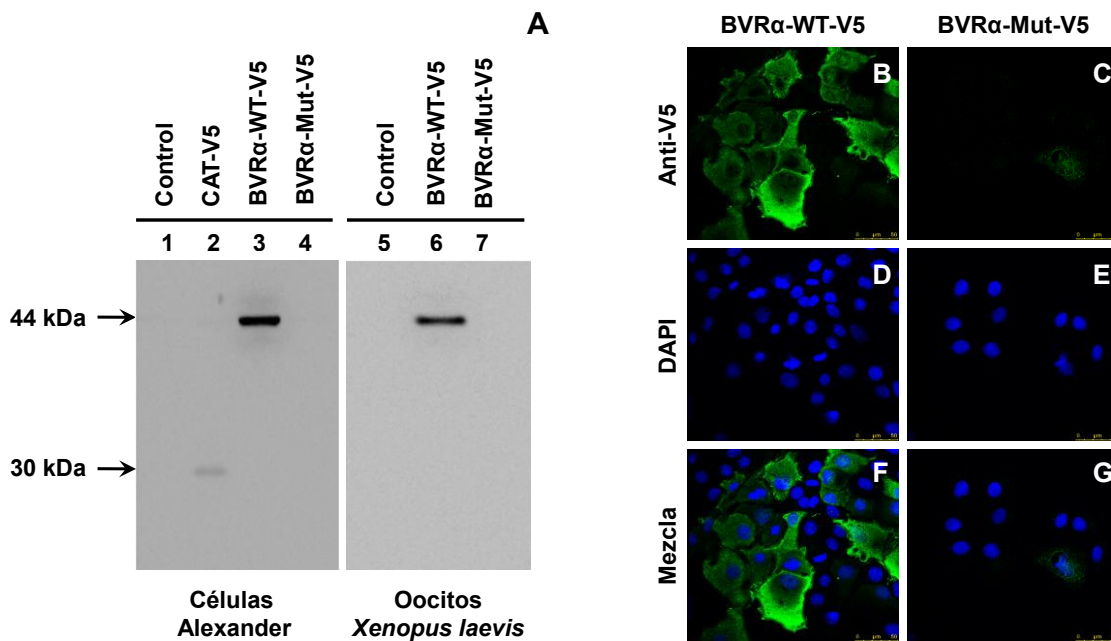
Como se mencionó anteriormente, la característica fenotípica más evidente para los sujetos homocigóticos, *a/a*, para el SNP c.214C>A, fue la aparición de ictericia verdínica debida a la acumulación de BV, cuando se impedía la normal secreción de bilis al duodeno.

A pesar de que en circunstancias fisiológicas la concentración de BV en suero es muy baja, en algunos casos clínicos se ha descrito un desequilibrio de la ruta BV→BR que conduce a la aparición de hiperbiliverdinemia (Gafvels *et al.*, 2009; Greenberg *et al.*, 1971; Larson *et al.*, 1947; Prichard, 1972). En estos pacientes, la aparición de ictericia verdínica se considera un signo de mal pronóstico, ya que, la coloración verdosa detectada en la piel, el suero y la orina puede enmascarar el incremento en la concentración de BR, que aparece como signo de una marcada alteración de la función hepática. En este sentido un trabajo publicado recientemente ha descrito la presencia una mutación sin sentido en el exón 1 del gen *BLVRA* en un paciente con HCC avanzado sobre un hígado cirrótico (Gafvels *et al.*, 2009). Aunque en este caso la mutación era heterocigótica, el paciente presentaba hiperbiliverdinemia probablemente por el profundo deterioro de la función hepática.

A diferencia de lo que ocurre en los distintos casos de hiperbiliverdinemia descritos hasta el momento, en los que los niveles de BR detectados son 10 veces superiores a los de BV (Tickner y Gutteridge, 1978), las pacientes portadoras de la mutación c.214C>A no presentaban hiperbilirrubinemia. Estos datos podrían indicar que la presencia de la mutación c.214C>A en la BVR $\alpha$  anularía su capacidad reductora impidiendo la síntesis de BR. Por ello, decidimos analizar en profundidad el efecto de esta mutación sobre la expresión y funcionalidad de esta enzima.

Para llevar a cabo estos estudios se utilizaron plásmidos que contenían la ORF (del inglés “Open Reading Frame”) de la BVR $\alpha$ , en sus formas WT y mutada, en fase con el epítipo V5, acoplado al extremo carboxilo de la secuencia peptídica. Ambos plásmidos se utilizaron para la transfección de células Alexander y para la síntesis de ARNc que se inyectó en oocitos de rana *Xenopus laevis*. De esta forma pudimos analizar el efecto de la mutación sobre la expresión de la BVR $\alpha$  en dos modelos diferentes. Para ello, la expresión de las formas WT y mutada de esta proteína, se determinó mediante WB e inmunofluorescencia (Figura RD39) utilizando un anticuerpo primario frente al epítipo V5. Los resultados de WB (Figura RD39-A) indicaban que, en los lisados de células Alexander

y oocitos que expresaban la forma WT de la BVR $\alpha$  se obtenía una banda a la altura esperada, correspondiente a la forma completa de esta proteína. Sin embargo, en el caso de las células Alexander y los oocitos de rana que expresaban la forma mutada de esta enzima no se detectó ninguna señal. Estos resultados se confirmaron mediante estudios de inmunofluorescencia en células Alexander. En las células transfectadas con la forma WT de la BVR $\alpha$ , el marcaje frente al epítipo V5 indicaba que esta proteína se distribuía por todo el citoplasma (Figura RD39-B y F). Sin embargo, en las células transfectadas con la construcción BVR $\alpha$ -Mut-V5 no se detectó ningún marcaje (Figura RD39- C y G), al igual que ocurría en los estudios de WB.

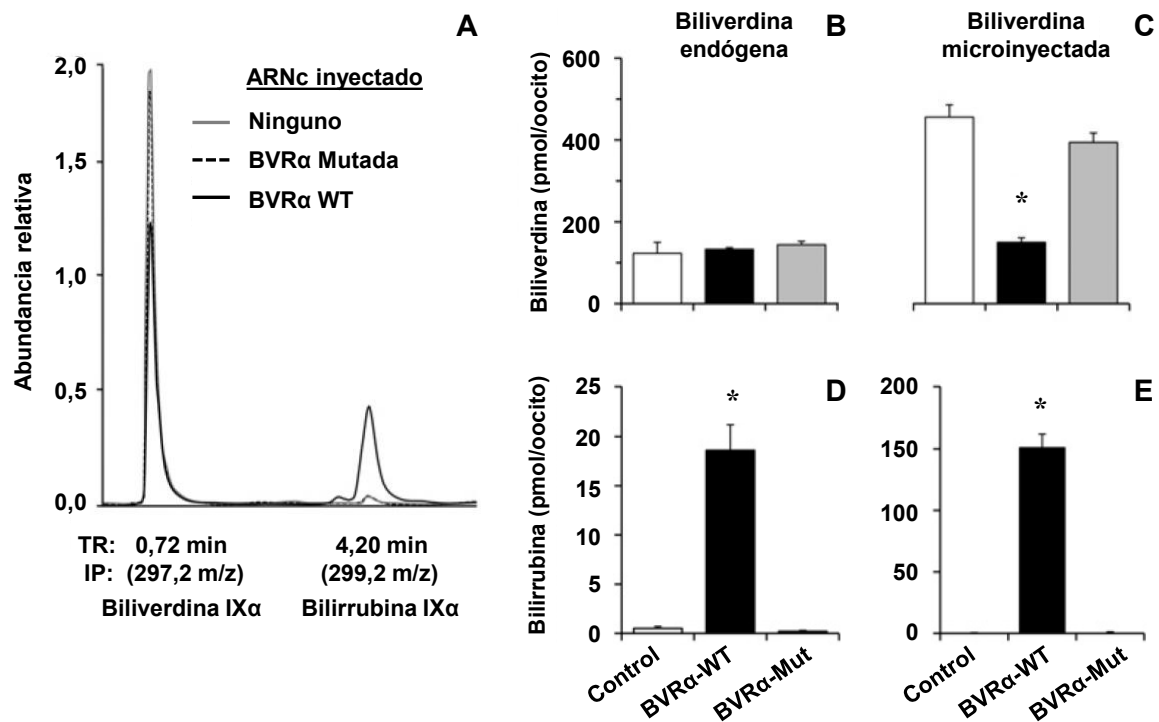


**Figura RD39.** Efecto de la mutación c.214C>A sobre la expresión de BVR $\alpha$ . Imágenes representativas de Western blot de la expresión de esta proteína en lisados de células Alexander y oocitos de *Xenopus laevis* que expresaban las formas WT o mutada de la BVR $\alpha$  marcadas con el epítipo V5 (A). Como control positivo se utilizaron lisados de células Alexander transfectadas con un plásmido que codifica la cloranfenicol acetiltransferasa marcada con V5 (CAT-V5). Imágenes de microscopía confocal de células Alexander transfectadas con la BVR $\alpha$  en sus formas WT (B, D y F) o mutada (C, E y G). La expresión de BVR $\alpha$  se detectó utilizando un anticuerpo frente al epítipo V5 (B y C). Los núcleos se tiñeron con DAPI (D y E).

Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante WB e inmunofluorescencia indicaban que la presencia de la mutación c.214C>A impedía la generación de la proteína BVR $\alpha$  completa. En su forma silvestre, esta proteína consta de 296 aminoácidos y contiene dos regiones altamente conservadas, el dominio de unión a NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> entre las posiciones 18-101, y el centro catalítico, compuesto por los aminoácidos 133-246, por lo que la presencia de mutación c.214C>A podría impedir la actividad de esta enzima.

Para confirmar esta hipótesis, analizamos la actividad enzimática de la BVR $\alpha$ , mediante la determinación de la biotransformación de BV a BR, en oocitos de *Xenopus laevis* inyectados con el ARNc sintetizado a partir de los plásmidos que contenían las formas WT y mutada de la BVR $\alpha$  (Figura RD40). Los estudios de HPLC-MS/MS (del inglés “High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry”) indicaron que en

los oocitos inyectados con la forma WT de esta enzima, la capacidad para transformar la BV endógena en BR era superior a la detectada en oocitos no inyectados y en oocitos inyectados con la forma mutada de la BVR $\alpha$  (Figura RD40-B y D). Los mismos resultados se obtuvieron cuando los oocitos fueron microinyectados con BV exógena. En este caso, 1 hora después de la microinyección de la BV se observó una reducción de los niveles de este pigmento, que se acompañó con un aumento similar del contenido en BR (Figura RD40-C y E).



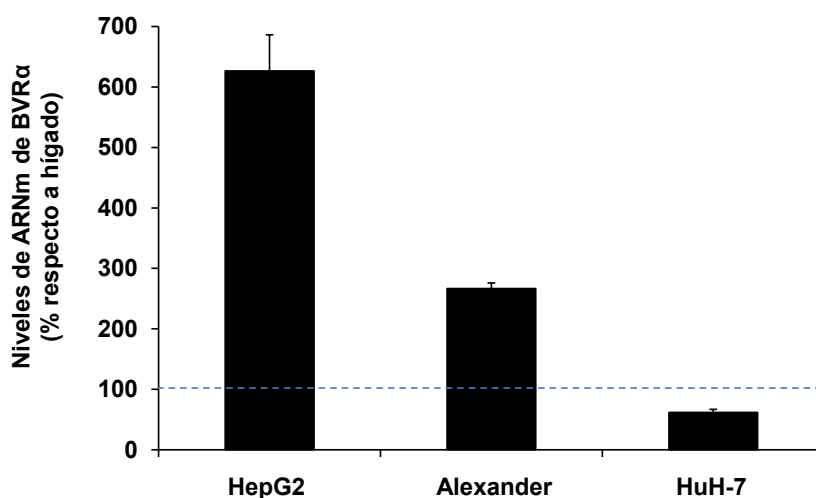
**Figura RD40.** Efecto de la mutación c.214C>A sobre la actividad enzimática de la BVR $\alpha$ . Cromatograma TIC (“Total Ion Chromatogram”) representativo en el que se muestran los picos correspondientes a la biliverdina IX $\alpha$  (IP 297,2 m/z) y la bilirrubina IX $\alpha$  (IP 299,2 m/z) obtenidos al inyectar en el sistema de HPLC-MS/MS los lisados metanólicos de oocitos de *Xenopus laevis* no inyectados (Control) o inyectados con el ARNc de las formas WT (WT-BVR $\alpha$ ) o mutada (Mut-BVR $\alpha$ ) de la BVR $\alpha$ . Todos los oocitos fueron inyectados con biliverdina IX $\alpha$  (300 pmol/oocito) 1 h antes del análisis (A). Estudio de la actividad funcional de la BVR $\alpha$  en oocitos de *Xenopus laevis* mediante HPLC-MS/MS (B-E). El contenido en biliverdina IX $\alpha$  y bilirrubina IX $\alpha$  se determinó en cada uno de los grupos de oocitos mencionados anteriormente, microinyectados (C-E) o no (B-D) con 300 pmol/oocito de biliverdina IX $\alpha$ . Los valores son la media  $\pm$  EEM de, al menos 20 determinaciones en cada grupo experimental, utilizando oocitos obtenidos de tres ranas diferentes. \*, p<0,05, respecto a los oocitos Control mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. TR, Tiempo de Retención; IP, Ion Producto.

Estos resultados indican que, la presencia de la mutación c.214C>A en el exón 3 del gen *BLVRA*, que se ha detectado en un 3% de la población de etnia Inuit de Groenlandia, da lugar a la generación de una proteína truncada que carece de actividad enzimática, ya que no permite la reducción de BV a BR.

#### 4.3.3. Papel de la biliverdina en la protección frente a la toxicidad inducida por ácidos biliares

Durante la colestasis, se acumulan en los hepatocitos ABs cuyo efecto tóxico puede provocar la muerte celular (Attili *et al.*, 1986). Como se ha mencionado a lo largo de esta Tesis Doctoral uno de los mecanismos implicados en la toxicidad inducida por estos ABs potencialmente tóxicos es la generación de ROS, que pueden modificar oxidativamente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y causar finalmente la muerte de los hepatocitos. (Sokol *et al.*, 1993; Sokol *et al.*, 2001; Sokol *et al.*, 1995). Además, estos ABs estimulan la generación de ROS en las células de Kupffer, aumentando así el daño hepático (Ljubuncic *et al.*, 1996). En estas circunstancias se activan distintos mecanismos celulares implicados en la defensa antioxidante, entre ellos, el ciclo el ciclo BV/BR mediado por la BVR $\alpha$ . Teniendo en cuenta que la presencia de la mutación c.214C>A en las dos pacientes homocigóticas se puso de manifiesto durante distintos episodios de colestasis, decidimos investigar si en casos de deficiencia del ciclo BV/BR, como el descrito en portadores homocigóticos del SNP c.214C>A, el hígado presenta una desprotección en casos de colestasis. O, visto desde otro punto de vista, si existe un papel protector de la BV y la BVR $\alpha$  frente a la toxicidad inducida por ABs. Para realizar estos experimentos elegimos el ADC, un AB con conocida capacidad para inducir estrés oxidativo y muerte celular (Palmeira y Rolo, 2004).

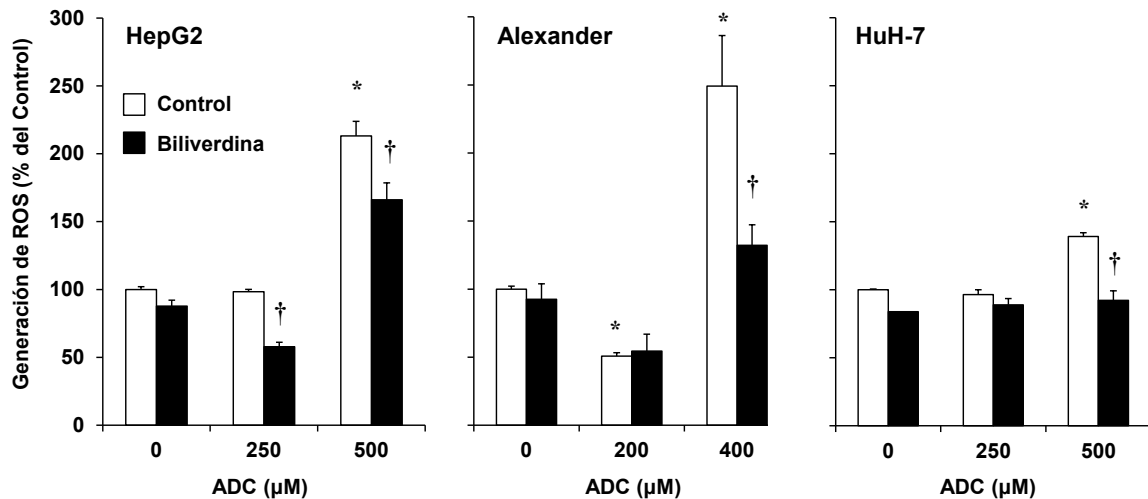
Como paso inicial de este estudio analizamos mediante RT-QPCR los niveles basales de expresión de la BVR $\alpha$  en distintas líneas celulares humanas de origen hepático. De entre todas ellas seleccionamos las células HepG2, Alexander y HuH-7, ya que, como se muestra en la Figura RD41, presentaban niveles muy distintos de expresión de esta enzima. Mientras que en las células HuH-7 la expresión de esta enzima se encontraba reducida con respecto a hígado humano, los niveles basales de expresión de la BVR $\alpha$  detectados en células Alexander y en las células HepG2 eran superiores a los encontrados en este tejido, siendo muchos más elevados en esta última línea celular.



**Figura RD41.** Determinación de los niveles basales de expresión de la BVR $\alpha$  en las líneas celulares humanas de origen hepático HepG2 (hepatoblastoma), Alexander (hepatoma) y Huh-7 (carcinoma hepatocelular) mediante RT-QPCR. Los valores se expresan como porcentaje de expresión con respecto a hígado humano y son la media  $\pm$  EEM de al menos tres cultivos realizados por triplicado.



A continuación, estas tres líneas celulares se trataron con dosis crecientes de ADC durante 48 h. Los resultados de citometría de flujo indicaron que, a las dosis más altas ensayadas, este AB indujo un aumento en la generación de ROS (Figura RD42). Además, la presencia de BV a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en el cultivo previno este aumento en los niveles de ROS, de forma parcial en células HepG2 y Alexander, y totalmente en la línea celular HuH-7 (Figura RD42).

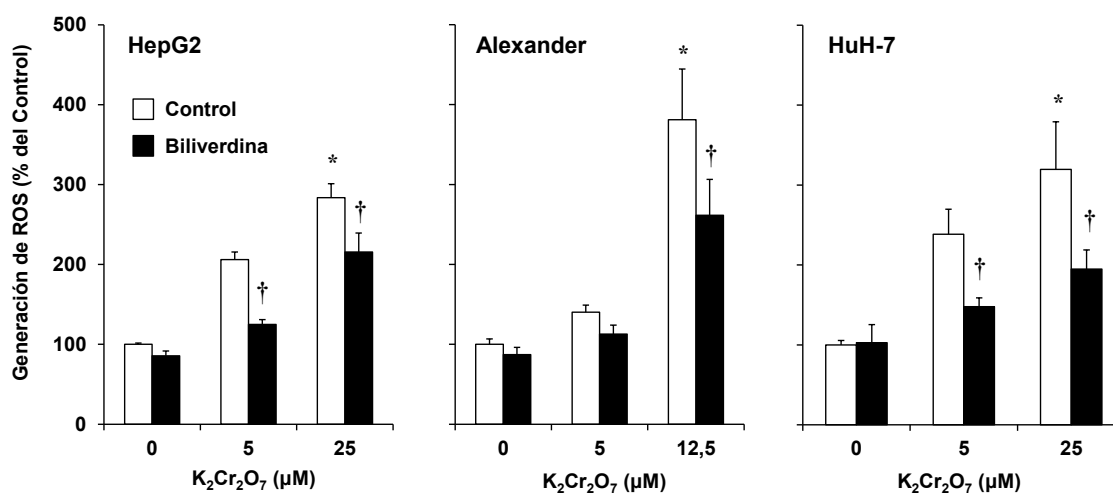


**Figura RD42.** Estudio de la generación de ROS en células HepG2, Alexander y HuH-7 tratadas con dosis crecientes de ácido desoxicólico (ADC)  $\pm$  biliverdina (BV) 100  $\mu\text{M}$  durante 48 h. Los niveles de ROS se determinaron mediante citometría de flujo utilizando diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA). Los valores representan la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , respecto a las células WT sin tratar; †  $p < 0,05$  al comparar las células tratadas con o sin biliverdina mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Puesto que el estrés oxidativo inducido por la acumulación de ABs durante la colestasis puede contribuir al daño hepático asociado con esta patología, el uso de agentes antioxidantes podría prevenir, al menos en parte la toxicidad inducida por estos compuestos. En este sentido, estudios recientes de nuestro grupo de investigación han demostrado que en situaciones de hipercolanemia materna aparece estrés oxidativo tanto en el hígado fetal (Perez *et al.*, 2005) como en la placenta (Perez *et al.*, 2008), lo que puede paliarse mediante el tratamiento con BR y con el ácido ursodesoxicólico (Perez *et al.*, 2008), un AB con conocidas propiedades antioxidantes (Mitsuyoshi *et al.*, 1999; Serviddio *et al.*, 2004). Sin embargo, otros estudios sugieren que el daño celular causado por la toxicidad de los ABs en los hepatocitos no puede prevenirse mediante el uso de agentes antioxidantes (Woudenberg-Vrenken *et al.*, 2010). En nuestro estudio, el tratamiento con BV previno el aumento en la generación de ROS inducido por el ADC en las tres líneas celulares hepáticas estudiadas. Ya que este pigmento biliar parece tener una muy baja capacidad antioxidante (Jansen y Daiber, 2012), su efecto protector podría deberse su transformación en BR, un potente agente antioxidante, mediada por la BVR $\alpha$ .

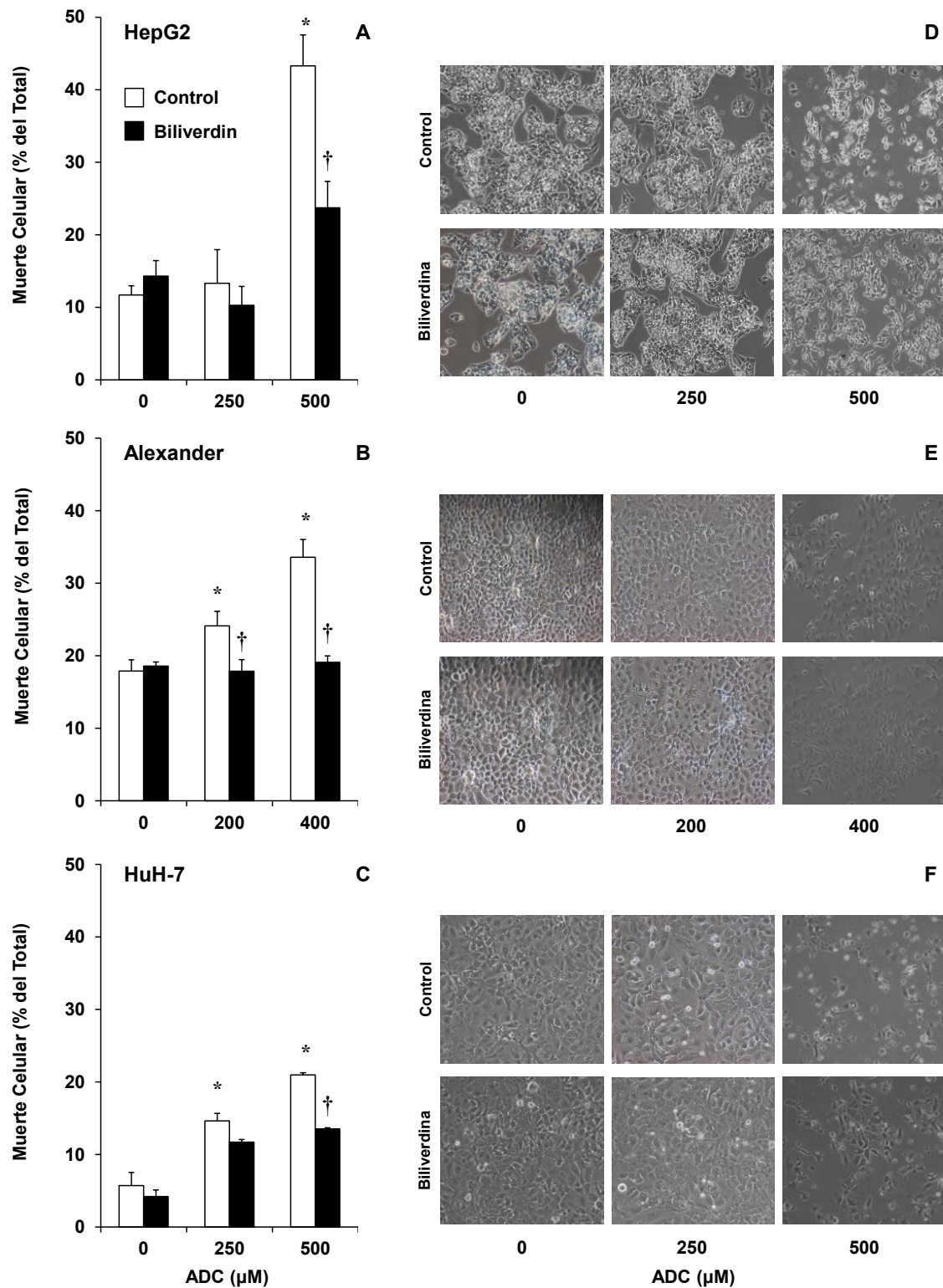


Para determinar si el efecto protector de la BV frente al estrés oxidativo era específico para la toxicidad inducida por los ABs, las 3 líneas celulares se trataron durante 48 h con dosis crecientes de dicromato potásico, un contaminante ambiental capaz de generar estrés oxidativo (Patlolla *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento con este agente xenobiótico aumentaba la generación de ROS de forma dosis dependiente y que la presencia de BV en el cultivo prevenía de forma parcial este aumento en los niveles de estrés oxidativo (Figura RD43).



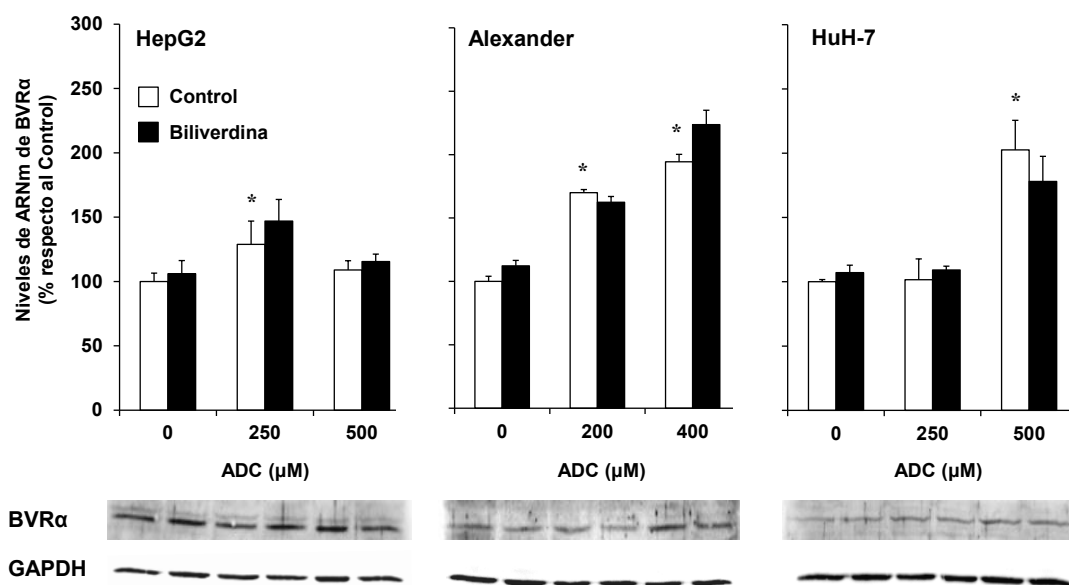
**Figura RD43.** Estudio de la generación de ROS en células HepG2, Alexander y HuH-7 tratadas con dosis crecientes de dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$ )  $\pm$  biliverdina (BV) 100  $\mu$ M durante 48 h. Los niveles de ROS se determinaron mediante citometría de flujo utilizando diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA). Los valores representan la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , respecto a las células WT sin tratar; †  $p < 0,05$ , al comparar las células tratadas con o sin biliverdina mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

La generación de ROS puede desencadenar la muerte celular por apoptosis o por necrosis (Patel y Gores, 1995; Spivey *et al.*, 1993). Por ello, analizamos si la reducción de los niveles de ROS generados por el ADC en presencia de BV podía disminuir la toxicidad de este compuesto en las líneas celulares incluidas en nuestro estudio. Para ello, la tasa de muerte celular se determinó mediante citometría de flujo utilizando yoduro de propidio. Los resultados obtenidos en este estudio, indicaron que en todas las líneas celulares estudiadas el tratamiento con BV reducía la toxicidad inducida por la exposición a dosis elevadas de este AB (Figura RD44). Además de su papel en la defensa antioxidante, la BV también puede participar en la modulación de distintas rutas de señalización proapoptóticas (Kapitulnik y Maines, 2009), lo que podría contribuir a su efecto citoprotector frente a la toxicidad inducida por el ADC.



**Figura RD44.** Niveles de muerte celular en células HepG2 (A), Alexander (B) y HuH-7(C) tratadas con dosis crecientes de ácido desoxicólico (ADC) ± biliverdina (BV) 100 μM durante 48 h. El porcentaje de muerte celular se determinó mediante citometría de flujo utilizando Ioduro de Propidio (IP). Los valores representan la media ± EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , respecto a las células WT sin tratar; †  $p < 0,05$  al comparar las células tratadas con o sin biliverdina mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Fotografías representativas de los cultivos de células HepG2 (D), Alexander (E) y Huh-7(F) obtenidas mediante microscopía de contraste de fases.

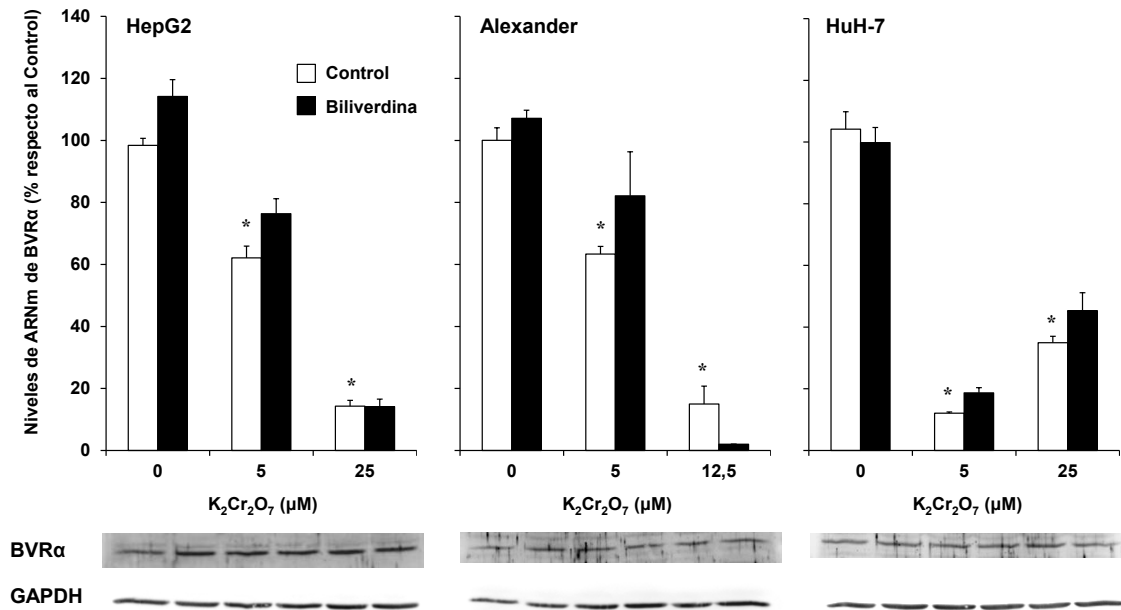
Como se ha comentado anteriormente, la capacidad antioxidante de la BV es debida a su participación en el ciclo BV/BR, en el que la BVR $\alpha$  juega un papel fundamental. Por ello, determinamos el efecto del tratamiento con ADC y BV sobre la expresión de esta enzima en las líneas celulares HepG2, Alexander y HuH-7 tratadas con estos compuestos durante 48 h. Los resultados obtenidos mediante RT-QPCR y WB indicaron que el tratamiento con este AB aumentó los niveles de expresión de la BVR $\alpha$  en las tres líneas celulares estudiadas, mientras que el tratamiento con BV no modificó los niveles de expresión de esta enzima (Figura RD45).



**Figura RD45.** Niveles de expresión de BVR $\alpha$  en células HepG2, Alexander y HuH-7 tratadas con dosis crecientes de ácido desoxicólico (ADC)  $\pm$  biliverdina (BV) 100  $\mu$ M durante 48 h determinados mediante RT-QPCR y WB. La GAPDH se utilizó como normalizador. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , respecto a las células WT sin tratar; †  $p < 0,05$  al comparar las células tratadas con o sin biliverdina mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación se ha descrito la inducción de la expresión de la BVR $\alpha$  en un modelo de colestasis gestacional en rata en hígado materno, hígado fetal y placenta, probablemente como mecanismo de defensa antioxidante (Perez *et al.*, 2007). Este efecto se confirmó en estudios *in vitro* con células hepáticas y placentarias tratadas con ácido taurocólico y ácido ursodesoxicólico (Perez *et al.*, 2008). En nuestro estudio, el tratamiento con ADC indujo los niveles de expresión de esta enzima en las líneas celulares HepG2, Alexander y HuH-7. Estos resultados podrían indicar que el ciclo de defensa antioxidante BV/BR catalizado por la BVR $\alpha$  se activa en respuesta a la toxicidad inducida por el ADC contribuyendo así a aumentar el efecto protector de la BV mediante su transformación a BR.

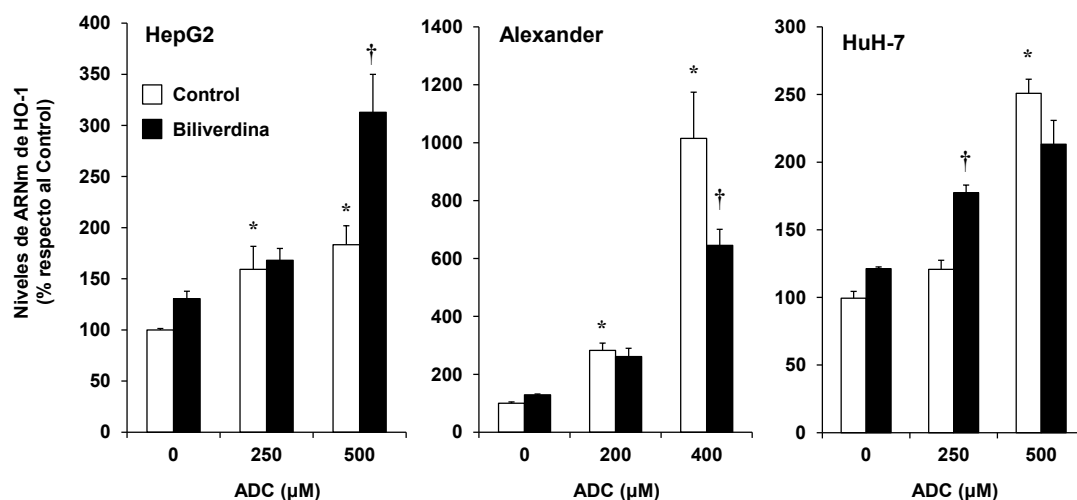
Cuando estos mismos estudios se llevaron a cabo en células HepG2, Alexander y HuH-7 tratadas con dicromato potásico se observó una reducción en los niveles de ARNm de BVR $\alpha$  (Figura RD46). Sin embargo, los estudios de WB indicaron que el tratamiento no modificaba los niveles de proteína de la BVR $\alpha$ .



**Figura RD46.** Niveles de expresión de BVR $\alpha$  en células HepG2, Alexander y HuH-7 tratadas con dosis crecientes de dicromato potásico (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)  $\pm$  biliverdina (BV) 100  $\mu$ M durante 48 h determinados mediante RT-QPCR. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*, p<0,05, respecto a las células WT sin tratar; † p<0,05 al comparar las células tratadas con o sin biliverdina mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

La BVR $\alpha$  puede actuar también como un factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión de HO-1 (Kravets *et al.*, 2004), la enzima que cataliza la primera reacción en la degradación del grupo hemo. Puesto que nuestros resultados indicaban que en las células HepG2, Alexander y HuH-7 expuestas a dosis altas de ADC la expresión de la BVR $\alpha$  se encontraba inducida, decidimos determinar qué ocurría con la expresión de la HO-1 en estas situaciones. Los resultados de RT-QPCR mostraron que la expresión de la HO-1 aumentaba en las células HepG2, Alexander y HuH-7 de forma dependiente a las dosis de ADC presente en el cultivo (Figura RD47). Sin embargo, el efecto del tratamiento con BV sobre la expresión de esta enzima fue diferente en función de la línea celular. Mientras que en células HepG2 y HuH-7 tratadas con ADC 500 y 250  $\mu$ M respectivamente, la presencia de BV aumentó aún más los niveles de expresión de HO-1, en las células Alexander tratadas con la dosis más alta de ADC (400  $\mu$ M), la BV redujo los niveles de expresión de esta enzima (Figura RD47).

Esta inducción en los niveles de expresión de la HO-1 podría contribuir a la reducción de la toxicidad inducida por el ADC, a través de la amplificación del ciclo BV/BR además, se ha descrito que uno de los productos generados en la reacción catalizada por esta enzima, el CO, tiene un efecto antiapoptótico (Kirkby y Adin, 2006).



**Figura RD47.** Niveles de expresión de HO-1 en células HepG2, Alexander y Huh-7 tratadas con dosis crecientes de ácido desoxicólico (ADC) ± biliverdina (BV) 100 μM durante 48 h determinados mediante RT-QPCR. Los valores representan la media ± EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , respecto a las células WT sin tratar; †  $p < 0,05$  al comparar las células tratadas con o sin biliverdina mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En resumen, los resultados obtenidos en este bloque experimental sugieren que en células hepáticas de origen humano tratadas con dosis elevadas de ADC el ciclo redox BV/BR catalizado por la BVR $\alpha$  parece estar implicado en la defensa celular frente al estrés oxidativo inducido por este compuesto. Además, la BV protege frente al estrés oxidativo y la muerte celular inducidos por este AB probablemente mediante su transformación a BR catalizada por la BVR $\alpha$ .

## 5. Conclusiones





## CONCLUSIÓN PRIMERA

El tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol modifica la expresión y funcionalidad de varios transportadores de la superfamilia ABC, que participan en su detoxificación, en distintos tejidos implicados en el metabolismo y excreción de este fármaco como hígado, riñón, intestino y placenta.

## CONCLUSIÓN SEGUNDA

El tratamiento con dosis subtóxicas de paracetamol en ratas gestantes, reduce los niveles de Bcrp en la placenta, donde esta proteína ABC juega un papel fundamental en la excreción de distintos compuestos potencialmente tóxicos, entre los que se incluyen los ácidos biliares. Así, en situaciones de hipercolanemia asociada a la colestasis durante la gestación, el tratamiento con dosis no tóxicas de paracetamol para la madre altera la funcionalidad de la barrera placentaria e induce un aumento en los niveles de ácidos biliares a los que se ve expuesto el feto, lo que puede causar patologías fetales.

## CONCLUSIÓN TERCERA

La reducción de los niveles de ADNmt en la línea celular de hepatoma de ratón Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> aumenta su resistencia a la toxicidad inducida por compuestos potencialmente tóxicos, xenobióticos como el paracetamol y endógenos como el ácido biliar glicoquenodesoxicólico. La menor sensibilidad de estas células a la muerte celular inducida por estos compuestos no se debe a un aumento de la expresión de bombas exportadoras ABC, implicadas en su detoxificación, sino que parece guardar relación con la menor generación de ROS observada en células Rho<sup>-</sup>.

## CONCLUSIÓN CUARTA

En la línea celular Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup>, la disminución de los niveles de ADNmt previene de forma parcial la translocación al núcleo del factor de transcripción Nrf2 en respuesta al tratamiento con paracetamol o ácido glicoquenodesoxicólico. Esta activación de Nrf2 no modifica los niveles de expresión de varios transportadores de la superfamilia ABC regulados por este factor de transcripción. Esto sugiere que, la reducción de los niveles de ADNmt puede limitar la funcionalidad de otros factores de transcripción o receptores nucleares, implicados en la inducción de la expresión de proteínas ABC en respuesta al tratamiento con estos compuestos.

## CONCLUSIÓN QUINTA

La ausencia de ADNmt en la línea celular de carcinoma hepatocelular humano SK-Hep-1 aumenta su resistencia frente a la necrosis inducida por concentraciones elevadas del ácido glicoquenodesoxicólico. Entre los mecanismos implicados en esta mayor quimiorresistencia se incluyen una reducción de los niveles de estrés oxidativo y la activación de la ruta de supervivencia Akt/mTOR de forma independiente de la generación de ROS.

## CONCLUSIÓN SEXTA

La ausencia de ADNmt en la línea celular de hepatoma humano SK-Hep-1 aumenta su resistencia frente a la toxicidad inducida por los fármacos antitumorales doxorubicina, SN-38 y cisplatino. Esta quimiorresistencia tiene un origen multifactorial ya que la ausencia de genoma mitocondrial reduce la generación de ROS, aumenta los niveles de expresión distintas bombas ABC implicadas en la disminución de la concentración intracelular de estos fármacos y del factor de transcripción NRF2 que participa en la regulación de distintos mecanismos de defensa celular. Además, la ausencia de ADNmt, estimula la expresión de genes de supervivencia como la survivina en respuesta a estos fármacos.

## CONCLUSIÓN SÉPTIMA

La línea celular SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> también presenta una menor sensibilidad a la toxicidad inducida por el fármaco antitumoral sorafenib. Sin embargo, ninguno de los mecanismos implicados en la resistencia a otros fármacos, a excepción de la reducción de la generación de ROS, parece estar implicado en la falta de respuesta a este fármaco.

El análisis de 90 genes implicados en quimiorresistencia reveló que, en las células SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>, la ausencia de genoma mitocondrial modifica la expresión de varios de estos genes. Uno de los cambios más destacados fue la pérdida de la expresión de *KIT*, uno de los principales genes diana del sorafenib. Además se encontró reducida la expresión de distintos genes proapoptóticos y un aumento de la expresión de *BCL2*, un gen antiapoptótico.

## CONCLUSIÓN OCTAVA

Uno de los sistemas celulares de defensa frente al estrés oxidativo es el ciclo de conversión de biliverdina en bilirrubina catalizado por la enzima biliverdina reductasa. La expresión de esta enzima en células hepáticas se induce por la exposición a concentraciones elevadas de ácido desoxicólico, como parte de la respuesta endógena de protección antioxidante. Además la biliverdina protege frente al estrés oxidativo y la muerte celular inducidos por este ácido biliar probablemente mediante su transformación a bilirrubina catalizada por la biliverdina reductasa.

## CONCLUSIÓN NOVENA

En un 3% de la población de etnia Inuit de Groenlandia se ha detectado la presencia de la mutación c.214C>A en el exón 3 del gen *BLVRA*. Esta mutación hace que se genere una proteína truncada que carece de actividad enzimática ya que no permite la reducción de biliverdina a bilirrubina, lo que sugiere la existencia de una mayor sensibilidad de los portadores a las situaciones de estrés oxidativo.

## CONCLUSIÓN GLOBAL

El genoma mitocondrial juega un papel fundamental en la regulación de la expresión de genes nucleares implicados en los mecanismos de defensa celular frente a la agresión de distintos compuestos endógenos y xenobióticos, mediante rutas de señalización retrógrada. Así, la ausencia de genoma mitocondrial y la acción de distintos mecanismos de defensa antioxidante como el ciclo biliverdina/bilirrubina mediado por la biliverdina reductasa pueden amortiguar el estrés oxidativo y aumentar la resistencia a la muerte celular generados por distintos agentes agresores.



## 6. Bibliografía



- Abele, R., Tampe, R., 2004. The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology (Bethesda)* 19, 216-224.
- Akita, H., Suzuki, H., Ito, K., Kinoshita, S., Sato, N., Takikawa, H., Sugiyama, Y., 2001. Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochimica et biophysica acta* 1511, 7-16.
- Alam, J., Shibahara, S., Smith, A., 1989. Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *The Journal of biological chemistry* 264, 6371-6375.
- Albrecht, C., Viturro, E., 2007. The ABCA subfamily--gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 453, 581-589.
- Alcaraz, M.J., Habib, A., Creminon, C., Vicente, A.M., Leuret, M., Levy-Toledano, S., Maclouf, J., 2001. Heme oxygenase-1 induction by nitric oxide in RAW 264.7 macrophages is upregulated by a cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Biochimica et biophysica acta* 1526, 13-16.
- Aleksunes, L.M., Augustine, L.M., Cherrington, N.J., Manautou, J.E., 2007. Influence of acetaminophen vehicle on regulation of transporter gene expression during hepatotoxicity. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 70, 1870-1872.
- Aleksunes, L.M., Campion, S.N., Goedken, M.J., Manautou, J.E., 2008a. Acquired resistance to acetaminophen hepatotoxicity is associated with induction of multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4) in proliferating hepatocytes. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 104, 261-273.
- Aleksunes, L.M., Scheffer, G.L., Jakowski, A.B., Pruijboom-Brees, I.M., Manautou, J.E., 2006. Coordinated expression of multidrug resistance-associated proteins (Mrps) in mouse liver during toxicant-induced injury. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 89, 370-379.
- Aleksunes, L.M., Slitt, A.L., Maher, J.M., Augustine, L.M., Goedken, M.J., Chan, J.Y., Cherrington, N.J., Klaassen, C.D., Manautou, J.E., 2008b. Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nrf2. *Toxicology and applied pharmacology* 226, 74-83.
- Aleksunes, L.M., Slitt, A.M., Cherrington, N.J., Thibodeau, M.S., Klaassen, C.D., Manautou, J.E., 2005. Differential expression of mouse hepatic transporter genes in response to acetaminophen and carbon tetrachloride. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 83, 44-52.
- Aleksunes, L.M., Xu, J., Lin, E., Wen, X., Goedken, M.J., Slitt, A.L., 2013. Pregnancy Represses Induction of Efflux Transporters in Livers of Type I Diabetic Mice. *Pharmaceutical research*.
- Allikmets, R., Schriml, L.M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., Dean, M., 1998. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer research* 58, 5337-5339.
- Amuthan, G., Biswas, G., Ananatheerthavarada, H.K., Vijayasathy, C., Shephard, H.M., Avadhani, N.G., 2002. Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene* 21, 7839-7849.
- Amuthan, G., Biswas, G., Zhang, S.Y., Klein-Szanto, A., Vijayasathy, C., Avadhani, N.G., 2001. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *The EMBO journal* 20, 1910-1920.
- Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., Suchy, F.J., 2001. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *The Journal of*



biological chemistry 276, 28857-28865.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.

Angelin, B., Einarsson, K., Hellstrom, K., 1976. Evidence for the absorption of bile acids in the proximal small intestine of normo- and hyperlipidaemic subjects. *Gut* 17, 420-425.

Anwer, M.S., Engelking, L.R., Nolan, K., Sullivan, D., Zimniak, P., Lester, R., 1988. Hepatotoxic bile acids increase cytosolic Ca<sup>++</sup> activity of isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 8, 887-891.

Aranda, A., Pascual, A., 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews* 81, 1269-1304.

Arisawa, S., Ishida, K., Kameyama, N., Ueyama, J., Hattori, A., Tatsumi, Y., Hayashi, H., Yano, M., Hayashi, K., Katano, Y., Goto, H., Takagi, K., Wakusawa, S., 2009. Ursodeoxycholic acid induces glutathione synthesis through activation of PI3K/Akt pathway in HepG2 cells. *Biochemical pharmacology* 77, 858-866.

Asechi, H., Hatano, E., Nitta, T., Tada, M., Iwaisako, K., Tamaki, N., Nagata, H., Narita, M., Yanagida, A., Ikai, I., Uemoto, S., 2010. Resistance to cisplatin-induced apoptosis via PI3K-dependent survivin expression in a rat hepatoma cell line. *International journal of oncology* 37, 89-96.

Attardi, G., Schatz, G., 1988. Biogenesis of mitochondria. *Annual review of cell biology* 4, 289-333.

Attia, S., 2012. Modulation of irinotecan-induced genomic DNA damage by theanine. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 50, 1749-1754.

Attili, A.F., Angelico, M., Cantafora, A., Alvaro, D., Capocaccia, L., 1986. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Medical hypotheses* 19, 57-69.

Avery, S.V., 2011. Molecular targets of oxidative stress. *The Biochemical journal* 434, 201-210.

Bajt, M.L., Cover, C., Lemasters, J.J., Jaeschke, H., 2006. Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver cell injury. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 94, 217-225.

Bajt, M.L., Knight, T.R., Lemasters, J.J., Jaeschke, H., 2004. Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N-acetyl cysteine. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 80, 343-349.

Bakos, E., Homolya, L., 2007. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 453, 621-641.

Baranano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D., Snyder, S.H., 2002. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16093-16098.

Barnes, S.N., Aleksunes, L.M., Augustine, L., Scheffer, G.L., Goedken, M.J., Jakowski, A.B., Pruijboom-Brees, I.M., Cherrington, N.J., Manautou, J.E., 2007. Induction of hepatobiliary efflux transporters in acetaminophen-induced acute liver failure cases. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35, 1963-1969.

Bartosz, G., 2009. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochemical pharmacology* 77, 1303-

1315.

- Beale, S.I., Cornejo, J., 1984. Enzymatic heme oxygenase activity in soluble extracts of the unicellular red alga, *Cyanidium caldarium*. *Archives of biochemistry and biophysics* 235, 371-384.
- Beghin, D., Forestier, F., Noel-Hudson, M.S., Gavard, L., Guibourdenche, J., Farinotti, R., Gil, S., 2010. Modulation of endocrine and transport functions in human trophoblasts by saquinavir and nelfinavir. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 152, 55-59.
- Belanger, S., Lavoie, J.C., Chessex, P., 1997. Influence of bilirubin on the antioxidant capacity of plasma in newborn infants. *Biology of the neonate* 71, 233-238.
- Belinsky, M.G., Chen, Z.S., Shchaveleva, I., Zeng, H., Kruh, G.D., 2002. Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer research* 62, 6172-6177.
- Bergen, A.A., Plomp, A.S., Hu, X., de Jong, P.T., Gorgels, T.G., 2007. ABCC6 and pseudoxanthoma elasticum. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 453, 685-691.
- Berndtsson, M., Hagg, M., Panaretakis, T., Havelka, A.M., Shoshan, M.C., Linder, S., 2007. Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 120, 175-180.
- Bianchi, L., Driscoll, M., 2006. Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *Worm-Book : the online review of C. elegans biology*, 1-16.
- Biswas, G., Adebajo, O.A., Freedman, B.D., Anandatheerthavarada, H.K., Vijayasathy, C., Zaidi, M., Kotlikoff, M., Avadhani, N.G., 1999. Retrograde Ca<sup>2+</sup> signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *The EMBO journal* 18, 522-533.
- Bjorkhem, I., 1992. Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids. *Journal of lipid research* 33, 455-471.
- Blazquez, A.G., Briz, O., Romero, M.R., Rosales, R., Monte, M.J., Vaquero, J., Macias, R.I., Cassio, D., Marin, J.J., 2012. Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Molecular pharmacology* 81, 273-283.
- Block, K.I., Koch, A.C., Mead, M.N., Tothy, P.K., Newman, R.A., Gyllenhaal, C., 2008. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 123, 1227-1239.
- Bogenghagen, D., Clayton, D.A., 1977. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 11, 719-727.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J., 1999. The multidrug resistance protein family. *Biochimica et biophysica acta* 1461, 347-357.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J., 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1295-1302.
- Bosch, I., Croop, J., 1996. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1288, F37-54.

- Botla, R., Spivey, J.R., Aguilar, H., Bronk, S.F., Gores, G.J., 1995. Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 272, 930-938.
- Bracarda, S., Caserta, C., Sordini, L., Rossi, M., Hamzay, A., Crino, L., 2007. Protein kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma: sorafenib. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 18 Suppl 6, vi22-25.
- Bravo, P., Marin, J.J., Beveridge, M.J., Novak, D.A., 1995. Reconstitution and characterization of ATP-dependent bile acid transport in human and rat placenta. *The Biochemical journal* 311 ( Pt 2), 479-485.
- Brown, T.A., Cecconi, C., Tkachuk, A.N., Bustamante, C., Clayton, D.A., 2005. Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes & development* 19, 2466-2476.
- Bryan, H.K., Olayanju, A., Goldring, C.E., Park, B.K., 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochemical pharmacology* 85, 705-717.
- Burgart, L.J., Zheng, J., Shu, Q., Strickler, J.G., Shibata, D., 1995. Somatic mitochondrial mutation in gastric cancer. *The American journal of pathology* 147, 1105-1111.
- Burger, G., Gray, M.W., Lang, B.F., 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends in genetics : TIG* 19, 709-716.
- Butow, R.A., Avadhani, N.G., 2004. Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Molecular cell* 14, 1-15.
- Byrne, J.A., Strautnieks, S.S., Mieli-Vergani, G., Higgins, C.F., Linton, K.J., Thompson, R.J., 2002. The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 123, 1649-1658.
- Campion, S.N., Johnson, R., Aleksunes, L.M., Goedken, M.J., van Rooijen, N., Scheffer, G.L., Cherrington, N.J., Manautou, J.E., 2008. Hepatic Mrp4 induction following acetaminophen exposure is dependent on Kupffer cell function. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 295, G294-304.
- Carey, J.B., Jr., 1958. The serum trihydroxy-dihydroxy bile acid ratio in liver and biliary tract disease. *The Journal of clinical investigation* 37, 1494-1503.
- Carpenter, S.P., Savage, D.D., Schultz, E.D., Raucy, J.L., 1997. Ethanol-mediated transplacental induction of CYP2E1 in fetal rat liver. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 282, 1028-1036.
- Casey, R.P., 1984. Membrane reconstitution of the energy-conserving enzymes of oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta* 768, 319-347.
- Ceckova, M., Libra, A., Pavek, P., Nachtigal, P., Brabec, M., Fuchs, R., Staud, F., 2006. Expression and functional activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) transporter in the human choriocarcinoma cell line BeWo. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 33, 58-65.
- Cepeda, V., Fuertes, M.A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., Perez, J.M., 2007. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 7, 3-18.
- Clayton, D.A., 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28, 693-705.
- Clayton, D.A., 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annual review of cell biology* 7, 453-478.

- Coffer, P.J., Jin, J., Woodgett, J.R., 1998. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Biochemical journal* 335 ( Pt 1), 1-13.
- Cohen, S.D., Pumford, N.R., Khairallah, E.A., Boekelheide, K., Pohl, L.R., Amouzadeh, H.R., Hinson, J.A., 1997. Selective protein covalent binding and target organ toxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 143, 1-12.
- Collins, M.L., Sondel, N., Cesar, D., Hellerstein, M.K., 2004. Effect of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on mitochondrial DNA synthesis in rats and humans. *J Acquir Immune Defic Syndr* 37, 1132-1139.
- Combettes, L., Berthon, B., Claret, M., 1992. Tauroolithocholate-induced Ca<sup>2+</sup> release is inhibited by phorbol esters in isolated hepatocytes. *The Biochemical journal* 287 ( Pt 3), 891-896.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J.R., Melamed, M.R., 1990. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 38, 1277-1287.
- Coriat, R., Nicco, C., Chereau, C., Mir, O., Alexandre, J., Ropert, S., Weill, B., Chaussade, S., Goldwasser, F., Batteux, F., 2012. Sorafenib-induced hepatocellular carcinoma cell death depends on reactive oxygen species production in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 11, 2284-2293.
- Costa, A.M., Tuchweber, B., Lamireau, T., Yousef, I.M., Balabaud, C., Rosenbaum, J., Desmouliere, A., 2003. Role of apoptosis in the remodeling of cholestatic liver injury following release of the mechanical stress. *Virchows Arch* 442, 372-380.
- Cover, C., Mansouri, A., Knight, T.R., Bajt, M.L., Lemasters, J.J., Pessayre, D., Jaeschke, H., 2005. Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315, 879-887.
- Crocenzi, F.A., Mottino, A.D., Cao, J., Veggi, L.M., Pozzi, E.J., Vore, M., Coleman, R., Roma, M.G., 2003. Estradiol-17beta-D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 285, G449-459.
- Croteau, D.L., Bohr, V.A., 1997. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 272, 25409-25412.
- Cuezva, J.M., Krajewska, M., de Heredia, M.L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J.M., Marusawa, H., Chamorro, M., Reed, J.C., 2002. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer research* 62, 6674-6681.
- Chan, L.M., Lowes, S., Hirst, B.H., 2004. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 21, 25-51.
- Chatterjee, A., Dasgupta, S., Sidransky, D., 2011. Mitochondrial subversion in cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 638-654.
- Chen, K.F., Chen, H.L., Tai, W.T., Feng, W.C., Hsu, C.H., Chen, P.J., Cheng, A.L., 2011. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 337, 155-161.
- Chen, Z.S., Guo, Y., Belinsky, M.G., Kotova, E., Kruh, G.D., 2005. Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Molecular pharmacology* 67, 545-557.

- Cheng, X., Klaassen, C.D., 2006. Regulation of mRNA expression of xenobiotic transporters by the pregnane x receptor in mouse liver, kidney, and intestine. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34, 1863-1867.
- Cherrington, N.J., Hartley, D.P., Li, N., Johnson, D.R., Klaassen, C.D., 2002. Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 300, 97-104.
- Childs, S., Yeh, R.L., Hui, D., Ling, V., 1998. Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein. *Cancer research* 58, 4160-4167.
- Chiou, J.F., Tai, C.J., Wang, Y.H., Liu, T.Z., Jen, Y.M., Shiau, C.Y., 2009. Sorafenib induces preferential apoptotic killing of a drug- and radio-resistant Hep G2 cells through a mitochondria-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer biology & therapy* 8, 1904-1913.
- Dalhoff, K., Laursen, H., Bangert, K., Poulsen, H.E., Anderson, M.E., Grunnet, N., Tygstrup, N., 2001. Autoprotection in acetaminophen intoxication in rats: the role of liver regeneration. *Pharmacology & toxicology* 88, 135-141.
- David Josephy, P., 2005. The molecular toxicology of acetaminophen. *Drug metabolism reviews* 37, 581-594.
- Davis, S., Weiss, M.J., Wong, J.R., Lampidis, T.J., Chen, L.B., 1985. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *The Journal of biological chemistry* 260, 13844-13850.
- De Matteis, F., Lord, G.A., Kee Lim, C., Pons, N., 2006. Bilirubin degradation by uncoupled cytochrome P450. Comparison with a chemical oxidation system and characterization of the products by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 20, 1209-1217.
- Dean, M., 2005. The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods in enzymology* 400, 409-429.
- Deavall, D.G., Martin, E.A., Horner, J.M., Roberts, R., 2012. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of toxicology* 2012, 645460.
- Deby, C., Goutier, R., 1990. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochemical pharmacology* 39, 399-405.
- Deleze, G., Paumgartner, G., Karlaganis, G., Giger, W., Reinhard, M., Sidiropoulos, D., 1978. Bile acid pattern in human amniotic fluid. *European journal of clinical investigation* 8, 41-45.
- DeNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K.H., Yeo, C.J., Calhoun, E.S., Scrimieri, F., Winter, J.M., Hruban, R.H., Iacobuzio-Donahue, C., Kern, S.E., Blair, I.A., Tuveson, D.A., 2011. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475, 106-109.
- Dent, P., Fang, Y., Gupta, S., Studer, E., Mitchell, C., Spiegel, S., Hylemon, P.B., 2005. Conjugated bile acids promote ERK1/2 and AKT activation via a pertussis toxin-sensitive mechanism in murine and human hepatocytes. *Hepatology* 42, 1291-1299.
- Dixon, P.H., van Mil, S.W., Chambers, J., Strautnieks, S., Thompson, R.J., Lammert, F., Kubitz, R., Keitel, V., Glantz, A., Mattsson, L.A., Marschall, H.U., Molokhia, M., Moore, G.E., Linton, K.J., Williamson, C., 2009. Contribution of variant alleles of ABCB11 to susceptibility to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut* 58, 537-544.

- Donner, M.G., Keppler, D., 2001. Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* 34, 351-359.
- Dore, S., Takahashi, M., Ferris, C.D., Zakhary, R., Hester, L.D., Guastella, D., Snyder, S.H., 1999. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2445-2450.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., Ross, D.D., 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15665-15670.
- Drescher, S., Glaeser, H., Murdter, T., Hitzl, M., Eichelbaum, M., Fromm, M.F., 2003. P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans. *Clinical pharmacology and therapeutics* 73, 223-231.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G., Wahli, W., 1992. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68, 879-887.
- Durante, W., Christodoulides, N., Cheng, K., Peyton, K.J., Sunahara, R.K., Schafer, A.I., 1997. cAMP induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle. *The American journal of physiology* 273, H317-323.
- Elbirt, K.K., Bonkovsky, H.L., 1999. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proceedings of the Association of American Physicians* 111, 438-447.
- Elferink, R.O., Groen, A.K., 2002. Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochimica et biophysica acta* 1586, 129-145.
- Erol, A., 2005. Retrograde regulation due to mitochondrial dysfunction may be an important mechanism for carcinogenesis. *Medical hypotheses* 65, 525-529.
- Falkenberg, M., Larsson, N.G., Gustafsson, C.M., 2007. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual review of biochemistry* 76, 679-699.
- Fang, Y., Han, S.I., Mitchell, C., Gupta, S., Studer, E., Grant, S., Hylemon, P.B., Dent, P., 2004. Bile acids induce mitochondrial ROS, which promote activation of receptor tyrosine kinases and signaling pathways in rat hepatocytes. *Hepatology* 40, 961-971.
- Fautz, R., Husein, B., Efstathiou, E., Hechenberger-Freudl, C., 1993. Assessment of the relation between the initial viability and the attachment of freshly isolated rat hepatocytes used for the in vivo/in vitro DNA repair assay (UDS). *Mutation research* 291, 21-27.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127, 2893-2917.
- Fernandez-Checa, J.C., Garcia-Ruiz, C., Ookhtens, M., Kaplowitz, N., 1991. Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats. Tracer kinetic studies in vitro and in vivo and susceptibility to oxidant stress. *The Journal of clinical investigation* 87, 397-405.
- Feverly, J., 2008. Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 28, 592-605.
- Fickert, P., Trauner, M., Fuchsbichler, A., Zollner, G., Wagner, M., Marschall, H.U., Zatloukal, K., Denk, H., 2005. Oncosis represents the main type of cell death in mouse models of cholestasis. *Journal of hepatology* 42,



378-385.

Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.

Fischer, S., Beuers, U., Spengler, U., Zwiebel, F.M., Koebe, H.G., 1996. Hepatic levels of bile acids in end-stage chronic cholestatic liver disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 251, 173-186.

Fliiss, M.S., Usadel, H., Caballero, O.L., Wu, L., Buta, M.R., Eleff, S.M., Jen, J., Sidransky, D., 2000. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 287, 2017-2019.

Florczyk, U.M., Jozkowicz, A., Dulak, J., 2008. Biliverdin reductase: new features of an old enzyme and its potential therapeutic significance. *Pharmacological reports : PR* 60, 38-48.

Fogg, V.C., Lanning, N.J., Mackeigan, J.P., 2011. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chinese journal of cancer* 30, 526-539.

Fortune, J.M., Osheroff, N., 2000. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 64, 221-253.

Frohling, W., Stiehl, A., 1976. Bile salt glucuronides: identification and quantitative analysis in the urine of patients with cholestasis. *European journal of clinical investigation* 6, 67-74.

Fromm, M.F., 2004. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in pharmacological sciences* 25, 423-429.

Fuchs-Tarlovsky, V., 2013. Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition* 29, 15-21.

Fujii, M., Inoguchi, T., Sasaki, S., Maeda, Y., Zheng, J., Kobayashi, K., Takayanagi, R., 2010. Bilirubin and biliverdin protect rodents against diabetic nephropathy by downregulating NAD(P)H oxidase. *Kidney international* 78, 905-919.

Fukushima, S., Honda, K., Awane, M., Yamamoto, E., Takeda, R., Kaneko, I., Tanaka, A., Morimoto, T., Tanaka, K., Yamaoka, Y., 1995. The frequency of 4977 base pair deletion of mitochondrial DNA in various types of liver disease and in normal liver. *Hepatology* 21, 1547-1551.

Fuste, J.M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C.E., Cluett, T.J., Shi, Y., Atanassova, N., Holt, I.J., Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., 2010. Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Molecular cell* 37, 67-78.

Gafvels, M., Holmstrom, P., Somell, A., Sjoval, F., Svensson, J.O., Stahle, L., Broome, U., Stal, P., 2009. A novel mutation in the biliverdin reductase-A gene combined with liver cirrhosis results in hyperbiliverdinaemia (green jaundice). *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 29, 1116-1124.

Galle, P.R., Theilmann, L., Raedsch, R., Otto, G., Stiehl, A., 1990. Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepatology* 12, 486-491.

Gedeon, C., Anger, G., Piquette-Miller, M., Koren, G., 2008. Breast cancer resistance protein: mediating the trans-placental transfer of glyburide across the human placenta. *Placenta* 29, 39-43.

Geier, A., Dietrich, C.G., Gerloff, T., Haendly, J., Kullak-Ublick, G.A., Stieger, B., Meier, P.J., Matern, S., Gartung, C., 2003. Regulation of basolateral organic anion transporters in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat. *Biochimica et biophysica acta* 1609, 87-94.



- Genter, M.B., Liang, H.C., Gu, J., Ding, X., Negishi, M., McKinnon, R.A., Nebert, D.W., 1998. Role of CYP2A5 and 2G1 in acetaminophen metabolism and toxicity in the olfactory mucosa of the Cyp1a2(-/-) mouse. *Biochemical pharmacology* 55, 1819-1826.
- Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A.F., Meier, P.J., 1998. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *The Journal of biological chemistry* 273, 10046-10050.
- Gewirtz, D.A., 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical pharmacology* 57, 727-741.
- Ghanem, C.I., Arias, A., Novak, A., Carpini, G.D., Villanueva, S., Blazquez, A.G., Marin, J.J., Mottino, A.D., Rubio, M.C., 2011. Acetaminophen-induced stimulation of MDR1 expression and activity in rat intestine and in LS 174T human intestinal cell line. *Biochemical pharmacology* 81, 244-250.
- Ghanem, C.I., Gomez, P.C., Arana, M.C., Perassolo, M., Ruiz, M.L., Villanueva, S.S., Ochoa, E.J., Catania, V.A., Bengochea, L.A., Mottino, A.D., 2004. Effect of acetaminophen on expression and activity of rat liver multidrug resistance-associated protein 2 and P-glycoprotein. *Biochemical pharmacology* 68, 791-798.
- Ghanem, C.I., Ruiz, M.L., Villanueva, S.S., Luquita, M., Llesuy, S., Catania, V.A., Bengochea, L.A., Mottino, A.D., 2009. Effect of repeated administration with subtoxic doses of acetaminophen to rats on enterohepatic recirculation of a subsequent toxic dose. *Biochemical pharmacology* 77, 1621-1628.
- Ghanem, C.I., Ruiz, M.L., Villanueva, S.S., Luquita, M.G., Catania, V.A., Jones, B., Bengochea, L.A., Vore, M., Mottino, A.D., 2005. Shift from biliary to urinary elimination of acetaminophen-glucuronide in acetaminophen-pretreated rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315, 987-995.
- Ghosh, A., Sil, P.C., 2009. Protection of acetaminophen induced mitochondrial dysfunctions and hepatic necrosis via Akt-NF-kappaB pathway: role of a novel plant protein. *Chemico-biological interactions* 177, 96-106.
- Gillet, J.P., Efferth, T., Remacle, J., 2007. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochimica et biophysica acta* 1775, 237-262.
- Goldstein, L.J., 1996. MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer* 32A, 1039-1050.
- Goldstein, L.J., Gottesman, M.M., Pastan, I., 1991. Expression of the MDR1 gene in human cancers. *Cancer treatment and research* 57, 101-119.
- Gollapudi, S., Kim, C.H., Tran, B.N., Sangha, S., Gupta, S., 1997. Probenecid reverses multidrug resistance in multidrug resistance-associated protein-overexpressing HL60/AR and H69/AR cells but not in P-glycoprotein-overexpressing HL60/Tax and P388/ADR cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 40, 150-158.
- Gong, Y., Huang, Z.B., Christensen, E., Gluud, C., 2008. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000551.
- Gonzalez-Loyola, A., 2009. Sensibilidad de células hepáticas de roedores deficientes de ADN mitocondrial frente al estrés oxidativo inducido por ácidos biliares. Trabajo de grado. Universidad de Salamanca.
- Gopinathan, V., Miller, N.J., Milner, A.D., Rice-Evans, C.A., 1994. Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS letters* 349, 197-200.
- Gourley, G.R., 1997. Bilirubin metabolism and kernicterus. *Adv Pediatr* 44, 173-229.

- Gradhand, U., Lang, T., Schaeffeler, E., Glaeser, H., Tegude, H., Klein, K., Fritz, P., Jedlitschky, G., Kroemer, H.K., Bachmakov, I., Anwald, B., Kerb, R., Zanger, U.M., Eichelbaum, M., Schwab, M., Fromm, M.F., 2008. Variability in human hepatic MRP4 expression: influence of cholestasis and genotype. *The pharmacogenomics journal* 8, 42-52.
- Graf, G.A., Yu, L., Li, W.P., Gerard, R., Tuma, P.L., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2003. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *The Journal of biological chemistry* 278, 48275-48282.
- Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F., 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Graziewicz, M.A., Day, B.J., Copeland, W.C., 2002. The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic acids research* 30, 2817-2824.
- Green, D.R., 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102, 1-4.
- Greenberg, A.J., Bossenmaier, I., Schwartz, S., 1971. Green jaundice. A study of serum biliverdin, mesobiliverdin and other green pigments. *Am J Dig Dis* 16, 873-880.
- Gregus, Z., Madhu, C., Klaassen, C.D., 1988. Species variation in toxication and detoxication of acetaminophen in vivo: a comparative study of biliary and urinary excretion of acetaminophen metabolites. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 244, 91-99.
- Gu, J., Cui, H., Behr, M., Zhang, L., Zhang, Q.Y., Yang, W., Hinson, J.A., Ding, X., 2005. In vivo mechanisms of tissue-selective drug toxicity: effects of liver-specific knockout of the NADPH-cytochrome P450 reductase gene on acetaminophen toxicity in kidney, lung, and nasal mucosa. *Molecular pharmacology* 67, 623-630.
- Gujral, J.S., Knight, T.R., Farhood, A., Bajt, M.L., Jaeschke, H., 2002. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 67, 322-328.
- Gumpricht, E., Devereaux, M.W., Dahl, R.H., Sokol, R.J., 2000. Glutathione status of isolated rat hepatocytes affects bile acid-induced cellular necrosis but not apoptosis. *Toxicology and applied pharmacology* 164, 102-111.
- Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z.S., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M.G., Kruh, G.D., 2003. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *The Journal of biological chemistry* 278, 29509-29514.
- Hallstrom, T.C., Moye-Rowley, W.S., 2000. Multiple signals from dysfunctional mitochondria activate the pleiotropic drug resistance pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 275, 37347-37356.
- Handschin, C., Meyer, U.A., 2003. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacological reviews* 55, 649-673.
- Hartley, J.L., Temple, G.F., Brasch, M.A., 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research* 10, 1788-1795.
- Hay, N., Sonenberg, N., 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* 18, 1926-1945.
- Hayashi, A., Suzuki, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Sugiyama, Y., 2003. Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo

- fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 310, 824-829.
- Hayashi, J., Tanaka, M., Sato, W., Ozawa, T., Yonekawa, H., Kagawa, Y., Ohta, S., 1990. Effects of ethidium bromide treatment of mouse cells on expression and assembly of nuclear-coded subunits of complexes involved in the oxidative phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* 167, 216-221.
- Hoffmann, K., Franz, C., Xiao, Z., Mohr, E., Serba, S., Buchler, M.W., Schemmer, P., 2010. Sorafenib modulates the gene expression of multi-drug resistance mediating ATP-binding cassette proteins in experimental hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 30, 4503-4508.
- Hofmann, A.F., 1994. Intestinal absorption of bile acids and biliary constituents. The intestinal component of the enterohepatic circulation and the integrated system. . Raven Press, New York.
- Hofmann, A.F., 1998. Progress in idiopathic bile acid malabsorption. *Gut* 43, 738-739.
- Holt, I.J., Lorimer, H.E., Jacobs, H.T., 2000. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100, 515-524.
- Hopper-Borge, E., Chen, Z.S., Shchaveleva, I., Belinsky, M.G., Kruh, G.D., 2004. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer research* 64, 4927-4930.
- Houten, S.M., 2006. Homing in on bile acid physiology. *Cell metabolism* 4, 423-424.
- Huang, L., Zhao, A., Lew, J.L., Zhang, T., Hrywna, Y., Thompson, J.R., de Pedro, N., Royo, I., Blevins, R.A., Pelaez, F., Wright, S.D., Cui, J., 2003. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *The Journal of biological chemistry* 278, 51085-51090.
- Huber, R.M., Murphy, K., Miao, B., Link, J.R., Cunningham, M.R., Rupa, M.J., Gunyuzlu, P.L., Haws, T.F., Kassam, A., Powell, F., Hollis, G.F., Young, P.R., Mukherjee, R., Burn, T.C., 2002. Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* 290, 35-43.
- Hung, W.Y., Lin, J.C., Lee, L.M., Wu, C.W., Tseng, L.M., Yin, P.H., Chi, C.W., Lee, H.C., 2008. Tandem duplication/triplication correlated with poly-cytosine stretch variation in human mitochondrial DNA D-loop region. *Mutagenesis* 23, 137-142.
- Hunter, J., Hirst, B.H., Simmons, N.L., 1993. Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Pharmaceutical research* 10, 743-749.
- Ikemoto, S., Takahashi, M., Tsunoda, N., Maruyama, K., Itakura, H., Kawanaka, K., Tabata, I., Higuchi, M., Tange, T., Yamamoto, T.T., Ezaki, O., 1997. Cholate inhibits high-fat diet-induced hyperglycemia and obesity with acyl-CoA synthetase mRNA decrease. *The American journal of physiology* 273, E37-45.
- Imai, Y., Asada, S., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Sugimoto, Y., 2003. Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Molecular pharmacology* 64, 610-618.
- Inoue, K., Ito, S., Takai, D., Soejima, A., Shisa, H., LePecq, J.B., Segal-Bendirdjian, E., Kagawa, Y., Hayashi, J.I., 1997a. Isolation of mitochondrial DNA-less mouse cell lines and their application for trapping mouse synaptosomal mitochondrial DNA with deletion mutations. *The Journal of biological chemistry* 272, 15510-15515.
- Inoue, K., Takai, D., Hosaka, H., Ito, S., Shitara, H., Isobe, K., LePecq, J.B., Segal-Bendirdjian, E., Hayashi, J., 1997b. Isolation and characterization of mitochondrial DNA-less lines from various mammalian cell lines

by application of an anticancer drug, ditercalinium. *Biochemical and biophysical research communications* 239, 257-260.

Inoue, M., 1994. Protective mechanism against reactive oxygen species. "The Liver: Biology and Pathobiology". Ed. Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA. Raven Press, Nueva York., 443-460

Ishikawa, T., Ali-Osman, F., 1993. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *The Journal of biological chemistry* 268, 20116-20125.

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

Itoh, T., Terazawa, R., Kojima, K., Nakane, K., Deguchi, T., Ando, M., Tsukamasa, Y., Ito, M., Nozawa, Y., 2011. Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cells. *Free radical research* 45, 1033-1039.

Izukura, M., Hashimoto, T., Gomez, G., Uchida, T., Greeley, G.H., Jr., Thompson, J.C., 1991. Intracolonic infusion of bile salt stimulates release of peptide YY and inhibits cholecystokinin-stimulated pancreatic exocrine secretion in conscious dogs. *Pancreas* 6, 427-432.

Jacinto, E., Hall, M.N., 2003. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 117-126.

Jaeschke, H., 1990. Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice in vivo: the protective effect of allopurinol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 255, 935-941.

Jaeschke, H., McGill, M.R., Ramachandran, A., 2012. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews* 44, 88-106.

James, L.P., Mayeux, P.R., Hinson, J.A., 2003. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 31, 1499-1506.

Jansen, T., Daiber, A., 2012. Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase? *Front Pharmacol* 3, 30.

Janvilisri, T., Shahi, S., Venter, H., Balakrishnan, L., van Veen, H.W., 2005. Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *The Biochemical journal* 385, 419-426.

Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Hummel-Eisenbeiss, J., Burchell, B., Keppler, D., 1997. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *The Biochemical journal* 327 ( Pt 1), 305-310.

Jeffery, E.H., Haschek, W.M., 1988. Protection by dimethylsulfoxide against acetaminophen-induced hepatic, but not respiratory toxicity in the mouse. *Toxicology and applied pharmacology* 93, 452-461.

Jigorel, E., Le Vee, M., Boursier-Neyret, C., Parmentier, Y., Fardel, O., 2006. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34, 1756-

1763.

- Juliano, R., 1976. Drug-resistant mutants of Chinese hamster ovary cells possess an altered cell surface carbohydrate component. *Journal of supramolecular structure* 4, 521-526.
- Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Sugimoto, Y., 2002. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 97, 626-630.
- Kamiyama, Y., Matsubara, T., Yoshinari, K., Nagata, K., Kamimura, H., Yamazoe, Y., 2007. Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 22, 287-298.
- Kang, K.W., Lee, S.J., Park, J.W., Kim, S.G., 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Molecular pharmacology* 62, 1001-1010.
- Kapitulnik, J., Maines, M.D., 2009. Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin. *Trends in pharmacological sciences* 30, 129-137.
- Karpen, S.J., 2002. Nuclear receptor regulation of hepatic function. *Journal of hepatology* 36, 832-850.
- Kartenbeck, J., Leuschner, U., Mayer, R., Keppler, D., 1996. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 23, 1061-1066.
- Kasamatsu, H., Vinograd, J., 1974. Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry* 43, 695-719.
- Kasherman, Y., Sturup, S., Gibson, D., 2009. Is glutathione the major cellular target of cisplatin? A study of the interactions of cisplatin with cancer cell extracts. *Journal of medicinal chemistry* 52, 4319-4328.
- Kast, H.R., Goodwin, B., Tarr, P.T., Jones, S.A., Anisfeld, A.M., Stoltz, C.M., Tontonoz, P., Kliewer, S., Willson, T.M., Edwards, P.A., 2002. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *The Journal of biological chemistry* 277, 2908-2915.
- Keppler, D., Konig, J., Buchler, M., 1997. The canalicular multidrug resistance protein, cMRP/MRP2, a novel conjugate export pump expressed in the apical membrane of hepatocytes. *Advances in enzyme regulation* 37, 321-333.
- Kim, D.H., Kim, J., Lee, J.W., 2011a. Requirement for MLL3 in p53 regulation of hepatic expression of small heterodimer partner and bile acid homeostasis. *Mol Endocrinol* 25, 2076-2083.
- Kim, Y.S., Jin, H.O., Seo, S.K., Woo, S.H., Choe, T.B., An, S., Hong, S.I., Lee, S.J., Lee, K.H., Park, I.C., 2011b. Sorafenib induces apoptotic cell death in human non-small cell lung cancer cells by down-regulating mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent survivin expression. *Biochemical pharmacology* 82, 216-226.
- King, M.P., Attardi, G., 1989. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246, 500-503.
- Kirchman, P.A., Kim, S., Lai, C.Y., Jazwinski, S.M., 1999. Interorganelle signaling is a determinant of longevity

in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152, 179-190.

Kirkby, K.A., Adin, C.A., 2006. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F563-571.

Klaassen, C.D., Aleksunes, L.M., 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacological reviews* 62, 1-96.

Klein, I., Sarkadi, B., Varadi, A., 1999. An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1461, 237-262.

Knight, T.R., Kurtz, A., Bajt, M.L., Hinson, J.A., Jaeschke, H., 2001. Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 62, 212-220.

Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M., 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and cellular biology* 24, 7130-7139.

Kok, T., Bloks, V.W., Wolters, H., Havinga, R., Jansen, P.L., Staels, B., Kuipers, F., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-mediated regulation of multidrug resistance 2 (Mdr2) expression and function in mice. *The Biochemical journal* 369, 539-547.

Kon, K., Kim, J.S., Jaeschke, H., Lemasters, J.J., 2004. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 40, 1170-1179.

Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., van Eijk, M.J., Juijn, J.A., Baas, F., Borst, P., 1997. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer research* 57, 3537-3547.

Kool, M., van der Linden, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., de Vree, J.M., Smith, A.J., Jansen, G., Peters, G.J., Ponne, N., Scheper, R.J., Elferink, R.P., Baas, F., Borst, P., 1999. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6914-6919.

Kotake, K., Nonami, T., Kurokawa, T., Nakao, A., Murakami, T., Shimomura, Y., 1999. Human livers with cirrhosis and hepatocellular carcinoma have less mitochondrial DNA deletion than normal human livers. *Life sciences* 64, 1785-1791.

Krahenbuhl, S., Talos, C., Fischer, S., Reichen, J., 1994. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 19, 471-479.

Kramer, W., Buscher, H.P., Gerok, W., Kurz, G., 1979. Bile salt binding to serum components. Taurocholate incorporation into high-density lipoprotein revealed by photoaffinity labelling. *European journal of biochemistry / FEBS* 102, 1-9.

Kravets, A., Hu, Z., Miralem, T., Torno, M.D., Maines, M.D., 2004. Biliverdin reductase, a novel regulator for induction of activating transcription factor-2 and heme oxygenase-1. *The Journal of biological chemistry* 279, 19916-19923.

Krishnamachary, N., Center, M.S., 1993. The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. *Cancer research* 53, 3658-3661.

Krishnamurthy, P., Ross, D.D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K.E., Sarkadi, B., Sorrentino,



- B.P., Schuetz, J.D., 2004. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *The Journal of biological chemistry* 279, 24218-24225.
- Kruse, B., Narasimhan, N., Attardi, G., 1989. Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell* 58, 391-397.
- Kusuhara, H., Sugiyama, Y., 2007. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 453, 735-744.
- Lage, H., 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International journal of antimicrobial agents* 22, 188-199.
- Lagerkvist, U., 1978. "Two out of three": an alternative method for codon reading. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 1759-1762.
- Laible, M., Boonrod, K., 2009. Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Gray, M.W., 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387, 493-497.
- Larson, E.A., Evans, G.T., Watson, C.J., 1947. A study of the serum biliverdin concentration in various types of jaundice. *J Lab Clin Med* 32, 481-488.
- Lecureur, V., Sun, D., Hargrove, P., Schuetz, E.G., Kim, R.B., Lan, L.B., Schuetz, J.D., 2000. Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Molecular pharmacology* 57, 24-35.
- Lee, C.K., Park, K.K., Chung, A.S., Chung, W.Y., 2012. Ginsenoside Rg3 enhances the chemosensitivity of tumors to cisplatin by reducing the basal level of nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated heme oxygenase-1/NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 and prevents normal tissue damage by scavenging cisplatin-induced intracellular reactive oxygen species. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 50, 2565-2574.
- Lee, F.Y., de Aguiar Vallim, T.Q., Chong, H.K., Zhang, Y., Liu, Y., Jones, S.A., Osborne, T.F., Edwards, P.A., 2010. Activation of the farnesoid X receptor provides protection against acetaminophen-induced hepatic toxicity. *Mol Endocrinol* 24, 1626-1636.
- Lee, H.C., Li, S.H., Lin, J.C., Wu, C.C., Yeh, D.C., Wei, Y.H., 2004. Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutation research* 547, 71-78.
- Lee, H.C., Wei, Y.H., 2009. Mitochondrial DNA instability and metabolic shift in human cancers. *International journal of molecular sciences* 10, 674-701.
- Lee, H.C., Yin, P.H., Lin, J.C., Wu, C.C., Chen, C.Y., Wu, C.W., Chi, C.W., Tam, T.N., Wei, Y.H., 2005. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1042, 109-122.
- Lee, K., Belinsky, M.G., Bell, D.W., Testa, J.R., Kruh, G.D., 1998. Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer research* 58, 2741-2747.



- Lee, W., Choi, H.I., Kim, M.J., Park, S.Y., 2008. Depletion of mitochondrial DNA up-regulates the expression of MDR1 gene via an increase in mRNA stability. *Exp Mol Med* 40, 109-117.
- Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Herman, B., 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta* 1366, 177-196.
- Lennartsson, J., Ronnstrand, L., 2012. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiological reviews* 92, 1619-1649.
- Lerner-Marmarosh, N., Shen, J., Torno, M.D., Kravets, A., Hu, Z., Maines, M.D., 2005. Human biliverdin reductase: a member of the insulin receptor substrate family with serine/threonine/tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7109-7114.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology* 204, 216-237.
- Lewis, W., Dalakas, M.C., 1995. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nature medicine* 1, 417-422.
- Li, G., Chen, X., Wang, Q., Xu, Z., Zhang, W., Ye, L., 2007. The roles of four multi-drug resistance proteins in hepatocellular carcinoma multidrug resistance. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban* 27, 173-175.
- Li, W., Kong, A.N., 2009. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Molecular carcinogenesis* 48, 91-104.
- Lievre, A., Chapusot, C., Bouvier, A.M., Zinzindohoue, F., Piard, F., Roignot, P., Arnould, L., Beaune, P., Faivre, J., Laurent-Puig, P., 2005. Clinical value of mitochondrial mutations in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 3517-3525.
- Ling, X., He, Y., Zhang, G., Zhou, Y., Yan, B., 2012. Increased P-glycoprotein expression in mitochondria is related to acquired multidrug resistance in human hepatoma cells depleted of mitochondrial DNA. *International journal of oncology* 40, 109-118.
- Litman, T., Druley, T.E., Stein, W.D., Bates, S.E., 2001. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 58, 931-959.
- Litman, T., Jensen, U., Hansen, A., Covitz, K.M., Zhan, Z., Fetsch, P., Abati, A., Hansen, P.R., Horn, T., Skovsgaard, T., Bates, S.E., 2002. Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2. *Biochimica et biophysica acta* 1565, 6-16.
- Liu, L.F., Desai, S.D., Li, T.K., Mao, Y., Sun, M., Sim, S.P., 2000. Mechanism of action of camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 922, 1-10.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Liu, Z., Butow, R.A., 2006. Mitochondrial retrograde signaling. *Annual review of genetics* 40, 159-185.
- Ljubuncic, P., Fuhrman, B., Oiknine, J., Aviram, M., Bomzon, A., 1996. Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages. *Gut* 39, 475-478.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol re-

- agent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.
- Lu, H., Klaassen, C., 2008. Gender differences in mRNA expression of ATP-binding cassette efflux and bile acid transporters in kidney, liver, and intestine of 5/6 nephrectomized rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 36, 16-23.
- Lu, Z., Xu, S., 2006. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 58, 621-631.
- Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.F., de Oliveira, A.C., Santoro, A., Raoul, J.L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T.F., Galle, P.R., Seitz, J.F., Borbath, I., Haussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D., Bruix, J., 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine* 359, 378-390.
- Macias, R.I., Pascual, M.J., Bravo, A., Alcalde, M.P., Larena, M.G., St-Pierre, M.V., Serrano, M.A., Marin, J.J., 2000. Effect of maternal cholestasis on bile acid transfer across the rat placenta-maternal liver tandem. *Hepatology* 31, 975-983.
- Machlin, L.J., Bendich, A., 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1, 441-445.
- Madon, J., Hagenbuch, B., Landmann, L., Meier, P.J., Stieger, B., 2000. Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Molecular pharmacology* 57, 634-641.
- Magalhaes, P.J., Andreu, A.L., Schon, E.A., 1998. Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria. *Molecular biology of the cell* 9, 2375-2382.
- Maghzal, G.J., Leck, M.C., Collinson, E., Li, C., Stocker, R., 2009. Limited role for the bilirubin-biliverdin redox amplification cycle in the cellular antioxidant protection by biliverdin reductase. *The Journal of biological chemistry* 284, 29251-29259.
- Maglich, J.M., Stoltz, C.M., Goodwin, B., Hawkins-Brown, D., Moore, J.T., Kliewer, S.A., 2002. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Molecular pharmacology* 62, 638-646.
- Magnani, E., Bartling, L., Hake, S., 2006. From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event. *BMC molecular biology* 7, 46.
- Maher, J.M., Cheng, X., Slitt, A.L., Dieter, M.Z., Klaassen, C.D., 2005. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33, 956-962.
- Maher, J.M., Dieter, M.Z., Aleksunes, L.M., Slitt, A.L., Guo, G., Tanaka, Y., Scheffer, G.L., Chan, J.Y., Manautou, J.E., Chen, Y., Dalton, T.P., Yamamoto, M., Klaassen, C.D., 2007. Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway. *Hepatology* 46, 1597-1610.
- Maher, J.M., Slitt, A.L., Callaghan, T.N., Cheng, X., Cheung, C., Gonzalez, F.J., Klaassen, C.D., 2006. Alterations in transporter expression in liver, kidney, and duodenum after targeted disruption of the transcription factor HNF1alpha. *Biochemical pharmacology* 72, 512-522.
- Maines, M.D., 1997. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 37, 517-554.
- Maines, M.D., Trakshel, G.M., 1993. Purification and characterization of human biliverdin reductase. *Archives of*

biochemistry and biophysics 300, 320-326.

Malhi, S.S., Budhiraja, A., Arora, S., Chaudhari, K.R., Nepali, K., Kumar, R., Sohi, H., Murthy, R.S., 2012. Intracellular delivery of redox cycler-doxorubicin to the mitochondria of cancer cell by folate receptor targeted mitocancerotropic liposomes. *International journal of pharmaceutics* 432, 63-74.

Mambo, E., Gao, X., Cohen, Y., Guo, Z., Talalay, P., Sidransky, D., 2003. Electrophile and oxidant damage of mitochondrial DNA leading to rapid evolution of homoplasmic mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1838-1843.

Manautou, J.E., de Waart, D.R., Kunne, C., Zelcer, N., Goedken, M., Borst, P., Elferink, R.O., 2005. Altered disposition of acetaminophen in mice with a disruption of the Mrp3 gene. *Hepatology* 42, 1091-1098.

Manning, B.D., Cantley, L.C., 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.

Manyike, P.T., Kharasch, E.D., Kalhorn, T.F., Slattery, J.T., 2000. Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clinical pharmacology and therapeutics* 67, 275-282.

Margulis, L., 1981. *Symbiosis in Cell Evolution: Life and Its Environment on the Early Earth*. W. H. Freeman, San Francisco.

Marin, J.J., Barbero, E.R., Herrera, M.C., Tabernero, A., Monte, M.J., 1993. Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology* 18, 1182-1192.

Marin, J.J., Bravo, P., el-Mir, M.Y., Serrano, M.A., 1995. ATP-dependent bile acid transport across microvillous membrane of human term trophoblast. *The American journal of physiology* 268, G685-694.

Marin, J.J., Briz, O., Perez, M.J., Romero, M.R., Monte, M.J., 2009a. Hepatobiliary transporters in the pharmacology and toxicology of anticancer drugs. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 14, 4257-4280.

Marin, J.J., Briz, O., Serrano, M.A., 2004. A review on the molecular mechanisms involved in the placental barrier for drugs. *Current drug delivery* 1, 275-289.

Marin, J.J., Macias, R.I., Briz, O., Perez, M.J., Blazquez, A.G., Arrese, M., Serrano, M.A., 2008. Molecular bases of the fetal liver-placenta-maternal liver excretory pathway for cholephilic compounds. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 28, 435-454.

Marin, J.J., Romero, M.R., Briz, O., 2010. Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Current medicinal chemistry* 17, 709-740.

Marin, J.J., Romero, M.R., Martinez-Becerra, P., Herraes, E., Briz, O., 2009b. Overview of the molecular bases of resistance to chemotherapy in liver and gastrointestinal tumours. *Curr Mol Med* 9, 1108-1129.

Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical biochemistry* 87, 206-210.

Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J., 1995. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth regulation* 5, 69-84.

Martin, M., Cho, J., Cesare, A.J., Griffith, J.D., Attardi, G., 2005. Termination factor-mediated DNA loop between termination and initiation sites drives mitochondrial rRNA synthesis. *Cell* 123, 1227-1240.

Martinez-Becerra, P., Vaquero, J., Romero, M.R., Lozano, E., Anadon, C., Macias, R.I., Serrano, M.A., Grane-

- Boladeras, N., Munoz-Bellvis, L., Alvarez, L., Sangro, B., Pastor-Anglada, M., Marin, J.J., 2012. No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm* 9, 1693-1704.
- Marusich, M.F., Robinson, B.H., Taanman, J.W., Kim, S.J., Schillace, R., Smith, J.L., Capaldi, R.A., 1997. Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived Rho0 human fibroblasts: a comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome. *Biochimica et biophysica acta* 1362, 145-159.
- Masahiko, N., Honkakoski, P., 2000. Induction of drug metabolism by nuclear receptor CAR: molecular mechanisms and implications for drug research. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 11, 259-264.
- Mashige, F., Imai, K., Osuga, T., 1976. A simple and sensitive assay of total serum bile acids. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 70, 79-86.
- Masubuchi, Y., Nakayama, J., Watanabe, Y., 2011. Sex difference in susceptibility to acetaminophen hepatotoxicity is reversed by buthionine sulfoximine. *Toxicology* 287, 54-60.
- Masuda, H., Tanaka, T., Takahama, U., 1994. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochemical and biophysical research communications* 203, 1175-1180.
- Matheny, C.J., Lamb, M.W., Brouwer, K.R., Pollack, G.M., 2001. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 21, 778-796.
- Maynard, S., Schurman, S.H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A., 2009. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30, 2-10.
- Mazer, M., Perrone, J., 2008. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology* 4, 2-6.
- McDevitt, C.A., Collins, R., Kerr, I.D., Callaghan, R., 2009. Purification and structural analyses of ABCG2. *Advanced drug delivery reviews* 61, 57-65.
- McDevitt, C.A., Collins, R.F., Conway, M., Modok, S., Storm, J., Kerr, I.D., Ford, R.C., Callaghan, R., 2006. Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* 14, 1623-1632.
- McDonagh, A.F., 1983. Protein-bound bilirubin. *The New England journal of medicine* 309, 1654-1655.
- McDonagh, A.F., 2001. Turning green to gold. *Nature structural biology* 8, 198-200.
- McGill, M.R., Yan, H.M., Ramachandran, A., Murray, G.J., Rollins, D.E., Jaeschke, H., 2011. HepaRG cells: a human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 53, 974-982.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J.D., 2003. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *The Journal of biological chemistry* 278, 21592-21600.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annual review of biochemistry* 52, 711-760.
- Mekhjian, H.S., Phillips, S.F., Hofmann, A.F., 1979. Colonic absorption of unconjugated bile acids: perfusion

studies in man. *Digestive diseases and sciences* 24, 545-550.

Mellstrom, B., Savignac, M., Gomez-Villafuertes, R., Naranjo, J.R., 2008. Ca<sup>2+</sup>-operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models. *Physiological reviews* 88, 421-449.

Meng, L.J., Reyes, H., Palma, J., Hernandez, I., Ribalta, J., Sjoval, J., 1997. Profiles of bile acids and progesterone metabolites in the urine and serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Journal of hepatology* 27, 346-357.

Mercy, L., Pauw, A., Payen, L., Tejerina, S., Houbion, A., Demazy, C., Raes, M., Renard, P., Arnould, T., 2005. Mitochondrial biogenesis in mtDNA-depleted cells involves a Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway and a reduced mitochondrial protein import. *FEBS J* 272, 5031-5055.

Merrell, M.D., Augustine, L.M., Slitt, A.L., Cherrington, N.J., 2008. Induction of drug metabolism enzymes and transporters by oltipraz in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 22, 128-135.

Meyers, L.L., Beierschmitt, W.P., Khairallah, E.A., Cohen, S.D., 1988. Acetaminophen-induced inhibition of hepatic mitochondrial respiration in mice. *Toxicology and applied pharmacology* 93, 378-387.

Miceli, M.V., Jazwinski, S.M., 2005. Common and cell type-specific responses of human cells to mitochondrial dysfunction. *Experimental cell research* 302, 270-280.

Miller, S.J., Lou, D.Y., Seldin, D.C., Lane, W.S., Neel, B.G., 2002. Direct identification of PTEN phosphorylation sites. *FEBS letters* 528, 145-153.

Minemura, M., Tanimura, H., Tabor, E., 1999. Overexpression of multidrug resistance genes MDR1 and cMOAT in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines. *International journal of oncology* 15, 559-563.

Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.

Mitsuyoshi, H., Nakashima, T., Sumida, Y., Yoh, T., Nakajima, Y., Ishikawa, H., Inaba, K., Sakamoto, Y., Okano, T., Kashima, K., 1999. Ursodeoxycholic acid protects hepatocytes against oxidative injury via induction of antioxidants. *Biochemical and biophysical research communications* 263, 537-542.

Modica, S., Gadaleta, R.M., Moschetta, A., 2010. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nuclear receptor signaling* 8, e005.

Moffit, J.S., Aleksunes, L.M., Maher, J.M., Scheffer, G.L., Klaassen, C.D., Manautou, J.E., 2006. Induction of hepatic transporters multidrug resistance-associated proteins (Mrp) 3 and 4 by clofibrate is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 317, 537-545.

Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M., Attardi, G., 1982. Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 7195-7199.

Montoya, J., Gaines, G.L., Attardi, G., 1983. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* 34, 151-159.

Morais, R., Zinkewich-Peotti, K., Parent, M., Wang, H., Babai, F., Zollinger, M., 1994. Tumor-forming ability in athymic nude mice of human cell lines devoid of mitochondrial DNA. *Cancer research* 54, 3889-3896.

Mori, K., Ma, W., Gething, M.J., Sambrook, J., 1993. A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related

- kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 74, 743-756.
- Mottino, A.D., Catania, V.A., 2008. Hepatic drug transporters and nuclear receptors: regulation by therapeutic agents. *World journal of gastroenterology* : WJG 14, 7068-7074.
- Mullenbach, R., Bennett, A., Tetlow, N., Patel, N., Hamilton, G., Cheng, F., Chambers, J., Howard, R., Taylor-Robinson, S.D., Williamson, C., 2005. ATP8B1 mutations in British cases with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut* 54, 829-834.
- Muller, M., Jansen, P.L., 1997. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *The American journal of physiology* 272, G1285-1303.
- Muller, M., Mayer, R., Hero, U., Keppler, D., 1994. ATP-dependent transport of amphiphilic cations across the hepatocyte canalicular membrane mediated by *mdr1* P-glycoprotein. *FEBS letters* 343, 168-172.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, 263-273.
- Murakami, E., Feng, J.Y., Lee, H., Hanes, J., Johnson, K.A., Anderson, K.S., 2003. Characterization of novel reverse transcriptase and other RNA-associated catalytic activities by human DNA polymerase gamma: importance in mitochondrial DNA replication. *The Journal of biological chemistry* 278, 36403-36409.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* 417, 1-13.
- Myers, C.E., McGuire, W.P., Liss, R.H., Ifrim, I., Grotzinger, K., Young, R.C., 1977. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 197, 165-167.
- Naito, A., Carcel-Trullols, J., Xie, C.H., Evans, T.T., Mizumachi, T., Higuchi, M., 2008. Induction of acquired resistance to antiestrogen by reversible mitochondrial DNA depletion in breast cancer cell line. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 122, 1506-1511.
- Nass, M.M., 1972. Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis in vivo in cultured mammalian cells. *Experimental cell research* 72, 211-222.
- Nauseef, W.M., 2008. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *The Journal of biological chemistry* 283, 16961-16965.
- Neeley, W.L., Essigmann, J.M., 2006. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chemical research in toxicology* 19, 491-505.
- Nelson, S.D., 1990. Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Seminars in liver disease* 10, 267-278.
- Nies, A.T., Keppler, D., 2007. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 453, 643-659.
- Niittyinen, M., Tuomisto, J.T., Auriola, S., Pohjanvirta, R., Syrjala, P., Simanainen, U., Viluksela, M., Tuomisto, J., 2003. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced accumulation of biliverdin and hepatic peliosis in rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 71, 112-123.
- Nishikawa, M., Nishiguchi, S., Shiomi, S., Tamori, A., Koh, N., Takeda, T., Kubo, S., Hirohashi, K., Kinoshita, H., Sato, E., Inoue, M., 2001. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 61, 1843-1845.



- Nomoto, M., Miyata, M., Yin, S., Kurata, Y., Shimada, M., Yoshinari, K., Gonzalez, F.J., Suzuki, K., Shibasaki, S., Kurosawa, T., Yamazoe, Y., 2009. Bile acid-induced elevated oxidative stress in the absence of farnesoid X receptor. *Biol Pharm Bull* 32, 172-178.
- Nomoto, S., Yamashita, K., Koshikawa, K., Nakao, A., Sidransky, D., 2002. Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8, 481-487.
- Ojala, D., Merkel, C., Gelfand, R., Attardi, G., 1980. The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell* 22, 393-403.
- Okamoto, M., Ohsato, T., Nakada, K., Isobe, K., Spelbrink, J.N., Hayashi, J., Hamasaki, N., Kang, D., 2003. Ditercalinium chloride, a pro-anticancer drug, intimately associates with mammalian mitochondrial DNA and inhibits its replication. *Current genetics* 43, 364-370.
- Olinga, P., Elferink, M.G., Draaisma, A.L., Merema, M.T., Castell, J.V., Perez, G., Groothuis, G.M., 2008. Coordinated induction of drug transporters and phase I and II metabolism in human liver slices. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 33, 380-389.
- Osawa, S., Jukes, T.H., Watanabe, K., Muto, A., 1992. Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiological reviews* 56, 229-264.
- Palmeira, C.M., Rolo, A.P., 2004. Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicology* 203, 1-15.
- Pan-Zhou, X.R., Cui, L., Zhou, X.J., Sommadossi, J.P., Darley-Usmar, V.M., 2000. Differential effects of anti-retroviral nucleoside analogs on mitochondrial function in HepG2 cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 496-503.
- Park, B.K., Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., 1995. The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacology & therapeutics* 68, 385-424.
- Park, S.Y., Chang, I., Kim, J.Y., Kang, S.W., Park, S.H., Singh, K., Lee, M.S., 2004. Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: role of mitochondrial superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry* 279, 7512-7520.
- Pascual, M.J., Serrano, M.A., El-Mir, M.Y., Macias, R.I., Jimenez, F., Marin, J.J., 2002. Relationship between asymptomatic hypercholanemia of pregnancy and progesterone metabolism. *Clin Sci (Lond)* 102, 587-593.
- Patel, T., Bronk, S.F., Gores, G.J., 1994. Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *The Journal of clinical investigation* 94, 2183-2192.
- Patel, T., Gores, G.J., 1995. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 21, 1725-1741.
- Patlolla, A.K., Barnes, C., Hackett, D., Tchounwou, P.B., 2009. Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int J Environ Res Public Health* 6, 643-653.
- Pavek, P., Cerveny, L., Svecova, L., Brysch, M., Libra, A., Vrzal, R., Nachtigal, P., Staud, F., Ulrichova, J., Fendrich, Z., Dvorak, Z., 2007. Examination of Glucocorticoid receptor alpha-mediated transcriptional regulation of P-glycoprotein, CYP3A4, and CYP2C9 genes in placental trophoblast cell lines. *Placenta* 28, 1004-1011.
- Pelicano, H., Carney, D., Huang, P., 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug resis-*



tance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy 7, 97-110.

- Pereira, P.J., Macedo-Ribeiro, S., Parraga, A., Perez-Luque, R., Cunningham, O., Darcy, K., Mantle, T.J., Coll, M., 2001. Structure of human biliverdin IXbeta reductase, an early fetal bilirubin IXbeta producing enzyme. *Nature structural biology* 8, 215-220.
- Perez, M.J., Briz, O., 2009. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World journal of gastroenterology : WJG* 15, 1677-1689.
- Perez, M.J., Castano, B., Gonzalez-Buitrago, J.M., Marin, J.J., 2007. Multiple protective effects of melatonin against maternal cholestasis-induced oxidative stress and apoptosis in the rat fetal liver-placenta-maternal liver trio. *J Pineal Res* 43, 130-139.
- Perez, M.J., Castano, B., Jimenez, S., Serrano, M.A., Gonzalez-Buitrago, J.M., Marin, J.J., 2008. Role of vitamin C transporters and biliverdin reductase in the dual pro-oxidant and anti-oxidant effect of biliary compounds on the placental-fetal unit in cholestasis during pregnancy. *Toxicology and applied pharmacology* 232, 327-336.
- Perez, M.J., Macias, R.I., Duran, C., Monte, M.J., Gonzalez-Buitrago, J.M., Marin, J.J., 2005. Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *Journal of hepatology* 43, 324-332.
- Perez, M.J., Macias, R.I., Marin, J.J., 2006. Maternal cholestasis induces placental oxidative stress and apoptosis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *Placenta* 27, 34-41.
- Peroukides, S., Bravou, V., Alexopoulos, A., Varakis, J., Kalofonos, H., Papadaki, H., 2010. Survivin overexpression in HCC and liver cirrhosis differentially correlates with p-STAT3 and E-cadherin. *Histol Histopathol* 25, 299-307.
- Petersen, S.V., Oury, T.D., Valnickova, Z., Thogersen, I.B., Hojrup, P., Crapo, J.D., Enghild, J.J., 2003. The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: one sequence and two structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13875-13880.
- Pillay, V., Martinus, R.D., Hill, J.S., Phillips, D.R., 1998. Upregulation of P-glycoprotein in rat hepatoma rho(o) cells: implications for drug-DNA interactions. *Journal of cellular biochemistry* 69, 463-469.
- Pinz, K.G., Bogenhagen, D.F., 1998. Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Molecular and cellular biology* 18, 1257-1265.
- Placke, M.E., Wyand, D.S., Cohen, S.D., 1987. Extrahepatic lesions induced by acetaminophen in the mouse. *Toxicologic pathology* 15, 381-387.
- Polyak, K., Li, Y., Zhu, H., Lengauer, C., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Trush, M.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1998. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nature genetics* 20, 291-293.
- Portincasa, P., Di Ciaula, A., Wang, H.H., Moschetta, A., Wang, D.Q., 2009. Medicinal treatments of cholesterol gallstones: old, current and new perspectives. *Current medicinal chemistry* 16, 1531-1542.
- Possel, H., Noack, H., Augustin, W., Keilhoff, G., Wolf, G., 1997. 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS letters* 416, 175-178.
- Prescott, L.F., 1980. Hepatotoxicity of mild analgesics. *British journal of clinical pharmacology* 10 Suppl 2, 373S-379S.

- Prichard, J.S., 1972. Biliverdin appearing in a case of malnutrition. *Br J Clin Pract* 26, 481-482.
- Pyrko, P., Soriano, N., Kardosh, A., Liu, Y.T., Uddin, J., Petasis, N.A., Hofman, F.M., Chen, C.S., Chen, T.C., Schonthal, A.H., 2006. Downregulation of survivin expression and concomitant induction of apoptosis by celecoxib and its non-cyclooxygenase-2-inhibitory analog, dimethyl-celecoxib (DMC), in tumor cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer* 5, 19.
- Qiao, L., Han, S.I., Fang, Y., Park, J.S., Gupta, S., Gilfor, D., Amorino, G., Valerie, K., Sealy, L., Engelhardt, J.F., Grant, S., Hylemon, P.B., Dent, P., 2003. Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Molecular and cellular biology* 23, 3052-3066.
- Qiu, Y., Benet, L.Z., Burlingame, A.L., 1998. Identification of the hepatic protein targets of reactive metabolites of acetaminophen in vivo in mice using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry* 273, 17940-17953.
- Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I.V., Treberg, J.R., Ackrell, B.A., Brand, M.D., 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *The Journal of biological chemistry* 287, 27255-27264.
- Rabindran, S.K., He, H., Singh, M., Brown, E., Collins, K.I., Annable, T., Greenberger, L.M., 1998. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer research* 58, 5850-5858.
- Rabindran, S.K., Ross, D.D., Doyle, L.A., Yang, W., Greenberger, L.M., 2000. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer research* 60, 47-50.
- Ramesh, M., Ahlawat, P., Srinivas, N.R., 2010. Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. *Biomedical chromatography* : BMC 24, 104-123.
- Revuelta, I., 2010. Papel del genoma mitocondrial en los cambios de expresión de proteínas ABC inducidos por ácidos biliares en células hepáticas. Trabajo de grado. Universidad de Salamanca.
- Richert, L., Tuschl, G., Abadie, C., Blanchard, N., Pekthong, D., Mantion, G., Weber, J.C., Mueller, S.O., 2009. Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolising enzymes in rat and human hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology* 235, 86-96.
- Rius, M., Hummel-Eisenbeiss, J., Hofmann, A.F., Keppler, D., 2006. Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 290, G640-649.
- Rius, M., Nies, A.T., Hummel-Eisenbeiss, J., Jedlitschky, G., Keppler, D., 2003. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 38, 374-384.
- Rodrigues, C.M., Fan, G., Wong, P.Y., Kren, B.T., Steer, C.J., 1998. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 4, 165-178.
- Roger, L., St Pyrek, J., Little, J.M., Adcock, E.W., 1983. What is meant by the term "bile acid"? *The American journal of physiology* 244, G107-110.
- Rosignoli, P., Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Pelli, M.A., Morozzi, G., 2008. Genotoxic effect of

- bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate. *European journal of nutrition* 47, 301-309.
- Ross, D.D., Yang, W., Abruzzo, L.V., Dalton, W.S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S.P., Doyle, L.A., 1999. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 91, 429-433.
- Ruetz, S., Gros, P., 1994. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell* 77, 1071-1081.
- Ryan, M.T., Hoogenraad, N.J., 2007. Mitochondrial-nuclear communications. *Annual review of biochemistry* 76, 701-722.
- Ryter, S.W., Tyrrell, R.M., 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28, 289-309.
- Salim, M., Brown-Kipphut, B.A., Maines, M.D., 2001. Human biliverdin reductase is autophosphorylated, and phosphorylation is required for bilirubin formation. *The Journal of biological chemistry* 276, 10929-10934.
- Sanchez Vicente, L., 2009. Hiperbiliverdinemia asociada a una mutación inactivante del gen BLVRA. Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Salamanca. Salamanca.
- Sandusky, G.E., Mintze, K.S., Pratt, S.E., Dantzig, A.H., 2002. Expression of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in normal human tissues and carcinomas using tissue microarrays. *Histopathology* 41, 65-74.
- Scialli, A.R., Ang, R., Breitmeyer, J., Royal, M.A., 2010. A review of the literature on the effects of acetaminophen on pregnancy outcome. *Reprod Toxicol* 30, 495-507.
- Scheffer, G.L., Kool, M., de Haas, M., de Vree, J.M., Pijnenborg, A.C., Bosman, D.K., Elferink, R.P., van der Valk, P., Borst, P., Scheper, R.J., 2002. Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 82, 193-201.
- Scheuer, P.J., 1980. *Liver biopsy interpretation*. Liver biopsy interpretation. . London: Balliere Tindall, 35-59
- Schinkel, A.H., 1998. Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 36, 9-13.
- Schinkel, A.H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L., Smit, J.J., van der Valk, M.A., Voordouw, A.C., Spits, H., van Tellingen, O., Zijlmans, J.M., Fibbe, W.E., Borst, P., 1997. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4028-4033.
- Schluchter, W.M., Glazer, A.N., 1997. Characterization of cyanobacterial biliverdin reductase. Conversion of biliverdin to bilirubin is important for normal phycobiliprotein biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 272, 13562-13569.
- Schoemaker, M.H., Gommans, W.M., Conde de la Rosa, L., Homan, M., Klok, P., Trautwein, C., van Goor, H., Poelstra, K., Haisma, H.J., Jansen, P.L., Moshage, H., 2003. Resistance of rat hepatocytes against bile acid-induced apoptosis in cholestatic liver injury is due to nuclear factor-kappa B activation. *Journal of hepatology* 39, 153-161.
- Schon, E., 1997. The mitochondrial genome. The molecular and genetic bases of neurologic and psychiatric diseases. *Mitochondrial Disorders*. Butterworth-Heinemann 14, 179-189.

- Schonhoff, C.M., Matsuoka, M., Tummala, H., Johnson, M.A., Estevez, A.G., Wu, R., Kamaid, A., Ricart, K.C., Hashimoto, Y., Gaston, B., Macdonald, T.L., Xu, Z., Mannick, J.B., 2006. S-nitrosothiol depletion in amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2404-2409.
- Schumacker, P.T., 2006. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer cell* 10, 175-176.
- Sebens, S., Bauer, I., Geismann, C., Grage-Griebenow, E., Ehlers, S., Kruse, M.L., Arlt, A., Schafer, H., 2011. Inflammatory macrophages induce Nrf2 transcription factor-dependent proteasome activity in colonic NCM460 cells and thereby confer anti-apoptotic protection. *The Journal of biological chemistry* 286, 40911-40921.
- Seeger, M.A., van Veen, H.W., 2009. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochimica et biophysica acta* 1794, 725-737.
- Sekine, S., Mitsuki, K., Ito, K., Kugioka, S., Horie, T., 2012. Sustained intrahepatic glutathione depletion causes proteasomal degradation of multidrug resistance-associated protein 2 in rat liver. *Biochimica et biophysica acta* 1822, 980-987.
- Serrano, M.A., Macias, R.I., Briz, O., Monte, M.J., Blazquez, A.G., Williamson, C., Kubitz, R., Marin, J.J., 2007. Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta* 28, 107-117.
- Serrano, M.A., Macias, R.I., Vallejo, M., Briz, O., Bravo, A., Pascual, M.J., St-Pierre, M.V., Stieger, B., Meier, P.J., Marin, J.J., 2003. Effect of ursodeoxycholic acid on the impairment induced by maternal cholestasis in the rat placenta-maternal liver tandem excretory pathway. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 305, 515-524.
- Serviddio, G., Pereda, J., Pallardo, F.V., Carretero, J., Borrás, C., Cutrin, J., Vendemiale, G., Poli, G., Vina, J., Sastre, J., 2004. Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology* 39, 711-720.
- Shaik, Z.P., Fifer, E.K., Nowak, G., 2007. Protein kinase B/Akt modulates nephrotoxicant-induced necrosis in renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F292-303.
- Shayiq, R.M., Roberts, D.W., Rothstein, K., Snawder, J.E., Benson, W., Ma, X., Black, M., 1999. Repeat exposure to incremental doses of acetaminophen provides protection against acetaminophen-induced lethality in mice: an explanation for high acetaminophen dosage in humans without hepatic injury. *Hepatology* 29, 451-463.
- Sheps, J.A., Ling, V., 2007. Preface: the concept and consequences of multidrug resistance. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 453, 545-553.
- Shidara, Y., Yamagata, K., Kanamori, T., Nakano, K., Kwong, J.Q., Manfredi, G., Oda, H., Ohta, S., 2005. Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer research* 65, 1655-1663.
- Singer, A.J., Carracio, T.R., Mofenson, H.C., 1995. The temporal profile of increased transaminase levels in patients with acetaminophen-induced liver dysfunction. *Annals of emergency medicine* 26, 49-53.
- Singh, A., Wu, H., Zhang, P., Happel, C., Ma, J., Biswal, S., 2010. Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. *Molecular cancer therapeutics* 9, 2365-2376.

- Singh, S., Shackleton, G., Ah-Sing, E., Chakraborty, J., Bailey, M.E., 1992. Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology* 103, 1625-1629.
- Smit, J.J., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P., Groen, A.K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N.M., van Roon, M.A., et al., 1993. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75, 451-462.
- Smith, A.J., van Helvoort, A., van Meer, G., Szabo, K., Welker, E., Szakacs, G., Varadi, A., Sarkadi, B., Borst, P., 2000. MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *The Journal of biological chemistry* 275, 23530-23539.
- Smoly, J.M., Kuylenstierna, B., Ernster, L., 1970. Topological and functional organization of the mitochondrion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66, 125-131.
- Smyth, M.J., Krasovskis, E., Sutton, V.R., Johnstone, R.W., 1998. The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7024-7029.
- Sokol, R.J., Devereaux, M., Khandwala, R., O'Brien, K., 1993. Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 17, 869-881.
- Sokol, R.J., Devereaux, M., Khandwala, R.A., 1991. Effect of dietary lipid and vitamin E on mitochondrial lipid peroxidation and hepatic injury in the bile duct-ligated rat. *Journal of lipid research* 32, 1349-1357.
- Sokol, R.J., McKim, J.M., Jr., Goff, M.C., Ruyle, S.Z., Devereaux, M.W., Han, D., Packer, L., Everson, G., 1998. Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat. *Gastroenterology* 114, 164-174.
- Sokol, R.J., Straka, M.S., Dahl, R., Devereaux, M.W., Yerushalmi, B., Gumprich, E., Elkins, N., Everson, G., 2001. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatric research* 49, 519-531.
- Sokol, R.J., Winkhofer-Roob, B.M., Devereaux, M.W., McKim, J.M., Jr., 1995. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* 109, 1249-1256.
- Soroka, C.J., Lee, J.M., Azzaroli, F., Boyer, J.L., 2001. Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* 33, 783-791.
- Spivey, J.R., Bronk, S.F., Gores, G.J., 1993. Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium. *The Journal of clinical investigation* 92, 17-24.
- St-Pierre, M.V., Serrano, M.A., Macias, R.I., Dubs, U., Hoehli, M., Lauper, U., Meier, P.J., Marin, J.J., 2000. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 279, R1495-1503.
- St-Pierre, M.V., Stallmach, T., Freimoser Grundschober, A., Dufour, J.F., Serrano, M.A., Marin, J.J., Sugiyama, Y., Meier, P.J., 2004. Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 287, R1505-1516.

- Staudinger, J., Liu, Y., Madan, A., Habeebu, S., Klaassen, C.D., 2001. Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 29, 1467-1472.
- Stedman, C.A., Liddle, C., Coulter, S.A., Sonoda, J., Alvarez, J.G., Moore, D.D., Evans, R.M., Downes, M., 2005. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2063-2068.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., Ames, B.N., 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235, 1043-1046.
- Stockert, J.C., Blazquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R.W., Villanueva, A., 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem* 114, 785-796.
- Strautnieks, S.S., Bull, L.N., Knisely, A.S., Kocoshis, S.A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M.S., Kagalwalla, A.F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N.B., Gardiner, R.M., Thompson, R.J., 1998. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nature genetics* 20, 233-238.
- Stravitz, R.T., Vlahcevic, Z.R., Russell, T.L., Heizer, M.L., Avadhani, N.G., Hylemon, P.B., 1996. Regulation of sterol 27-hydroxylase and an alternative pathway of bile acid biosynthesis in primary cultures of rat hepatocytes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 57, 337-347.
- Summers, M.A., Moore, J.L., McAuley, J.W., 2004. Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy. *The Annals of pharmacotherapy* 38, 1631-1634.
- Synold, T.W., Dussault, I., Forman, B.M., 2001. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nature medicine* 7, 584-590.
- Syvanen, S., Hammarlund-Udenaes, M., 2010. Using PET studies of P-gp function to elucidate mechanisms underlying the disposition of drugs. *Current topics in medicinal chemistry* 10, 1799-1809.
- Taanman, J.W., 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et biophysica acta* 1410, 103-123.
- Takahata, T., Ookawa, K., Suto, K., Tanaka, M., Yano, H., Nakashima, O., Kojiro, M., Tamura, Y., Tateishi, T., Sakata, Y., Fukuda, S., 2008. Chemosensitivity determinants of irinotecan hydrochloride in hepatocellular carcinoma cell lines. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 102, 399-407.
- Talalay, P., 1960. Enzymic analysis of steroid hormones. *Methods of biochemical analysis* 8, 119-143.
- Tamori, A., Nishiguchi, S., Nishikawa, M., Kubo, S., Koh, N., Hirohashi, K., Shiomi, S., Inoue, M., 2004. Correlation between clinical characteristics and mitochondrial D-loop DNA mutations in hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology* 39, 1063-1068.
- Tamura, A., Wakabayashi, K., Onishi, Y., Takeda, M., Ikegami, Y., Sawada, S., Tsuji, M., Matsuda, Y., Ishikawa, T., 2007. Re-evaluation and functional classification of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Cancer science* 98, 231-239.
- Tanaka, Y., Kobayashi, Y., Gabazza, E.C., Higuchi, K., Kamisako, T., Kuroda, M., Takeuchi, K., Iwasa, M., Kaito, M., Adachi, Y., 2002. Increased renal expression of bilirubin glucuronide transporters in a rat model of obstructive jaundice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 282, G656-662.



- Tarrago-Litvak, L., Viratelle, O., Darriet, D., Dalibart, R., Graves, P.V., Litvak, S., 1978. The inhibition of mitochondrial DNA polymerase gamma from animal cells by intercalating drugs. *Nucleic acids research* 5, 2197-2210.
- Tickner, T.R., Gutteridge, J.M., 1978. A simple colorimetric method for the estimation of plasma biliverdin. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 85, 125-129.
- Togashi, H., Shinzawa, H., Wakabayashi, H., Nakamura, T., Yamada, N., Takahashi, T., Ishikawa, M., 1990. Activities of free oxygen radical scavenger enzymes in human liver. *Journal of hepatology* 11, 200-205.
- Trauner, M., Boyer, J.L., 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiological reviews* 83, 633-671.
- Trauner, M., Fickert, P., Wagner, M., 2007. MDR3 (ABCB4) defects: a paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes. *Seminars in liver disease* 27, 77-98.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., Walter, P., 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101, 249-258.
- Tseng, L.M., Yin, P.H., Chi, C.W., Hsu, C.Y., Wu, C.W., Lee, L.M., Wei, Y.H., Lee, H.C., 2006. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in breast cancer. *Genes, chromosomes & cancer* 45, 629-638.
- Tsutsumishita, Y., Onda, T., Okada, K., Takeda, M., Endou, H., Futaki, S., Niwa, M., 1998. Involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochemical and biophysical research communications* 242, 310-312.
- Tudor, C., Lerner-Marmarosh, N., Engelborghs, Y., Gibbs, P.E., Maines, M.D., 2008. Biliverdin reductase is a transporter of haem into the nucleus and is essential for regulation of HO-1 gene expression by haematin. *The Biochemical journal* 413, 405-416.
- Tzagoloff, A., Siekevitz, P., 1982. Oxidative pathways in mitochondria; in *Mitochondria*. Plenum Press New York, 39-60.
- Uppal, H., Toma, D., Saini, S.P., Ren, S., Jones, T.J., Xie, W., 2005. Combined loss of orphan receptors PXR and CAR heightens sensitivity to toxic bile acids in mice. *Hepatology* 41, 168-176.
- Vallejo, M., Briz, O., Serrano, M.A., Monte, M.J., Marin, J.J., 2006. Potential role of trans-inhibition of the bile salt export pump by progesterone metabolites in the etiopathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Journal of hepatology* 44, 1150-1157.
- Van Mil, S.W., Milona, A., Dixon, P.H., Mullenbach, R., Geenes, V.L., Chambers, J., Shevchuk, V., Moore, G.E., Lammert, F., Glantz, A.G., Mattsson, L.A., Whittaker, J., Parker, M.G., White, R., Williamson, C., 2007. Functional variants of the central bile acid sensor FXR identified in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gastroenterology* 133, 507-516.
- Vergani, L., Floreani, M., Russell, A., Ceccon, M., Napoli, E., Cabrelle, A., Valente, L., Bragantini, F., Leger, B., Dabbeni-Sala, F., 2004. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *European journal of biochemistry / FEBS* 271, 3646-3656.
- Vivanco, I., Sawyers, C.L., 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Vollrath, V., Wielandt, A.M., Iruetagoiena, M., Chianale, J., 2006. Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *The Biochemical journal* 395, 599-609.



- Vos, T.A., Hooiveld, G.J., Koning, H., Childs, S., Meijer, D.K., Moshage, H., Jansen, P.L., Muller, M., 1998. Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* 28, 1637-1644.
- Wada, M., Toh, S., Taniguchi, K., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Yoshida, I., Kimura, A., Sakisaka, S., Adachi, Y., Kuwano, M., 1998. Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Human molecular genetics* 7, 203-207.
- Wakamatsu, T., Nakahashi, Y., Hachimine, D., Seki, T., Okazaki, K., 2007. The combination of glycyrrhizin and lamivudine can reverse the cisplatin resistance in hepatocellular carcinoma cells through inhibition of multidrug resistance-associated proteins. *International journal of oncology* 31, 1465-1472.
- Wallace, D.C., 1997. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Scientific American* 277, 40-47.
- Wallace, D.C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual review of genetics* 39, 359-407.
- Wallace, D.C., 2007. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annual review of biochemistry* 76, 781-821.
- Wallace, D.C., 2008. Mitochondria as chi. *Genetics* 179, 727-735.
- Wang, H., Morais, R., 1997. Up-regulation of nuclear genes in response to inhibition of mitochondrial DNA expression in chicken cells. *Biochimica et biophysica acta* 1352, 325-334.
- Wang, X., 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development* 15, 2922-2933.
- Wang, X.J., Sun, Z., Villeneuve, N.F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., Wondrak, G.T., Wong, P.K., Zhang, D.D., 2008. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 29, 1235-1243.
- Wanrooij, S., Luoma, P., van Goethem, G., van Broeckhoven, C., Suomalainen, A., Spelbrink, J.N., 2004. Tinkle and POLG defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA. *Nucleic acids research* 32, 3053-3064.
- Warburg, O., 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Wei, L., Su, N., Zheng, D.Y., Cao, M.R., Li, A.M., Yan, X., Lu, C.W., Luo, R.C., 2009. [Reversion of drug-resistant hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402/FU by sorafenib]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 25, 344-347.
- Wei, Y.H., 1992. Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. *Mutation research* 275, 145-155.
- Wheelhouse, N.M., Lai, P.B., Wigmore, S.J., Ross, J.A., Harrison, D.J., 2005. Mitochondrial D-loop mutations and deletion profiles of cancerous and noncancerous liver tissue in hepatitis B virus-infected liver. *British journal of cancer* 92, 1268-1272.
- Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R.A., Schwartz, B., Simantov, R., Kelley, S., 2006. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5, 835-844.
- Wilkes, J.M., Clark, L.E., Herrera, J.L., 2005. Acetaminophen overdose in pregnancy. *South Med J* 98, 1118-

1122.

- Wilson, J.X., 2005. Regulation of vitamin C transport. *Annual review of nutrition* 25, 105-125.
- Williamson, C., Gorelik, J., Eaton, B.M., Lab, M., de Swiet, M., Korchev, Y., 2001. The bile acid taurocholate impairs rat cardiomyocyte function: a proposed mechanism for intra-uterine fetal death in obstetric cholestasis. *Clin Sci (Lond)* 100, 363-369.
- Wittenburg, H., Carey, M.C., 2002. Biliary cholesterol secretion by the twinned sterol half-transporters ABCG5 and ABCG8. *The Journal of clinical investigation* 110, 605-609.
- Wortham, M., Czerwinski, M., He, L., Parkinson, A., Wan, Y.J., 2007. Expression of constitutive androstane receptor, hepatic nuclear factor 4 alpha, and P450 oxidoreductase genes determines interindividual variability in basal expression and activity of a broad scope of xenobiotic metabolism genes in the human liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35, 1700-1710.
- Woudenberg-Vrenken, T.E., Buist-Homan, M., Conde de la Rosa, L., Faber, K.N., Moshage, H., 2010. Anti-oxidants do not prevent bile acid-induced cell death in rat hepatocytes. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 30, 1511-1521.
- Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S., Zhang, J.T., 2004. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *The Journal of biological chemistry* 279, 19781-19789.
- Yakubovskaya, E., Mejia, E., Byrnes, J., Hambardjjeva, E., Garcia-Diaz, M., 2010. Helix unwinding and base flipping enable human MTERF1 to terminate mitochondrial transcription. *Cell* 141, 982-993.
- Yamada, S., Nomoto, S., Fujii, T., Kaneko, T., Takeda, S., Inoue, S., Kanazumi, N., Nakao, A., 2006. Correlation between copy number of mitochondrial DNA and clinico-pathologic parameters of hepatocellular carcinoma. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 32, 303-307.
- Yamaguchi, T., Nakajima, H., 1995. Changes in the composition of bilirubin-IX isomers during human prenatal development. *European journal of biochemistry / FEBS* 233, 467-472.
- Yamamoto, Y., Moore, R., Hess, H.A., Guo, G.L., Gonzalez, F.J., Korach, K.S., Maronpot, R.R., Negishi, M., 2006. Estrogen receptor alpha mediates 17alpha-ethynylestradiol causing hepatotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 281, 16625-16631.
- Yasukawa, T., Yang, M.Y., Jacobs, H.T., Holt, I.J., 2005. A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Molecular cell* 18, 651-662.
- Yerushalmi, B., Dahl, R., Devereaux, M.W., Gumprich, E., Sokol, R.J., 2001. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 33, 616-626.
- Yin, P.H., Lee, H.C., Chau, G.Y., Wu, Y.T., Li, S.H., Lui, W.Y., Wei, Y.H., Liu, T.Y., Chi, C.W., 2004. Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer* 90, 2390-2396.
- Yin, P.H., Wu, C.C., Lin, J.C., Chi, C.W., Wei, Y.H., Lee, H.C., 2010. Somatic mutations of mitochondrial genome in hepatocellular carcinoma. *Mitochondrion* 10, 174-182.
- Young, A.M., Allen, C.E., Audus, K.L., 2003. Efflux transporters of the human placenta. *Advanced drug delivery reviews* 55, 125-132.

Zamek-Gliszczynski, M.J., Hoffmaster, K.A., Tian, X., Zhao, R., Polli, J.W., Humphreys, J.E., Webster, L.O., Bridges, A.S., Kalvass, J.C., Brouwer, K.L., 2005. Multiple mechanisms are involved in the biliary excretion of acetaminophen sulfate in the rat: role of Mrp2 and Bcrp1. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33, 1158-1165.

Zamek-Gliszczynski, M.J., Nezasa, K., Tian, X., Bridges, A.S., Lee, K., Belinsky, M.G., Kruh, G.D., Brouwer, K.L., 2006a. Evaluation of the role of multidrug resistance-associated protein (Mrp) 3 and Mrp4 in hepatic basolateral excretion of sulfate and glucuronide metabolites of acetaminophen, 4-methylumbelliferone, and harmol in Abcc3<sup>-/-</sup> and Abcc4<sup>-/-</sup> mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319, 1485-1491.

Zamek-Gliszczynski, M.J., Nezasa, K., Tian, X., Kalvass, J.C., Patel, N.J., Raub, T.J., Brouwer, K.L., 2006b. The important role of Bcrp (Abcg2) in the biliary excretion of sulfate and glucuronide metabolites of acetaminophen, 4-methylumbelliferone, and harmol in mice. *Molecular pharmacology* 70, 2127-2133.

Zecca, E., De Luca, D., Baroni, S., Vento, G., Tiberi, E., Romagnoli, C., 2008. Bile acid-induced lung injury in newborn infants: a bronchoalveolar lavage fluid study. *Pediatrics* 121, e146-149.

Zelcer, N., Reid, G., Wielinga, P., Kuil, A., van der Heijden, I., Schuetz, J.D., Borst, P., 2003. Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *The Biochemical journal* 371, 361-367.

Zelcer, N., van de Wetering, K., de Waart, R., Scheffer, G.L., Marschall, H.U., Wielinga, P.R., Kuil, A., Kunne, C., Smith, A., van der Valk, M., Wijnholds, J., Elferink, R.O., Borst, P., 2006. Mice lacking Mrp3 (Abcc3) have normal bile salt transport, but altered hepatic transport of endogenous glucuronides. *Journal of hepatology* 44, 768-775.

Zeng, H., Liu, G., Rea, P.A., Kruh, G.D., 2000. Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer research* 60, 4779-4784.

Zhao, Q., Wang, J., Levichkin, I.V., Stasinopoulos, S., Ryan, M.T., Hoogenraad, N.J., 2002. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *The EMBO journal* 21, 4411-4419.

Zhou, S., Ye, W., Duan, X., Zhang, M., Wang, J., 2013. The Noncytotoxic Dose of Sorafenib Sensitizes Bel-7402/5-FU Cells to 5-FU by Down-Regulating 5-FU-Induced Nrf2 Expression. *Digestive diseases and sciences*.

Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A.G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., 2010. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-biological interactions* 188, 334-339.

Zimber, A., Zusman, I., 1990. Effects of secondary bile acids on the intrauterine development in rats. *Teratology* 42, 215-224.

Zollner, G., Wagner, M., Fickert, P., Silbert, D., Fuchsbichler, A., Zatloukal, K., Denk, H., Trauner, M., 2005. Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 25, 367-379.

Zusman, I., Zimber, A., 1990. Effects of secondary bile acids on the in vitro development of early somite rat embryos. *Acta anatomica* 138, 144-149.

## 7. English Summary



## 7.1. AIMS

The accumulation in cells of potentially toxic endogenous compounds or xenobiotics may alter the redox status and induce oxidative stress, which eventually may cause cell death by apoptosis or necrosis.

Under these circumstances, cells activate different mechanisms in order to reduce cellular injury. These include the activation of antioxidant systems, the induction of mechanisms of biotransformation and detoxification, mediated by phase I and II enzymes and efflux proteins belonging to the ABC (“ATP-Binding Cassette”) superfamily, and the activation of survival signaling pathways. However, despite the importance of these cellular defense systems, the mechanisms involved in their regulation are poorly understood.

The crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes is essential to keep several cellular functions under control, including the maintenance of cellular homeostasis in spite of situations causing oxidative or chemical stress. Thus, changes in mitochondrial function may trigger retrograde signaling pathways from mitochondria to the nucleus which causes changes in gene expression. Due to the high sensitivity of mitochondria to the toxicity induced by many endogenous compounds and drugs, the activation of these signaling pathways could participate in the control of the expression of genes involved in cellular defense mechanisms leading to the development of a chemoresistance phenotype.

Therefore the **global aim** of this Doctoral Thesis was to analyze the role of mitochondrial genome in the regulation of the expression of several genes and the activation of signaling pathways involved in the defense against oxidative stress and cell death induced by potentially toxic endogenous compounds or xenobiotics. To achieve this goal the project was divided into the following partial aims.

**First aim:** To evaluate the effect of subtoxic doses of acetaminophen on the expression of ABC proteins in rat liver and extrahepatic tissues as well as in human cell lines.

**Second aim:** To study the role of the mitochondrial genome in the mechanisms involved in the regulation of the expression of ABC proteins under oxidative stress situations induced by potentially toxic endogenous compounds such as bile acids, and xenobiotics, such as acetaminophen.

**Third aim:** To investigate the role of the complete mitochondrial genome depletion in the mechanisms by which human liver cells become resistant to cell death induced by incubation with high concentrations of bile acids.

**Fourth aim:** To study the role of the mitochondrial genome in the regulation of genes involved in different mechanisms of resistance to the toxicity induced by drugs included in the pharmacological treatment of hepatocellular carcinoma.

**Fifth aim:** To determine the effect of c.214C>A mutation in the human biliverdin reductase gene (*BLVRA*) on the activity of this enzyme and analyze the role of biliverdin, the substrate of this enzyme, against bile acid-induced oxidative stress in human hepatic cell lines.



## 7.2. RESULTS

### 7.2.1. Study of the expression of ABC transporters under oxidative stress situations induced by endogenous and xenobiotic compounds in different tissues: role of the mitochondrial genome

ABC pumps are membrane proteins that actively transport a wide range of substrates with different chemical structures. In mammals they have a great clinical interest since their expression is altered in several diseases (Trauner *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 1998) and they are involved in the development of resistance to chemotherapy (Lage, 2003).

These transporters are also involved in a variety of important physiological processes. Thus, ABC proteins participate in the regulation of the permeability of placental and blood-brain barriers, where their expression is particularly high (Klein *et al.*, 1999). In liver, kidney and gastrointestinal tract, these pumps mediate the elimination of xenobiotic and endogenous toxic compounds (Leslie *et al.*, 2005).

The expression of ABC proteins is tightly regulated under physiological conditions and may be altered in pathological situations. Multiple factors can participate in this control, including levels of bile constituents, hormones, lipid metabolites, pro-inflammatory cytokines and many xenobiotics. However, the precise mechanisms involved in this regulation are largely unknown. At the transcriptional level these transporters can be regulated by nuclear receptors such as the farnesoid X receptor (FXR), which is sensitive to bile acids (BAs), and a member of this signaling pathway, the small heterodimer partner (SHP). Xenobiotic receptors such as the constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR), which can be activated by a variety of drugs and toxins (Klaassen and Aleksunes, 2010), and the transcriptional factor NRF2, which is activated under oxidative stress conditions, are also involved in the regulation of the expression of these proteins (Klaassen and Aleksunes, 2010). In addition to the control mediated by direct activation of nuclear receptors, retrograde control mechanisms, permitting crosstalk between mitochondrial and nuclear genomes, can modulate the expression of these pumps (Hallstrom and Moye-Rowley, 2000; Pillay *et al.*, 1998). Since mitochondria are particularly sensitive to the toxicity induced by many endogenous compounds and drugs, these signaling pathways may play a critical role in the activation of cellular defense mechanisms (Erol, 2005), including the modulation of the expression of ABC export pumps, under chemical stress conditions.

#### 7.2.1.1. Effect of subtoxic doses of acetaminophen on the expression of ABC transporters in different tissues

Acetaminophen or paracetamol is one of the most popular analgesic and antipyretic drugs. Moreover, this compound is used as a first choice drug for pain relieve during pregnancy because at therapeutic doses it is considered safe for the mother and the fetus (Scialli *et al.*, 2010).

This drug is mainly metabolized in the liver by UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases generating unarmful metabolites that are eliminated by renal and biliary excretion (James *et al.*, 2003). At therapeutic doses, a small proportion of acetaminophen is biotransformed by cytochrome P450 (CYP450) enzymes to the highly reactive intermediate metabolite, N-acetyl-pbenzoquinone-imine (NAPQI). Under normal conditions, this compound has a short half-life and is eliminated by conjugation with glutathione. In the case of acetaminophen overdose, the glucuronidation and sulfation pathways become saturated, and excessive amounts of acetaminophen undergo P450-mediated formation of NAPQI, which results in reduction of intracellular glutathione levels. Accumulated NAPQI then binds to cellular macromolecules (Nelson, 1990), leading to structural and metabolic alterations and eventually to necrosis in the liver (Prescott, 1980). Moreover, acetaminophen overdose can induce toxicity in extrahepatic tissues which is at least partly caused by liver-derived acetaminophen metabolites (Gu *et al.*, 2005).

Some ABC efflux transporters are involved in the elimination of acetaminophen metabolites from liver and kidney cells. Thus, Abcc2, Abcc3, Abcc4, and Abcg2 have the ability to transport sulfate-, glucuronate- or glutathione-conjugated acetaminophen (Zamek- Gliszczynski *et al.*, 2005; Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2006). Induction of the expression of these transporters, and also that of ABCB1/Abcb1 and ABCC1/Abcc1, in both human and rodent liver during administration of high toxic doses of acetaminophen has been reported (Aleksunes *et al.*, 2008; Aleksunes *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2007; Ghanem *et al.*, 2004). However, the effect of non-toxic treatments on the expression of these pumps is not well known.

Thus, the first aim of This Doctoral Thesis was to evaluate the effect of the treatment with subtoxic doses of acetaminophen on the ABC protein expression in the liver and extrahepatic tissues in human and rat.

The results obtained in this section of the Doctoral Thesis have been used to write the manuscript entitled: "Effect of acetaminophen on the expression of ABC proteins in placenta. Toxic effect on the placental barrier for bile acids during maternal cholestasis" which has been submitted for publication to the journal Toxicology and Applied Pharmacology and whose first evaluation has been positive although the acceptance is still pending on the consideration of a revised version.

- Aleksunes, L.M., Slitt, A.L., Maher, J.M., Augustine, L.M., Goedken, M.J., Chan, J.Y., Cherrington, N.J., Klaassen, C.D., Manautou, J.E., 2008. Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nrf2. *Toxicology and applied pharmacology* 226, 74-83.
- Aleksunes, L.M., Slitt, A.M., Cherrington, N.J., Thibodeau, M.S., Klaassen, C.D., Manautou, J.E., 2005. Differential expression of mouse hepatic transporter genes in response to acetaminophen and carbon tetrachloride. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 83, 44-52.
- Barnes, S.N., Aleksunes, L.M., Augustine, L., Scheffer, G.L., Goedken, M.J., Jakowski, A.B., Pruijboom-Brees, I.M., Cherrington, N.J., Manautou, J.E., 2007. Induction of hepatobiliary efflux transporters in acetaminophen-induced acute liver failure cases. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35, 1963-1969.
- Erol, A., 2005. Retrograde regulation due to mitochondrial dysfunction may be an important mechanism for carcinogenesis. *Medical hypotheses* 65, 525-529.
- Ghanem, C.I., Gomez, P.C., Arana, M.C., Perassolo, M., Ruiz, M.L., Villanueva, S.S., Ochoa, E.J., Catania, V.A., Bengochea, L.A., Mottino, A.D., 2004. Effect of acetaminophen on expression and activity of rat liver multidrug resistance-associated protein 2 and P-glycoprotein. *Biochemical pharmacology* 68, 791-798.
- Gu, J., Cui, H., Behr, M., Zhang, L., Zhang, Q.Y., Yang, W., Hinson, J.A., Ding, X., 2005. In vivo mechanisms of tissue-selective drug toxicity: effects of liver-specific knockout of the NADPH-cytochrome P450 reductase gene on acetaminophen toxicity in kidney, lung, and nasal mucosa. *Molecular pharmacology* 67, 623-630.
- Hallstrom, T.C., Moye-Rowley, W.S., 2000. Multiple signals from dysfunctional mitochondria activate the pleiotropic drug resistance pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 275, 37347-37356.
- James, L.P., Mayeux, P.R., Hinson, J.A., 2003. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 31, 1499-1506.
- Klaassen, C.D., Aleksunes, L.M., 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacological reviews* 62, 1-96.
- Klein, I., Sarkadi, B., Varadi, A., 1999. An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1461, 237-262.
- Lage, H., 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International journal of antimicrobial agents* 22, 188-199.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology* 204, 216-237.
- Nelson, S.D., 1990. Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Seminars in liver disease* 10, 267-278.
- Pillay, V., Martinus, R.D., Hill, J.S., Phillips, D.R., 1998. Upregulation of P-glycoprotein in rat hepatoma rho(o) cells: implications for drug-DNA interactions. *Journal of cellular biochemistry* 69, 463-469.

- Prescott, L.F., 1980. Hepatotoxicity of mild analgesics. *British journal of clinical pharmacology* 10 Suppl 2, 373S-379S.
- Scialli, A.R., Ang, R., Breitmeyer, J., Royal, M.A., 2010. A review of the literature on the effects of acetaminophen on pregnancy outcome. *Reprod Toxicol* 30, 495-507.
- Trauner, M., Fickert, P., Wagner, M., 2007. MDR3 (ABCB4) defects: a paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes. *Seminars in liver disease* 27, 77-98.
- Wada, M., Toh, S., Taniguchi, K., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Yoshida, I., Kimura, A., Sakisaka, S., Adachi, Y., Kuwano, M., 1998. Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Human molecular genetics* 7, 203-207.
- Zamek-Gliszczyński, M.J., Hoffmaster, K.A., Tian, X., Zhao, R., Polli, J.W., Humphreys, J.E., Webster, L.O., Bridges, A.S., Kalvass, J.C., Brouwer, K.L., 2005. Multiple mechanisms are involved in the biliary excretion of acetaminophen sulfate in the rat: role of Mrp2 and Bcrp1. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33, 1158-1165.
- Zamek-Gliszczyński, M.J., Nezasa, K., Tian, X., Bridges, A.S., Lee, K., Belinsky, M.G., Kruh, G.D., Brouwer, K.L., 2006. Evaluation of the role of multidrug resistance-associated protein (Mrp) 3 and Mrp4 in hepatic basolateral excretion of sulfate and glucuronide metabolites of acetaminophen, 4-methylumbelliferone, and harmol in Abcc3<sup>-/-</sup> and Abcc4<sup>-/-</sup> mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319, 1485-1491.

\*Manuscript Text

*Acetaminophen affects the placental barrier*

Blazquez *et al.* 1

**Effect of acetaminophen on the expression of ABC proteins in placenta.  
Toxic effect on the placental barrier for bile acids during maternal cholestasis**

Alba G. Blazquez<sup>1,3</sup>, Oscar Briz<sup>1,3</sup>, Ester Gonzalez-Sanchez<sup>1</sup>, Carolina I. Ghanem<sup>2</sup>,  
Jose J.G. Marin<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>) Laboratory of Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), IBSAL, University of Salamanca. Salamanca, Spain.

(<sup>2</sup>) Instituto de Investigaciones Farmacologicas, Facultad de Farmacia y Bioquimica, CONICET-Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

(<sup>3</sup>) National Institute for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERehd).

**Running Title:** Acetaminophen affects the placental barrier

**Author for correspondence:**

Jose J.G. Marin  
Department of Physiology and Pharmacology  
Campus Miguel de Unamuno, E.I.D., S-09  
37007, Salamanca, Spain  
Telephone: 34 923 294674  
Fax: 34 923 294669  
E-mail: [jjgmarin@usal.es](mailto:jjgmarin@usal.es)

**E-mail addresses:**

A.G. Blazquez: [albamgb@usal.es](mailto:albamgb@usal.es)

O. Briz: [obriz@usal.es](mailto:obriz@usal.es)

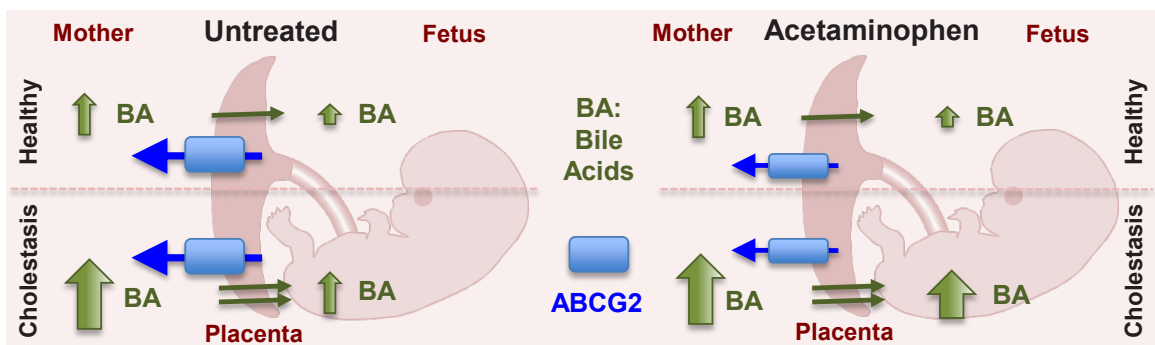
E. Gonzalez-Sanchez: [u60343@usal.es](mailto:u60343@usal.es)

C.I. Ghanem: [cghanem@ffyb.uba.ar](mailto:cghanem@ffyb.uba.ar)

J.J.G. Marin: [jjgmarin@usal.es](mailto:jjgmarin@usal.es)

**Abbreviations:**

Bcrp/BCRP, breast cancer resistance protein; calcein-AM, calcein acetoxymethyl ester; FTC, fumitremorgin C; GCA, glycocholic acid; Mdr/MDR, multidrug resistance protein; Mrp/MRP, multidrug resistance-associated protein; NAPQI, N-acetyl-p-benzoquinone-imine; PBS, phosphate-buffered saline; QPCR, real-time quantitative PCR; PI, propidium iodide.

**\*Highlights****Highlights**

- Acetaminophen induces changes in placental ABCG2 expression in vitro.
- Acetaminophen affects the ability of placental cells to export ABCG2 substrates
- Acetaminophen induces changes in Abcg2 expression in rat placenta.
- Placental barrier for bile acids is impaired in rats treated with acetaminophen.

## ABSTRACT

Acetaminophen affects the expression of ABC proteins in several tissues. Here we investigated whether treatment with acetaminophen changes the expression of these pumps in placenta and how these modifications could affect the fetal protection against bile acids during maternal cholestasis. The amount of mRNA was determined by RT-QPCR after incubating human cell lines derived from placenta and tissues involved in bile acid handling with subtoxic concentrations of acetaminophen. Although an up-regulation of ABCB1 in gastrointestinal and kidney cells was observed, in placental cells the expression of ABCB1 and ABCC1-4 was not markedly affected. In contrast, ABCG2 was down-regulated. Acetaminophen-induced changes in mRNA levels were consistent with changes in the ability to export typical ABCB1, ABCC1-4 and ABCG2 substrates from preloaded cells, which was determined flow cytometry. In rat placentas, collected at term after acetaminophen administration for 3 days, an enhanced mRNA levels of *Abcc1*, but not *Abcb1* and *Abcc2-4* was found. Interestingly, although *Abcg2* mRNA was slightly increased, which was consistent with an increased expression and presumably activity of *Nfr2*, the amount of *Abcg2* protein was markedly reduced. Complete biliary obstruction in pregnant rats induced a marked bile acid accumulation in the mother. In the serum and tissues of fetuses from untreated cholestatic rats bile acid accumulation was only moderate but this was significantly increased when the mothers had been treated with acetaminophen. In conclusion, acetaminophen treatment during pregnancy may reduce ABCG2 expression/activity in the placenta and hence impair the placental barrier for ABCG2 substrates, such as bile acids.

**Keywords:** ABCG2, BCRP, Paracetamol, Pregnancy, Transport.



## INTRODUCTION

The placenta expresses a large number of transport proteins responsible for the translocation of a broad spectrum of pharmacological agents and endogenous substances. Some of them, such as bile acids, are potentially toxic and are actively transported across the placenta in an ATP-dependent manner (Bravo *et al.*, 1995). The ATP-binding cassette (ABC) superfamily of proteins is particularly important in this context, being involved in both removal of fetal metabolites and placental barrier functions (Marin *et al.*, 2004). Among the ABC pumps expressed in the placenta are the multidrug resistance protein-1 (MDR1 or ABCB1, gene symbol *ABCB1*), several members of the multidrug resistance-associated proteins (MRPs or ABCCs, gene symbol *ABCCs*), and the breast cancer resistance protein (BCRP or ABCG2, gene symbol *ABCG2*) (St-Pierre *et al.*, 2000; Marin *et al.*, 2004). Placental ABCB1 plays an important protective role that has been recently reviewed (Ni and Mao, 2011; Iqbal *et al.*, 2012). While ABCG2 may provide fetal protection against potentially harmful substances (Marin *et al.*, 2004), the functional importance of ABCB1, ABCB3 and ABCB4 in the placenta remains poorly understood. ABCB1 and ABCB3 are mainly localized in the basolateral membranes of polarized cells and in the endothelium of the fetal vessels, although apical syncytiotrophoblasts expression has also been identified (Ni and Mao, 2011). ABCB4 has been detected in the placenta at mRNA level; however, its exact localization in this tissue remains to be elucidated (Langmann *et al.*, 2003; Maher *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2007).

ABCG2 is one of the most important ABC pumps in placental barrier (Ni and Mao, 2011; Iqbal *et al.*, 2012). This protein has been recently identified as a key player in the function of exporting bile acids from the fetus to the mother (Blazquez *et al.*, 2012). Under pathological circumstances, such as maternal cholestasis, when these potentially toxic compounds become accumulated, ABCG2 may play an important role in the protection of the fetus against enhanced levels of bile acids in the maternal blood (Blazquez *et al.*, 2012).

Acetaminophen is a drug widely used in pregnancy because at therapeutic doses it is considered safe for the mother and the fetus (Scialli *et al.*, 2010). The drug is mainly

metabolized in the liver by UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases, generating unharmed metabolites that are eliminated by renal and biliary excretion (James *et al.*, 2003). In addition, a small proportion of acetaminophen, which depends on the dose used but usually lower than 5%, is biotransformed by cytochrome P450 (CYP450) enzymes to the highly reactive intermediate metabolite, N-acetyl-p-benzoquinone-imine (NAPQI) (Dahlin *et al.*, 1984). Under normal conditions, this compound has a short half-life and is eliminated by conjugation with glutathione in a reaction mediated by glutathione S-transferases. The metabolite is further transformed to mercapturic acid and excreted into the urine (Beckett *et al.*, 1985). In the case of acetaminophen overdose, the glucuronidation and sulfation pathways become saturated, and excessive amounts of acetaminophen undergo P450-mediated formation of NAPQI, which results in reduction in intracellular glutathione levels (Potter *et al.*, 1974). Accumulated NAPQI then binds to cellular macromolecules, leading to structural and metabolic alterations and eventually to necrosis (Jollow *et al.*, 1973). Some of ABC efflux transporters are involved in the elimination of acetaminophen metabolites from liver and kidney cells. Both *in vivo* drug disposition studies and *in vitro* functional transport experiments indicate that Abcc2, Abcc3, Abcc4, and Abcg2 have the ability to transport sulfate-, glucuronate- or glutathione-conjugated acetaminophen (Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2005; Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2006). The induction of the expression of these transporters, and also ABCB1/Abcb1 and ABCC1/Abcc1, in both human and rodent liver during administration of high toxic doses of acetaminophen has been reported (Ghanem *et al.*, 2004; Aleksunes *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2007; Aleksunes *et al.*, 2008b). However, the effect of non-toxic treatments has been less studied.

Since a large proportion of pregnant women are treated with acetaminophen, it is important to know the effect of the exposure to this drug on placental ABC transporters and its functional repercussion on placental barrier, in particular under pathological conditions that require an enhanced protection of the fetus, such as maternal cholestasis. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of acetaminophen on the expression of ABC proteins in the placenta and the integrity of the placental barrier against the overall transfer of maternal bile acids into the fetal compartment.

## MATERIALS AND METHODS

### **Chemicals**

Acetaminophen, funitremorgin C (FTC), polyethylene glycol 400, probenecid, propidium iodide (PI), rhodamine 123, and verapamil were obtained from Sigma-Aldrich Quimica (Madrid, Spain). BODIPY<sup>®</sup> FL-prazosin and calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM) were from Life Technologies (Madrid, Spain). [<sup>14</sup>C]-glycocholic acid ([<sup>14</sup>C]-GCA) (specific activity 56 mCi/mmol) was from GE Healthcare (Barcelona, Spain). According to the suppliers, the purity of these compounds was ≥97%. All other chemicals were of analytical grade.

### **Cell lines and culture conditions**

The human cell lines HepG2 (HB-8065) from hepatoblastoma, SK-HEP-1 (HTB-52) from hepatocarcinoma, LS174T (CL-188) and Caco-2 (HTB-37) from colorectal adenocarcinoma, HK-2 (CRL-2190) from renal proximal tubule, and BeWo (CCL-98), JEG-3 (HTB-36), and JAr (HTB-144) from choriocarcinoma were obtained from the American Type Culture Collection (LGC Standards, Barcelona, Spain). Cells were cultured as recommended by the supplier in a humidified atmosphere in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The cells were subcultured or used in the experiments at 80% confluence. To determine the effect of acetaminophen on cell viability, the cells were incubated with increasing concentrations of acetaminophen for 48 h. Cell viability was measured using the CellTiter 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay (Promega, Madrid, Spain). From concentration-response studies (Fig. 1), the subtoxic acetaminophen concentration was calculated as the highest one with no effect on cell viability. To carry out flow cytometry and gene expression assays, the cells were incubated in the presence of subtoxic drug concentrations for 48 h. The cells were then detached with trypsin-EDTA, pelleted, rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), and pelleted again to proceed with total RNA extraction, or with flow cytometry studies to determine the activity of ABC transporters.

### **In vivo experiments**

Pregnant Wistar rats on day 18 of gestation were provided by the University of Salamanca Animal House (Salamanca, Spain). The animals received humane care as

outlined in the National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals (<http://grants.nih.gov/olaw/olaw.html>). The experimental protocols were positive approved by the Ethical Committee for Laboratory Animals of the University of Salamanca. Acetaminophen dissolved in 45% polyethylene glycol 400 was intraperitoneally administered to pregnant rats as a fix daily dose (0.4 g/kg body weight before pregnancy, i.e.,  $\approx 200$  g) over three consecutive days before term. The control group received only the vehicle. Acetaminophen dosage was selected in order to achieve a non-toxic situation according with a previously described protocol (Ghanem *et al.*, 2009). Samples from anaesthetized animals (sodium pentobarbital 50 mg/kg b.wt., i.p., Nembutal N.R., Abbot, Madrid, Spain) were collected on day 21 of gestation, and were immediately immersed in the RNAlater RNA-stabilization reagent (Life Technologies) or frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until measurement of gene/protein expression. To determine the effect of acetaminophen on the functionality of the placental barrier for bile acids, complete obstructive cholestasis was imposed in pregnant rats by bile duct ligation and section (BDL) on day 19 of gestation (Macias *et al.*, 2000). Control animals underwent sham operation. The maternal bile acid pool was labeled on day 20 of gestation by intraperitoneal administration of 22  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-GCA (400 nmol). Bile acid concentrations in maternal serum were determined enzymatically to calculate the corrected specific radioactivity of [ $^{14}\text{C}$ ]-GCA, which was used to determine bile acid levels in maternal and fetal serum and tissues by radioactivity measurements.

#### **Determination of gene expression**

Total RNA was isolated from cell or tissue lysates using RNeasy spin columns from GE Healthcare, treated with RNase-free DNase I (GE Healthcare), determined fluorometrically with the RiboGreen RNA-Quantitation kit (Life Technologies), and used for cDNA synthesis using random hexamers and avian myeloblastosis virus RT (Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis kit, Life Technologies). Real-time quantitative PCR (QPCR) was carried out using AmpliTaq Gold polymerase (Life Technologies) in a 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies). The thermal cycling conditions were as follows: a single cycle at  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min, and  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min followed by 40 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and at  $60^{\circ}\text{C}$  for 60 s. The oligonucleotide sequences of primers are shown in Supplementary Table 1. Detection of the amplification products was carried out using

SYBR Green I (Life Technologies). The presence of non-specific amplified products, as examined by 2.5% agarose gel electrophoresis and melting temperature curves, was ruled out in all cases, except for human ABCC1 and ABCC3. In these cases, detection was carried out using TaqMan® probes with the following sequences: 5'-ACCGTGCTGCTGTTTGTCACTGCC-3' for ABCC1 and 5'-TGGCCGTGAAGATGCGC-3' for ABCC3. The results concerning mRNA abundance for the target genes in each sample were normalized on the basis of the 18S rRNA content of the samples, which was measured using TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents kit (Life Technologies). A bank of healthy human tissues cryopreserved in RNAlater was used for calibration purposes.

#### ***Determination of the activity of ABC proteins***

The functionality of ABC proteins was determined by their ability to export specific substrates, i.e., rhodamine 123 for ABCB1, calcein (administered to cells as calcein-AM) for ABCCs, and BODIPY-prazosin for ABCG2, which was measured by flow cytometry. In brief, the cell suspension was incubated in 100 µl of uptake medium (96 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM glucose and 50 mM HEPES, pH 7.40), containing 1 µM of the substrate and 50 µg/ml PI, for 30 min at 37°C. Then, 900 µl of uptake medium, containing or not a specific inhibitor of each pump, i.e., 10 µM verapamil for ABCB1, 500 µM probenecid for ABCCs, and 5 µM FTC for ABCG2, was added and cells were incubated for 30 min at 37°C. To stop transport processes, ice-chilled uptake medium was added, after which intracellular fluorescence was determined with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Madrid, Spain). Dead cells, based on PI staining, were excluded from the data analysis.

#### ***Determination of rat Abcg2 protein expression***

Western blot analyses on placenta homogenates were carried out in 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, using 50 µg of protein per lane and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The mouse monoclonal antibody BXP-21 (Abcam, Cambridge, UK) (1:500 dilution) was used to detect rat Abcg2. The protein load was normalized using an antibody against Gapdh (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (1:1000). The appropriate horseradish

peroxidase-linked secondary antibodies were from GE Healthcare. An enhanced chemiluminescence detection system (Hybond ECL; GE Healthcare) was used to visualize the bands. The relative abundance of proteins was determined by densitometric analysis of the bands using the Fujifilm MultiGauge software (TDI, Madrid, Spain).

**Statistical analysis**

To calculate the statistical significance of differences among groups, after ANOVA analysis, the paired or unpaired *t*-test were used, as appropriate.

## RESULTS

### ***Determination of subtoxic concentrations of acetaminophen on the expression of ABC proteins in human placental cells***

To investigate the sensitivity to the toxic effect of acetaminophen, human cell lines derived from placenta (BeWo, JAr and JEG-3) and other organs involved in bile acid handling used here for comparative purposes, such as liver (HepG2 and SK-HEP-1), colon (LS174T and Caco-2) and kidney (HK-2), were incubated with increasing concentrations (from 20  $\mu$ M to 40 mM) of acetaminophen for 48 h (Fig. 1). SK-HEP-1, LS174T, HK-2 and JEG-3 displayed the lowest sensitivity to the toxic effect of this drug (Fig. 1). From these studies a subtoxic concentrations of 1 or 5 mM, depending on the sensitivity of each cell line to acetaminophen, was chosen to be used in further studies of ABC expression regulation and export activity in the absence of toxic effects (Fig. 1).

### ***Effect of subtoxic concentrations of acetaminophen on the expression of ABC proteins in extra-placental cells***

The incubation of cells from extra-placental tissues, with a subtoxic concentration of acetaminophen for 48 h induced an increase in mRNA levels of ABCB1 in HepG2 (1.6 fold), LS174T (2.0 fold), Caco-2 (2.4 fold) and HK-2 (1.9 fold) (Fig. 2A). The highest up-regulation of this pump (9.7 fold) was observed in SK-HEP-1, although the basal expression was very low (Fig. 2A). A modest but significant up-regulation of ABCG2 in SK-HEP-1 (1.6 fold) was found (Fig. 2B). Acetaminophen induced no significant changes in the expression of ABCC1 (Fig. 2C), but reduced (-48%) ABCC2 expression in HK-2 cells (Fig. 2D). The expression of ABCC3 was reduced in SK-HEP-1 (-69%) and Caco-2 (-37%) cells, and that of ABCC4 expression was also decreased by acetaminophen in SK-HEP-1 (-54%) and HK-2 (-57%) cells (Fig. 2E-2F).

### ***Effect of subtoxic concentrations of acetaminophen on the expression of ABC proteins in placental cells***

Regarding placental cells, as previously described (Serrano *et al.*, 2007), the expression of ABCB1 in BeWo, JAr and JEG-3 cells was low and this was not significantly increased by treatment with acetaminophen (Fig. 2A). A reduction of ABCG2 mRNA levels (-33%) in JEG-3 cells was found (Fig. 2B). Acetaminophen



induced no significant changes in the expression of ABCC1 (Fig. 2C). However, although it should be noted that under basal conditions the abundance of ABCC2 mRNA in JEG-3 cells was markedly lower than in human liver (Fig. 2D), acetaminophen was able to enhance (+80%) ABCC2 expression in JEG-3 cells (Fig. 2D). The poor expression of ABCC3 and ABCC4 in placental cells was not affected by acetaminophen (Fig. 2E-2F).

#### ***Effect of subtoxic concentrations of acetaminophen on NRF2 expression in placental cells***

Since NRF2 pathway is involved in the response of ABC expression to toxic/oxidative challenge, we investigated whether, under our experimental conditions, the expression of NRF2 and hence the sensitivity of the NRF2-mediated defense mechanism could be impaired by acetaminophen treatment (Fig. 3A). In BeWo and JAr cells, no change in NRF2 expression was detected. In contrast, a mild but significant up-regulation was observed in JEG-3 cells.

#### ***Effect of acetaminophen on ABC-mediated export activity***

To study whether the acetaminophen-induced changes in the expression of ABCs transporters in human cells had functional consequences, the activity of ABCB1, ABCC1-4 and ABCG2 was evaluated by their ability to export rhodamine-123 (a typical ABCB1 substrate), calcein (a shared substrate of ABCC1-4) and BODIPY-prazosin (a specific ABCG2 substrate) from preloaded cells in the absence or presence of specific inhibitors (Fig. 4). The results from these functional studies were consistent with those obtained in gene expression analyses. ABCB1 activity was detected in HepG2, LS174T, Caco-2 and HK-2 cells. These cells were able to export rhodamine-123 in a verapamil-sensitive manner (Fig. 4A). Although acetaminophen induced enhanced levels of ABCB1 mRNA in all these cells, ABCB1 activity was only increased in HepG2- and LS174T-treated cells (Fig. 4A). An ABCG2-mediated efflux, sensitive to inhibition by FTC, was observed in HepG2, HK-2 and the placental cell lines BeWo, JAr and JEG-3 (Fig. 4B). After treatment with acetaminophen, a trend toward reduced ABCG2-mediated BODIPY-prazosin efflux from HK-2 and placental cells was observed, which was significant in BeWo and JEG-3 cells (Fig. 4B). A probenecid-sensitive efflux of

calcein was seen in LS174T and HK-2 cells (Fig. 4C). In HK-2 cells, exposure to acetaminophen resulted in a significant decrease in ABCC-mediated transport (Fig. 4C).

### ***Effect of subtoxic doses of acetaminophen on ABC protein expression in pregnant rats***

In pregnant rats Abcb1 was mainly expressed in ileum followed colon and placenta (Fig. 5). Treatment with acetaminophen over the last three days of pregnancy resulted in a trend toward increased expression of Abcb1 in liver, jejunum, kidney, and placenta, which was significant in ileum. In contrast, in duodenum a slight down-regulation was observed (Fig. 5).

Abcc1 was mainly expressed in placenta (used here as a calibrator) and colon. The treatment significantly enhanced its expression levels in these tissues (Fig. 5). Moreover, a trend toward increased mRNA levels of Abcc1 in the intestine and kidney of treated rats was observed, whereas its hepatic expression was not affected (Fig. 5). As compared with liver (used here as a calibrator), the expression of Abcc2 was very low in intestine, kidney and placenta, and it was similar in both the control and acetaminophen groups (Fig. 5). Acetaminophen induced no significant change in mRNA levels of Abcc3 and Abcc4. Only a slight up-regulation of the basal levels of Abcc3 in liver and jejunum and of Abcc4 in kidney was observed (Fig. 5).

The expression of Abcg2 in small intestine and colon was higher than that found in placenta at term. In the acetaminophen-treated group, Abcg2 mRNA levels were moderately enhanced in jejunum (1.4 fold) (Fig. 6A) and placenta (1.9 fold) (Fig. 6B), whereas the treatment slightly reduced (-27%) the expression of this pump in duodenum (Fig. 6A). Interestingly, when Abcg2 protein levels in rat placenta were analyzed by Western blot a significant acetaminophen-induced reduction was observed (Fig. 6C).

A mild but significant acetaminophen-induced change in Nrf2 expression in rat placentas was found (Fig. 3B). Moreover, a significant correlation between the expression of Nrf2 and that of Abcc1 (Fig. 3C) and Abcg2 (Fig. 3D) was found.

***Effect of acetaminophen on rat placental barrier in vivo***

Maternal BDL was carried out on day 19 of gestation. As expected, the levels of bile acids in maternal tissues (Fig. 7A) and serum (Fig. 7B) were increased. The placental barrier for bile acids limited the accumulation of these compounds in fetal tissues (Fig. 7C) and serum (Fig. 7D), although the levels were also increased as compared with non-cholestatic group. Treatment with acetaminophen had low effect on the maternal accumulation of bile acids, except in kidney where significantly higher levels were found (Fig. 7A). Although acetaminophen did not affect the basal levels of bile acids in fetal serum and tissues, maternal treatment with this drug resulted in a markedly higher bile acid accumulation in the fetal compartment during maternal cholestasis (Fig. 7C-7D).

## DISCUSSION

Several ABC transport proteins are involved in the placental barrier that protect the fetus from noxious substances (Ni and Mao, 2011). The expression of these transporters is under the control of transcription factors, such as NRF2, able to respond through complex signaling mechanisms to exposure to potentially toxic compounds, including many drugs. Thus, pharmacological treatment during pregnancy may modify the efficacy of the placental barrier. In addition, a large number of drugs administered to pregnant women are substrates of ABC proteins. Acetaminophen is one of the most popular analgesic and antipyretic agents and is considered as to be safe when used at therapeutic doses. Although acetaminophen is used as first choice drug for pain relief during pregnancy (Scialli *et al.*, 2010) and its ability to cross the placenta has been reported (Wilkes *et al.*, 2005), the impact of this drug on the expression of placental ABC proteins and its functional repercussions are poorly understood. It noteworthy that under pathological circumstances, such as maternal cholestasis, characterized by an accumulation of endogenous substances whose transfer across the placenta is limited by the export activity of ABC proteins, the impairment of the placental barrier by acetaminophen administration may have serious consequences. This may be the case for bile acids, which are exported across the placenta in the fetal-to-maternal direction mainly by ABCG2 (Blazquez *et al.*, 2012).

Rodent models of acetaminophen-induced hepatotoxicity are widely used because of the similarities in acetaminophen bioactivation and patterns of liver injury between rodents and humans. Tolerance to acetaminophen toxicity also occurs in both humans and in laboratory animals (Shayiq *et al.*, 1999; Dalhoff *et al.*, 2001; Ghanem *et al.*, 2005; Aleksunes *et al.*, 2008a; Ghanem *et al.*, 2009). Although the mechanism is likely multifactorial, the up-regulation of ABC transporters probably plays a key role (Aleksunes *et al.*, 2008a). A selective up-regulation of hepatic Abcc3 in male rats treated with repeated subtoxic doses of acetaminophen has been associated with the development of resistance to the toxicity of this drug by decreasing its enterohepatic recirculation (Ghanem *et al.*, 2009). An enhanced expression of ABC transporters in response to subtoxic doses of acetaminophen has also been found in extrahepatic tissues. Thus, stimulation of Abcb1 expression in the intestinal epithelium has been

reported (Ghanem *et al.*, 2011). In the present study, on pregnant rats, only mild changes in mRNA levels of several ABC transporters in liver, small intestine, colon and kidney of treated animals were found. A significant increase was only observed in the expression of Abcc1 in colon and Abcg2 in jejunum. This discrepancy might be due to differences in the sensitivity to acetaminophen related to the sex difference and/or to pregnancy. Indeed, a higher basal expression of Abcc2 in liver and Abcc3 in liver and kidney in female rats in comparison with male rats has been reported (Lu and Klaassen, 2008). Both transporters are involved in the excretion of acetaminophen glucuronide, a major metabolite in rats, across the canalicular (mediated by Abcc2) and sinusoidal (mediated by Abcc3) membranes of hepatocytes (Ghanem *et al.*, 2005). Although acetaminophen glucuronide is not toxic, the up-regulation of these transporters confers protection against acetaminophen-induced toxicity (Ghanem *et al.*, 2009). Thus, a higher resistance to developing hepatotoxicity after acetaminophen treatment has been described in female mice (Masubuchi *et al.*, 2011).

Several drugs included treatments used for pregnant women have regulatory effects on placental ABC transporters. For instance, dexamethasone, which is used in pregnancies at risk of premature delivery is able to increase ABCB1 mRNA in placental cell lines (Pavek *et al.*, 2007), but decreases ABCG2 expression in breast cancer cell lines (Elahian *et al.*, 2009). Moreover, saquinovir, a HIV protease inhibitor used in antiretroviral therapy, results in an up-regulation of ABCB1 in primary trophoblasts (Beghin *et al.*, 2010). In the present study, in the placenta of rats treated with acetaminophen both Abcc1 and Abcg2 were up-regulated. Among placental cells, only JEG-3 cells were able to respond to acetaminophen by modifying ABC protein expression.

Although, the exact mechanism accounting for acetaminophen-induced modulation of placental ABC protein expression is not known, a role of nuclear receptors such as CAR and PXR has been suggested (Mottino and Catania, 2008). However, in the rat placenta the expression of these nuclear receptors is very poor (St-Pierre *et al.*, 2004). The transcription factor Nrf2 plays an essential role in the mammalian response to chemical and oxidative stress, such as this induced by acetaminophen, through two

mechanisms: i) a direct modification of cysteine residues in Keap1 by NAPQI; and ii) a substantial depletion of glutathione (to <15% of basal levels) (Copple *et al.*, 2008). The findings of the present study indicate the sensitivity of the Nrf2-mediated cell defense system is not impaired but probably enhanced, at least as far as the expression levels of Nrf2 was concerned.

Despite the relatively low abundance of Abcg2 mRNA in whole rat placenta at term, the functional activity of Abcg2 has been demonstrated previously using in-situ perfused rat placenta (Blazquez *et al.*, 2012). Such activity is probably due to its restricted location at the apical (maternal-facing) membrane of the trophoblast (Serrano *et al.*, 2007), where this pump plays a key role in the vectorial transfer of substrates, such as bile acids (Blazquez *et al.*, 2012). In the present study, despite the acetaminophen-induced increase in placenta Abcg2 mRNA, the amount of Abcg2 protein was decreased in treated pregnant rats. The decrease in Abcg2 protein was presumably due to an increased degradation. In this respect, it has recently been reported that sustained glutathione depletion may accelerate ABCG2 protein degradation in rat liver (Sekine *et al.*, 2012). Whether this is also the case for Abcg2 is not improbable because acetaminophen reactive metabolite NAPQI is scavenged by glutathione. CYP2E1, which contributes to generating NAPQI in liver (Manyike *et al.*, 2000), is also expressed in rat placenta (Carpenter *et al.*, 1997). It could be reasoned that the production of NAPQI might deplete the GSH store in placenta, which is almost 10-fold lower than that found in maternal liver (Perez *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2006).

In conclusion, these results indicate that treatment with subtoxic doses of acetaminophen during pregnancy alter the efficacy of the placental barrier, which may reduce the protection of the fetus against xenobiotics and potentially toxic maternal metabolites. In particular, the acetaminophen-induced reduction in ABCG2 function impairs the placental barrier for bile acids, which results in a lower protection of the fetus against the maternal hypercholanemia that accompanies cholestatic liver diseases.

**Acknowledgements:**

We thank L. Muñoz, J. F. Martin, J. Villoria and E. Cruz for care of the animals. Revision of the English spelling, grammar and style of the manuscript by N. Skinner is also gratefully acknowledged.

**Funding source:**

This study was supported in part by the Instituto de Salud Carlos III, FIS (Grants PI080151 and PI110337), Spain; Junta de Castilla y Leon (Grants SA023A11-2, SA070A11-2, BIO39/SA27/10 and Biomedicina-2011), Spain; The Ministerio de Ciencia e Innovacion, Plan Nacional de Investigacion Cientifica, Desarrollo e Innovacion Tecnologica and the European Regional Development Fund (ERDF) (Grant SAF2010-15517), Spain. The group is member of the Network for Cooperative Research on Membrane Transport Proteins (REIT), co-funded by the Ministerio de Ciencia e Innovacion, Spain, and the ERDF (Grant BFU2007-30688-E/BFI); and belongs to the CIBERehd (Centro de Investigacion Biomedica en Red) for Hepatology and Gastroenterology Research (Instituto de Salud Carlos III, Spain). Ester Gonzalez-Sanchez is a recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educacion, Spain (Grant AP2008-03762).



## REFERENCES

- Aleksunes, L.M., Campion, S.N., Goedken, M.J., Manautou, J.E., 2008a. Acquired resistance to acetaminophen hepatotoxicity is associated with induction of multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4) in proliferating hepatocytes. *Toxicol Sci* **104**, 261-273.
- Aleksunes, L.M., Slitt, A.L., Maher, J.M., Augustine, L.M., Goedken, M.J., Chan, J.Y., Cherrington, N.J., Klaassen, C.D., Manautou, J.E., 2008b. Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* **226**, 74-83.
- Aleksunes, L.M., Slitt, A.M., Cherrington, N.J., Thibodeau, M.S., Klaassen, C.D., Manautou, J.E., 2005. Differential expression of mouse hepatic transporter genes in response to acetaminophen and carbon tetrachloride. *Toxicol Sci* **83**, 44-52.
- Barnes, S.N., Aleksunes, L.M., Augustine, L., Scheffer, G.L., Goedken, M.J., Jakowski, A.B., Pruijboom-Brees, I.M., Cherrington, N.J., Manautou, J.E., 2007. Induction of hepatobiliary efflux transporters in acetaminophen-induced acute liver failure cases. *Drug Metab Dispos* **35**, 1963-1969.
- Beckett, G.J., Chapman, B.J., Dyson, E.H., Hayes, J.D., 1985. Plasma glutathione S-transferase measurements after paracetamol overdose: evidence for early hepatocellular damage. *Gut* **26**, 26-31.
- Beghin, D., Forestier, F., Noel-Hudson, M.S., Gavard, L., Guibourdenche, J., Farinotti, R., Gil, S., 2010. Modulation of endocrine and transport functions in human trophoblasts by saquinavir and nelfinavir. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **152**, 55-59.
- Blazquez, A.G., Briz, O., Romero, M.R., Rosales, R., Monte, M.J., Vaquero, J., Macias, R.I., Cassio, D., Marin, J.J., 2012. Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Mol Pharmacol* **81**, 273-283.
- Bravo, P., Marin, J.J., Beveridge, M.J., Novak, D.A., 1995. Reconstitution and characterization of ATP-dependent bile acid transport in human and rat placenta. *Biochem J* **311** ( Pt 2), 479-485.
- Carpenter, S.P., Savage, D.D., Schultz, E.D., Raucy, J.L., 1997. Ethanol-mediated transplacental induction of CYP2E1 in fetal rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* **282**, 1028-1036.
- Copple, I.M., Goldring, C.E., Jenkins, R.E., Chia, A.J., Randle, L.E., Hayes, J.D., Kitteringham, N.R., Park, B.K., 2008. The hepatotoxic metabolite of acetaminophen directly activates the Keap1-Nrf2 cell defense system. *Hepatology* **48**, 1292-1301.
- Dahlin, D.C., Miwa, G.T., Lu, A.Y., Nelson, S.D., 1984. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1327-1331.
- Dalhoff, K., Laursen, H., Bangert, K., Poulsen, H.E., Anderson, M.E., Grunnet, N., Tygstrup, N., 2001. Autoprotection in acetaminophen intoxication in rats: the role of liver regeneration. *Pharmacol Toxicol* **88**, 135-141.
- Elahian, F., Kalalinia, F., Behravan, J., 2009. Dexamethasone downregulates BCRP mRNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Oncol Res* **18**, 9-15.
- Ghanem, C.I., Arias, A., Novak, A., Carpinì, G.D., Villanueva, S., Blazquez, A.G., Marin, J.J., Mottino, A.D., Rubio, M.C., 2011. Acetaminophen-induced stimulation of MDR1 expression and activity in rat intestine and in LS 174T human intestinal cell line. *Biochem Pharmacol* **81**, 244-250.

- Ghanem, C.I., Gomez, P.C., Arana, M.C., Perassolo, M., Ruiz, M.L., Villanueva, S.S., Ochoa, E.J., Catania, V.A., Bengochea, L.A., Mottino, A.D., 2004. Effect of acetaminophen on expression and activity of rat liver multidrug resistance-associated protein 2 and P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* **68**, 791-798.
- Ghanem, C.I., Ruiz, M.L., Villanueva, S.S., Luquita, M., Llesuy, S., Catania, V.A., Bengochea, L.A., Mottino, A.D., 2009. Effect of repeated administration with subtoxic doses of acetaminophen to rats on enterohepatic recirculation of a subsequent toxic dose. *Biochem Pharmacol* **77**, 1621-1628.
- Ghanem, C.I., Ruiz, M.L., Villanueva, S.S., Luquita, M.G., Catania, V.A., Jones, B., Bengochea, L.A., Vore, M., Mottino, A.D., 2005. Shift from biliary to urinary elimination of acetaminophen-glucuronide in acetaminophen-pretreated rats. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 987-995.
- Iqbal, M., Audette, M.C., Petropoulos, S., Gibb, W., Matthews, S.G., 2012. Placental drug transporters and their role in fetal protection. *Placenta* **33**, 137-142.
- James, L.P., Mayeux, P.R., Hinson, J.A., 2003. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* **31**, 1499-1506.
- Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Potter, W.Z., Davis, D.C., Gillette, J.R., Brodie, B.B., 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **187**, 195-202.
- Langmann, T., Mauerer, R., Zahn, A., Moehle, C., Probst, M., Stremmel, W., Schmitz, G., 2003. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* **49**, 230-238.
- Lu, H., Klaassen, C., 2008. Gender differences in mRNA expression of ATP-binding cassette efflux and bile acid transporters in kidney, liver, and intestine of 5/6 nephrectomized rats. *Drug Metab Dispos* **36**, 16-23.
- Macias, R.I., Pascual, M.J., Bravo, A., Alcalde, M.P., Larena, M.G., St-Pierre, M.V., Serrano, M.A., Marin, J.J., 2000. Effect of maternal cholestasis on bile acid transfer across the rat placenta-maternal liver tandem. *Hepatology* **31**, 975-983.
- Maher, J.M., Slitt, A.L., Cherrington, N.J., Cheng, X., Klaassen, C.D., 2005. Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice. *Drug Metab Dispos* **33**, 947-955.
- Manyike, P.T., Kharasch, E.D., Kalthorn, T.F., Slattery, J.T., 2000. Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clin Pharmacol Ther* **67**, 275-282.
- Marin, J.J., Briz, O., Serrano, M.A., 2004. A review on the molecular mechanisms involved in the placental barrier for drugs. *Curr Drug Deliv* **1**, 275-289.
- Masubuchi, Y., Nakayama, J., Watanabe, Y., 2011. Sex difference in susceptibility to acetaminophen hepatotoxicity is reversed by buthionine sulfoximine. *Toxicology* **287**, 54-60.
- Mottino, A.D., Catania, V.A., 2008. Hepatic drug transporters and nuclear receptors: regulation by therapeutic agents. *World J Gastroenterol* **14**, 7068-7074.
- Ni, Z., Mao, Q., 2011. ATP-binding cassette efflux transporters in human placenta. *Curr Pharm Biotechnol* **12**, 674-685.

- Pavek, P., Cerveny, L., Svecova, L., Brysch, M., Libra, A., Vrzal, R., Nachtigal, P., Staud, F., Ulrichova, J., Fendrich, Z., Dvorak, Z., 2007. Examination of Glucocorticoid receptor alpha-mediated transcriptional regulation of P-glycoprotein, CYP3A4, and CYP2C9 genes in placental trophoblast cell lines. *Placenta* **28**, 1004-1011.
- Perez, M.J., Macias, R.I., Duran, C., Monte, M.J., Gonzalez-Buitrago, J.M., Marin, J.J., 2005. Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* **43**, 324-332.
- Perez, M.J., Macias, R.I., Marin, J.J., 2006. Maternal cholestasis induces placental oxidative stress and apoptosis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *Placenta* **27**, 34-41.
- Potter, W.Z., Thorgeirsson, S.S., Jollow, D.J., Mitchell, J.R., 1974. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. V. Correlation of hepatic necrosis, covalent binding and glutathione depletion in hamsters. *Pharmacology* **12**, 129-143.
- Scialli, A.R., Ang, R., Breitmeyer, J., Royal, M.A., 2010. A review of the literature on the effects of acetaminophen on pregnancy outcome. *Reprod Toxicol* **30**, 495-507.
- Sekine, S., Mitsuki, K., Ito, K., Kugioka, S., Horie, T., 2012. Sustained intrahepatic glutathione depletion causes proteasomal degradation of multidrug resistance-associated protein 2 in rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 980-987.
- Serrano, M.A., Macias, R.I., Briz, O., Monte, M.J., Blazquez, A.G., Williamson, C., Kubitz, R., Marin, J.J., 2007. Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta* **28**, 107-117.
- Shayiq, R.M., Roberts, D.W., Rothstein, K., Snawder, J.E., Benson, W., Ma, X., Black, M., 1999. Repeat exposure to incremental doses of acetaminophen provides protection against acetaminophen-induced lethality in mice: an explanation for high acetaminophen dosage in humans without hepatic injury. *Hepatology* **29**, 451-463.
- St-Pierre, M.V., Serrano, M.A., Macias, R.I., Dubs, U., Hoechli, M., Lauper, U., Meier, P.J., Marin, J.J., 2000. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R1495-1503.
- St-Pierre, M.V., Stallmach, T., Freimoser Grundschober, A., Dufour, J.F., Serrano, M.A., Marin, J.J., Sugiyama, Y., Meier, P.J., 2004. Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R1505-1516.
- Wilkes, J.M., Clark, L.E., Herrera, J.L., 2005. Acetaminophen overdose in pregnancy. *South Med J* **98**, 1118-1122.
- Zamek-Gliszczynski, M.J., Hoffmaster, K.A., Tian, X., Zhao, R., Polli, J.W., Humphreys, J.E., Webster, L.O., Bridges, A.S., Kalvass, J.C., Brouwer, K.L., 2005. Multiple mechanisms are involved in the biliary excretion of acetaminophen sulfate in the rat: role of Mrp2 and Bcrp1. *Drug Metab Dispos* **33**, 1158-1165.
- Zamek-Gliszczyński, M.J., Nezasa, K., Tian, X., Bridges, A.S., Lee, K., Belinsky, M.G., Kruh, G.D., Brouwer, K.L., 2006. Evaluation of the role of multidrug resistance-associated protein (Mrp) 3 and Mrp4 in hepatic basolateral excretion of sulfate and glucuronide metabolites of acetaminophen, 4-methylumbelliferone, and harmol in Abcc3<sup>-/-</sup> and Abcc4<sup>-/-</sup> mice. *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 1485-1491.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Effect of incubation with acetaminophen for 48 h on the viability of human cells derived from hepatoblastoma (HepG2), hepatocarcinoma (SK-HEP-1), colorectal adenocarcinoma (LS174T and Caco-2), renal proximal tubule (HK-2), and choriocarcinoma (BeWo, JEG-3, and JAr). The amount of living cells was determined by the formazan test as compared with untreated cells (Control = 100%). Values are expressed as means $\pm$ SEM of 4 separate cultures in which each data point was obtained in triplicate. \*,  $p < 0.05$  as compared with untreated cells. Arrowheads indicate the subtoxic concentration of 1 or 5 mM chosen for each cell line.

**Figure 2.** Effect of incubation with subtoxic concentrations of acetaminophen for 48 h on the relative mRNA abundance of the ABC proteins ABCB1 (A), ABCG2 (B), ABCC1 (C), ABCC2 (D), ABCC3 (E) and ABCC4 (F) in human cells derived from hepatoblastoma (HepG2), hepatocarcinoma (SK-HEP-1), colorectal adenocarcinoma (LS174T and Caco-2), renal proximal tubule (HK-2), and choriocarcinoma (BeWo, JEG-3, and JAr). Values (means $\pm$ SEM), determined by RT-QPCR in 4 cultures measured in triplicate for each data point, are expressed as the percentage of the calibrator used in each case, which was human liver (for ABCB1 and ABCC2), kidney (for ABCC3 and ABCC4) and placenta (for ABCC1 and ABCG2). \*,  $p < 0.05$ , as compared with Control untreated cells.

**Figure 3.** Effect of acetaminophen on the abundance of NRF2 mRNA in human placental cells (A) and Nrf2 mRNA in rat placenta (B). Relationship between the abundance of mRNA for Nrf2 and Abcc1 (C) or Abcg2 (D) in rat placenta. Human placental cells were incubated with a subtoxic concentration of acetaminophen for 48 h. Rats were treated with acetaminophen (0.4 g/kg b.w., i.p.) on days 18, 19 and 20 of pregnancy. The abundance of mRNA was determined by RT-QPCR and expressed as the percentage of the calibrator used in each case, which was human or rat liver (NRF2/Nrf2) and placenta (Abcc1 and Abcg2). Values are means $\pm$ SEM from (A) 4 cultures measured in triplicate for each data point or 9 placentas per group (B). \*,  $p < 0.05$ , as compared with Control untreated animals. Correlations between the abundance of mRNA for Nrf2 and Abcc1 (C) or Abcg2 (D) in rat placenta were

calculated by the least-squares method. Data from both untreated and treated animals were plotted together.

**Figure 4.** Effect of incubation with subtoxic concentrations of acetaminophen for 48 h on the efflux of rhodamine-123 (A), BODIPY FL-prazosin (B) and calcein (C) from preloaded human cells derived from hepatoblastoma (HepG2), hepatocarcinoma (SK-HEP-1), colorectal adenocarcinoma (LS174T and Caco-2), renal proximal tubule (HK-2), and choriocarcinoma (BeWo, JEG-3, and JAr). After being loaded with the substrates at 37°C for 30 min the cells were diluted 1:10 with substrate-free medium containing or not the specific ABC inhibitors, which were 10 µM verapamil (A, ABCB1), 5 µM fumitremorgin C (B, ABCG2) or 500 µM probenecid (C, ABCCs), and incubated at 37°C for 30 min. Values (means±SEM), determined by flow cytometry in 4 cultures measured in triplicate for each data point, reflect changes in the mean fluorescence as compared with that found at the end of the loading period. \*,  $p < 0.05$ , on comparing acetaminophen-treated with untreated Control cells. †,  $p < 0.05$ , as compared with the efflux in absence of the inhibitor.

**Figure 5.** Effect of acetaminophen on the expression of Abcb1, Abcc1, Abcc2, Abcc3 and Abcc4 in liver, intestine, kidney and placenta in pregnant rats at term. Rats were treated with subtoxic dose of acetaminophen (0.4 g/kg b.w., i.p.) on days 18, 19 and 20 of pregnancy. The abundance of mRNA was determined by RT-QPCR and expressed as the percentage of the calibrator used in each case, which was rat liver (Abcb1 and Abcc2), kidney (Abcc3 and Abcc4) and placenta (Abcc1). Values are expressed as means±SEM from 4 pregnant rats and 9 placentas per group. \*,  $p < 0.05$ , as compared with Control untreated animals.

**Figure 6.** Effect of acetaminophen on the abundance of Abcg2 mRNA in liver, intestine and kidney in pregnant rats at term. Rats (n=4 per group) were treated with a subtoxic dose of acetaminophen (0.4 g/kg b.w., i.p.) on days 18, 19 and 20 of pregnancy. The abundance of mRNA was determined by RT-QPCR and expressed as the percentage of the calibrator used, which was rat placenta (A). Abundance of Abcg2 mRNA in placentas (n=9 per group) from treated and untreated Control groups (B). Western

blotting analysis of Abcg2 in rat placenta (n=6 per group). Results are expressed as relative integrated optic density (RIOD) upon correcting the intensity of the target band with that of Gapdh (100%). Representative Western blot with samples from each group is shown (C). Values are expressed as means±SEM. \*, p<0.05, as compared with Control untreated animals.

**Figure 7.** Effect of acetaminophen on bile acid distribution in maternal (A, B) and fetal (C, D) tissues and serum from pregnant rats at term. The animals were treated with a subtoxic dose of acetaminophen (0.4 g/kg b.w., i.p.) on days 18, 19 and 20 of pregnancy. The maternal bile acid pool was labeled on day 20 of pregnancy after administering 400 nmol [<sup>14</sup>C]-glycocholic acid. To induce complete obstructive cholestasis, maternal common bile duct ligation (BDL) and surgical section was imposed at day 19 of pregnancy. Control animals underwent sham operation. Values are means±SEM from 4 pregnant rats and 12 fetuses per group. \*, p<0.05, as compared with Control untreated animals; †, p<0.05 as compared with BDL untreated animals.

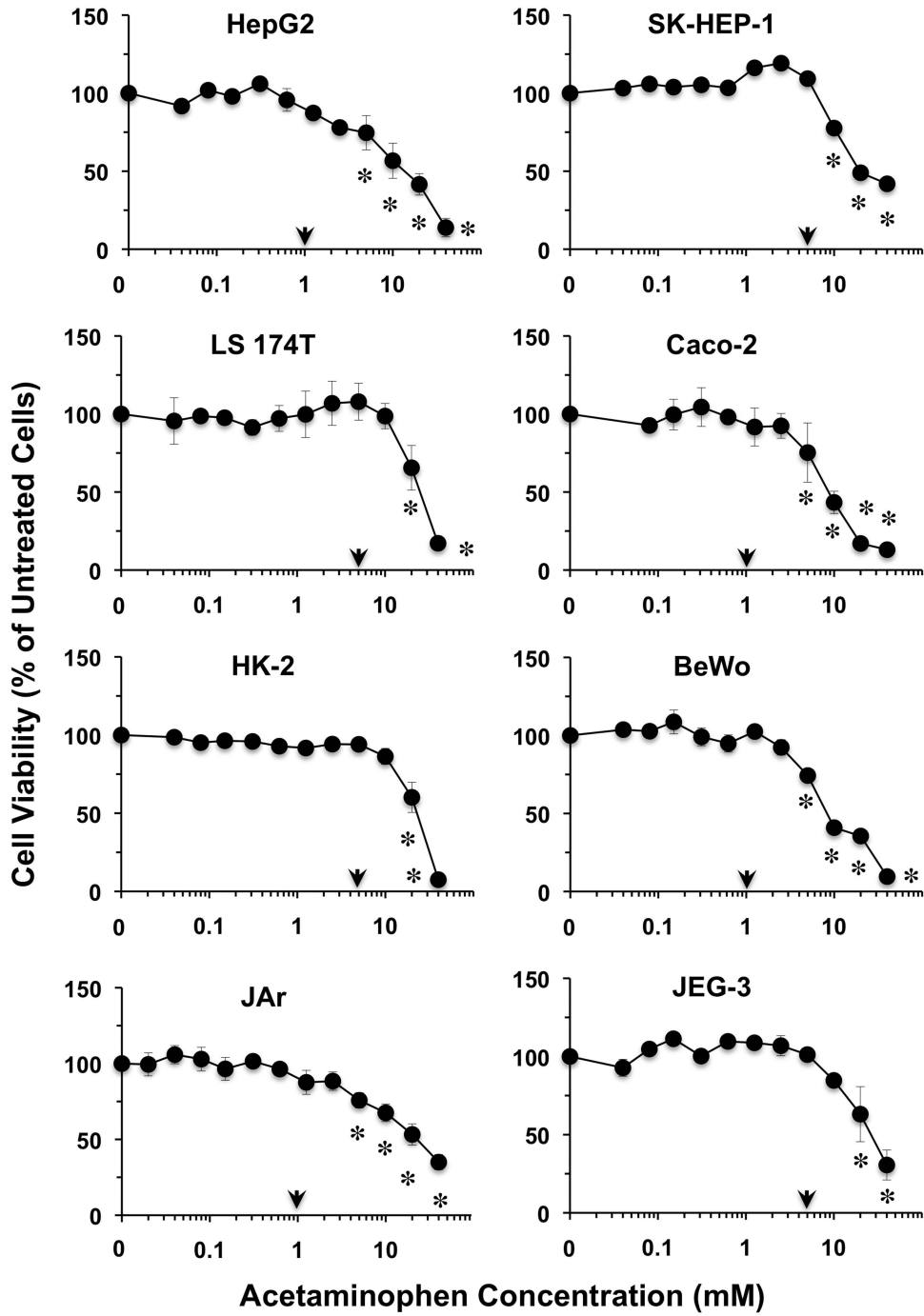


Figure 1



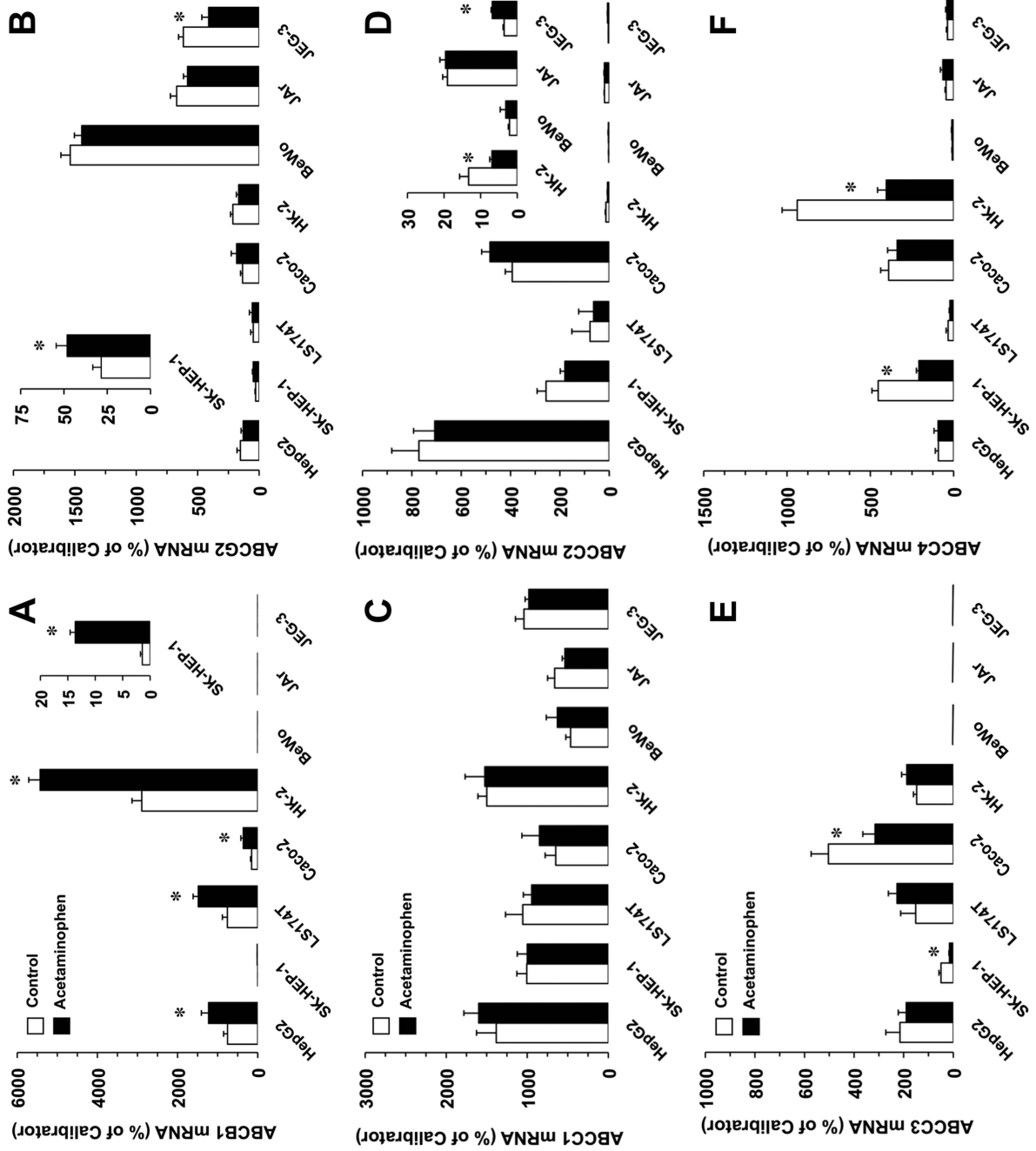


Figure 2

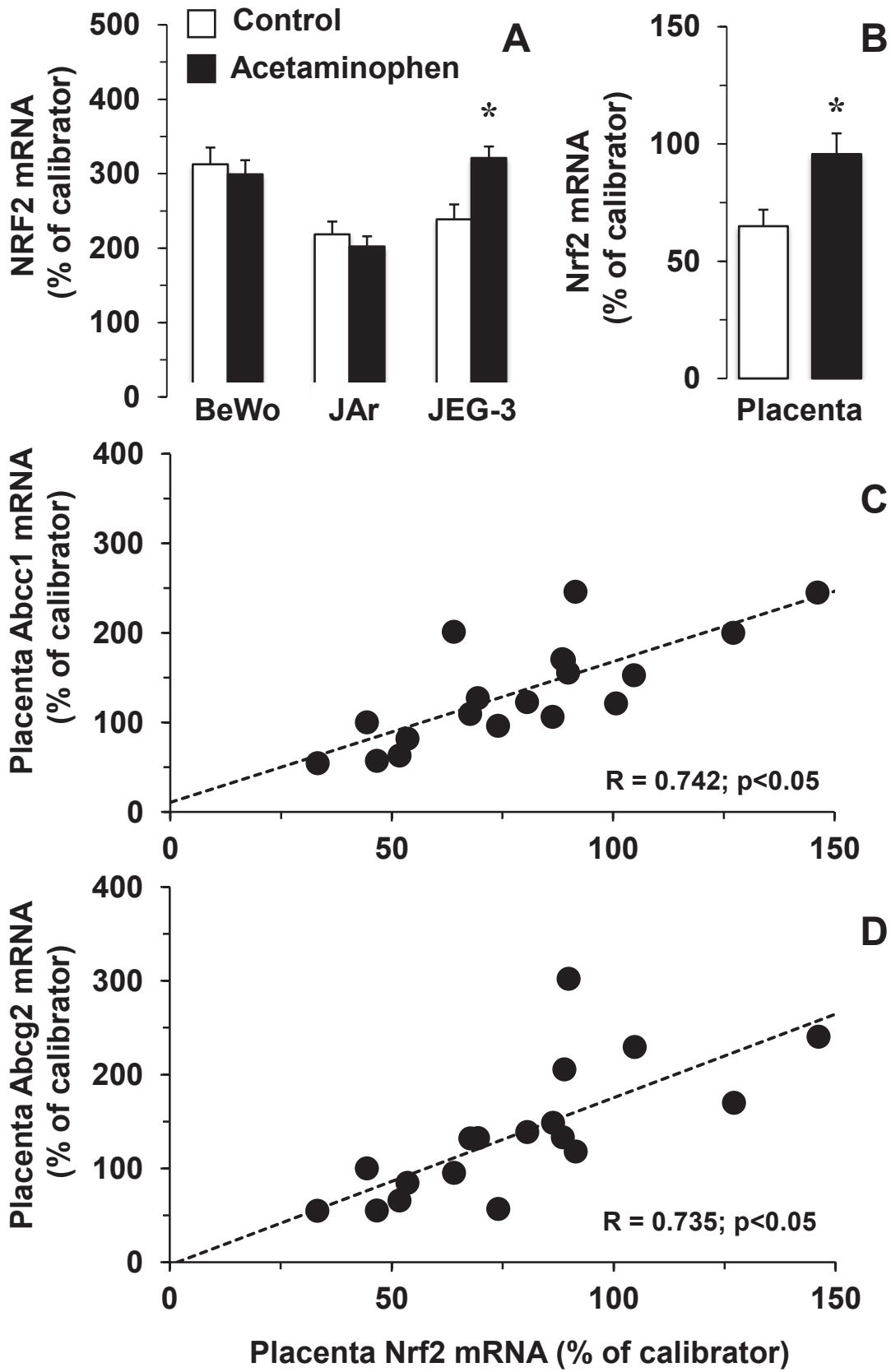


Figure 3

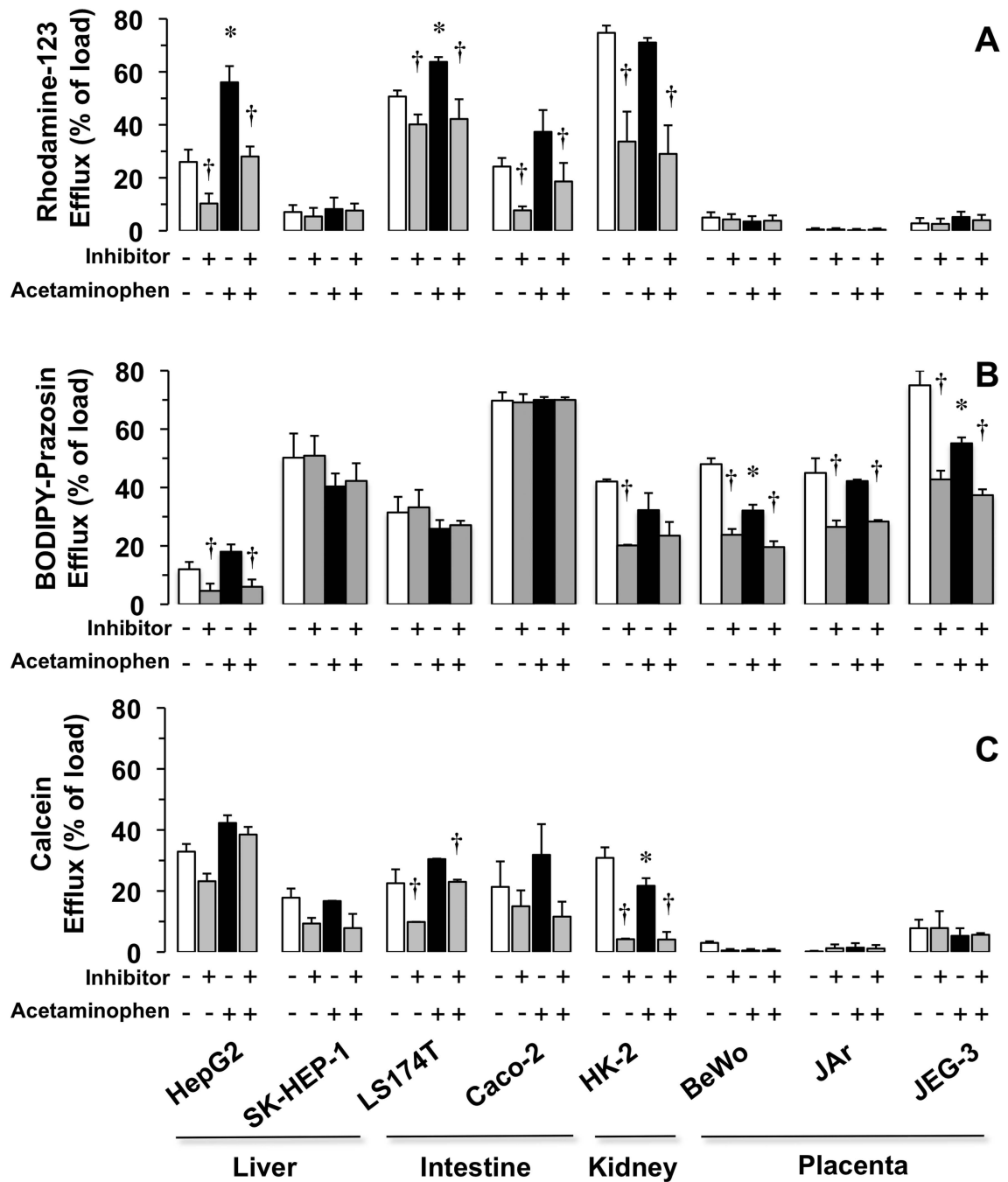


Figure 4

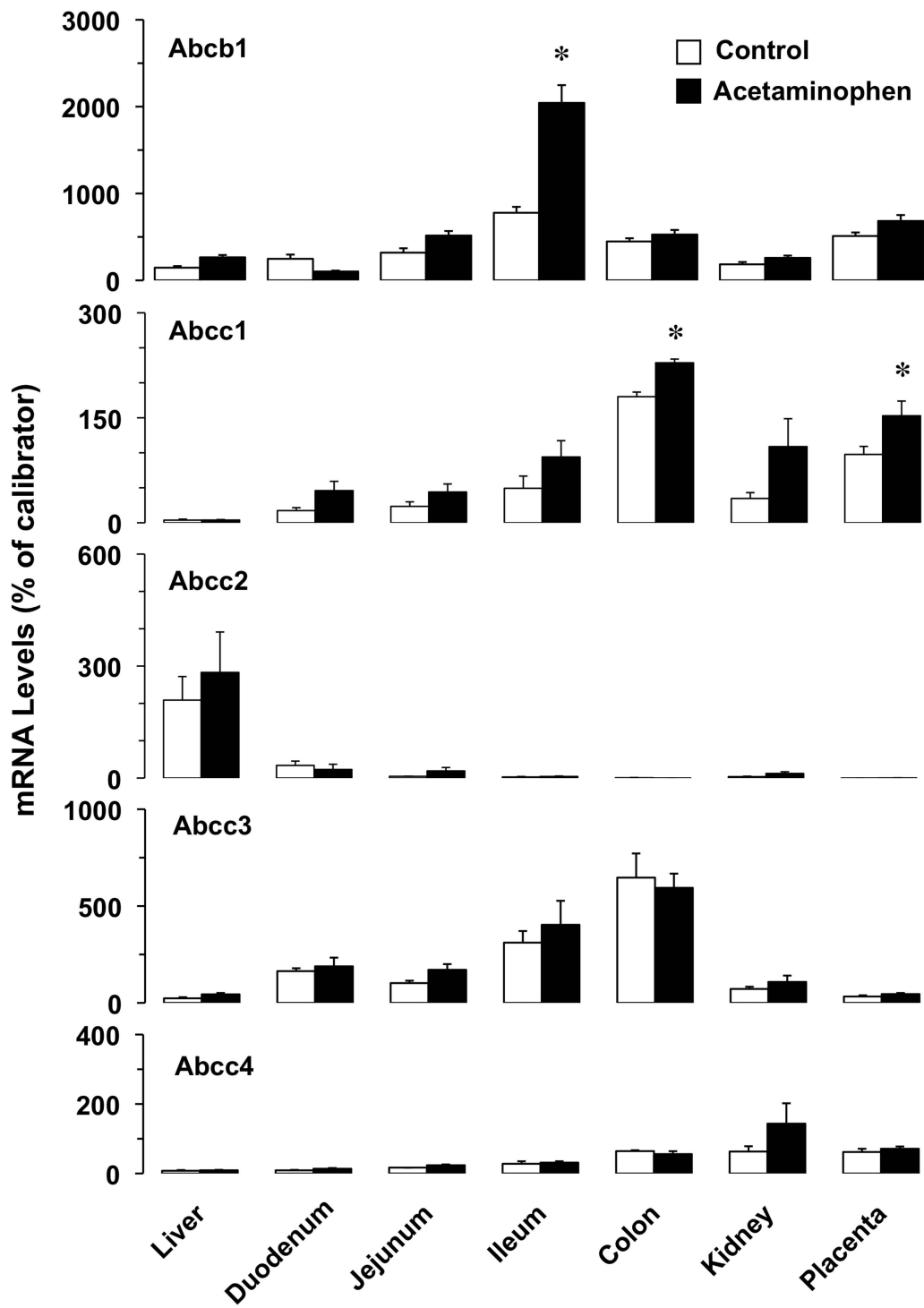


Figure 5

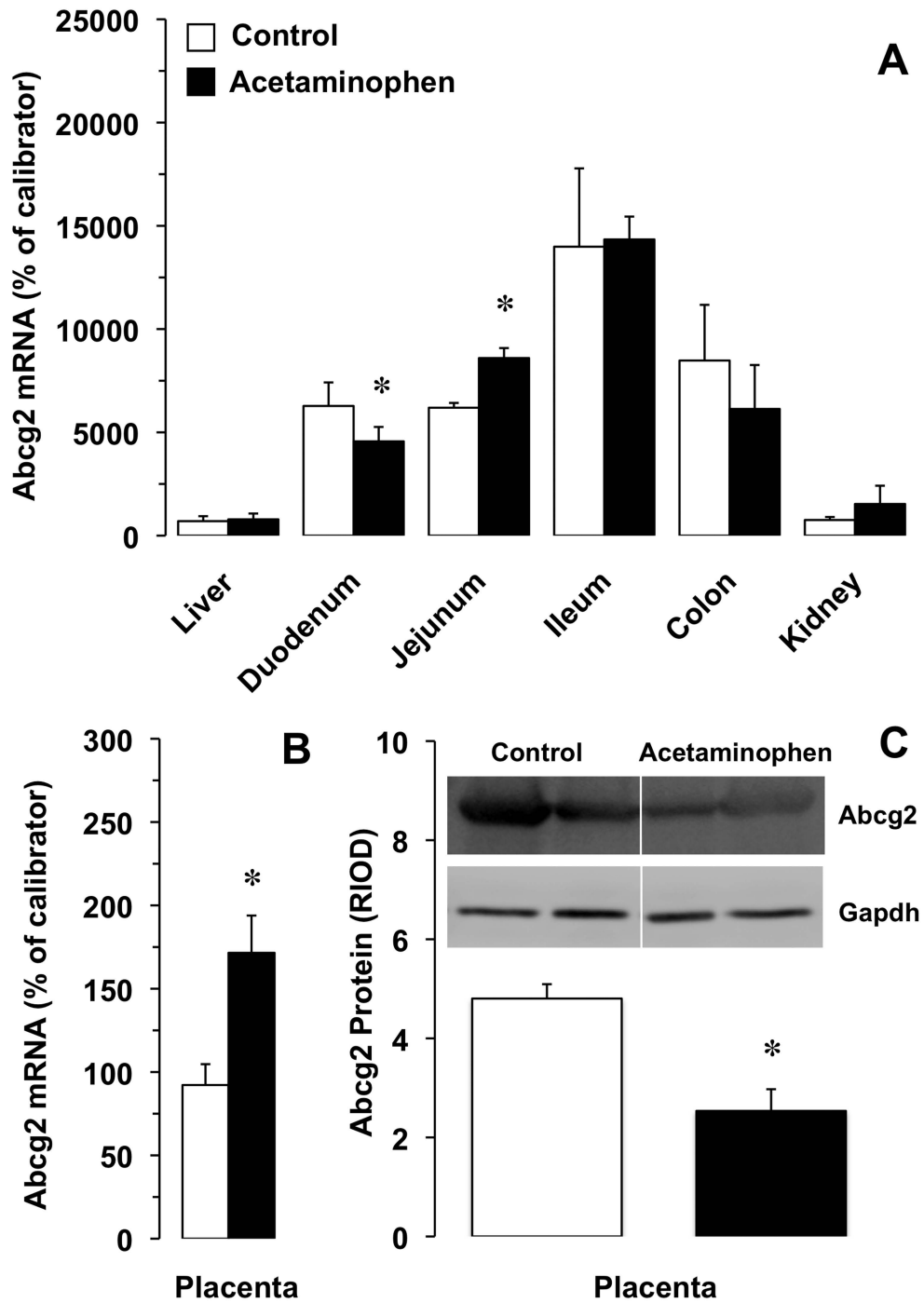


Figure 6

*Acetaminophen affects the placental barrier*

Blazquez et al. S1

**Supplementary Table 1.** Gene-specific oligonucleotide sequences for primers used in RT-QPCR.

Protein	Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product size (bp)	Accession number
MDR1	ABCB1	GCCTACTTGGTGGCACATAAAC	GCACCAAGACAAACAGCTGAAA	74	NM_000927
MRP1	ABCC1	CCGCAGATCTTAAAGTTGCTCA	TGCCACTGACGAAGCAGATG	151	NM_004996
MRP2	ABCC2	GGCAGTGAAGAAGAAGACGATGA	ATTGGACCTAGAAGCTGCGGCT	132	NM_000392
MRP3	ABCC3	TCTGTCTCTGGCTGGAGTCCG	TCAGCTTGATGCGCGAGTC	121	NM_003786
MRP4	ABCC4	TGCAAGGGTTCTGGGATAAAGA	CTTTGGCACTTTCCTCAATTAACG	141	NM_005845
BCRP	ABCG2	TTAAGTGAAACTGCTGCTTTAGAGT	TCGGTCTTAACCAAAGGCTCA	134	NM_004827
NRF2	NFE2L2	CGTCCCAGCAGGACATGGAT	AGCTCATACTCTTTCGGTCGCTGA	109	NM_006164
Mdr1	Abcb1b	AACCCCATGGCTGGAACA	TGGGCTCCTGGGACACAAT	100	NM_012623
Mrp1	Abcc1	ATCCGGCTCTGGGATTGGAAT	AGAGGTAGAAAACAAGGCACCCCA	102	NM_022281
Mrp2	Abcc2	TTCTACCTTGCCCAAGCAGGTGTT	AGCCATGTGCACAGGTAGAGGATT	146	NM_012833
Mrp3	Abcc3	AAGGAGTCTTGCAACATGCAAAAT	CAAGGAGCTCATCTCTCATGAA	134	NM_080581
Mrp4	Abcc4	TGCAATCATACCTCAGGAACCTGT	TGTACCTCCTCTAGGGCTTTCCA	112	NM_133411
Bcrp	Abcg2	TTATGTGGTTCAAGATGACGTTGTG	TTCCAACCTTGGAATCTGCTACTTT	173	NM_181381
Nrf2	Nfe2l2	TACAGTCCCAGCAGGACATGGATTT	TCTGGAGTTGCTCTTGTCTCTCCT	159	NM_031789

### 7.2.1.2. Role of the mitochondrial genome in the regulation of the expression of ABC transporters under oxidative stress conditions

ABC pumps located at the plasma membrane of hepatocytes play a key role in the secretory function of the liver by removing xenobiotic and endogenous substances that otherwise could accumulate and cause noxious effects.

The expression of these transporters is regulated by nuclear receptors and transcriptional factors (Klaassen and Aleksunes, 2010). Moreover, crosstalk between mitochondrial and nuclear genomes can modulate the expression of these pumps (Hallstrom and Moye-Rowley, 2000; Pillay *et al.*, 1998). In spite of the great sensitivity of mitochondria to the toxicity induced by many endogenous compounds and drugs, the role of this organelle as a sensor in the retro-control of the expression of genes involved in cellular defense, including ABC transporters, is poorly understood.

Retrograde signaling pathways can regulate the expression of Pdr5p, an ABC transporter involved in multidrug resistance (MDR) phenotype in yeast, by modulating the activity of two transcriptional factors, Pdr1p and Pdr3p (Hallstrom and Moye-Rowley, 2000). In humans, it has recently been reported that mitochondrial DNA depletion induces the expression of MRD1 and MRP1 in hepatoma cells (Ling *et al.*, 2012). However, our present knowledge of about these signaling pathways is still very poor.

Thus, the aim of this section was to investigate the effect of mitochondrial genome depletion on the mechanisms involved in the regulation of the expression of ABC transporters under paracetamol- and BAs-induced oxidative/chemical stress.

The results obtained in this part of the project have recently been published in the article entitled: "Mitochondrial genome depletion dysregulates bile acid- and paracetamol-induced expression of the transporters Mdr1, Mrp1 and Mrp4 in liver cells", *British Journal of Pharmacology*, 2011;162:1686-99. These results are shown in figure 3C, figure 6D, figures 7-12 and Table 2.

Hallstrom, T.C., Moye-Rowley, W.S., 2000. Multiple signals from dysfunctional mitochondria activate the pleiotropic drug resistance pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 275, 37347-37356.

Klaassen, C.D., Aleksunes, L.M., 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacological reviews* 62, 1-96.

Ling, X., He, Y., Zhang, G., Zhou, Y., Yan, B., 2012. Increased P-glycoprotein expression in mitochondria is related to acquired multidrug resistance in human hepatoma cells depleted of mitochondrial DNA. *International journal of oncology* 40, 109-118.

Pillay, V., Martinus, R.D., Hill, J.S., Phillips, D.R., 1998. Upregulation of P-glycoprotein in rat hepatoma rho(o) cells: implications for drug-DNA interactions. *Journal of cellular biochemistry* 69, 463-469.



## RESEARCH PAPER

# Mitochondrial genome depletion dysregulates bile acid- and paracetamol-induced expression of the transporters Mdr1, Mrp1 and Mrp4 in liver cells

MJ Perez<sup>1,2</sup>, E Gonzalez-Sanchez<sup>3</sup>, A Gonzalez-Loyola<sup>3</sup>, JM Gonzalez-Buitrago<sup>1</sup> and JJG Marin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Research Unit, University Hospital, Salamanca, 37007 Salamanca, Spain, <sup>2</sup>Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León, Spain, and <sup>3</sup>Laboratory of Experimental Hepatology and Drug Targeting, CIBERehd, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

## BACKGROUND AND PURPOSE

Mitochondria are involved in the toxicity of several compounds, retro-control of gene expression and apoptosis activation. The effect of mitochondrial genome (mtDNA) depletion on changes in ABC transporter protein expression in response to bile acids and paracetamol was investigated.

## EXPERIMENTAL APPROACH

Hepa 1-6 mouse hepatoma cells with 70% decrease in 16S/18S rRNA ratio (Rho cells) were obtained by long-term treatment with ethidium bromide.

## KEY RESULTS

Spontaneous apoptosis and reactive oxygen species (ROS) generation were decreased in Rho cells. Following glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) or paracetamol, Rho cells generated less ROS and were more resistant to cell death. Apoptosis induced by GCDCA and Fas was also reduced. The basal expression of Mdr1 was significantly enhanced, but this was not further stimulated by GCDCA or paracetamol, as observed in wild-type (WT) cells. Basal expression of Mrp1 and Mrp4 was similar in WT and Rho cells, whereas they were up-regulated only in WT cells after GCDCA or paracetamol, along with the transcription factors Shp and Nrf2, but not Fxr or Pxr. Increased expression of Nrf2 was accompanied by its enhanced nuclear translocation. Glycoursodeoxycholic acid failed to cause any of the effects observed for GCDCA or paracetamol.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The Nrf2-mediated pathway is partly independent of ROS production. Nuclear translocation of Nrf2 is insufficient to up-regulate Mdr1, Mrp1 and Mrp4, which requires the participation of other regulatory element(s) whose activation in response to GCDCA and paracetamol is impaired in Rho cells and hence probably sensitive to ROS.

## Abbreviations

ABC, ATP-binding cassette; CAR, constitutive androstane receptor; DCFH-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; FXR, farnesoid X receptor; GCDCA, glycochenodeoxycholic acid; GUDCA, glycoursodeoxycholic acid; MDR, multidrug resistance protein; MRP, multidrug resistance associated protein; NRF2, nuclear factor E2-related factor 2; PXR, pregnane X receptor; Rh123, rhodamine 123; SHP, small heterodimer partner; tBOOH, *tert*-butyl hydroperoxide

## Correspondence

Jose J. G. Marin, Department of Physiology and Pharmacology Campus Miguel de Unamuno E.I.D. S-09 37007-Salamanca, Spain. E-mail: jjgmarin@usal.es

## Keywords

ABC proteins; paracetamol (acetaminophen); bile acid; cholestasis; drug toxicity; liver; mitochondria; multidrug resistance; retrograde control; rho cells

## Received

29 July 2010

## Revised

8 October 2010

## Accepted

9 November 2010

## Introduction

Export pumps located at the plasma membrane of hepatocytes play a key role in the secretory function of the liver by removing xenobiotic and endogenous substances that otherwise could accumulate and cause noxious effects (Chandra and Brouwer, 2004). Most of these transporters belong to the superfamily of ATP-binding cassette (ABC) proteins (Schinkel and Jonker, 2003), which includes these gene families: *ABCB*, encoding multidrug-resistance proteins (e.g. multidrug-resistance protein-1 or MDR1 and the bile salt export pump or BSEP); *ABCC*, encoding multidrug-resistance-associated proteins (e.g. MRP1-4); and *ABCG* (e.g. the breast cancer resistance protein or BCRP).

The elimination of toxic compounds into the bile across the canalicular membrane is mainly mediated by MDR1 (gene symbol *ABCB1*), BSEP (*ABCB11*), MRP2 (*ABCC2*) and ABCG2 (*ABCG2*). However, when the normal vectorial transfer from blood to bile is impaired, MRP1 (*ABCC1*), MRP3 (*ABCC3*) and MRP4 (*ABCC4*), located at the sinusoidal membrane of hepatocytes, increase their expression and become important routes to mediate the regurgitation of cholephilic compounds back into the bloodstream, which favours their renal elimination (Geier *et al.*, 2007).

How hepatocytes regulate the expression of these transporters, as well as the shift in the importance of different elements of their excretory machinery is largely unknown. The expression of ABC transport proteins in hepatocytes can be regulated by transcriptional events involving nuclear transcription factors such as the farnesoid X receptor (FXR), sensitive to bile acids, and the member of its signalling pathway, the small heterodimer partner (SHP), whereas xenobiotic receptors such as the constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) can be activated by a variety of drugs and toxins. Moreover, it has been suggested that nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2) can be activated by both bile acids (Miyata *et al.*, 2009) and xenobiotics such as paracetamol (acetaminophen; Aleksunes *et al.*, 2008). In human liver cells, NRF2 has been reported to stimulate the expression of MRP2 (Vollrath *et al.*, 2006). Moreover, this and other members of the MRP family, such as the rodent isoforms Mrp3 and Mrp4 can be up-regulated in mouse liver cells through the pharmacological activation of Nrf2 (Maher *et al.*, 2007).

Mitochondrial function depends on proteins that are encoded by nuclear DNA and mitochondrial DNA (mtDNA), which contains the genes coding for 13 of the components of the respiratory chain (Attardi and Schatz, 1988). This is the main source of reactive oxygen species (ROS) produced in mitochondria as a by-product of aerobic metabolism. Although excessive generation of ROS can damage cellular constituents, including proteins, lipids, and DNA, low levels of ROS play a role in cell signalling (Finkel, 2000). Thus, in addition to the control mediated by direct activation of nuclear receptors, retrograde control mechanisms permitting crosstalk between mitochondrial and nuclear genomes have been suggested to play an important role in the overall response of hepatocytes to chemical stress and hence in the prevention of carcinogenesis (Erol, 2005). This is an interesting possibility, because mitochondria are particularly sensitive to the toxicity induced by many endogenous com-

pounds, such as bile acids, and drugs, such as paracetamol. The role of this organelle as a sensor in the retro-control of the expression of genes involved in the defence against chemical stress could constitute an important mechanism in the overall function of hepatocytes.

The aim of the present study was to investigate the effect of depletion of the mitochondrial genome in the response of liver cells to exposure to bile acids and paracetamol, in terms of the expression of ABC proteins.

## Methods

### Cell lines and culture conditions

The mouse hepatoma Hepa 1-6 (CRL-1830) cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Hepa 1-6 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) containing 10% FCS (TDI S.A., Madrid, Spain) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Invitrogen, Barcelona, Spain) and other supplements, as reported by the supplier, in a humidified atmosphere in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Rho Hepa 1-6 cells with a partial depletion of mtDNA were obtained by long-term (2 months) treatment with ethidium bromide (100 ng·mL<sup>-1</sup>), as described previously (Miller *et al.*, 1996). To compensate for the impairment of respiratory metabolism and to support cell growth, the auxotrophy of Rho cells for uridine and pyruvate (Trounce *et al.*, 1994) required the culture medium to be supplemented with 100 µg·mL<sup>-1</sup> pyruvate and 50 µg·mL<sup>-1</sup> uridine. To carry out the experiments, the cells were plated and incubated overnight in the absence of any of the compounds tested and then treated with *tert*-butyl hydroperoxide (tBOOH; 10, 25, 50, 100 µM for 5 h), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA; 25, 50, 100 µM for 1, 3, 5, 6, 12, 24 or 48 h), deoxycholic acid (DCA; 25, 50 µM for 48 h), glyoursodeoxycholic acid (GUDCA; 25, 50, 100 µM for 1, 3, 48 h), paracetamol (50, 100, 300 µM for 1, 3, 5, 6, 12, 24 or 48 h), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) or rhodamine 123 (Rh123) (Sigma-Aldrich). For studies of flow cytometry and gene expression, cells were detached with trypsin-EDTA solution and then pelleted by centrifugation at 250×g for 10 min, washed once with phosphate-buffered saline (PBS), pelleted again, and resuspended in DMEM.

### Determination of gene expression levels and mtDNA copy number

Depletion of mtDNA was confirmed by real-time PCR amplification using specific primers for 16S rRNA. Total cellular DNA (nuclear and mtDNA) was extracted using the QIAamp DNA Blood Mini kit from Qiagen (Izasa, Barcelona, Spain). DNA was then quantified fluorimetrically with the PicoGreen DNA-Quantitation kit (Invitrogen). To determine mRNA levels by real-time RT-PCR, total RNA was isolated from cell lysates using RNeasy spin columns from Qiagen. RNA was then quantified fluorimetrically with the RiboGreen RNA-Quantitation kit (Invitrogen). Random hexamers and avian myeloblastosis virus RT (Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis kit, Invitrogen) were used to synthesize cDNA from total RNA. Real-time quantitative PCR was then

performed using AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems, Madrid, Spain) in an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions were as follows: a single cycle at 95°C for 10 min followed by 45 cycles at 95°C for 15 s and at 60°C for 60 s. Detection of the amplification products was carried out using SYBR Green I (Applied Biosystems). The absence of non-specific products of PCR, as examined by 2.5% agarose gel electrophoresis or melting-temperature curves, was confirmed in all cases, except in some cases where detection was carried out using TaqMan probes. As a calibrator, total RNA from mouse liver or kidney was used. The results of mRNA abundance for the target genes in each sample were normalized on the basis of 18S rRNA abundance, which was measured with the TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents kit (Applied Biosystems). The mtDNA copy number was measured from total DNA and corrected by simultaneous measurement of the nuclear DNA by multiplex PCR using appropriate primers and TaqMan probes for DNA encoding 16S rRNA and 18S rRNA, respectively. The primer and TaqMan probe oligonucleotide sequences for mouse DNA encoding 16S rRNA (GeneBank Accession Number AY675564) were as follows: forward, 5'-AAC CCC GCC TGT TTA CCA A-3'; reverse, 5'-CGT TCA TGC TAG TCC CTA ATT AAG G-3'; and TaqMan probe, 5'-TTT AAC GGC CGC GGT ATC CTG ACC-3'. The same sets of primers and probes were used to measure the absolute abundance of the rRNAs corresponding to these genes. Absolute quantification of mtDNA and rRNAs was carried out using standard curves generated by plotting the threshold cycle (Ct) versus log<sub>10</sub> of the copy number of cDNA fragments obtained by conventional PCR and quantified with the PicoGreen detection kit, as described in detail previously (Briz *et al.*, 2003b). The primer oligonucleotide sequences and conditions to carry out quantitative PCR of Mrp1, Mrp2, Mdr1 (Briz *et al.*, 2003a) and Ntcp (Vicens *et al.*, 2007) have been described previously. The primer oligonucleotide sequences for mouse Mrp4 were: forward, 5'-TGG TCA TAA GCG GAG ACT GGA-3' and reverse, 5'-CCA GTA CCG TTG AAG CTC CTC T-3' (position 195–288, GeneBank Accession Number NM\_001033336). For mouse Bsep they were: forward primer 5'-TGA CTT TCC ACA GTG GCG TCT-3' and reverse primer 5'-ATG GTG TCT GCA ATC TTC ACT CA-3' (position 43–129), GeneBank Accession Number NM\_021022). For mouse Bcrp they were: forward primer 5'-CAC GTG TTA GTA CCA ATG TCG CA-3' and reverse primer 5'-TCC GGA CTA GAA ACC CAC TCT TT-3' (position 475–622, GeneBank Accession Number AF103796). All primers were designed with the assistance of Primer Express software (Applied Biosystems), and their specificity was checked using BLAST, and were obtained from Sigma-Genosys (Madrid, Spain).

#### *Cell viability, apoptosis, ROS generation and mitochondrial membrane potential (MMP)*

The cell growth rate was determined by measuring total protein (Markwell *et al.*, 1978) at different time points during 1 week of cell culture. Cell viability was evaluated using the Neutral Red (Sigma-Aldrich) test (Fautz *et al.*, 1991). To quantify the percentage of apoptotic cells, DNA fragmentation was analysed by flow cytometry using a FACSort flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After the corresponding

treatment, cells were trypsinized, washed with PBS and centrifuged. The pellets were resuspended in ethanol and stored at 4°C for 24 h. After washing, the cells were treated with RNase A in PBS at 37°C for 30 min, stained with 50 µg·mL<sup>-1</sup> propidium iodide (Sigma-Aldrich), and analysed by flow cytometry to measure their DNA content, as described previously (Perez and Cederbaum, 2001).

Flow cytometry was also used to measure the generation of ROS, MMP and cell viability. Cells were incubated with medium containing 5 µg·mL<sup>-1</sup> Rh123 (MMP measurement) or 5 µg·mL<sup>-1</sup> DCFH-DA (ROS measurement) for 1 h after the corresponding treatment. Then, they were trypsinized and resuspended in FCS-free medium. Propidium iodide (5 µg·mL<sup>-1</sup>) was added 10 min before fluorescence measurement, as described previously (Perez and Cederbaum, 2002). Conventional fluorescence images were obtained with a fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

#### *Preparation of nuclear, cytoplasmic and crude membrane fractions*

Nuclear extracts were prepared essentially according to a method published previously (Schonhoff *et al.*, 2006), with minor modifications. All steps were carried out at approximately 4°C. Cells were rinsed and scraped off into PBS and the pellets were suspended in 3 volumes of ice-cold hypotonic buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM dithiothreitol (DTT) and protease inhibitors) and incubated on ice for 15 min. Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) was then added to a final concentration of 0.05% before vortexing vigorously for 10 s. After centrifugation (500× *g* for 30 s), the supernatant was collected and saved as the cytoplasmic fraction. The remaining crude nuclear pellet was washed with hypotonic buffer and resuspended in two-thirds volumes of ice-cold extraction buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.42 M NaCl, 0.2 mM EDTA, 25% (vol/vol) glycerol, 1 mM DTT and protease inhibitors). The sample was kept on ice for 30 min with gentle vortexing every 5–10 min. Samples were then centrifuged (5 min at 20 000× *g*) and the supernatant (nuclear extract) was collected. All samples were stored at –80°C until use. To assess the purity of the nuclear and cytoplasmic fractions, immunoblot-based detection of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), as a cytoplasmic marker, and Oct1 (a transcription factor located at the nucleus), as a nuclear marker, was carried out. To prepare crude membranes cells were trypsinized, washed with PBS and centrifuged. The pellets were suspended in ice-cold homogenization buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HEPES, pH 7.4) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Membranes were disrupted by homogenization using a Polytron, collected by centrifugation (200 000× *g*, Beckman Ti70.1 rotor at 4°C for 90 min) and suspended in homogenization buffer.

#### *Western blot analyses*

Immunoblotting analyses were carried out in 7.5, 8 or 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, using 50 µg of protein loading per lane and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). The primary antibodies (working dilutions) used were as follows: rabbit polyclonal antibodies against MDR1 (1:500) (Lifespan Biosciences,

## Role of mitochondria in ABC proteins regulation



Seattle, WA, USA), Oct1 (1:500) (Abcam, Cambridge, UK), SHP (H-160) (1:100) and Nrf2 (C-20) (1:500), rat monoclonal antibodies against MRP1 (1:500) (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) and MRP4 (1:500) and mouse monoclonal antibodies against Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (1:500) (Sigma-Aldrich) and GAPDH (6C5) (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Anti-rat IgG (Santa Cruz Biotechnology), anti-rabbit and anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) horseradish peroxidase-linked secondary antibodies were used.

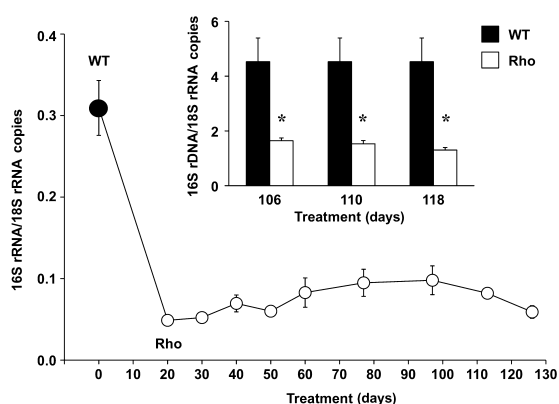
### Statistical analysis

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using the SPSS 10.0.6 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) for Windows (Microsoft Co., Seattle, WA, USA). To calculate the statistical significance of the differences between groups, the Bonferroni method for multiple range testing, and Student's *t*-test or the paired *t*-test were used, as appropriate.

## Results

### Characterization of Rho cells

Long-term incubation in the presence of 100 ng·mL<sup>-1</sup> ethidium bromide causes depletion in mtDNA. This was assessed as the decreased abundance of 16S rRNA (Figure 1). To confirm that this was not due to changes in expression levels, the abundance of the corresponding DNA was also measured (Figure 1, inset). A rapid depletion of approximately 70% in both RNA and DNA coding 16S rRNA was



**Figure 1**

Time-course of mtDNA depletion in Hepa 1–6 mouse hepatoma cells during treatment with 100 ng·mL<sup>-1</sup> ethidium bromide. The ratio of abundance between mitochondrial-encoded (16S rRNA) and nuclear-encoded (18S rRNA) genes was calculated from results of RT-PCR analysis. The amount of mtDNA determined by direct PCR using 16S rRNA primers is shown in the inset. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from three cultures measured in triplicate for each data point. \**P* < 0.05, significant differences between wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) cells.

observed. This reached steady state, which persisted for more than two months. The shape of the mtDNA-depleted or Rho cells was slightly less rounded (Figure 2A and B). The growth of these cells in culture was similar to that of wild-type (WT) cells (Figure 2C). In contrast, ROS production was markedly lower in Rho cells than in WT cells (Figure 2D–F).

### Sensitivity of Rho cells to bile acids or paracetamol-induced toxicity

When the cells were exposed to bile acids or paracetamol and viability was measured with the Neutral Red test, which is not directly dependent on mitochondrial function, a clearly different sensitivity was found (Figure 3). In the range of concentrations investigated here, GUDCA induced no marked toxic effect on WT or Rho cells (Figure 3A). In contrast, in WT cells, GCDCA and paracetamol markedly reduced cell viability, with an IC<sub>50</sub> of approximately 150  $\mu$ M and 180  $\mu$ M, respectively (Figure 3B, C). Sensitivity to GCDCA and paracetamol was significantly decreased in Rho cells, for which the IC<sub>50</sub> values increased to approximately 350  $\mu$ M and 500  $\mu$ M, respectively (Figure 3B, C).

When spontaneous cell death was studied by flow cytometry, we found a significantly lower proportion of dead cells in Rho than in WT cell cultures (Figure 4A). This was consistent with the smaller proportion of hypodiploid (apoptotic) bodies observed in Rho cells (Figure 4B). Treatment of WT cells with either 100  $\mu$ M GCDCA (Figure 4C) or 2  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> Fas antibody (Jo2) (BD, Biosciences) (Figure 4D) resulted in a stimulation of apoptosis. In contrast, under similar experimental circumstances apoptosis in Rho cells was not induced (Figure 4C and D).

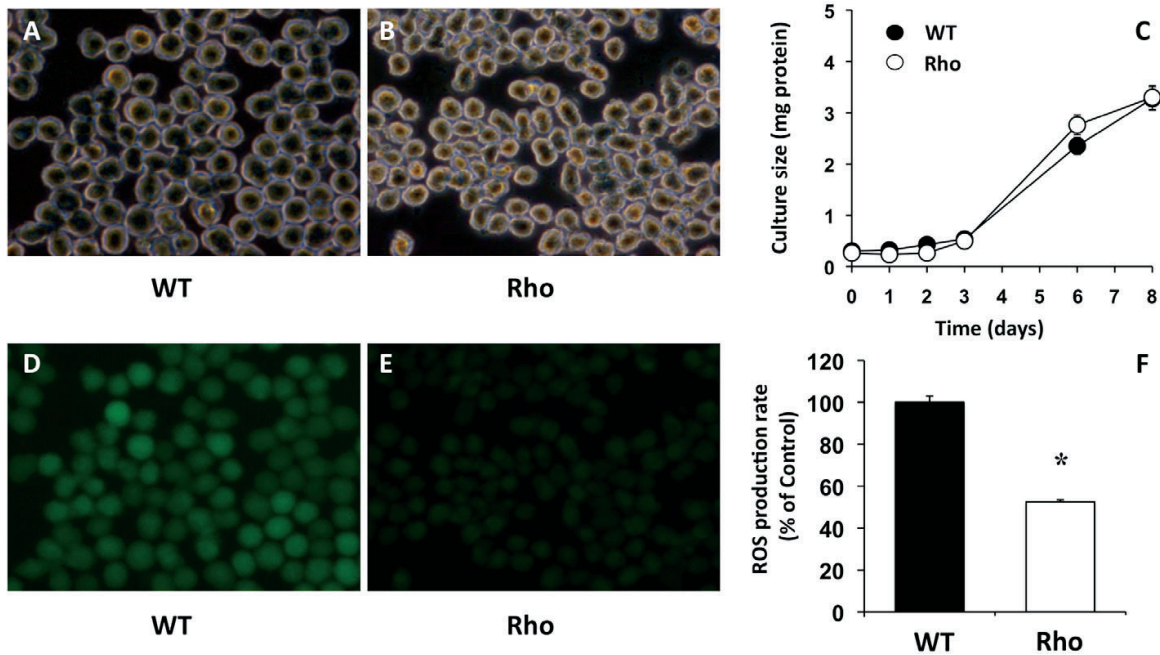
There were fewer cells with low MMP in Rho than in WT cell cultures (Figure 5). Moreover, the effect of a non-specific agent able to induce oxidative stress, such as tBOOH, affected MMP more in WT than in Rho cells (Figure 5). This was accompanied by a higher response regarding ROS generation in WT than in Rho cells when incubated with tBOOH (Figure 6A). As a negative control, we used incubation with GUDCA, which did not increase ROS production in either WT or Rho cells; instead, a decrease was observed in WT cells (Figure 6B). In contrast, GCDCA (Figure 6C) and paracetamol (Figure 6D) induced ROS generation in WT cells, whereas neither had any effect on Rho cells.

### Changes in ABC protein expression

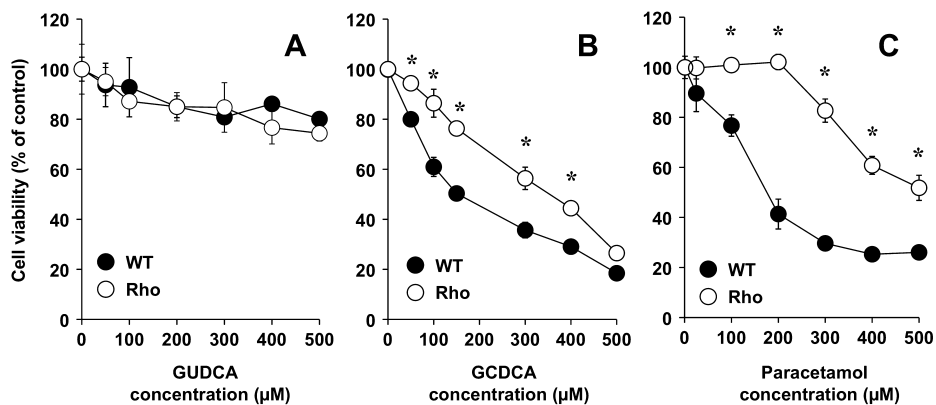
As compared with mouse liver and/or kidney, a markedly higher expression of Mrp1, Mrp4 and Mrd1, but a poor or negligible expression of Mrp2, Mdr2 and Bsep, was found in WT cells (Table 1). When comparing expression of genes in a hepatoma cell line with that in samples of liver tissue, it should be noted that liver parenchyma contains many types of cells and approximately 30% of them are non-hepatocytes. Regarding uptake transporters, such as Ntcp and Oatp1b2, as well as enzymes involved in bile acid metabolism, their expression in WT cells was also negligible (Table 1). Similar results were obtained when Rho cells were investigated, except that Mdr1 expression was higher in Rho than in WT cells (Table 1), as has been previously described in human HCT-8 colon cancer cells with reduced mtDNA content (Lee *et al.*, 2008). In both WT and Rho cells incubation with GUDCA did not stimulate the



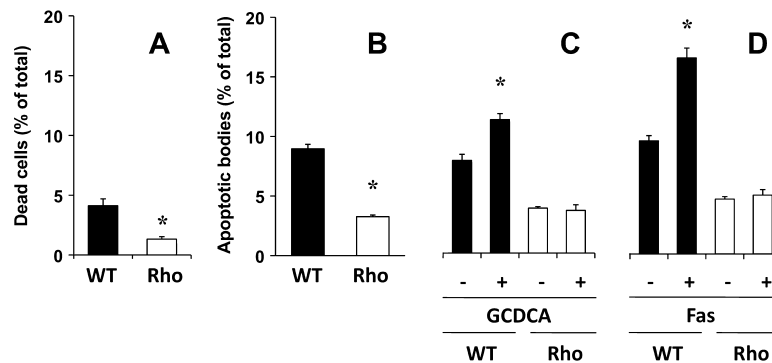
BJP MJ Perez et al.

**Figure 2**

Representative photographs of phase-contrast (A,B) and fluorescence (D,E) microscopy of wild-type (WT) (A,D) and mtDNA-depleted (Rho) (B,E) Hepa 1–6 mouse hepatoma cells incubated with  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DCFH-DA for 1 h. The rate of cell growth was measured by total protein content (C). Fluorescence was measured to determine ROS production (D,E,F). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from five cultures measured in triplicate for each data point. \* $P < 0.05$ , significant differences between WT and Rho cells.

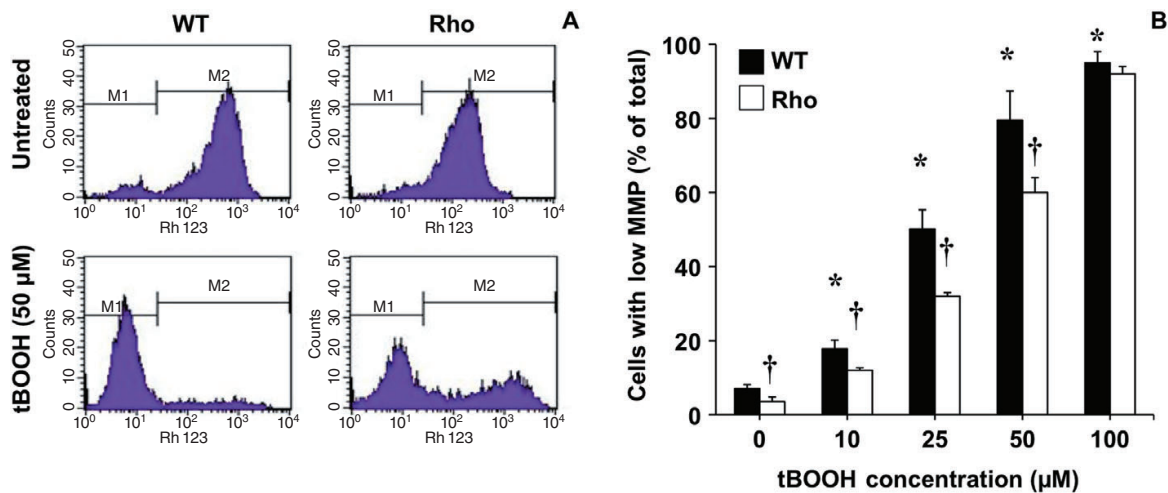
**Figure 3**

Concentration-dependent effect of glyoursodeoxycholic acid (GUDCA) (A), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) (B) and paracetamol (C) on the viability of wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) Hepa 1–6 mouse hepatoma cells as measured with the Neutral Red test after 48 h of incubation. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from five cultures measured in triplicate for each data point. \* $P < 0.05$ , significant differences between WT and Rho cells.



**Figure 4**

Proportion of dead cells (A) and hypodiploid bodies (B) determined with flow cytometry after staining with propidium iodide in wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) Hepa 1–6 mouse hepatoma cells. Effect of incubation with 100  $\mu\text{M}$  glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) (C) and 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Fas antibody (Jo2) (D) for 24 h on the proportion of apoptotic bodies. Values are mean  $\pm$  SEM from five cultures measured in triplicate for each data point. \* $P < 0.05$ , significant differences between WT and Rho cells.



**Figure 5**

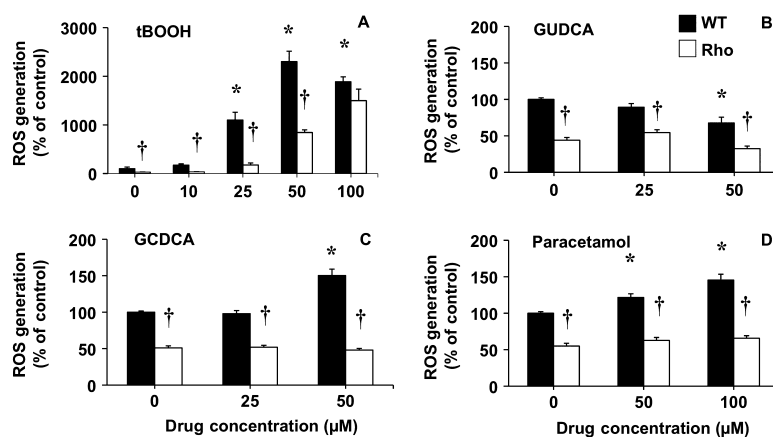
Representative histograms obtained with flow cytometry to determine mitochondrial membrane potential (MMP) after incubating wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) Hepa 1–6 mouse hepatoma cells with 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  rhodamine 123 for 1 h. Two populations of cells with either low (M1) or high (M2) MMP were identified (A). Proportion of cells with low MMP after treating the culture with the indicated concentrations of *tert*-butyl hydroperoxide (tBOOH) for 5 h (B). Values are mean  $\pm$  SEM from five cultures measured in triplicate for each data point. \* $P < 0.05$ , significantly different from untreated WT cells; † $P < 0.05$ , significant differences between Rho with WT cells.

expression of Mdr1 (Figure 7A), Mrp1 (Figure 7D) or Mrp4 (Figure 7G). In contrast, in WT cells, GCDCA was able to enhance the expression of Mdr1 (Figure 7B), Mrp1 (Figure 7E) and Mrp4 (Figure 7H), whereas in Rho cells GCDCA induced no significant change in the expression levels of these three proteins (Figure 7B, E and H). Similar results were obtained using another potentially toxic bile acid, such as deoxycholic acid (data not shown). In WT cells, paracetamol was also able to induce the expression of Mdr1 (Figure 7C), Mrp1 (Figure 7F) and Mrp4 (Figure 7I), but not in Rho cells (Figure 7C, F and I).

Western blot analyses confirmed the results of the changes in expression of Mdr1, Mrp1 and Mrp4 observed in the presence of bile acids (Figure 8).

### *Changes in nuclear receptors and transcription factors*

Regarding the nuclear receptors and transcription factors involved in the control of ABC protein expression (Table 2), no detectable expression of Car was found either in WT or Rho cells. Both Fxr and Shp were detected but at very low levels as



**Figure 6**

ROS production as determined by flow cytometry after incubating wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) Hepa 1–6 mouse hepatoma cells with  $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DCFH-DA for 1 h. ROS generation was stimulated by treating the cells with the indicated concentrations of tert-butyl hydroperoxide (tBOOH) (A), glycooursodeoxycholic acid (GUDCA) (B), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) (C) and paracetamol (D) for 5 h. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from five cultures measured in triplicate for each data point. \* $P < 0.05$ , significantly different from untreated WT cells; † $P < 0.05$ , significant differences between Rho with WT cells.

**Table 1**

Basal expression levels of main transporters and enzymes involved in the uptake/export and metabolism of bile acids

	Ct Mouse liver (kidney)	Hepa 1-6 wild type	mRNA abundance versus mouse liver (kidney) (in %)	
			Wild type	Rho
Mrp1	30 (25)	23	3000 (200)	3360 (225)
Mrp2	22	35	<0.01	<0.01
Mrp4	31 (20)	21	50 000 (40)	53 000 (42)
Mdr1	34 (30)	29	1800 (140)	3000 (225)
Mdr2	23	31	0.50	0.31
Ntcp	17	30	0.02	0.05
Bsep	25	ND	ND	ND
Bcrp	26	32	0.33	0.23
Oatp1b2	25	ND	ND	ND
Cyp27	21	30	0.07	0.13
Cyp7a1	20	31	0.09	0.10

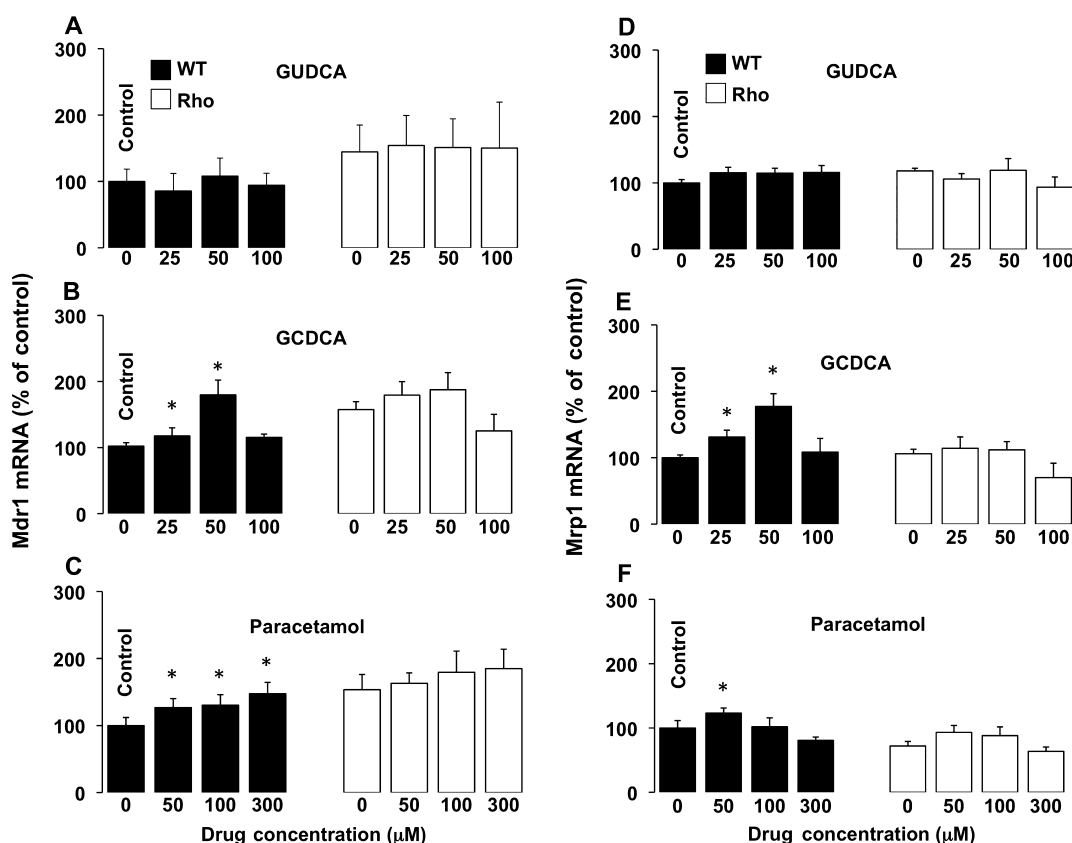
Values of threshold cycle (Ct) and mRNA abundances were determined by real-time RT-PCR. ND, non-detected.

compared with mouse liver. In contrast, although at lower levels than in liver, both Pxr and Nrf2 were clearly expressed in these cells. The abundance of Nrf2 and Fxr mRNA was similar in WT and Rho cells, whereas the expression of Pxr and Shp was reduced in Rho cells (Figure 9). Incubation with GUDCA had no significant effect on the expression of these nuclear receptors either in WT or Rho cells (Figure 9). Fxr and Pxr levels were not affected by incubation with either GCDCA or paracetamol, whereas both compounds were able to induce the

expression of Shp in WT but not in Rho cells (Figure 9). Western blot analyses confirmed the absence of stimulation of Shp expression by GCDCA and paracetamol in Rho cells (Figure 10), together with the mild up-regulation of Shp expression by both compounds, in WT cells (Figure 10).

In contrast, Nrf2 expression was clearly stimulated by GCDCA and paracetamol in both WT and Rho cells (Figure 9). A time-course study of this stimulation by Western blot revealed that steady state was reached at approximately





**Figure 7**

Concentration-dependent effect in wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) Hepa 1-6 mouse hepatoma cells of incubation with glycooursodeoxycholic acid (GUDCA) (A,D,G), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) (B,E,H) or paracetamol (C,F,I) for 48 h on Mdr1 (A,B,C), Mrp1 (D,E,F) and Mrp4 (G,H,I) expression as revealed by determining the abundance of mRNA using real-time quantitative RT-PCR. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from five cultures measured in triplicate for each data point. \* $P < 0.05$ , significant differences between treated and untreated cells.

12 h (Figure 11). The translocation of Nrf2 from the cytoplasm into the nucleus was investigated by adding a typical stimulator of this process: tert-butyl hydroquinone (TBHQ). This resulted in an early increase of Nrf2 in the nuclear fraction together with a mild but progressive decrease of the immunoblotting signal for Nrf2 in the cytoplasm. Similarly, in WT cells, translocation of Nrf2 into the nucleus was stimulated by GCDCA and paracetamol (Figure 12). This response, although weaker, was also observed in Rho cells (Figure 12).

## Discussion

Long-term treatment of cells with low doses of ethidium bromide, an inhibitor of DNA/RNA synthesis, specifically suppresses the replication and transcription of extrachromosomal genetic components such as mtDNA without affecting nuclear DNA replication and transcription (Zylber *et al.*, 1969) (Desjardins *et al.*, 1985) (Hayakawa *et al.*, 1998). In

previous studies this allowed several groups to obtain mtDNA-depleted (Rho) cells (King and Attardi, 1989). Here we took advantage of this possibility to develop a useful tool to investigate the effect of the mitochondrial genome on the response of liver cells to bile acids and paracetamol as regards ROS production, the activation of apoptosis and the up-regulation of ABC proteins.

Bile acids are signalling molecules that facilitate the synchronization of the regulatory mechanisms involved in lipid metabolism as well as bile acid elimination/detoxification. The latter constitutes the basis for protection of liver cells against the ability of these compounds to cause toxicity during pathological accumulation. A complex network involving several nuclear receptors and transcription factors, has been reported to regulate the mechanisms accounting for the prevention of excessive accumulation of bile acids and drugs in liver cells (Eloranta and Kullak-Ublick, 2005). An important finding of the present study is that, although mtDNA depletion has no significant effect on very low levels

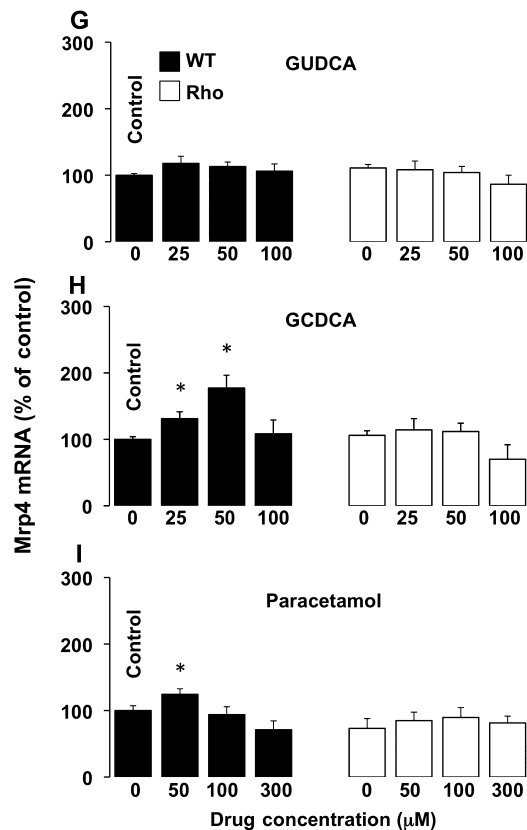


Figure 7

Continued.

of Fxr, it affects the basal expression of Shp, which is also very low, and Pxr. Both GCDCA and paracetamol, but not GUDCA, were able to induce the expression of Shp in WT cells. Interestingly, this ability was lost in Rho cells.

The mechanism of bile acid-induced toxicity on liver cells is complex and not fully understood, but it seems to involve mitochondrial toxicity, with an increased cellular production of ROS and oxidative stress. Mitochondrial impairment and activation of death receptors can subsequently result in the induction of apoptosis via activation of the pro-apoptotic effector caspases, and/or necrosis (Palmeira and Rolo, 2004). The results of the present study strongly support the well-known concept that mitochondria play a key role in bile acid-induced apoptosis, since Rho cells exhibited a significantly lower sensitivity to GCDCA-induced cell death. The ability of bile acids to induce ROS generation by isolated hepatic mitochondria has been reported (Krahenbuhl *et al.*, 1994). Our results indicate that depletion of mtDNA also reduces the ability of cells to increase ROS production in response to certain bile acids. The effects on both ROS production and the induction of cell death were not specific to bile acids since they were also diminished as compared with WT cells when Rho cells were incubated with paracetamol.

1694 British Journal of Pharmacology (2011) 162 1686–1699

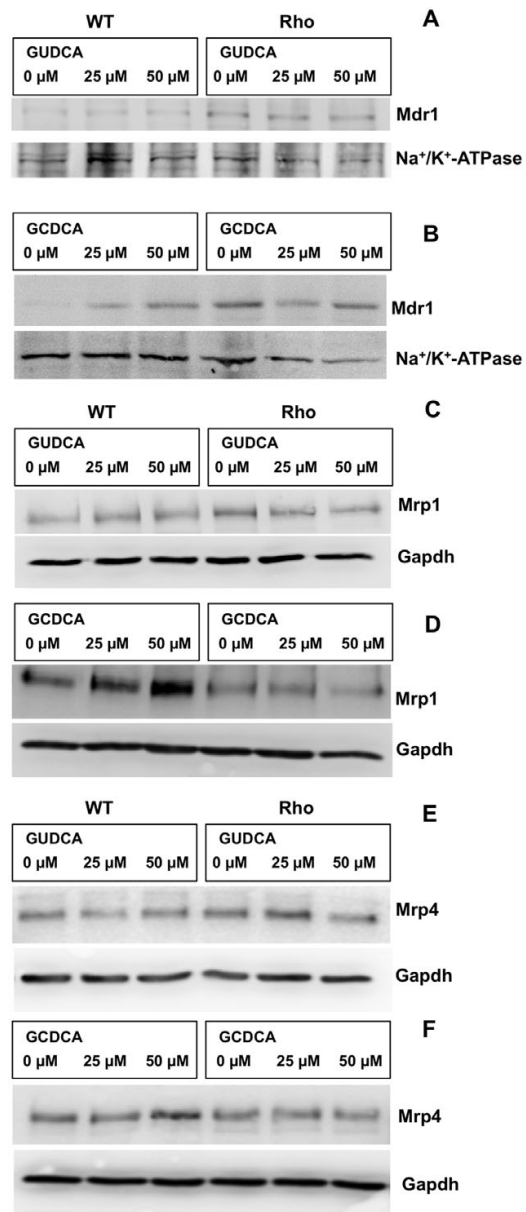


Figure 8

Representative Western blots of Mdr1 (A,B), Mrp1 (C,D) and Mrp4 (E,F) in wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) Hepa 1–6 mouse hepatoma cells incubated with the indicated concentrations of glycochenodeoxycholic acid (GUDCA) (A,C,E) or glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) (B,D,F) for 48 h. These results were confirmed in two additional experiments. For Mrp1 and Mrp4, total cell lysates were used and Western blots were normalized using Gapdh detection. Owing to the low signal found for Mdr1, the Western blots for this protein were carried out with crude membrane, and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase detection was used to normalize the results.

Table 2

Basal expression levels of main nuclear receptors and transcription factors involved in the control of ABC protein expression

	Ct Mouse liver	WT	mRNA abundance versus mouse liver (in %) Wild type	Rho
Fxr	20	31	0.15	0.12
Shp	23	30	1.24	1.11
Pxr	27	30	25.73	18.87
Car	27	38	<0.01	<0.01
Nrf2	25	27	45.46	45.68

Values of threshold cycle (Ct) and mRNA abundances were determined by real-time RT-PCR.

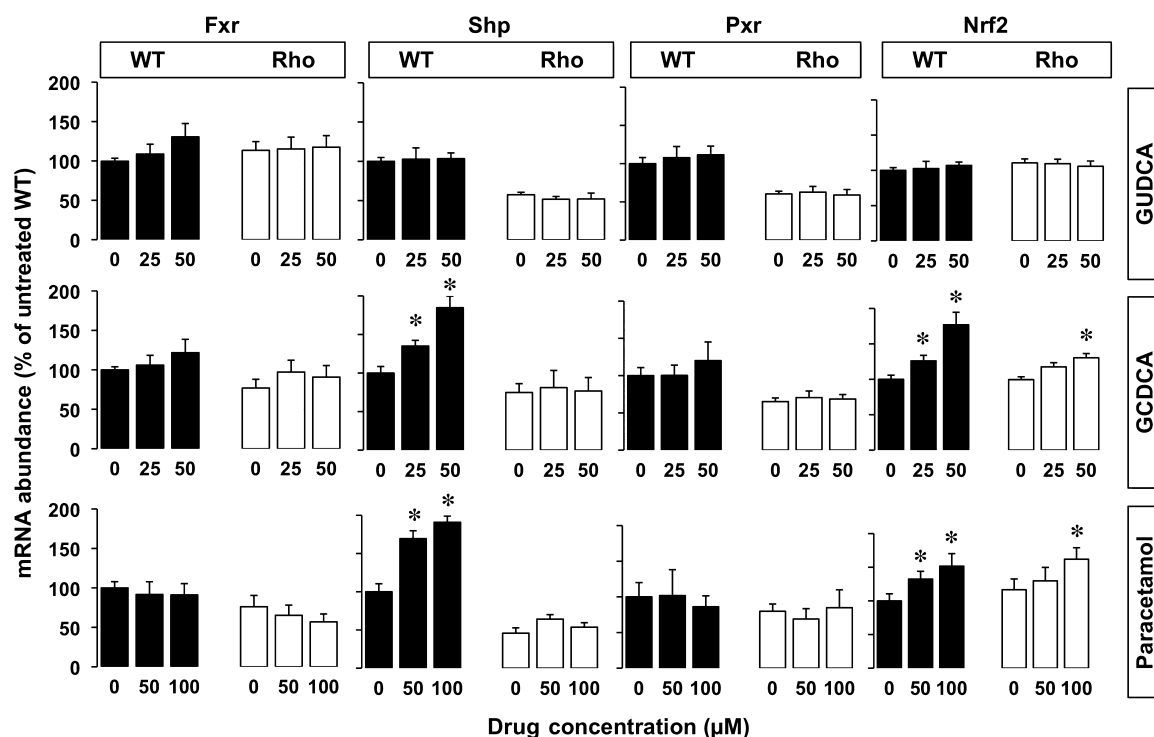
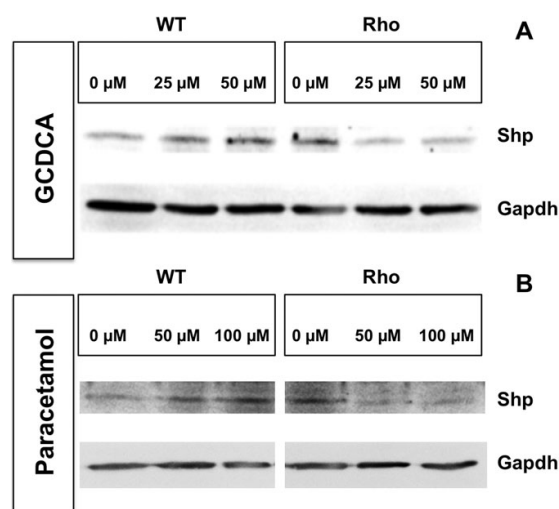


Figure 9

Concentration-dependent effect in wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) Hepa 1-6 mouse hepatoma cells of the incubation with glycochenodeoxycholic acid (GUDCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) or paracetamol for 48 h on Fxr, Shp, Pxr and Nrf2 expression as revealed by determining the abundance of mRNA using real-time quantitative RT-PCR. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from five cultures measured in triplicate for each data point. \* $P < 0.05$ , significantly different from untreated cells.

ROS generation by cells can have both anti- and pro-apoptotic consequences, depending upon the intensity and duration of the production process (Fang *et al.*, 2004). An important factor determining the final effect of ROS is the activation of anti-apoptotic genes. One of them is NRF2, which stimulates the adaptive response and cell survival during exposure to a large variety of endogenous and xenobiotic compounds (Klaassen and Reisman, 2010). NRF2 is a

basic leucine-zipper transcription factor that binds to antioxidant responsive elements (AREs), and behaves as a main regulator for many antioxidative and/or cytoprotective genes (Kensler *et al.*, 2007) (for a scheme see Figure 13). Proteasomal degradation of NRF2 is a very efficient mechanism dependent on Keap1 protein that determines the short half-life (approximately 20 min) of NRF2 in the absence of stimulatory/inhibitory signals. Keap1 recruits NRF2 into the

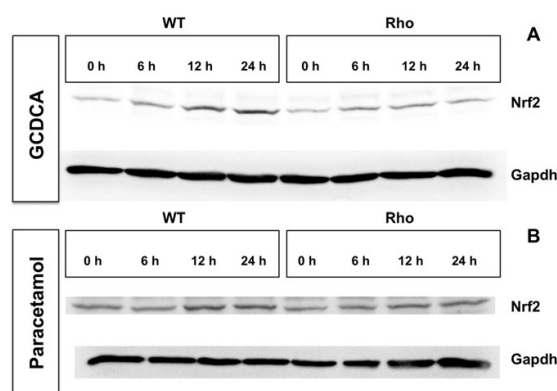


**Figure 10**

Representative Western blots showing the concentration-dependent effect of the incubation with glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) (A) or paracetamol (B) for 48 h on Shp expression in wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) Hepa 1–6 mouse hepatoma cells. These results were confirmed in two additional experiments.

Cul3-containing E3 ubiquitin ligase complex for ubiquitin conjugation and subsequent proteasomal degradation (Sun *et al.*, 2007). However, under certain circumstances, such as oxidative or electrophilic stress, the interaction between NRF2 and Keap1 is disrupted, resulting in a decreased proteasomal degradation of NRF2, the accumulation of free NRF2 in the cytosol, and an increase in NRF2 translocation into the nucleus (Li and Kong, 2009). In addition, NRF2 up-regulation results from both the inhibition of NRF2 degradation and enhanced NRF2 translation, which is partly dependent on interactions with specific regions recently described in the untranslated region of human NRF2 mRNA (Li *et al.*, 2010). Once in the nucleus, NRF2 heterodimerizes with a small musculo-aponeurotic fibrosarcoma (Maf) protein and binds to ARE sequences in ARE-bearing promoters, leading to the recruitment of the nuclear elements required for transcription of several target genes (Klaassen and Reisman, 2010).

Many compounds have been reported to activate the NRF2-mediated defence mechanism (Ramos-Gomez *et al.*, 2001). Among them are paracetamol (Chan *et al.*, 2001) and some bile acids (Tan *et al.*, 2007). On one hand, paracetamol was the first compound selected to illustrate the effects of a loss of NRF2. Paracetamol administration to Nrf2-null mice caused severe hepatocellular injury, whereas, at the same dose, paracetamol was relatively non-toxic to WT mice (Chan *et al.*, 2001; Enomoto *et al.*, 2001). On the other hand, potentially toxic bile acids, such as lithocholic acid and chenodeoxycholic acid, induce Nrf2 target genes, especially the rate-limiting enzyme in glutathione (GSH) biosynthesis (Tan *et al.*, 2007). Moreover, in *Fxr*-null mice the accumulation of



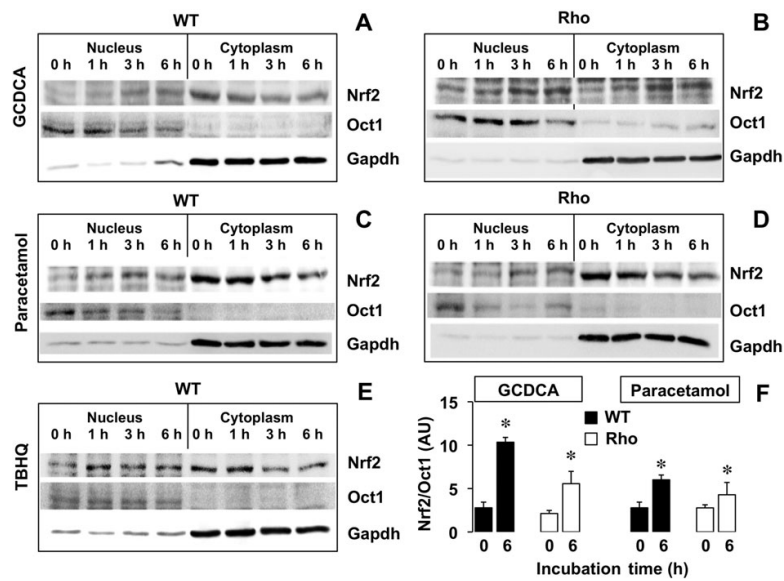
**Figure 11**

Representative Western blots showing the time-course of the effect of the incubation with 50  $\mu$ M glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) (A) or 50  $\mu$ M paracetamol (B) on Nrf2 expression in wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) Hepa 1–6 mouse hepatoma cells. These results were confirmed in two additional experiments.

bile acids results in an enhanced expression of Nrf2 (Nomoto *et al.*, 2009). Our results indicate that mechanisms accounting for mouse Nrf2 up-regulation and translocation into the nucleus were preserved in Rho cells. The observed up-regulation was not only due to changes in protein fate but also involved an enhanced transcription as the mRNA of Nrf2 was increased by incubation with GCDCA and paracetamol. Moreover, although slightly weaker, an up-regulatory response to the presence of GCDCA and paracetamol was also observed in Rho cells. This was an important finding of the present study because it suggested that both Nrf2 up-regulation and nuclear translocation were not strictly dependent on ROS production. In this respect, it has been recently demonstrated that the antioxidant bile acid ursodeoxycholic acid promotes the translocation of NRF2 into the nucleus in human hepatoma HepG2 cells (Arisawa *et al.*, 2009). A ROS-independent interaction of bile acids and paracetamol on the Nrf2 up-regulatory machinery or an indirect effect through the activation of an intermediate sensor can be suggested (see Figure 13 for a working hypothesis).

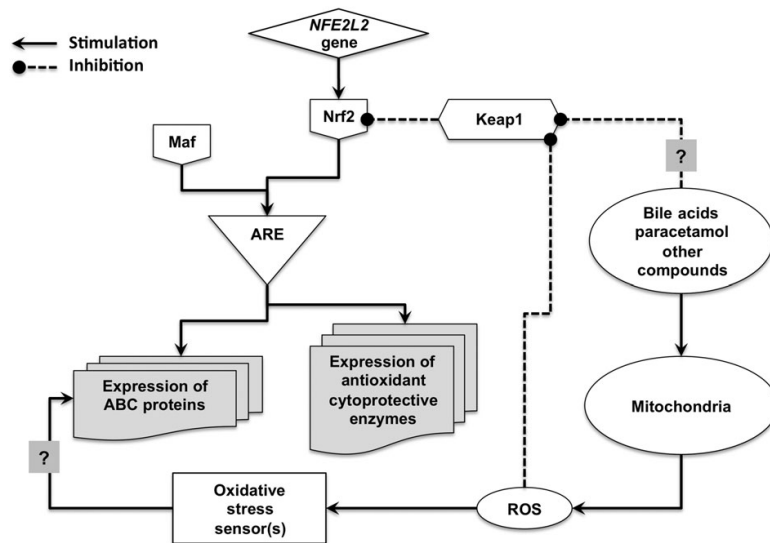
The defensive mechanism activated by NRF2 involves the stimulation of ABC protein expression. In the present study we observed that in Rho cells, even though GCDCA- and paracetamol-induced ROS production was abolished, Nrf2 translocation into the nucleus was enhanced, although to a lower extent than in WT cells. In contrast, in Rho cells, the expression of the ABC proteins Mdr1, Mrp1 and Mrp4 did not respond to exposure to either GCDCA or paracetamol.

In conclusion, the present results suggest that activation of the Nrf2-mediated pathway is partly independent of ROS production. Moreover, in terms of ABC protein expression, Nrf2 translocation to the nucleus is insufficient for the up-regulation of Mdr1, Mrp1 and Mrp4, which probably requires the participation of other regulatory



**Figure 12**

Representative Western blot showing the time course of the effect of 60  $\mu$ M tert-butyl hydroquinone (TBHQ) (A), 50  $\mu$ M glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) (B) or 50  $\mu$ M paracetamol (C) on Nrf2 translocation from the cytoplasm into the nucleus in wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) Hepa 1–6 mouse hepatoma cells. Oct1 and Gapdh were used as nuclear and cytoplasmic markers, respectively. These results were confirmed in five additional experiments. Results from densitometry of bands at 0 and 6 h in nuclear extracts were normalized with Oct1 (F). \* $P < 0.05$ , significant differences between nuclear extracts collected at 0 and 6 h from the same culture; paired t-test. AU, arbitrary units.



**Figure 13**

Schematic representation of the mechanisms proposed to be involved in the Shp and Nrf2-mediated up-regulation of ABC proteins induced by bile acids and paracetamol in liver cells. ARE, antioxidant response element; Fxr, farnesoid nuclear receptor; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; Maf, musculo-aponeurotic fibrosarcoma protein; ROS, reactive oxygen species; Shp, small heterodimer partner.



MJ Perez et al.

element(s) whose activation in response to GCDCA and paracetamol may be (directly or indirectly) sensitive to ROS production and hence affected by the lack of mtDNA integrity.

## Acknowledgements

The authors thank N. Skinner for the revision of the English spelling, grammar and style of the manuscript.

This study was supported in part by the Instituto de Salud Carlos III, FIS (Grants CP05/0135, PI070517 and PI080151), Spain; the Junta de Castilla y Leon (Grant GR75-2008), Spain; the Ministerio de Ciencia e Innovacion, Plan Nacional de Investigacion Cientifica, Desarrollo e Innovacion Tecnologica and the European Regional Development Fund (ERDF) (Grants BFU2006-12577 and SAF2009-08493), Spain; and the Fundacion Investigacion Medica, Mutua Madrileña (Conv-VI, 2009), Spain. The group is member of the Network for Cooperative Research on Membrane Transport Proteins (REIT), co-funded by the Ministerio de Ciencia e Innovacion, Spain, and the ERDF (Grant BFU2007-30688-E/BFI), and belongs to the CIBERehd (Centro de Investigacion Biomedica en Red) for Hepatology and Gastroenterology Research (Instituto de Salud Carlos III, Spain). Ester González-Sánchez is a recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación, Spain (Grant AP2008-03762).

## Conflicts of interest

None to declare.

## References

- Aleksunes LM, Slitt AL, Maher JM, Augustine LM, Goedken MJ, Chan JY *et al.* (2008). Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* 226: 74–83.
- Arisawa S, Ishida K, Kameyama N, Ueyama J, Hattori A, Tatsumi Y *et al.* (2009). Ursodeoxycholic acid induces glutathione synthesis through activation of PI3K/Akt pathway in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 77: 858–866.
- Attardi G, Schatz G (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4: 289–333.
- Briz O, Macias RI, Serrano MA, Gonzalez-Gallego J, Bayon JE, Marin JJ (2003a). Excretion of foetal bilirubin by the rat placenta-maternal liver tandem. *Placenta* 24: 462–472.
- Briz O, Serrano MA, Macias RI, Gonzalez-Gallego J, Marin JJ (2003b). Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem J* 371 (Pt 3):897–905.
- Chan K, Han XD, Kan YW (2001). An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4611–4616.
- Chandra P, Brouwer KL (2004). The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* 21: 719–735.
- Desjardins P, Frost E, Morais R (1985). Ethidium bromide-induced loss of mitochondrial DNA from primary chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 5: 1163–1169.
- Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA (2005). Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch Biochem Biophys* 433: 397–412.
- Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T *et al.* (2001). High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci* 59: 169–177.
- Erol A (2005). Retrograde regulation due to mitochondrial dysfunction may be an important mechanism for carcinogenesis. *Med Hypotheses* 65: 525–529.
- Fang Y, Han SI, Mitchell C, Gupta S, Studer E, Grant S *et al.* (2004). Bile acids induce mitochondrial ROS, which promote activation of receptor tyrosine kinases and signaling pathways in rat hepatocytes. *Hepatology* 40: 961–971.
- Fautz R, Husein B, Hechenberger C (1991). Application of the neutral red assay (NR assay) to monolayer cultures of primary hepatocytes: rapid colorimetric viability determination for the unscheduled DNA synthesis test (UDS). *Mutat Res* 253: 173–179.
- Finkel T (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* 476: 52–54.
- Geier A, Wagner M, Dietrich CG, Trauner M (2007). Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1773: 283–308.
- Hayakawa T, Noda M, Yasuda K, Yorifuji H, Taniguchi S, Miwa I *et al.* (1998). Ethidium bromide-induced inhibition of mitochondrial gene transcription suppresses glucose-stimulated insulin release in the mouse pancreatic beta-cell line betaHC9. *J Biol Chem* 273: 20300–20307.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 89–116.
- King MP, Attardi G (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246: 500–503.
- Klaassen CD, Reisman SA (2010). Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 244: 57–65.
- Krahenbuhl S, Fischer S, Talos C, Reichen J (1994). Ursodeoxycholate protects oxidative mitochondrial metabolism from bile acid toxicity: dose-response study in isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 20: 1595–1601.
- Lee W, Choi HI, Kim MJ, Park SY (2008). Depletion of mitochondrial DNA up-regulates the expression of MDR1 gene via an increase in mRNA stability. *Exp Mol Med* 40: 109–117.
- Li W, Kong AN (2009). Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* 48: 91–104.
- Li W, Thakor N, Xu EY, Huang Y, Chen C, Yu R *et al.* (2010). An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2. *Nucleic Acids Res* 38: 778–788.

1698 *British Journal of Pharmacology* (2011) **162** 1686–1699



## Role of mitochondria in ABC proteins regulation



- Maher JM, Dieter MZ, Aleksunes LM, Slitt AL, Guo G, Tanaka Y *et al.* (2007). Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway. *Hepatology* 46: 1597–1610.
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87: 206–210.
- Miller SW, Trimmer PA, Parker WD, Jr, Davis RE (1996). Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with 'neuronal-like' properties. *J Neurochem* 67: 1897–1907.
- Miyata M, Matsuda Y, Nomoto M, Takamatsu Y, Sato N, Hamatsu M *et al.* (2009). Cholesterol feeding prevents hepatic accumulation of bile acids in cholic acid-fed farnesoid X receptor (FXR)-null mice: FXR-independent suppression of intestinal bile acid absorption. *Drug Metab Dispos* 37: 338–344.
- Nomoto M, Miyata M, Yin S, Kurata Y, Shimada M, Yoshinari K *et al.* (2009). Bile acid-induced elevated oxidative stress in the absence of farnesoid X receptor. *Biol Pharm Bull* 32: 172–178.
- Palmeira CM, Rolo AP (2004). Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicology* 203: 1–15.
- Perez MJ, Cederbaum AI (2001). Spin trapping agents (Tempol and POBN) protect HepG2 cells overexpressing CYP2E1 against arachidonic acid toxicity. *Free Radic Biol Med* 30: 734–746.
- Perez MJ, Cederbaum AI (2002). Antioxidant and pro-oxidant effects of a manganese porphyrin complex against CYP2E1-dependent toxicity. *Free Radic Biol Med* 33: 111–127.
- Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P *et al.* (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3410–3415.
- Schinkel AH, Jonker JW (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 3–29.
- Schonhoff CM, Matsuoka M, Tummala H, Johnson MA, Estevez AG, Wu R *et al.* (2006). S-nitrosothiol depletion in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2404–2409.
- Sun Z, Zhang S, Chan JY, Zhang DD (2007). Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol* 27: 6334–6349.
- Tan KP, Yang M, Ito S (2007). Activation of nuclear factor (erythroid-2 like) factor 2 by toxic bile acids provokes adaptive defense responses to enhance cell survival at the emergence of oxidative stress. *Mol Pharmacol* 72: 1380–1390.
- Trounce I, Neill S, Wallace DC (1994). Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T ->G (ATP6) point mutation associated with Leigh syndrome into mtDNA-less cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8334–8338.
- Vicens M, Medarde M, Macias RI, Larena MG, Villafaina A, Serrano MA *et al.* (2007). Novel cationic and neutral glycocholic acid and polyamine conjugates able to inhibit transporters involved in hepatic and intestinal bile acid uptake. *Bioorg Med Chem* 15: 2359–2367.
- Vollrath V, Wielandt AM, Iruretagoyena M, Chianale J (2006). Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *Biochem J* 395: 599–609.
- Zylber E, Vesco C, Penman S (1969). Selective inhibition of the synthesis of mitochondria-associated RNA by ethidium bromide. *J Mol Biol* 44: 195–204.



### 7.2.1.3. Role of mitochondrial genome in the protective mechanisms against bile acid-induced cell death in liver

According to the results described in section 7.2.1.2, partial mtDNA depletion in mouse liver Hepa 1-6 cells enhance their resistance to chemical stress induced by toxic compounds such as paracetamol and BAs. The reduction in the sensitivity of Hepa 1-6 Rho cells to these compounds is not dependent on the expression of ABC transporters, although it may be related with the reduced production of ROS observed in these cells in response to the treatment with toxic compounds.

Oxidative stress plays a crucial role among the mechanisms involved in the cytotoxic effect associated with BAs accumulation in cholestatic liver diseases (Sokol *et al.*, 1991) (Togashi *et al.*, 1990). Hepatic mitochondria have been proposed as a major source of ROS generation induced by BAs. These compounds impair respiration and electron transport in hepatocyte mitochondria (Krahenbuhl *et al.*, 1994) and induce the mitochondrial permeability transition (MPT), a critical intracellular event that triggers both the apoptotic and necrotic forms of cell death in hepatocytes (Lemasters *et al.*, 1998). Induction of MPT is associated with the collapse of mitochondrial membrane potential, reduced oxidative phosphorylation, rupture of the outer mitochondrial membrane, cytochrome c release, and generation of ROS (Reactive Oxygen Species) (Lemasters *et al.*, 1998).

At high levels, ROS production is related with toxicity and eventually cell death. However, it should be noted that, at lower levels, ROS can modulate several signaling pathways (Bartosz, 2009) and may play a protective role via activation of survival pathways such as ERK1/2 and Akt (Fang *et al.*, 2004).

Since mitochondria plays a pivotal role in BAs-induced toxicity and participates in the mechanisms of apoptosis and necrosis, in this part of the project we have analyzed the role of the complete mitochondrial genome depletion in the mechanisms by which human liver cells become resistant to apoptosis- or necrosis-mediated cell death in response to incubations with high concentrations of BAs.

The results obtained in this section have been included in the manuscript entitled: "Mitochondrial genome depletion in human liver cells abolishes bile acid-induced apoptosis: Role of the Akt/mTOR survival pathway and Bcl-2 family proteins" which has been accepted for publication in the journal *Free Radical Biology & Medicine*. These results are shown in figure 1G-H, figure 4B and D, figure 6D-F.

- Bartosz, G., 2009. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochemical pharmacology* 77, 1303-1315.
- Fang, Y., Han, S.I., Mitchell, C., Gupta, S., Studer, E., Grant, S., Hylemon, P.B., Dent, P., 2004. Bile acids induce mitochondrial ROS, which promote activation of receptor tyrosine kinases and signaling pathways in rat hepatocytes. *Hepatology* 40, 961-971.
- Krahenbuhl, S., Talos, C., Fischer, S., Reichen, J., 1994. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 19, 471-479.
- Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Herman, B., 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta* 1366, 177-196.
- Sokol, R.J., Devereaux, M., Khandwala, R.A., 1991. Effect of dietary lipid and vitamin E on mitochondrial lipid peroxidation and hepatic injury in the bile duct-ligated rat. *Journal of lipid research* 32, 1349-1357.
- Togashi, H., Shinzawa, H., Wakabayashi, H., Nakamura, T., Yamada, N., Takahashi, T., Ishikawa, M., 1990. Activities of free oxygen radical scavenger enzymes in human liver. *Journal of hepatology* 11, 200-205.

**Mitochondrial genome depletion in human liver cells abolishes bile acid-induced apoptosis: Role of the Akt/mTOR survival pathway and Bcl-2 family proteins**

Jose J. G. Marin <sup>a</sup>, Alicia Hernandez <sup>a</sup>, Isabel E. Revuelta <sup>a</sup>, Ester Gonzalez-Sanchez <sup>a</sup>, Jose M. Gonzalez-Buitrago <sup>b,c</sup> and Maria J. Perez <sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Experimental Hepatology and Drug Targeting, CIBERehd, IBSAL. University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain.

<sup>b</sup> University Hospital of Salamanca, IECSCYL-IBSAL, 37007 Salamanca, Spain.

<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain.

**Running Title:** Role of the mitochondrial genome in apoptosis

**Contact Information:**

Maria J. Perez, Ph.D.  
Research Unit, University Hospital of Salamanca  
Edificio Departamental (Lab. 129)  
Campus Miguel de Unamuno  
37007 Salamanca, Spain  
Telephone: 34-923-294781  
Fax: 34-923-294579  
E-mail: [mjperez@usal.es](mailto:mjperez@usal.es)

**List of Abbreviations:**

ABC, ATP-binding cassette; DCA, deoxycholic acid; DCFH-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; ERK, extracellular regulated kinase; EtBr, ethidium bromide; GCDCA, glycochenodeoxycholic acid; HE, hydroethidine; MDR, multidrug resistance protein; MRP, multidrug resistance-associated protein; MT-ND1, mitochondrially encoded NADH dehydrogenase subunit 1; mTOR, mammalian target of rapamycin; Rh123, rhodamine 123; ROS, reactive oxygen species.

## Abstract

Acute accumulation of bile acids in hepatocytes may cause cell death. However, during long-term exposure due to prolonged cholestasis, hepatocytes may develop a certain chemoresistance to these compounds. Since mitochondrial adaptation to persistent oxidative stress may be involved in this process, here we have investigated the effect of complete mitochondrial genome depletion on the response to bile acid-induced hepatocellular injury. A subline (Rho) of human hepatoma SK-Hep-1 cells totally depleted of mitochondrial DNA (mtDNA) was obtained and concentration-dependent activation of apoptosis and survival signaling pathways studies in the presence of bile acids were carried out. Rho cells were highly resistant to bile acid-induced apoptosis and partially resistant to bile acid-induced necrosis. In Rho cells, both the constitutive and bile acid-induced generation of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide and superoxide anion, were decreased. Bile acid-induced pro-apoptotic signals were also decreased, as evidenced by a reduction in the expression ratios: Bax- $\alpha$ /Bcl-2, Bcl-xS/Bcl-2 and Bcl-xS/Bcl-xL. This was mainly due to a down-regulation of Bax- $\alpha$  and Bcl-xS. Moreover, in these cells the Akt/mTOR pathway was constitutively activated under basal conditions in a ROS-independent manner and remained similarly activated in the presence of bile acid treatment. In contrast, ERK1/2 activation was constitutively reduced, and was not activated by incubation with bile acids. In conclusion, these results suggest that a compromised mitochondrial function associated with mtDNA alterations, which may occur in liver cells during prolonged cholestasis activates mechanisms of cell survival which are involved in an enhanced resistance of hepatocytes to bile acid-induced apoptosis.

**Keywords:** Akt; apoptosis; Bcl-2; bile acid; cholestasis; liver; mitochondria; retrograde signaling; Rho cells.

## Introduction

The accumulation of some molecular species of bile acids in the liver during cholestasis causes parenchymal cell death, leading to impaired hepatic function and -eventually- liver failure [1]. A central feature observed during chronic cholestasis is mitochondrial dysfunction [2], which is evidenced by a reduction in mitochondrial membrane potential, decreased activities of respiratory chain complexes, and subsequent impairment of ATP production [3, 4]. Cholestasis-induced cell death may be due to necrosis or apoptosis. The latter is activated by either mitochondrial damage or the interaction of pro-apoptotic effectors with membrane death receptors [5]. Apoptosis is the predominant mechanism during acute cholestasis, whereas necrosis is the major form of hepatocyte death during chronic cholestasis. After bile duct ligation in the rat, biphasic changes in processes leading to cell death occur in hepatocytes: (i) a transient increase in caspase-3 activity during the first week, followed by a (ii) decrease in caspase-3 activity during the second week. This suggests that prolonged cholestasis induces adaptive changes in hepatocytes that may result in a certain resistance to bile acid-induced activation of apoptosis. Thus, if the chemical stress is maintained and high enough, cell death is characterized by an increased proportion of necrotic cells [6, 7]. Indeed, oncotic necrosis has been proposed as the predominant form of cell death in rodent models of long-term cholestasis [8].

Bile acid-induced hepatocellular injury has been shown to be associated with the ability of these steroids to induce ROS generation [9]. However, it should be noted that ROS can have both pro- and anti-apoptotic effects, depending on the type of stimulus as well as on the amount and duration of ROS production [10]. Thus, the toxic effects of bile acids can be modified by ROS; i.e., high ROS production may induce toxicity due to an irreversible loss of mitochondrial membrane potential and the release of cytochrome c into the cytosol. By contrast, lower levels of ROS may play a protective role via activation of anti-apoptotic pathways such as these involving ERK1/2 and Akt [10]. Since mitochondria are a major site of ROS generation and are critical targets of bile acid-induced toxicity, these organelles have received much attention with a view to elucidating the mechanism underlying hepatotoxicity associated with cholestatic liver diseases and to exploring novel strategies for their treatment [5, 11]. Mitochondrial function depends on proteins that are encoded by both nuclear DNA (nDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA), which contains the genes coding for 13 components of the respiratory chain [12]. MtDNA damage is tightly associated with

mitochondria-related pathology, including cholestatic liver disease [13, 14]. Thus, persistent mitochondrial oxidative stress caused by bile acid accumulation may lead to a decline in mitochondrial respiratory function, with decreased mtDNA copy number [13, 14].

Chemical stress-induced dysfunctional mitochondria may trigger retrograde signaling from these organelles to the nucleus, which causes changes in gene expression, such as the up-regulation of proteins involved in diverse cellular processes, including the control of metabolism, nutrient sensing, stress response, drug sensitivity, life span and the development of resistance to apoptosis [15].

In previous studies, using an *in vitro* model of partial mtDNA depletion in mouse liver cells, we have reported that retrograde regulation may be involved in the defense response of mouse liver cells against the chemical stress induced by toxic compounds such as paracetamol and bile acids [16]. In the present study, we aimed to investigate the role of the complete mitochondrial genome depletion in the mechanisms by which human liver cells become resistant to apoptosis- or necrosis-mediated cell death in response to incubations with high concentrations of bile acids.

## Materials and Methods

### Methods

#### *Cell lines and culture conditions*

The human hepatoma SK-Hep-1 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, HTB-52, Rockville, MD, USA). SK-Hep-1 cells were cultured in Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) containing 10% FCS (TDI S.A., Madrid, Spain) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Invitrogen, Barcelona, Spain) and supplements reported by the supplier, in a humidified atmosphere in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. SK-Hep-1 Rho cells totally depleted of mtDNA were derived from wild-type (WT) SK-Hep-1 cells by culturing them in the presence of 100 ng/ml ethidium bromide (EtBr) for more than 20 generations [17]. To compensate for the impairment of respiratory metabolism and to support cell growth, the auxotrophy of Rho cells for uridine and pyruvate [18] required the culture medium to be supplemented with 100 µg/ml pyruvate and 50 µg/ml uridine. To carry out the experiments, the cells were plated and incubated for 24 h in the absence of any of the compounds tested and then treated with deoxycholic acid (DCA: 25 to 500 µM) or glycochenodeoxycholic acid (GCDCA: 25 to 2000 µM) (Sigma-Aldrich) for 0.5 or 8 h. In some experiments, Akt phosphorylation was blocked using the selective PI3K inhibitor, LY294002 (Sigma-Aldrich). For flow cytometry and gene expression studies, cells were detached with trypsin-EDTA solution and then pelleted by centrifugation at 250x g for 10 min and washed once with phosphate-buffered saline (PBS).

#### *Determination of gene expression levels and mtDNA copy number*

The depletion of mtDNA was confirmed by real-time PCR amplification using specific primers for the mitochondrion-encoded genes 16S rRNA and NADH dehydrogenase subunit 1 (MT-ND1). Total cellular DNA (nDNA and mtDNA) was extracted using the QIAamp DNA Blood Mini kit from Qiagen (Izasa, Barcelona, Spain). DNA was then quantified fluorometrically with the PicoGreen DNA-Quantitation kit (Invitrogen). To determine mRNA levels by real-time RT-QPCR, total RNA was isolated from cell lysates using the Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, Barcelona, Spain). RNA was then quantified fluorometrically with the RiboGreen RNA-Quantitation kit (Invitrogen). SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) was used to synthesize cDNA from total RNA. Real-time QPCR was then performed using AmpliTaq Gold polymerase (Applied



Biosystems, Madrid, Spain) in an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions were as follows: a single cycle at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles at 95°C for 15 s and at 60°C for 60 s. Detection of the amplification products was carried out using SYBR Green I or TaqMan probes (Applied Biosystems). As a calibrator, total RNA from human liver was used. The results of mRNA abundance for the target genes in each sample were normalized on the basis of human GAPDH mRNA or 18S rRNA abundance. The mtDNA copy number was measured from total DNA using the primer and Taqman probe oligonucleotides listed in supplementary Table S1. The TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents kit (Applied Biosystems) was used to measure DNA encoding 18S rRNA. The same sets of primers and probes were used to measure the absolute abundance of the rRNAs or mRNAs corresponding to these genes. Absolute quantification of mtDNA and RNAs was carried out using standard curves generated by plotting the threshold cycle (Ct) versus log<sub>10</sub> of the copy number of cDNA fragments obtained by conventional PCR and quantified with the PicoGreen detection kit, as previously described in detail [19]. The primer oligonucleotide sequences and the conditions to carry out quantitative PCR of human MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MDR1, MDR3, BSEP and BCRP have been described previously [20]. The primer oligonucleotide sequences to carry out quantitative PCR of human Akt1, Bax- $\alpha$ , Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-xS are listed in supplementary Table S1. All primers (obtained from Sigma-Genosys, Madrid, Spain) were designed with the assistance of Primer Express software (Applied Biosystems), and their specificity was checked using BLAST.

#### ***Cell death, ROS generation and mitochondrial membrane potential (MMP)***

Cell death was determined by flow cytometry (FACSort flow cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) after staining with propidium iodide (Sigma-Aldrich). The amount of attached cells was also evaluated by measuring the total protein content of the cell cultures [21]. To quantify the degree of apoptosis, DNA fragmentation was analyzed by flow cytometry as previously described [22], with some modifications. Briefly, after permeabilizing the cells in ethanol, they were incubated with 100  $\mu$ g/ml RNase A, in PBS, pH 7.8, containing 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 100 mM citric acid, stained with 25  $\mu$ g/ml propidium iodide, and analyzed by flow cytometry to measure their DNA content. The combination of this method to reveal apoptosis and scatter analysis of the cell population allowed the exclusion of necrotic cells from the analysis. As an index of necrosis, the lactate

dehydrogenase (LDH) activity [23] released from the cells to the culture medium was measured (referred to as LDH<sub>out</sub>) as previously described [22]. LDH activity was also measured in the cell lysate supernatants (referred to as LDH<sub>in</sub>) and the results are expressed as the ratio between LDH<sub>out</sub> and LDH<sub>total</sub> (LDH<sub>out</sub>+LDH<sub>in</sub>). MMP was assayed by flow cytometry using Rhodamine 123 (Rh123) [22]. Cells were incubated with medium containing 5 µg/ml Rh123 for 1 h after the corresponding treatment. Flow cytometry was also used to measure the generation of the ROS hydrogen peroxide and superoxide anion using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and hydroethidine (HE), respectively. After the corresponding treatment, cells were incubated with medium containing 5 µg/ml DCFH-DA or 3 µg/ml HE for 30 minutes. Both compounds are freely permeable across cell membranes. DCFH-DA is cleaved by cellular esterases to the non-fluorescent DCFH. HE is oxidized to ethidium in an earlier step than DCFH in the reactive oxygen metabolism of cells, i.e., by early oxygen metabolites such as superoxide anion, while DCFH is oxidized mainly by hydrogen peroxide and phagosomal peroxidases [24].

#### **Western blot analyses**

After the corresponding treatments, cells were harvested by washing with cold PBS and scraping into lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, and 0.5% sodium deoxycholate. Protease inhibitors (1% protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitors (10 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate) were also added. After mixing for 30 minutes at 4°C, the cell lysates were centrifuged at 20,000x g for 20 minutes at 4°C and the supernatant fractions were used for Western blot analyses. Protein concentrations were determined [21] using bovine serum albumin as standard. Proteins (15-30 µg) were loaded onto 6, 8 or 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). The primary antibodies (working dilution) used were as follows: rabbit polyclonal antibodies against phospho-Akt (Ser473) (1:1000), Akt (1:1000), phospho-mTOR (Ser2448) (1:1000), p44/42 MAPK (ERK1/2) (1:1000), rabbit monoclonal antibody against phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® (1:2000) (Cell Signaling Technology, MA, USA) and mouse monoclonal antibody against GAPDH (6C5) (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Anti-rabbit and anti-mouse IgG horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany)

were used. Blots were visualized using enhanced chemiluminescence reagents (Amersham Pharmacia Biotech) and a Fujifilm LAS-4000 (TDI S.A.) luminescent image analyzer.

### ***Statistical analysis***

Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using the SPSS 10.0.6 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) for Windows (Microsoft Co., Seattle, WA, USA). To calculate the statistical significance of the differences between groups, the Bonferroni method for multiple range testing, and Student's *t*-test or the paired *t*-test were used, as appropriate.

## Results

### *Characterization of Rho cells*

Long-term incubation of SK-Hep-1 cells in the presence of a sub-toxic dose of EtBr resulted in total mtDNA depletion, which persisted even after discontinuation of the treatment (Table 1). Thus, the abundance of 16S rRNA and MT-ND1 mRNA was markedly decreased whereas that of 18S rRNA encoded by the nuclear genome remained unchanged (Table 1). A dramatic depletion in RNA coding for 16S rRNA and MT-ND1 was already found after 20 days of EtBr treatment. At this time the number of copies for 16S rRNA and MT-ND1 mRNA fell to 0.002% and 0.02% respectively. After 130 days of treatment with EtBr, and after the subsequent removal of this compound for 50 days, the expression of these genes was not detectable. To confirm that this was not due to changes in transcription, the abundance of the corresponding DNA was also measured (Table 1). In non-treated cultures, the cells contained approximately 260 mtDNA genomes per cell whereas in EtBr-treated cells depletion of mtDNA was complete and persisted even after EtBr removal.

Some morphological differences between WT and mtDNA-depleted (Rho) cells were seen. Thus, the latter mainly grew in bundles of polygonal cells, whereas in the WT cell cultures spindle-shaped cells were more abundant (Figure 1A, 1D). However, the growth rate was similar for WT and Rho cells, as indicated by the protein content of the cultures (Figure 1G).

### *Sensitivity of Rho cells to bile acid-induced cell death*

When SK-Hep-1 cells were exposed to DCA and GCDCA for 8 hours, a clearly different ability to induce cell death was observed. WT cells were more sensitive to DCA than to GCDCA (Figure 1H). Thus, only very high concentrations of GCDCA were able to induce cell death. The percentage of dead cells in cultures of WT cells incubated with 500  $\mu$ M DCA or 2000  $\mu$ M GCDCA was increased 6- and 13-fold, respectively (Figure 1H). Rho cells showed a significantly lower sensitivity to GCDCA and were fully resistant to DCA-induced cell death as shown by phase-contrast microscopy studies (Figure 1A-1F), changes in cell culture growth (Figure 1G) and increases in the proportion of dead cells (Figure 1H).

Measurements of the degree of apoptosis by flow cytometry analysis, i.e., by determining the proportion of hypodiploid bodies in the M1 zone of frequency histograms (Figure 2A-2F), are summarized in Fig. 3G. These results revealed that treatment of WT cells with 300 or 500  $\mu$ M

DCA for 8 h resulted in a marked increase in the percentage of apoptotic cells, which was not observed after incubation with 2000  $\mu$ M GCDCA. In contrast, neither DCA nor GCDCA had any pro-apoptotic effect on Rho cells (Figure 2D-2G). To determine the proportion of necrosis-mediated cell death under these conditions, LDH release to the culture medium was measured (Figure 2H). In WT cells, treatment with high concentrations of DCA or GCDCA induced a dose-dependent release of LDH to the culture medium. This effect was also observed, although with lower magnitude, in Rho cells (Figure 2H)

Since reductions in MMP are associated with bile acid-induced cell toxicity, the percentage of cells with low MMP was determined. In WT cells, this value was increased by treatment with both bile acids at concentrations able to induce cell death (Figure 2I, 2J). In Rho cells, DCA was not able to affect MMP (Figure 2I), whereas GCDCA only increased MMP at very high concentrations (Figure 2J).

### ***ROS generation***

DCFH oxidation, which is mainly due to hydrogen peroxide and phagosomal peroxidases in cells, was used as an index of hydrogen peroxide generation. This was markedly lower in Rho than in WT cells (Figure 3A). In WT cells, the treatment with DCA (Figure 3A) or GCDCA (Figure 3B) for 8 h induced a concentration-dependent increase in hydrogen peroxide generation. This response was more marked in cells treated with GCDCA. In contrast, in Rho cells, DCA was not able to induce an enhanced production of hydrogen peroxide (Figure 3A), whereas a response to GCDCA was observed only at very high concentrations (Figure 3B). Since these experimental conditions induce cell death, to rule out any potential effect due to cell death-associated events, an early response was also analyzed. Treatment of WT cells with DCA or GCDCA for 30 min stimulated hydrogen peroxide production in a concentration-dependent manner (Figure 3C, 3D). Interestingly, in Rho cells, both bile acids were also able to induce a response even at non-toxic concentrations, although this was weaker than that found in WT cells (Figure 3C, 3D). These results suggest the existence of compensatory mechanisms able, after a certain time, to counterbalance bile acid-induced hydrogen peroxide generation when the cells were exposed at low concentrations of DCA or GCDCA.

The results of measuring superoxide anion using HE [24] revealed that under basal conditions these levels were dramatically lower in Rho cells as compared with WT cells (Figure 4A). In WT cells, only high concentrations of DCA and very high of GCDCA after either long-term

(8 h) (Figure 4A, 4B) or short-term (30 min) (Figure 4C, 4D) exposure were able to enhance superoxide anion generation. In contrast, in Rho cells neither DCA nor GCDCA, either after long-term or short-term incubation, were able to stimulate superoxide anion generation (Figure 4).

### ***Changes in ABC protein expression***

Since ABC (ATP-binding cassette) proteins play an important role in the chemoresistance that characterizes liver tumors [25] and because their expression is believed to be affected by retrocontrol mechanisms, in the present study the expression of the major ABC proteins involved in the efflux of endogenous and xenobiotic substances from hepatocytes, was determined (Table 2). As compared with human liver, the expression in WT cells was markedly higher for MRP1 and MRP4; similar for MRP2; poor for MRP3, MDR1 and BCRP, and negligible for MDR3 and BSEP. Similar results were obtained in Rho cells, except for MDR1, whose expression, although poor in both cell types, was significantly higher in Rho than in WT cells (Table 2). This was consistent with previous findings in mouse hepatoma Hepa1-6 cells with partial reduction in their mtDNA contents [16].

### ***Balance in the signaling between apoptosis and cell survival***

Since apoptosis is repressed when part ( $\geq 50\%$ ) of endogenous Bax heterodimerizes with Bcl-2 or Bcl-xL [26], whereas Bcl-xS facilitates cell death by inhibiting Bcl-2 function [27], the relative expression of these anti- and pro-apoptotic genes was investigated (Figure 5A-5E). Bcl-2 expression was slightly higher in Rho than in WT cells and was decreased by treatment with DCA in both cell types but more markedly in WT cells. The basal levels of Bax- $\alpha$  mRNA were lower in Rho than in WT cells. Treatment with DCA had no effect at any of the concentrations tested in either WT or Rho cells. Bcl-xL and Bcl-xS mRNA levels were decreased in Rho cells in comparison with WT cells, and treatment with DCA induced an increase in Bcl-xS and, to a lesser extent, in Bcl-xL but only in the WT cells. The ratios between the relative mRNA abundances of Bax- $\alpha$ /Bcl-xL (Figure 5F), Bax- $\alpha$ /Bcl-2 (Figure 5G), and Bcl-xS/Bcl-2 (Figure 5I) but not that of Bcl-xS/Bcl-xL (Figure 5H) were constitutively decreased in Rho cells. In response to high DCA concentrations, these parameters were increased in WT cells, except for the Bax- $\alpha$ /Bcl-xL ratio, but not in Rho cells (Figures 5F-5I). No significant changes were observed in the mRNA expression levels of

the pro-apoptotic or the anti-apoptotic proteins assayed or in the ratios calculated between them after treatment of WT and Rho cells with GCDCA (Figures 5A-5I).

Since the serine/threonine kinase Akt, involved in cell survival through the inhibition of apoptosis [28] has previously been reported to play a role in bile acid-induced signaling [10], this was investigated in WT and Rho cells following exposure to DCA and GCDCA. Akt1 mRNA levels were lower in Rho than in WT cells (Figure 5C). After incubation with DCA or GCDCA for 8 h, an increase in Akt1 mRNA was only found for DCA at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  in WT cells but not in Rho cells. To determine the degree of Akt activation, the amount of total Akt protein was compared with that of phosphorylated Akt using Western blot analysis. The primary antibodies used here were able to detect the three Akt isoforms: i.e., Akt1, Akt2 and Akt3. In WT cells, Akt phosphorylation at ser473 was increased by treatment with DCA (Figure 6A) and GCDCA (Figure 6D). In contrast, although total Akt protein expression was reduced, in Rho cells the degree of Akt phosphorylation under basal conditions was higher than in WT cells. This activation was not further increased by treatment with DCA (Figure 6A) or GCDCA (Figure 6D).

The phosphorylation of the serine/threonine protein kinase mTOR (the mammalian target of rapamycin, a downstream target of Akt involved in the regulation of cell survival and proliferation), was also investigated. In WT cells, the phosphorylation of mTOR after incubation with DCA (Figure 6B) and GCDCA (Figure 6E) was found to be increased. In contrast, in Rho cells mTOR phosphorylation was already increased under basal conditions but no further phosphorylation was induced by bile acid treatment (Figure 6B, 6E).

Regarding the ERK1/2 survival pathway, total ERK1/2 expression was similar in both cell types (Figure 6C, 6F). However, basal ERK1/2 phosphorylation (Thr202/Tyr204) was weaker in Rho than in WT cells; DCA was able to activate ERK1/2 phosphorylation in WT but not in Rho cells (Figure 6C), whereas GCDCA induced a marked effect in WT cells but also, although to a lesser extent, in Rho cells (Figure 6F).

To elucidate whether the Akt/mTOR signaling pathway, which seems to be constitutively activated in Rho cells, actually plays a key role in mediating the poor sensitivity to the DCA-induced apoptosis of these cells, we used the selective PI3K inhibitor LY294002, which blocks Akt phosphorylation. Indeed, after treatment of Rho cells with 25 and 50  $\mu\text{M}$



LY294002 for 1 h, both Akt and mTOR phosphorylation were partially inhibited in a dose-dependent manner (Figure 7A, 7B). When this treatment was combined with 500  $\mu$ M DCA for 8 h, the ability of Rho cells to respond to DCA-induced apoptosis was partly restored (Figure 7C).

## Discussion

Long-term cultures in the presence of sub-toxic doses of EtBr have been used to obtain mtDNA-depleted (Rho) mammalian cell lines [16-18] because EtBr is able to inhibit DNA/RNA synthesis specifically suppressing the replication and transcription of extrachromosomal genetic components, such as mtDNA, without affecting nDNA replication and transcription [29]. Since mitochondria are pivotal components of the apoptotic cell death machinery, in the present study, we used human liver Rho cells to investigate the importance of the mitochondrial genome in the response of liver cells to chemical stress due to exposure to cholestasis-associated-bile acid accumulation.

When hepatocytes are exposed to high levels of some bile acid species, two types of cellular death may occur [30, 31]. Our results are consistent with the concept that toxic bile acids, such as DCA and GCDCA, are potentially able to induce apoptosis and necrosis at high and very high concentrations, respectively [30, 31]. It should be kept in mind that necrosis and apoptosis are not completely independent processes but share some signaling pathways [32]. Our results support the well-established concept that mitochondria play a key role in bile acid-induced apoptosis [5]. Accordingly, mtDNA-depleted liver cells exhibited a decreased susceptibility to bile acid-induced cell death. Thus, Rho cells were highly resistant to apoptosis induced by DCA and partially resistant to necrosis induced by high doses of GCDCA. Elimination-mediated by export pumps is one of the mechanisms responsible for the protection of hepatocytes against many different compounds to cause toxicity during pathological accumulation of endogenous substances or xenobiotic toxins [33]. Among the ABC proteins investigated here, only MDR1 expression was up-regulated in Rho cells. Although MDR1 has been reported to be related to the apoptotic resistance of Rho cells to antitumor agents [34], we found very low levels of MDR1 expression in the Rho cells obtained in the present study. Moreover, its relationship with resistance to bile acid-induced toxicity is not expected to be a cause-effect one because this pump is not involved in bile acid efflux [33].

Mitochondria-derived ROS has been suggested to constitute one early event in bile acid-induced hepatocyte toxicity [9]. Moreover, a burst in the intracellular level of superoxide has been related to the switch in the cell death mode from apoptosis to necrosis [35]. In the present study, the depletion of mtDNA resulted in decreased basal levels of hydrogen

peroxide and superoxide anion, as well as in a reduced ability of Rho cells to increase the production of these ROS in response to bile acids. Discrepancies are found in the literature regarding basal levels of ROS in mtDNA-depleted cells (unchanged for some authors, decreased for others) [16, 17, 36, 37]. Our results suggest that without a functional electron transport chain, Rho cells cannot normally regulate redox potential and their mitochondria appear to be incapable of generating ROS. It should be kept in mind that biogenesis of complex I and III of the electron transport chain, where superoxide anion is produced, involves the coordinated assembly of subunits encoded by both mitochondrial and nuclear genomes [12].

ROS generation by hepatocytes can activate both apoptotic and survival signaling, depending upon the intensity and duration of the production process [10]. An important factor determining the final effect of ROS is the regulation of pro- and anti-apoptotic genes. Among them, there are several members of the Bcl-2 family proteins that regulate the mitochondrial pathway of apoptosis by controlling the permeabilization of the outer mitochondrial membrane [38]. It has been reported that mechanisms involved in the pre-apoptotic disruption of the mitochondrial membrane potential, as well as mitochondrial apoptotic factors, seem to be present in Rho cells [39]. However, alterations in Bax translocation to the mitochondria have also been described in cells lacking mtDNA [40]. Our results indicate that bile acid-induced mitochondrial depolarization does not occur in Rho cells. Moreover, an important finding was that mtDNA depletion results in the dysregulation of both constitutive and bile acid-induced expression of several members of the Bcl-2 family proteins such as Bax- $\alpha$ , Bcl-2, Bcl-xS and Bcl-xL, resulting in favor of an anti-apoptotic balance.

Bile acids can induce the pro-survival ERK1/2 and Akt signaling pathways in hepatocytes as a protective response to prevent apoptosis [10]. Conjugated bile acids activate these signaling pathways in liver cells, primarily via G $\alpha$ i protein-dependent receptors, while unconjugated hydrophobic bile acids stimulate the synthesis of mitochondrial superoxide ions, which inactivate phosphoprotein phosphatases [41]. Our results reveal a ROS-dependent activation of ERK1/2 by bile acids. However, a constitutive activation of Akt was found in human hepatoma Rho cells that was not mediated by ROS-dependent mechanisms. It has been reported that mitochondrial respiratory defects in leukemia and lymphoma cell lines cause an increase in Akt phosphorylation through a redox-mediated mechanism [42]. The increase in NADH caused by respiratory deficiency has been suggested to inactivate the negative

regulator of the Akt pathway PTEN through a redox modification mechanism. The Akt pathway can promote cell survival and proliferation through a series of downstream events, including the stimulation of aerobic glycolysis, the suppression of apoptosis, as well as an enhancement of nutrient uptake and energy metabolism through the activation of mTOR [28]. The activation of mTOR also elicits pro-survival and anti-apoptotic activities [43]. Our results show that mTOR is activated by bile acids in WT cells but that it is constitutively activated in Rho cells. Interestingly, the activation of the Akt/mTOR survival pathway (in Rho cells) prior to exposure to bile acids is able to prevent the apoptosis induced by these compounds. In contrast, in WT cells, although Akt expression was higher than that in Rho cells and the Akt/mTOR pathway was activated in response to incubation with high bile acid levels, the survival response was not as effective as the preexisting protection seen in Rho cells. In addition, the present study demonstrates that the ERK1/2 survival pathway does not play a major role in the mechanism of resistance against bile acid-induced toxicity in Rho cells.

In conclusion, these results indicate that in liver cells lacking mtDNA several mechanisms may account for a certain resistance to bile acid-induced apoptosis: i) a decrease in oxidative stress; (ii) a decrease in the balance between the pro- and anti-apoptotic genes involved in the mitochondrion-mediated signaling pathway for apoptosis activation, and (iii) a ROS-independent increase in the activation of the Akt/mTOR pathway. Thus, during prolonged cholestasis, which could be accompanied by the compromised mitochondrial function associated with mtDNA alterations, these mechanisms may play a role in attenuating hepatocellular injury due to bile acid accumulation.

## **Acknowledgements**

This study was supported in part by the Instituto de Salud Carlos III, FIS (Grant PI11/00337); the Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant SAF2010-15517) and the Junta de Castilla y Leon (Grants SA023A11-2, SA070A11-2 and Biomedicina-2011), Spain. The group is member of the Network for Cooperative Research on Membrane Transport Proteins (REIT), co-funded by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain and the European Regional Development Fund (ERDF) (Grant BFU2007-30688-E/BFI) and belongs to the CIBERehd (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas), Instituto de Salud Carlos III, Spain.

The authors thank Nicholas Skinner for revision of the English text of the manuscript.

## **Disclosure statement**

The authors disclose they have not had any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the work submitted that could inappropriately influence their work.

## Figure Legends

**Figure 1.** Toxicity induced by deoxycholic acid (DCA) and glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) treatment for 8 h in wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) SK-Hep-1 human hepatoma cells. (A-F) Representative photographs of phase-contrast microscopy. (G) Total protein contents of the cell cultures. (H) Proportion of dead cells determined by flow cytometry after staining with propidium iodide. Values are expressed as means  $\pm$  SEM from three cultures measured in triplicate for each data point. \* $P < 0.05$ , significantly different from untreated WT cells; † $P < 0.05$ , significant differences between Rho with WT cells.

**Figure 2.** Apoptosis, necrosis and mitochondrial membrane potential (MMP) in wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) SK-Hep-1 human hepatoma cells. (A-F) Representative flow cytometry DNA histograms corresponding to the analysis of DNA contents by flow cytometry. The percentage of apoptotic cells is depicted in the M1 zone of the graphs. (G) Percentage of apoptotic cells as measured by flow cytometry. (H) Release of LDH by cells to the culture media. LDH activity was measured in both the culture medium (LDHout) and in cell lysates (LDHin). Results are expressed as the ratio of released-to-total LDH activity: LDHout/(LDHin+LDHout). (I, J) Proportion of cells with low MMP as measured by flow cytometry. After treatment with the indicated concentrations of deoxycholic acid (DCA) and glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) for 8 h, cell cultures were processed as appropriate. Values are expressed as means  $\pm$  SEM from three cultures measured in triplicate for each data point. \* $P < 0.05$ , significantly different from untreated WT cells; † $P < 0.05$ , significant differences between Rho with WT cells.

**Figure 3.** Hydrogen peroxide production as determined by flow cytometry after incubating wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) SK-Hep-1 human hepatoma cells with 5  $\mu\text{g/ml}$  DCFH-DA for 30 minutes. The generation of hydrogen peroxide was stimulated by treating the cells with the indicated concentrations of deoxycholic acid (DCA) (A) and glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) (B) for 8 h or 30 min (C, D). Values are expressed as means  $\pm$  SEM from three cultures measured in triplicate for each data point. \* $P < 0.05$ , significantly different from untreated WT cells; † $P < 0.05$ , significant differences between Rho with WT cells.

**Figure 4.** Superoxide anion production as determined by flow cytometry after incubating wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) SK-Hep-1 human hepatoma cells with 3  $\mu\text{g/ml}$  hydroethidine for 30 minutes. The generation of superoxide anion was stimulated by treating

the cells with the indicated concentrations of deoxycholic acid (DCA) (A) and glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) (B) for 8 h or 30 min (C, D). Values are expressed as means  $\pm$  SEM from three cultures measured in triplicate for each data point.  $*P < 0.05$ , significantly different from untreated WT cells;  $\dagger P < 0.05$ , significant differences between Rho with WT cells.

**Figure 5.** Relative abundances of mRNA of anti-apoptotic and pro-apoptotic genes in wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) SK-Hep-1 human hepatoma cells. (A) Bcl-2, (B) Bcl-xL, (C) Akt1, (D) Bax- $\alpha$  and (E) Bcl-xS determined by using real-time RT-QPCR and ratios between the relative abundances of mRNA for (F) Bax- $\alpha$  and Bcl-xL, (G) Bax- $\alpha$  and Bcl-2, (H) Bcl-xS and Bcl-xL, and (I) Bcl-xS and Bcl-2. After treatment with the indicated concentrations of deoxycholic acid (DCA) and glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) for 8 h, cell lysates were processed for RNA isolation. Values are expressed as means  $\pm$  SEM from three cultures measured in triplicate for each data point.  $*P < 0.05$ , significantly different from untreated WT cells;  $\dagger P < 0.05$ , significant differences between Rho with WT cells.

**Figure 6.** Representative Western blots showing the activation of several protein kinase signaling pathways in wild-type (WT) and mtDNA-depleted (Rho) SK-Hep-1 human hepatoma cells. (A, D) Phosphorylated (p-Akt) and total Akt, (B, E) phosphorylated mTOR (p-mTOR) and (C, F) phosphorylated (p-ERK1/2) and total ERK1/2. GAPDH was also detected by Western blot. After treatment with the indicated concentrations of deoxycholic acid (DCA) and glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) for 30 min, total cell lysates were processed for Western blotting. These results were confirmed in two additional experiments.

**Figure 7.** Effect of the inhibition of Akt phosphorylation on deoxycholic acid (DCA)-induced apoptosis in mtDNA-depleted (Rho) SK-Hep-1 human hepatoma cells. (A) Representative Western blots showing the concentration-dependent effect of the PI3K inhibitor LY294002 for 1 h on Akt phosphorylation (p-Akt) and (B) mTOR phosphorylation (p-mTOR). Total Akt and GAPDH were also detected by Western blotting. (C) Percentage of apoptotic cells induced by 500  $\mu$ M deoxycholic acid (DCA) for 8 h in cells pretreated or not with LY294002 (50  $\mu$ M, 1 h) as measured by flow cytometry. Values are expressed as means  $\pm$  SEM from three cultures measured in triplicate for each data point.  $*P < 0.05$ , significantly different from untreated Rho cells.



**References**

- [1] Attili, A. F.; Angelico, M.; Cantafora, A.; Alvaro, D.; Capocaccia, L. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic–hydrophilic balance of bile acids. *Med. Hypotheses* 19:57-69; 1986.
- [2] Krähenbühl, L.; Schäfer, M.; Krähenbühl, S. Reversibility of hepatic mitochondrial damage in rats with long-term cholestasis. *J. Hepatol.* 28:1000-1007; 1998.
- [3] Goncalves, I.; Hermans, D.; Chretien, D.; Rustin, P.; Munnich, A.; Saudubray, J. M.; Van Hoof, F.; Reding, R.; de Ville de Goyet, J.; Otte, J. B.; Buts, J. P.; Sokal, E.M. Mitochondrial respiratory chain defect: a new etiology for neonatal cholestasis and early liver insufficiency. *J. Hepatol.* 23:290-294; 1995.
- [4] Krahenbuhl, S.; Talos, C.; Fischer, S.; Reichen, J. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 19:471-479; 1994.
- [5] Palmeira, C. M.; Rolo, A. P. Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicology* 203:1-15; 2004.
- [6] Schoemaker, M. H.; Gommans, W. M.; Conde de la Rosa, L.; Homan, M.; Klok, P.; Trautwein, C.; van Goor, H.; Poelstra, K.; Haisma, H. J.; Jansen, P. L.; Moshage, H. Resistance of rat hepatocytes against bile acid-induced apoptosis in cholestatic liver injury is due to nuclear factor-kappa B activation. *J. Hepatol.* 39:153-161; 2003.
- [7] Costa, A. M.; Tuchweber, B.; Lamireau, T.; Yousef, I. M.; Balabaud, C.; Rosenbaum, J.; Desmouliere, A. Role of apoptosis in the remodeling of cholestatic liver injury following release of the mechanical stress. *Virchows Arch.* 442:372-380; 2003.
- [8] Fickert, P.; Trauner, M.; Fuchsbichler, A.; Zollner, G.; Wagner, M.; Marschall, H. U.; Zatloukal, K.; Denk, H. Oncosis represents the main type of cell death in mouse models of cholestasis. *J. Hepatol.* 42:378-385; 2005.
- [9] Sokol, R. J.; Winklhofer-Roob, B. M.; Devereaux, M. W.; McKim, J. M. Jr. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* 109:1249-1256; 1995.

- [10] Fang, Y.; Han, S. I.; Mitchell, C.; Gupta, S.; Studer, E.; Grant, S.; Hylemon, P. B.; Dent, P. Bile acids induce mitochondrial ROS, which promote activation of receptor tyrosine kinases and signaling pathways in rat hepatocytes. *Hepatology* 40:961-971; 2004.
- [11] Rolo, A. P.; Oliveira, P. J.; Moreno, A. J.; Palmeira, C. M. Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy. *Toxicol. Sci.* 57:177-185; 2000.
- [12] Attardi, G.; Schatz, G. Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:289-333; 1998.
- [13] Tiao, M. M.; Lin, T. K.; Liou, C. W.; Wang, P. W.; Chen, J. B.; Kuo, F. Y.; Huang, C. C.; Chou, Y. M.; Chuang, J.H. Early transcriptional deregulation of hepatic mitochondrial biogenesis and its consequent effects on murine cholestatic liver injury. *Apoptosis* 14:890-899; 2009.
- [14] Arduini, A.; Serviddio, G.; Escobar, J.; Tormos, A. M.; Bellanti, F.; Vina, J.; Monsalve, M.; Sastre, J. Mitochondrial biogenesis fails in secondary biliary cirrhosis in rats leading to mitochondrial DNA depletion and deletions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301:G119-G127; 2011.
- [15] Erol, A. Retrograde regulation due to mitochondrial dysfunction may be an important mechanism for carcinogenesis. *Med. Hypotheses* 65:525-529; 2005.
- [16] Perez, M. J.; Gonzalez-Sanchez, E.; Gonzalez-Loyola, A.; Gonzalez-Buitrago, J. M.; Marin, J. J. Mitochondrial genome depletion dysregulates bile acid- and paracetamol-induced expression of the transporters Mdr1, Mrp1 and Mrp4 in liver cells. *Br. J. Pharmacol.* 162:1686-1699; 2011.
- [17] Park, S. Y.; Chang, I.; Kim, J. Y.; Kang, S. W.; Park, S. H.; Singh, K.; Lee, M. S. Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: role of mitochondrial superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 279:7512-7520; 2004.
- [18] King, M. P.; Attardi, G. Human cells lacking mtDNA: Repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 24:6500-6503; 1989.

- [19] Briz, O.; Serrano, M. A.; Macias, R. I.; Gonzalez-Gallego, J.; Marin, J. J. Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem. J.* 371 (Pt 3):897-905; 2003.
- [20] Serrano, M. A.; Macias, R. I.; Briz, O.; Monte, M. J.; Blazquez, A. G.; Williamson, C.; Kubitz, R.; Marin, J. J. Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta* 28:107-117; 2007.
- [21] Markwell, M. A.; Haas, S. M.; Bieber, L. L.; Tolbert, N. E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87:206-210; 1978.
- [22] Perez, M.J.; Cederbaum, A.I. Spin trapping agents (Tempol and POBN) protect HepG2 cells overexpressing CYP2E1 against arachidonic acid toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 30:734-746; 2001.
- [23] Gutmann, I.; Wahlefeld, A. W. L-(+)-lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NA. In: Bergmeyer, H.U. ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press; 1974:1464-1468.
- [24] Carter, W. O.; Narayanan, P. K.; Robinson, J.P. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 55:253-258; 1994.
- [25] Marin, J. J.; Romero, M. R.; Martinez-Becerra, P.; Herraes, E.; Briz, O. Overview of the molecular bases of resistance to chemotherapy in liver and gastrointestinal tumours. *Curr. Mol. Med.* 9:1108-1129; 2009.
- [26] Sedlak, T. W.; Oltvai, Z. N.; Yang, E.; Yang, K.; Boise, L. H.; Thompson C. B.; Korsmeyer S. J. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:7834-7838; 1995.
- [27] Boise, L. H.; Gonzalez-Garcia, M.; Postema, C. E.; Ding, L.; Lindsten, T.; Turka, L. A.; Mao, X.; Nunez, G.; Thompson, C. B. Bcl-X, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597-608; 1993.

- [28] Manning, B. D.; Cantley L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-1274; 2007.
- [29] Zylber, E.; Vesco, C.; Penman, S. Selective inhibition of the synthesis of mitochondria-associated RNA by ethidium bromide. *J. Mol. Biol.* 44:195-204; 1969.
- [30] Spivey, J.; Bronk, S.; Gores, G. Glycochenodeoxycholate induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium. *J. Clin. Invest.* 92:17-24; 1993.
- [31] Patel, T.; Bronk, S.; Gores, G. Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 94:2183-2192; 1994.
- [32] Lemasters, J. J. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am. J. Physiol.* 276 (1 Pt 1):G1-G6; 1999.
- [33] Klaassen, C. D.; Aleksunes, L. M. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol. Rev.* 62:1-96; 2010.
- [34] Ling, X.; He, Y.; Zhang, G.; Zhou, Y.; Yan, B. Increased P-glycoprotein expression in mitochondria is related to acquired multidrug resistance in human hepatoma cells depleted of mitochondrial DNA. *Int. J. Oncol.* 40:109-118; 2012.
- [35] Wochna, A.; Niemczyk, E.; Kurono, C.; Masaoka, M.; Kedzior, J.; Słomińska, E.; Lipiński, M.; Wakabayashi T. A possible role of oxidative stress in the switch mechanism of the cell death mode from apoptosis to necrosis-studies on rho0 cells. *Mitochondrion* 7:119-124; 2007.
- [36] Vergani, L.; Floreani, M.; Russell, A.; Ceccon, M.; Napoli, E.; Cabrelle, A.; Valente, L.; Bragantini, F.; Leger, B.; Dabbeni-Sala, F. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *Eur. J. Biochem.* 271:3646-3656; 2004.
- [37] Mercy, L.; Pauw, A.; Payen, L.; Tejerina, S.; Houbion, A.; Demazy, C.; Raes, M.; Renard, P.; Arnould, T. Mitochondrial biogenesis in mtDNA-depleted cells involves a Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway and a reduced mitochondrial protein import. *FEBS J.* 272:5031-5055; 2005.

- [38] Garcia-Saez, A.J. The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ.* 19:1733-1740; 2012.
- [39] Marchetti, P.; Susin, S. A.; Decaudin, D.; Gamen, S.; Castedo, M.; Hirsch, T.; Zamzami, N.; Naval, J.; Senik, A.; Kroemer, G. Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cells lacking mitochondrial DNA. *Cancer Res.* 1:2033-2038; 1996.
- [40] Kim, J. Y.; Kim, Y. H.; Chang, I.; Chang, I.; Kim, S.; Park, Y. K.; Oh, B. H.; Yagita, H.; Jung, Y. K.; Oh, Y. J.; Lee, M.S. Resistance of mitochondrial DNA-deficient cells to TRAIL: Role of Bax in TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene* 21:3139-3148; 2002.
- [41] Dent, P.; Fang, Y.; Gupta, S.; Studer, E.; Mitchell, C.; Spiegel, S.; Hylemon, P.B. Conjugated bile acids promote ERK 1/2 and AKT activation via a pertussis toxin-sensitive mechanism in murine and human hepatocytes. *Hepatology* 42:1291-1299; 2005.
- [42] Pelicano, H.; Xu., R. H.; Du, M.; Feng, L.; Sasaki, R.; Carew, J. S.; Hu, Y.; Ramdas, L.; Hu, L.; Keating, M. J.; Zhang, W.; Plunkett, W.; Huang, P. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J. Cell Biol.* 175:913-923; 2006.
- [43] Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18:1926-1945; 2004.

**Table 1**

Depletion of mtDNA in SK-Hep-1 human hepatoma cells during and after treatment with ethidium bromide.

	Copy number per cell (Ct)		
	16S rRNA	18S rRNA	MT-ND1
<b>QPCR-Blank</b>	ND (34.1)	ND (35.1)	ND (35.4)
<b>Treatment EtBr (days)</b>	<b>16S rRNA</b>	<b>18S rRNA</b>	<b>MT-ND1</b>
<b>No treatment</b>	6338 ± 974 (12.8)	(15.3)	510 ± 108 (18.0)
<b>20</b>	0.16 ± 0.02 (28.5)	(15.2)	0.12 ± 0.07 (31.5)
<b>50</b>	0.06 ± 0.02 (29.5)	(15.0)	0.01 ± 0.0006 (34.4)
<b>130</b>	ND (34.6)	(15.1)	ND (35.4)
<b>Removal EtBr (days)</b>	<b>16S rRNA</b>	<b>18S rRNA</b>	<b>MT-ND1</b>
<b>15</b>	ND (34.6)	(15.7)	ND (35.8)
<b>50</b>	ND (34.3)	(15.4)	ND (35.5)
<b>Removal EtBr (days)</b>	<b>mtDNA</b>	<b>nDNA</b>	<b>mtDNA</b>
<b>No treatment</b>	250 ± 43 (19.0)	(26.8)	274 ± 35 (19.8)
<b>50</b>	ND (35.9)	(26.4)	ND (35.8)

Time-course of mtDNA depletion in SK-Hep-1 cells during and after treatment with 100 ng/ml of ethidium bromide (EtBr). Copy number per cell of 16S rRNA, NADH dehydrogenase subunit 1 (MT-ND1) mRNA and mtDNA were determined by real-time RT-QPCR or direct QPCR, as appropriate. Values are expressed as means ± SEM from three cultures measured in triplicate for each data point. Values of threshold cycle (Ct) are given in parentheses. ND: not detectable.

**Table 2**

Expression of ABC proteins in human hepatoma wild-type (WT) and Rho SK-Hep-1 cells.

Protein	Ct		mRNA abundance (% of human liver)	
	Human Liver	SK-HEP-1 WT	SK-HEP-1 WT	SK-Hep-1 Rho
<b>MRP1</b>	28	22	4336 ± 917	6119 ± 483
<b>MRP2</b>	26	26	107.3 ± 19	86.2 ± 7
<b>MRP3</b>	27	31	5.8 ± 0.7	4.4 ± 1.4
<b>MRP4</b>	29	23	3318 ± 378	2265 ± 203
<b>MDR1</b>	26	30	0.5 ± 0.1	9.1 ± 1.7 <sup>a</sup>
<b>MDR3</b>	23	ND	ND	ND
<b>BSEP</b>	26	ND	ND	ND
<b>BCRP</b>	29	33	8.9 ± 1.7	6.6 ± 0.4

Values of threshold cycle (Ct) and mRNA abundances were determined by real-time RT-QPCR. Values are expressed as means ± SEM from three cultures measured in triplicate for each data point. <sup>a</sup>,  $P < 0.05$ : significant differences between Rho with WT cells. ND: not detectable.



**Supplementary Table 1**

Gene-specific primers and Taqman probes used for quantitative real-time RT-PCR analysis.

Name	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Product size (bp)	Accession number
16S rRNA	CACGAGGGTTCAGCTGICTCT CCAGTGA AATTGACCTGCCCGTGAA	TCTCGTCTTGCTGTGCATGC	151	AJ842751
MT-ND1	CCTTCGCTGACGCCATAAA TCACCAAAGAGCCCCCTAAAACCCGC	TCATAGTAGAAGAGCGATGGTGAGAG	115	AJ842751
Akt1	AGCTGGTGCATCAGAGGCT	AAGGTGCCATCATCTTGAGGAGG	197	NM_005163
Bax- $\alpha$	ATGGAGCTGCAGAGGATGATTGC	GTTCTGATCAGTCCGGCACCTT	185	NM_138761
Bcl-2	GGAGGCTGGGATGCCTTTGT	AGGCAITGTGACTTCACTTGTGGC	157	NM_000633
Bcl-xL	GAACGGGGCTGGGATACTTT	GAGTGGATGGTCAGTGTCTGGTCATT	172	NM_138578
Bcl-xS	GGACAGCATATCAGAGCTTTGAACAGGATA	GAGTGGATGGTCAGTGTCTGGTCATT	185	NM_138578

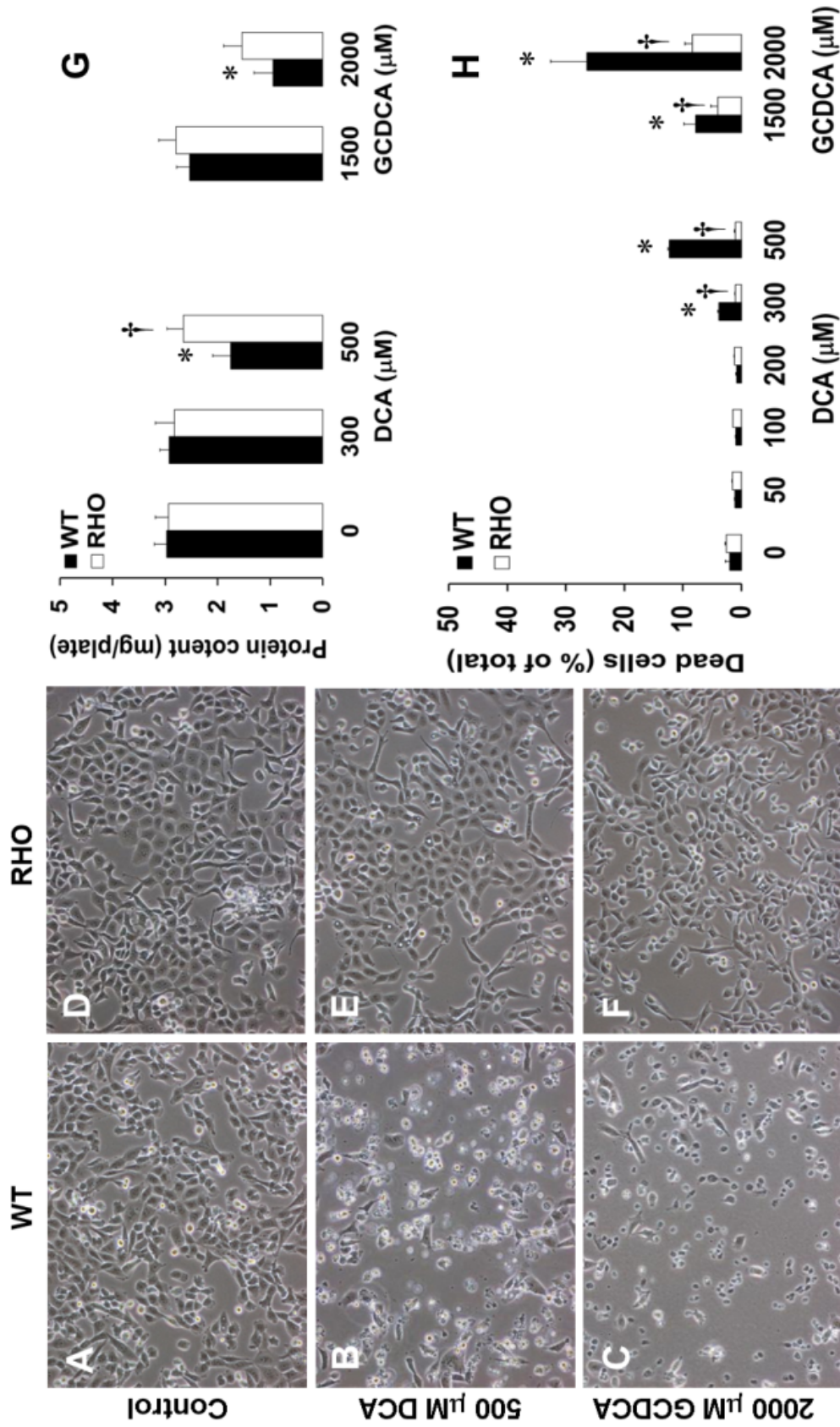


Figure 1

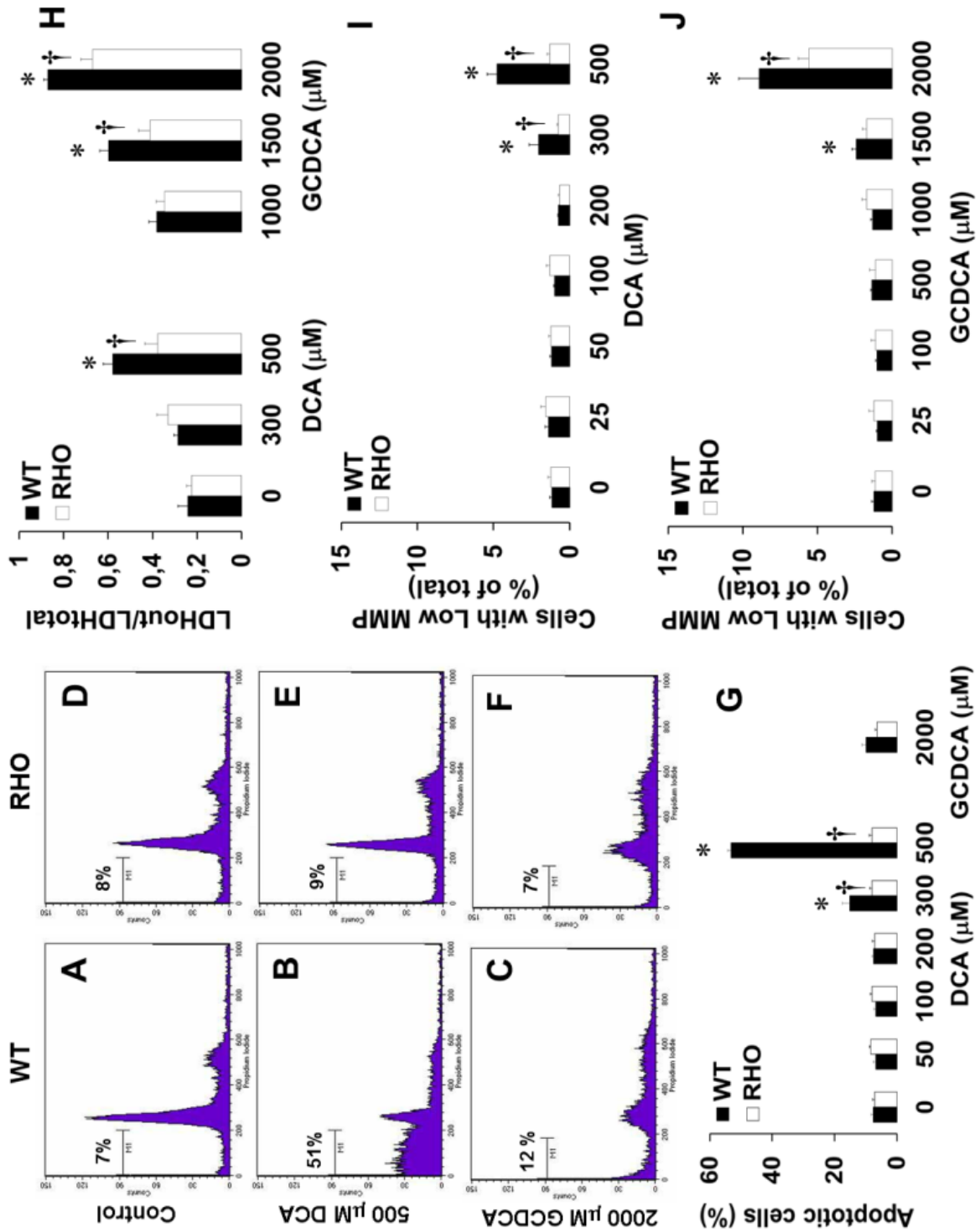


Figure 2

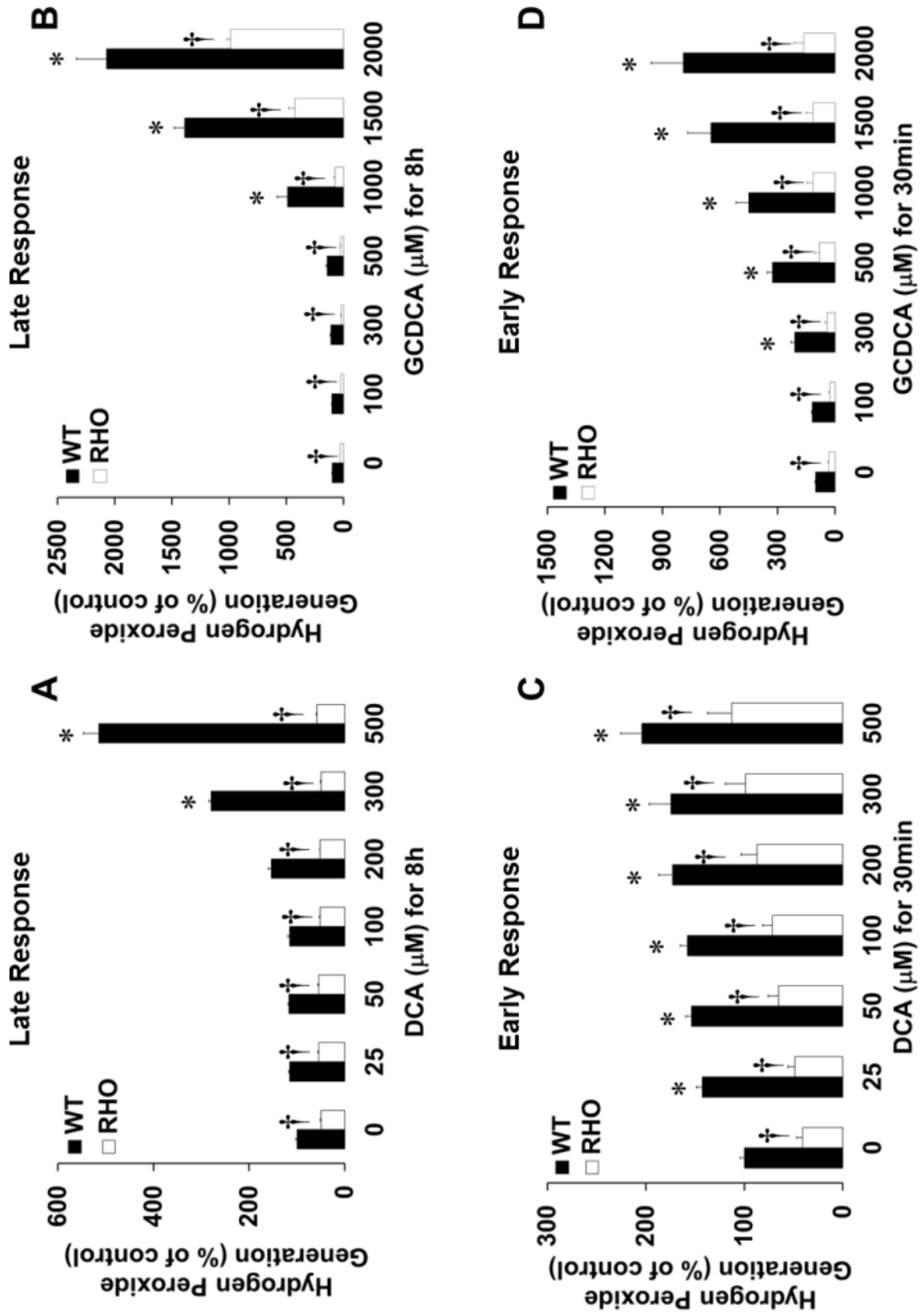


Figure 3

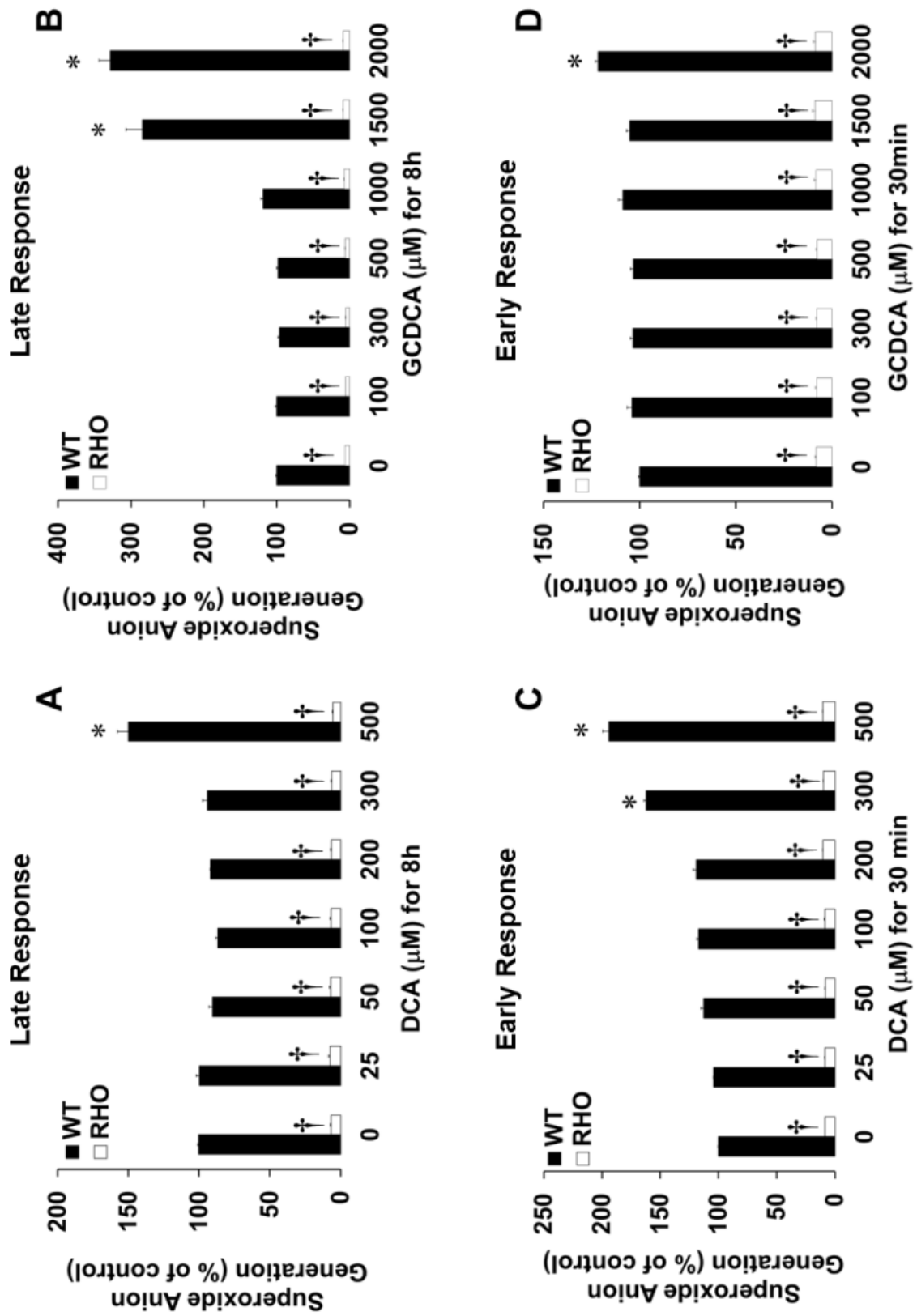


Figure 4

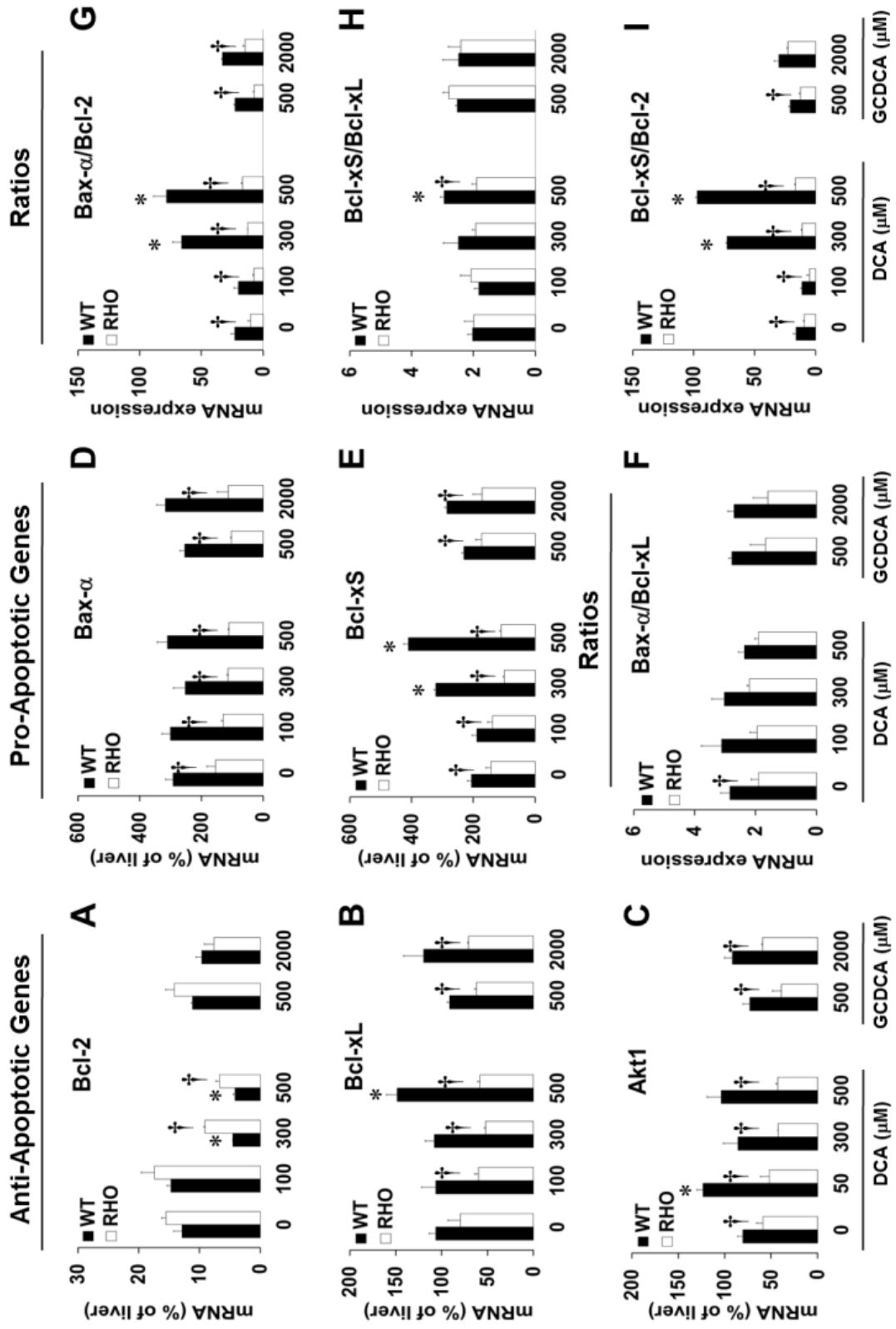


Figure 5



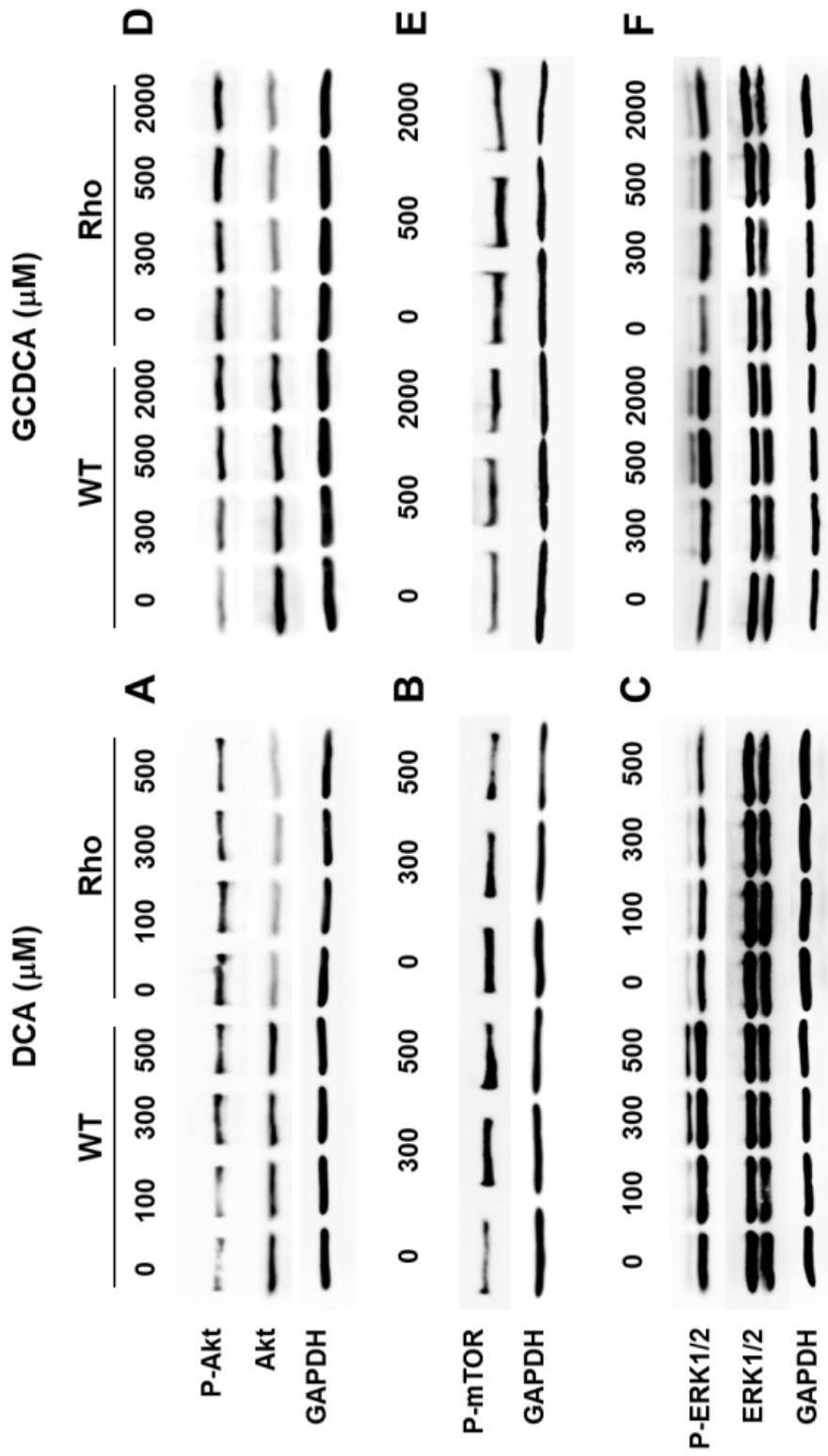


Figure 6



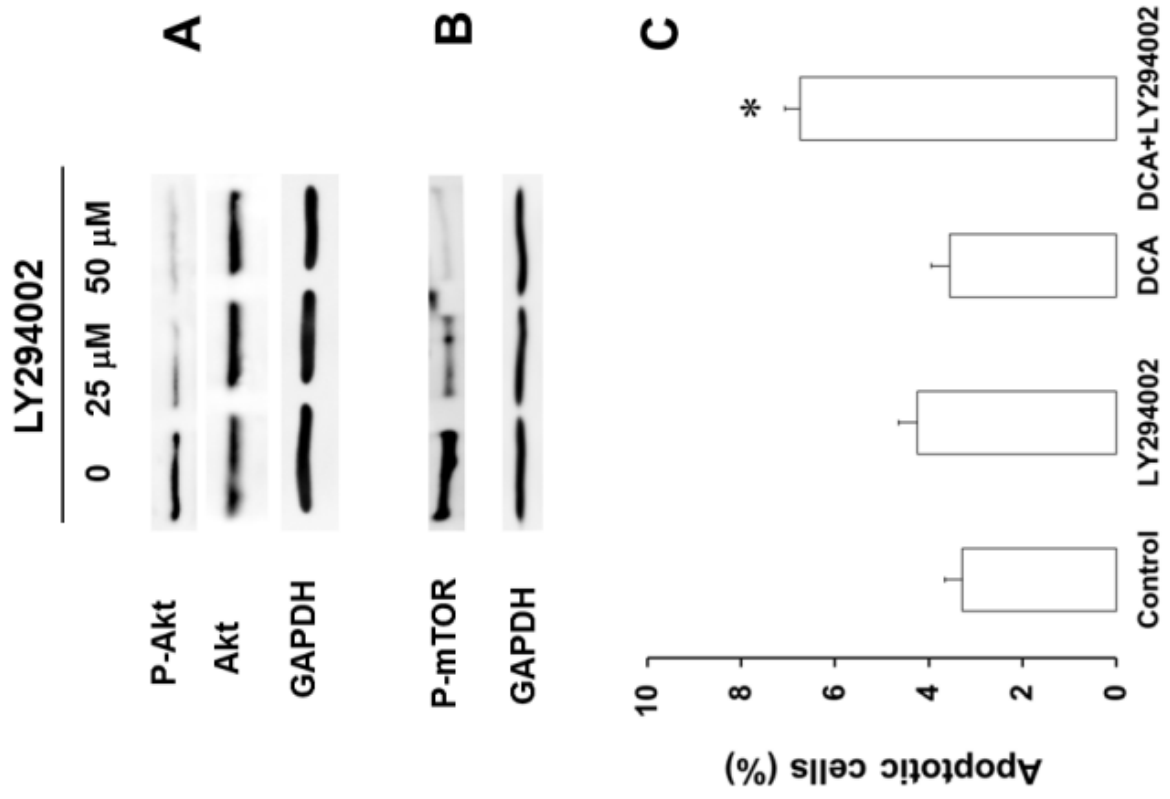


Figure 7

## 7.2.2. Role of the mitochondrial genome in the regulation of the expression of genes involved in chemoresistance in hepatic tumor cells

Liver tumors are one of the most common causes of death due to cancer worldwide (Ferlay *et al.*, 2010). In spite of the long list of drugs that have been assayed in the treatment of these tumors, the marked refractoriness together with the development of chemoresistance during pharmacological treatment (Marin *et al.*, 2009b) limit the effectiveness of the current therapies.

Resistance to chemotherapy depends in part on the expression of genes involved in a variety of mechanisms of chemoresistance (MOC) (Marin *et al.*, 2010). These include a reduction in drug uptake (MOC-Ia), an enhanced drug export (MOC-Ib), a reduction in metabolic pro-drug activation or an increase in drug inactivation (MOC-II), changes in molecular targets (MOC-III), enhanced DNA repair (MOC-IV) and a modification in the pro-apoptotic (MOC-Va) versus pro-survival (MOC-Vb) balance.

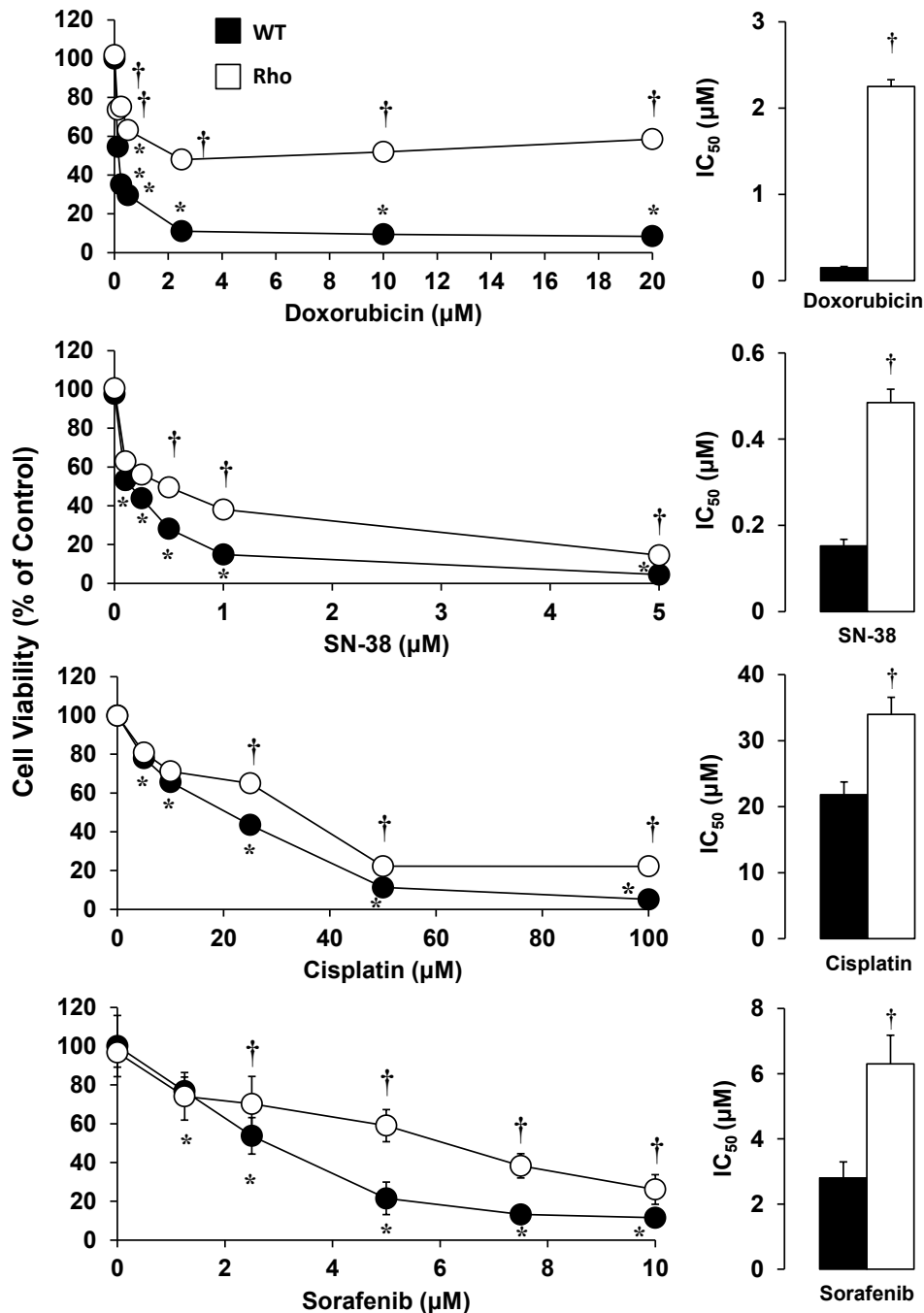
The existence of a link between the alteration of mitochondrial function and the development and progression of cancer has been a possibility investigated for a long time. One of the mechanisms that may be involved in this process is the accumulation of mutations in the genome of this organelle, which may alter the mitochondrial respiratory chain. In the last years a large number of mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) have been identified in several human primary tumors, including hepatocellular carcinoma (HCC) (Chatterjee *et al.*, 2011).

These alterations in mtDNA could also modify retrograde signaling pathways and, thus, contribute to the development of this disease. Different studies carried out in mtDNA depleted cells indicate that alteration of mitochondrial function may activate retrograde signaling mechanisms that promote tumor invasiveness and induce the expression of specific tumor markers (Amuthan *et al.*, 2002; Amuthan *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 1999). These signaling pathways can also be involved in the development of resistance to several cytostatic drugs (Ling *et al.*, 2012; Pillay *et al.*, 1998). Thus, the presence of alterations in mtDNA may reduce the effectiveness of chemotherapy.

Based on this data, the aim of the present study was to determine the role of mtDNA in the regulation of the expression of genes involved in chemoresistance in HCC.

### 7.2.2.1. Sensitivity of SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cells to cytostatic drugs-induced toxicity

To determine whether the lack of mtDNA could modify the resistance to cell death induced by cytostatic drugs, the human liver SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cell line, totally depleted of mtDNA, was used.

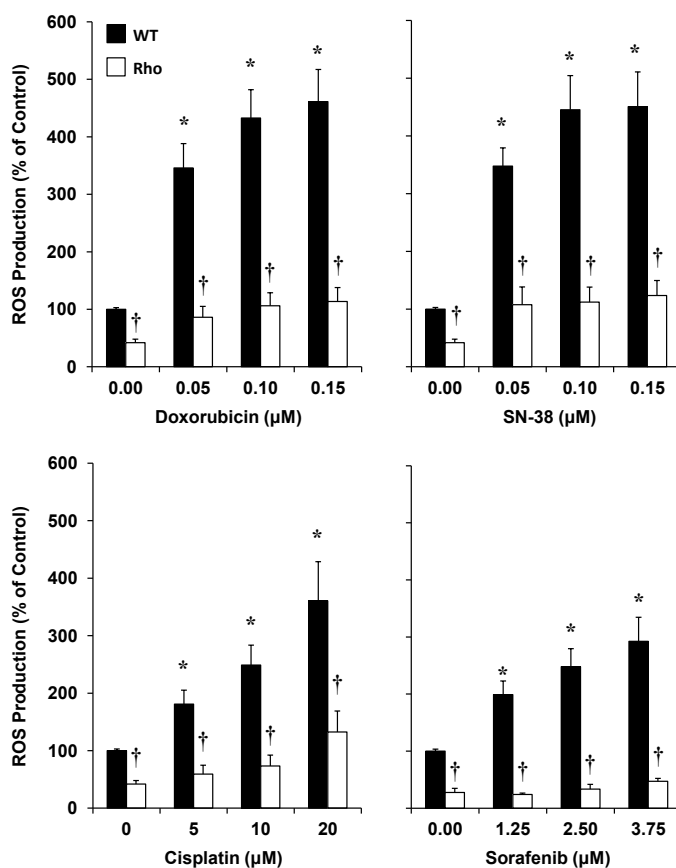


**Figure 1.** Effect of doxorubicin, SN-38, cisplatin and sorafenib on SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cell viability, as measured with the Neutral Red test, after incubation with the indicated concentrations of the toxic compounds for 48 h. IC<sub>50</sub> was defined as the drug concentration required to reduce cell viability to 50% of control cells. Values are expressed as means±SEM from 3 cultures in triplicate. \*, p<0.05, as compared with WT untreated cells. † p<0.05, on comparing Rho<sup>0</sup> with WT cells.

Cells were exposed to doxorubicin, SN-38, cisplatin and sorafenib for 48 h and viability was measured with the neutral red test, which is not directly dependent on mitochondrial function. In the range of concentrations investigated here, these cytostatic drugs markedly reduced cell viability in WT cells. In contrast, in Rho<sup>0</sup> cells, the sensitivity to doxorubicin, SN-38, cisplatin and sorafenib was significantly decreased, which was reflected in higher IC<sub>50</sub> values (Figure 1).

### 7.2.2.2. ROS generation

Despite the differences in the mechanisms of action of doxorubicin, SN-38, cisplatin and sorafenib, all of them have in common the ability to induce oxidative stress (Block *et al.*, 2008; Chiou *et al.*, 2009). Thus, in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cells, treatment with these drugs for 48 h induced ROS production in a dose dependent manner (Figure 2). In Rho<sup>0</sup> cells, the basal levels of ROS and the increment in their production after the treatment was markedly lower (Figure 2).



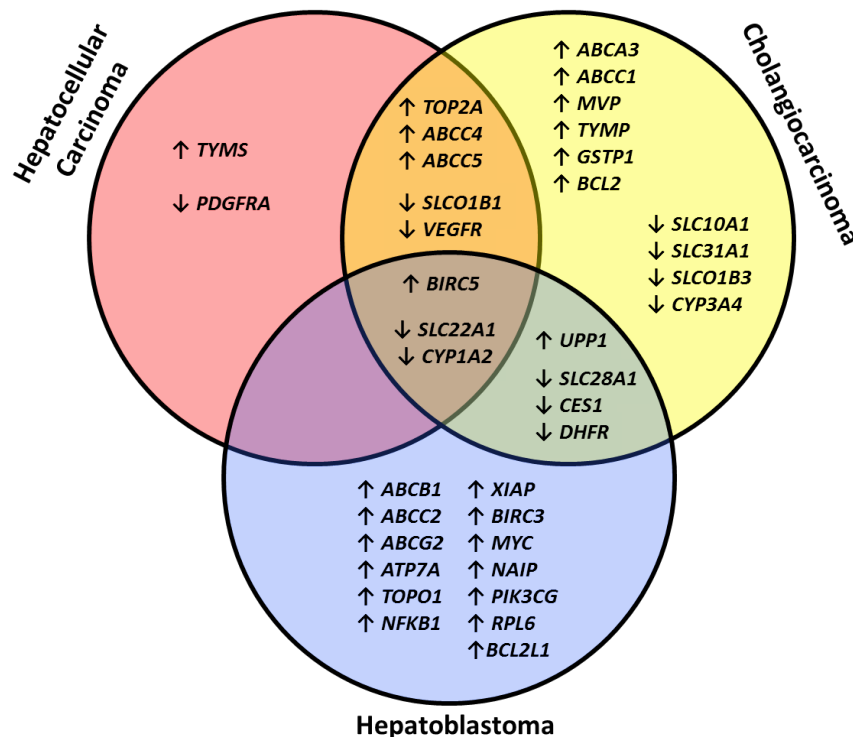
**Figure 2.** ROS production in SK-Hep1 WT and Rho<sup>0</sup> cells treated with the indicated concentrations of doxorubicin, SN-38, cisplatin and sorafenib for 48h. ROS production was determined by flow cytometry using dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Values are expressed as means±SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. \*, p<0.05, as compared with WT untreated cells. † p<0.05, on comparing Rho<sup>0</sup> with WT cells.

These results suggest that due to the lack of a functional electron transport chain, Rho<sup>0</sup> cells cannot normally regulate redox potential and their mitochondria appear to be incapable of generating ROS. It should be kept in mind that biogenesis of complex I and III of the electron transport chain, where superoxide anion is produced, involves the coordinated assembly of subunits encoded by both mitochondrial and nuclear genomes (Attardi and Schatz, 1988).

Due to the role of ROS in apoptosis induced by doxorubicin, SN-38, cisplatin and sorafenib (Attia, 2012; Berndtsson *et al.*, 2007; Chiou *et al.*, 2009; Malhi *et al.*, 2012), our findings suggest that the decreased production of ROS in Rho<sup>0</sup> cells may contribute to their resistance to cell death induced by these drugs.

### 7.2.2.3. Changes in the expression of genes involved in chemoresistance in HCC

The expression of 90 genes involved in different MOCs in tumor samples from patients with HCC has been analyzed by our group in a previous report (Martinez-Becerra *et al.*, 2012). Results from this study revealed that, despite the heterogeneity in the genetic signatures regarding MOCs among the different individuals, some trends toward the up-regulation or down-regulation of certain genes are common in this type of tumor, as shown in Figure 3.



**Figure 3.** Changes in the expression of genes involved in MDR phenotype.

Based on this study we analyzed the basal expression of these genes in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cell lines. We also determined the expression of *ABCB1* (MDR1) and *ABCC1* (MRP1), which have been found upregulated in SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cells (Ling *et al.*, 2012), and *ABCC2* (MRP2), one of the most important genes involved in cisplatin chemoresistance (Nies and Keppler, 2007; Zollner *et al.*, 2005)..

Our results (Table 1) indicated that in Rho<sup>0</sup> cells, the expression of MDR1, MRP1 and MRP2 was up-regulated, whereas that of MRP4 and MRP5 was reduced when compared with WT cells. The expression levels of the uptake transporters *SLCO1B1* (OATP1B1) and *SLC22A1* (OCT1) and the enzyme *CYP1A2*, were very low in both WT and Rho<sup>0</sup> cells. As compared with liver, the expression of *TOP2A* and *TYMS* was increased in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cells, whereas that of *PDGFRA* was decreased in both cell types but more markedly in Rho<sup>0</sup> cells. *VEGFR* expression was undetectable in both WT and Rho<sup>0</sup> cells. Survivin was overexpressed in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cells, as compared with liver and its expression levels were lower in Rho<sup>0</sup> than in WT cells.

**Table 1.** Basal expression levels in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cells of genes involved in MDR phenotype in HCC.

Gene	Liver (Ct)	SK-Hep-1 WT (Ct)	mRNA levels (% of human liver)	
			WT	Rho
<i>ABCB1</i>	23	32	0.08	1.7
<i>ABCC1</i>	26	22	109	188
<i>ABCC2</i>	20	21	7.67	8.98
<i>ABCC4</i>	26	20	1265	875
<i>ABCC5</i>	24	24	9.35	8.72
<i>BIRC5</i>	31	19	39651	27748
<i>CYP1A2</i>	17	36	<0.01	<0.01
<i>PDGFRA</i>	24	32	0.05	0.03
<i>SLCO1B1</i>	23	33	0.01	0.01
<i>SLC22A1</i>	18	31	<0.01	<0.01
<i>TOP2A</i>	31	19	46504	49918
<i>TYMS</i>	28	19	4013055	4059377
<i>VEGFR</i>	23	ND	ND	ND

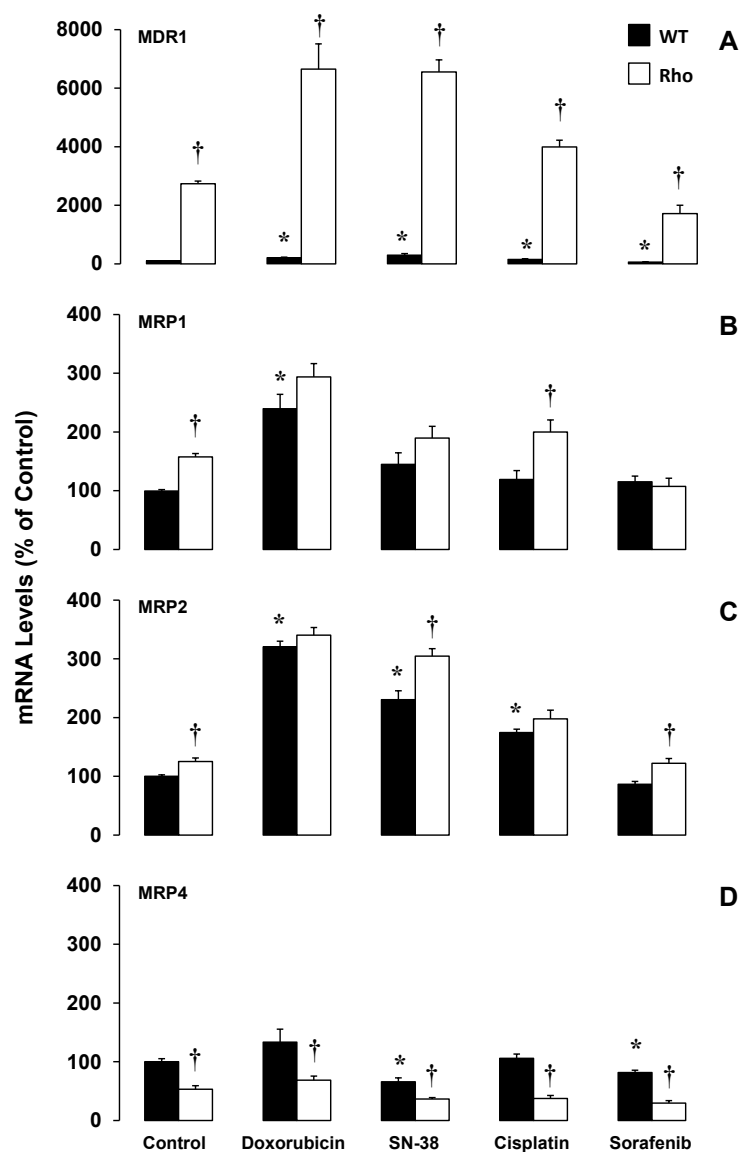
#### 7.2.2.4. Effect of treatment with doxorubicin, SN-38, cisplatin and sorafenib on the expression of genes involved in chemoresistance in HCC

Based on the results obtained in section 7.2.2.3, the expression of MDR1, MRP1, MRP2, MRP4 and survivin was determined by RT-QPCR in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cells treated with doxorubicin, SN-38, cisplatin and sorafenib for 48 h.

##### A. ABC proteins

MDR1 was over-expressed in Rho<sup>0</sup> cells as compared with WT (Figure 4A). Treatment with doxorubicin, SN-38 and cisplatin increased its expression in both cell types but this induction was higher in Rho<sup>0</sup> cells (Figure 4A). The expression of MRP1 was enhanced in Rho<sup>0</sup> cells and it was further increased after treatment with doxorubicin in both cell lines. However cisplatin induced MRP1 expression in Rho<sup>0</sup> but not in WT cells (Figure 4B). MRP2 was slightly upregulated in Rho<sup>0</sup> cells and its expression was induced by doxorubicin, SN-38 and cisplatin in both WT and Rho<sup>0</sup> cells, although this induction was higher in Rho<sup>0</sup> cells after treatment with SN-38 (Figure 4C). MRP4 was downregulated in Rho<sup>0</sup> cells, and its expression was reduced only in WT cells after the exposure to SN-38 (Figure 4D). Treatment with sorafenib reduced MDR1 and MRP4 expression both in WT and Rho<sup>0</sup> cells, MRP1 expression only in Rho<sup>0</sup> cells and MRP2 expression only in WT cells (Figure 4).

Over-expression of ABC transporters is one of the most important mechanisms involved in chemoresistance in liver tumors (Marin *et al.*, 2010). Moreover, in SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cells the up-regulation of MDR1 and MRP1 has been related with an increase in the resistance to doxorubicin and cisplatin (Ling *et al.*, 2012). In our study we found that, in addition to the basal over-expression of these transporters in Rho<sup>0</sup> cells (Figure 4A-B), the induction of MDR1 was higher in this cells than in WT cells after the treatment with doxorubicin, SN-38 and cisplatin, which may contribute to the resistance to these antitumor drugs observed in Rho<sup>0</sup> cells (Figure 4A). Moreover, the induction of MRP1 and MRP2 detected in Rho<sup>0</sup> cells exposed to cisplatin and SN-38, respectively (Figure 4B-C), may be also related with the resistance to these drugs. Our results also indicate that MRP4 is not involved in the resistance of Rho<sup>0</sup> cells to the toxicity induced by any of these drugs. Regarding sorafenib, changes in ABC transporters expression (Figure 4) cannot explain the resistance of to this drug observed in Rho<sup>0</sup> cells.

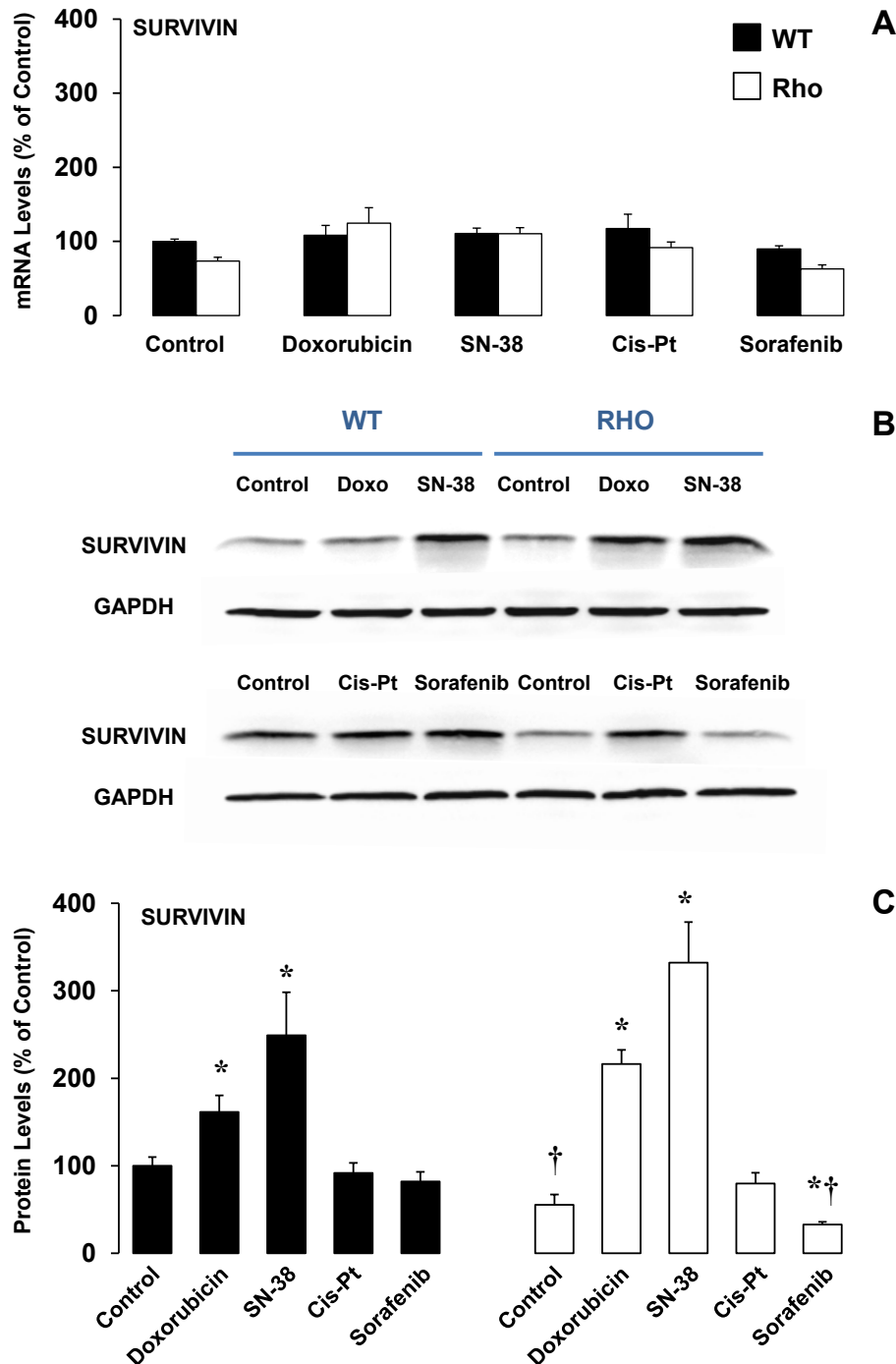


**Figure 4.** Effect of doxorubicin, SN-38, cisplatin and sorafenib on MDR1, MRP1, MRP2 and MRP4 expression in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cells. Cells were treated with 0.05  $\mu$ M doxorubicin, 0.05  $\mu$ M SN-38, 5  $\mu$ M cisplatin and 1.25  $\mu$ M sorafenib for 48 h before mRNA levels were measured by RT-QPCR. Values, expressed as percentage of untreated WT cells, are means  $\pm$  SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. \*, p < 0.05, as compared with untreated (Control) cells. † p < 0.05, on comparing Rho<sup>0</sup> with WT cells.



## B. Survivin

The modification of the survival/apoptosis balance is one of the mechanisms involved in chemoresistance (Marin *et al.*, 2010). Survivin, an inhibitor of apoptosis has been found overexpressed in HCC (Peroukides *et al.*, 2010), which may contribute to tumor proliferation.



**Figure 5.** mRNA (A) and protein levels (B-C) of survivin in SK-Hep1 WT and Rho<sup>0</sup> cells treated with 0.05  $\mu$ M doxorubicin, 0.05  $\mu$ M SN-38, 5  $\mu$ M cisplatin and 1.25  $\mu$ M sorafenib for 48 h. Expression levels were determined by RT-QPCR (A) and Western blot (B). Densitometry analysis of Western blots are shown in C. Values, expressed as percentage of untreated WT cells, are means $\pm$ SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. \*,  $p < 0.05$ , as compared with untreated (Control) cells. †  $p < 0.05$ , on comparing Rho<sup>0</sup> with WT cells.

In our study, survivin was found over-expressed in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cells as compared with healthy liver, and its expression was lower in Rho<sup>0</sup> than in WT cells. Despite mRNA levels of survivin were not modified after the treatment with doxorubicin, SN-38, cisplatin and sorafenib in both cell lines in our study (Figure 5A), Western blot analysis showed that protein levels of survivin were increased in WT cell and Rho<sup>0</sup> cells treated with doxorubicin and SN-38 (Figure 5B-C). Moreover, the increment in survivin protein expression was higher in Rho<sup>0</sup> cells than in WT cells (Figure 5B-C). However, treatment with sorafenib did not modify the protein levels of survivin in WT cells but reduced its expression in Rho<sup>0</sup> cells (Figure 5B-C).

Since survivin is over-expressed in HCC as compared with healthy liver, it has been proposed as a pharmacological target for the treatment of this type of tumor. In this regard, reduction in the expression of survivin has been found to increase tumor cell sensitivity to cell death induced by doxorubicin (Pyrko *et al.*, 2006), irinotecan (Pyrko *et al.*, 2006), cisplatin (Asechi *et al.*, 2010) and sorafenib (Kim *et al.*, 2011). According to this data, our results suggest that survivin may contribute to the resistance of SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cells to the toxicity induced by doxorubicin, SN-38 and cisplatin but is not involved in the resistance to sorafenib.

#### 7.2.2.5. Changes in nuclear receptors and transcription factors

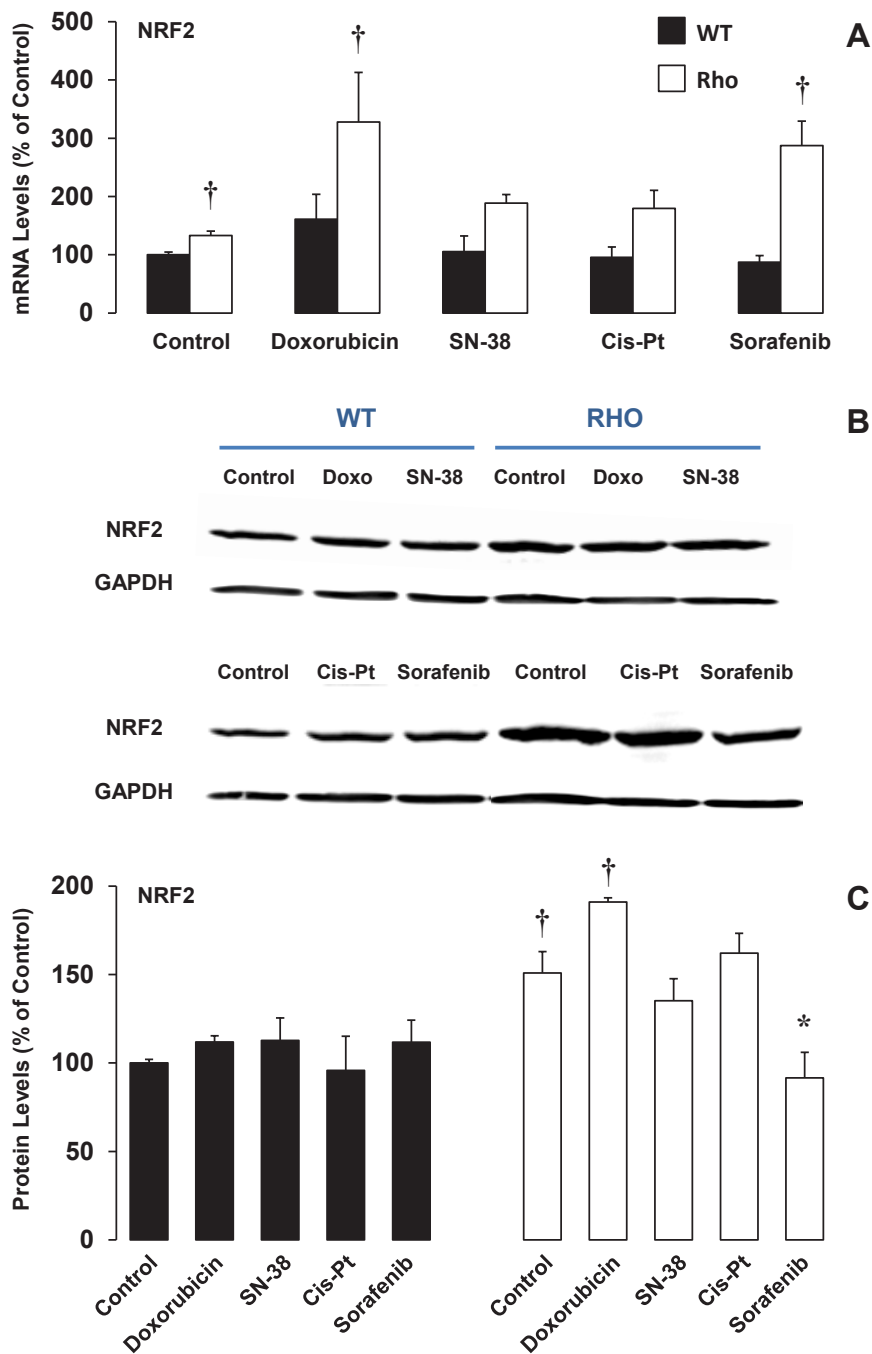
The results obtained in section 7.2.2.4 indicated that several ABC transporters may be involved in the resistance to doxorubicin, SN-38 and cisplatin observed in SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cells. To further analyze the role of mtDNA on the expression of these proteins we studied the expression of several nuclear receptors and transcription factors which participates in the regulation of these efflux pumps (Klaassen and Aleksunes, 2010). Results showed in Table 2 indicate that the expression of the nuclear receptors FXR, PXR and CAR was very low in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cells as compared with human liver. In contrast, NRF2 and its repressor KEAP1 were detectable in these cells. The abundance of NRF2 mRNA was similar in WT and Rho<sup>0</sup> cells whereas the expression of KEAP1 was reduced in Rho<sup>0</sup> cells.

**Table 2.** Basal expression levels of nuclear receptors (NR) and transcription factors (TF) involved in chemoresistance in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cells.

NR/TF	Liver	SK-Hep-1 WT	mRNA levels (% of human liver)	
	(Ct)	(Ct)	WT	Rho
CAR	24	ND	ND	ND
FXR	24	38.4	<0.01	<0.01
PXR	21	37.5	0.01	0.01
NRF2	23	21.3	43	57
KEAP1	28.6	25.5	69	32

The study of the expression of NRF2 by RT-QPCR and Western blot in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cells treated with doxorubicin, SN-38, cisplatin and sorafenib for 48 h indicated that basal levels of mRNA and protein of NRF2 were higher in Rho<sup>0</sup> cells as compared with

WT and its expression was increased in these cells after treatment with doxorubicin and cisplatin, whereas treatment with sorafenib reduced the protein levels of this transcription factor (Figure 6).

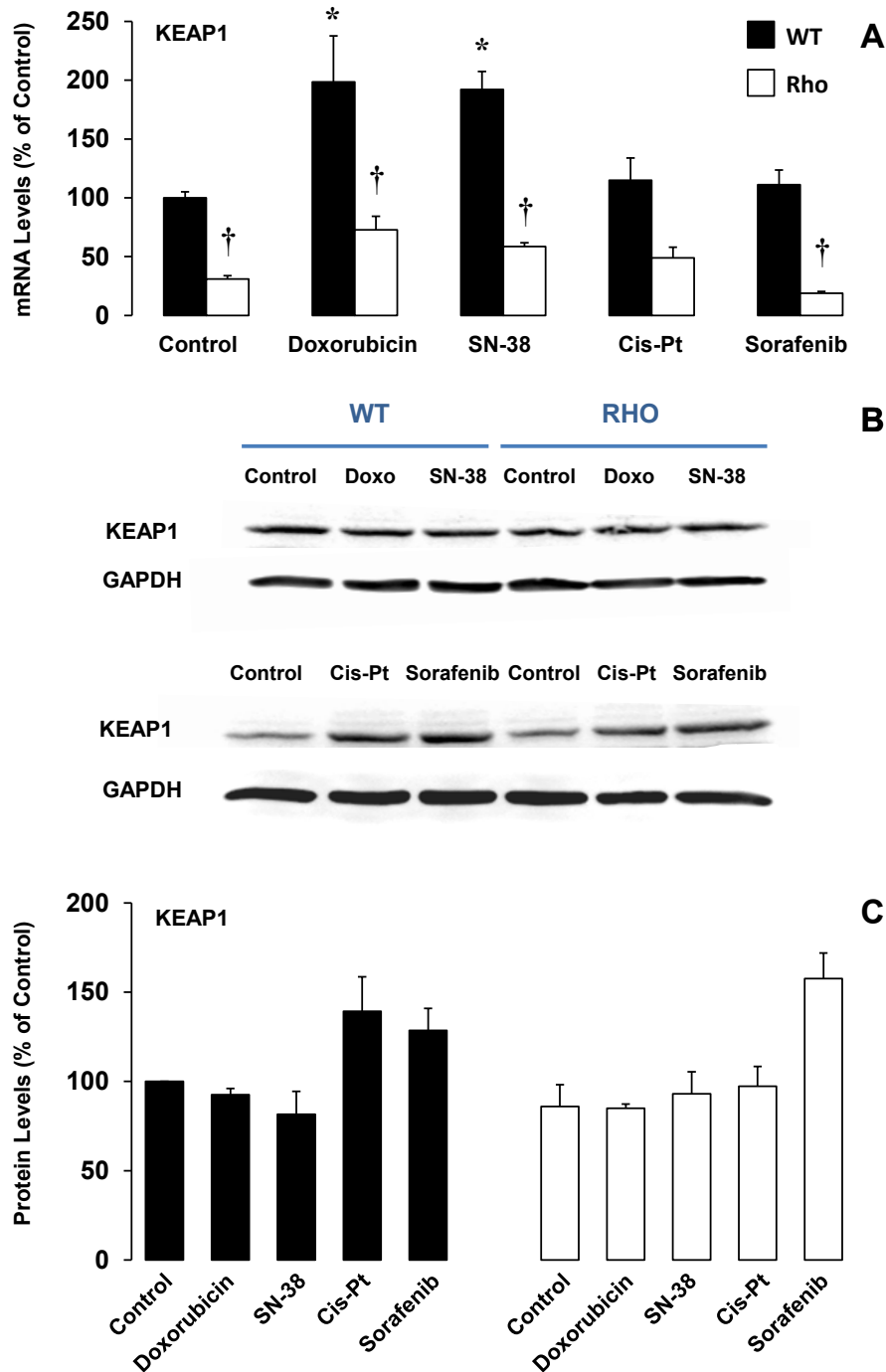


**Figure 6.** mRNA (A) and protein levels (B-C) of NRF2 in SK-Hep1 WT and Rho<sup>0</sup> cells treated with 0.05  $\mu$ M doxorubicin, 0.05  $\mu$ M SN-38, 5  $\mu$ M cisplatin and 1.25  $\mu$ M sorafenib for 48 h. Expression levels were determined by RT-QPCR (A) and Western blot (B). Densitometry analysis of Western blots are shown in C. Values, expressed as percentage of untreated WT cells, are means $\pm$ SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. \*,  $p < 0.05$ , as compared with untreated (Control) cells.  $\dagger p < 0.05$ , on comparing Rho<sup>0</sup> with WT cells.

The overexpression of NRF2 found in SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cells may be one of the mechanisms involved in the resistance of these cells to the toxicity induced by doxorubicin, SN-38 and cisplatin. This transcription factor is involved in the regulation of the expression of different proteins involved in the antioxidant defense including several ABC transporters. Moreover NRF2 has been found overexpressed in several tumors in which this transcription factor has been related with an increase in tumor proliferation and the development of resistance to different antitumor drugs (Bryan *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2008). Recent studies have shown that the overexpression of NRF2 may contribute to the resistance to cell death induced by doxorubicin, cisplatin (Lee *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2008) and SN-38 (Sebens *et al.*, 2011).

Although the expression of NRF2 can be modulated by several mechanisms, one of the best known is the NRF2- KEAP1 pathway (Itoh *et al.*, 1999). This protein binds to NRF2 in the cytoplasm and induces its proteasomal degradation. In our study, one of the most remarkable results was the reduction of the KEAP1 mRNA observed in Rho<sup>0</sup>, which may account for the increased expression of NRF2 found in these cells. To further analyze the role of the mtDNA on the regulation of NRF2 mediated by KEAP1, we determined the effect of doxorubicin, SN-38, cisplatin and sorafenib on the expression of this repressor in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cells. RT-QPCR analysis indicated that KEAP1 expression was increased after treatment with doxorubicin and SN-38 in both cell lines whereas it was increased only in Rho<sup>0</sup> cells after treatment with cisplatin. Treatment with sorafenib reduced KEAP1 expression only in Rho<sup>0</sup> cells (Figure 7A). In contrast, Western blot analysis showed that KEAP1 protein levels were increased only in WT cells treated with cisplatin, and in WT and Rho<sup>0</sup> cells treated with sorafenib (Figure 7A). The increment in the protein levels of KEAP1 found in Rho<sup>0</sup> cells treated with sorafenib may account for the reduction of NRF2 protein observed in these cells (Figure 6B-C).

The slight reduction of KEAP1 protein levels in Rho<sup>0</sup> cells can be involved in the increased expression of NRF2, which may increase the resistance of these cells to the toxicity induced by doxorubicin, SN-38 and cisplatin. In addition to KEAP1, other mechanisms can be involved in the regulation of the expression of NRF2. Thus, it has been recently described that the Akt survival pathway may increase the expression of NRF2, by impairing its degradation (Bryan *et al.*, 2013). As mentioned in section 7.2.1.3, this signaling pathway is constitutively activated under basal conditions in SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cells, which may also contribute to the over-expression of NRF2 observed in these cells.



**Figure 7.** mRNA (A) and protein levels (B-C) of KEAP1 in SK-Hep1 WT and Rho<sup>0</sup> cells treated with 0.05  $\mu$ M doxorubicin, 0.05  $\mu$ M SN-38, 5  $\mu$ M cisplatin and 1.25  $\mu$ M sorafenib for 48 h. Expression levels were determined by RT-QPCR (A) and Western blot (B). Densitometry analysis of Western blots are shown in C. Values, expressed as percentage of untreated WT cells, are means  $\pm$  SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. \*,  $p < 0.05$ , as compared with untreated (Control) cells. †  $p < 0.05$ , on comparing Rho<sup>0</sup> with WT cells.

In summary, these results indicate that SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cells lacking mtDNA are more resistant to the toxicity induced by doxorubicin, SN-38 and cisplatin. Several mechanisms may account for this enhanced chemoresistance, including a decrease in oxidative stress, the up-regulation of several ABC transporters, which reduce the intracellular accumulation of these drugs, and an increase in the expression of NRF2, a transcriptional factor involved in the regulation of several cellular mechanisms of defense against chemical challenge. Moreover, the lack of mtDNA also stimulates the expression of proteins that inhibit apoptosis such as survivin after treatment with these antitumor drugs.

### 7.2.2.6. Changes in the expression of genes involved in MDR phenotype

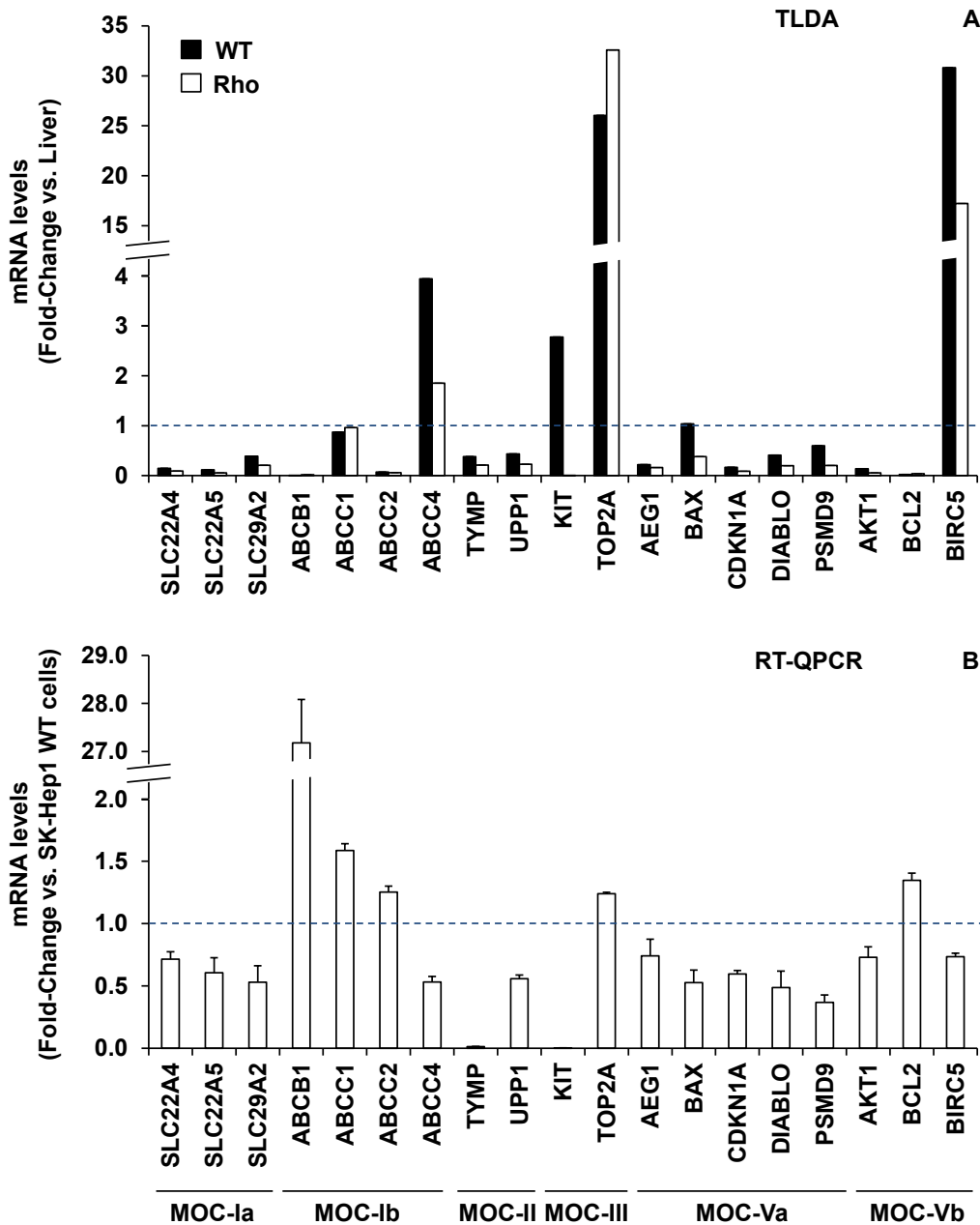
Despite SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cells are also more resistant to sorafenib-induced cell death (Figure 1) none of the mechanisms involved in the resistance to doxorubicin, SN-38 and cisplatin, except the decrease in ROS production, seems to be involved in the resistance to the toxicity induced by this anticancer drug.

To elucidate the actual mechanisms accounting for the resistance to sorafenib-induced toxicity observed in Rho<sup>0</sup> cells, the expression of 90 genes involved in chemoresistance was investigated in SK-Hep-1 WT and Rho<sup>0</sup> cells using TLDAs (Taqman Low Density Arrays) (Table 3).

**Table 3.** Genes included in the analysis classified on the bases of their role in the mechanism of chemoresistance (MOC).

MOC-Ia	MOC-Ib	MOC-II	MOC-III	MOC-IV	MOC-Va	MOC-Vb
<i>SLC10A1</i>	<i>ABCA2</i>	<i>CES1</i>	<i>DHFR</i>	<i>DUT</i>	<i>AEG1</i>	<i>AKT1</i>
<i>SLC10A2</i>	<i>ABCA3</i>	<i>CES2</i>	<i>ESR2</i>	<i>ERCC1</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>
<i>SLCO1B1</i>	<i>ABCA6</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>FRAP1</i>	<i>GADD45A</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>BIRC5</i>
<i>SLCO1B3</i>	<i>ABCA8</i>	<i>CYP1A2</i>	<i>KDR</i>	<i>MLH1</i>	<i>BIRC2</i>	<i>BIRC7</i>
<i>SLCO2B1</i>	<i>ABCB1</i>	<i>CYP3A4</i>	<i>KIT</i>	<i>MLH3</i>	<i>BIRC3</i>	<i>CFLAR</i>
<i>SLCO4A1</i>	<i>ABCC1</i>	<i>DPYD</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>MSH2</i>	<i>CDKN1</i>	<i>EGFR</i>
<i>SLC22A1</i>	<i>ABCC2</i>	<i>GSTA1</i>	<i>TOP1</i>	<i>MSH6</i>	<i>DIABLO</i>	<i>JUN</i>
<i>SLC22A2</i>	<i>ABCC3</i>	<i>GSTP1</i>	<i>TOP2A</i>	<i>PMS1</i>	<i>FAS</i>	<i>MAPK1</i>
<i>SLC22A4</i>	<i>ABCC4</i>	<i>TYMP</i>	<i>TYMS</i>	<i>PMS2</i>	<i>PSMD9</i>	<i>MYC</i>
<i>SLC22A5</i>	<i>ABCC5</i>	<i>UGT1A</i>		<i>UDG</i>	<i>TP53</i>	<i>NAIP</i>
<i>SLC28A1</i>	<i>ABCC6</i>	<i>UMPS</i>		<i>XPA</i>		<i>NFKB1</i>
<i>SLC28A2</i>	<i>ABCC10</i>	<i>UPP1</i>		<i>XPC</i>		<i>PIK3CG</i>
<i>SLC28A3</i>	<i>ABCG2</i>	<i>UPP2</i>				<i>RPL6</i>
<i>SLC29A1</i>	<i>ATP7A</i>					<i>XIAP</i>
<i>SLC29A2</i>	<i>ATP7B</i>					
<i>SLC31A1</i>	<i>LRP</i>					

Our results indicate that the lack of mtDNA modifies the expression of several genes involved in several MOCs. The expression of *SLC22A4*, *SLC22A5* and *SLC29A2*, included in MOC-Ia, *TYMP* and *UPP1*, belonging to MOC-II, *KIT*, from MOC-III, and *AEG1*, *BAX*, *CDKN1A*, *DIABLO* and *PSMD9*, included in MOC-Va, was reduced in Rho<sup>0</sup> cells, whereas the expression of *BCL2*, included in MOC-Vb was increased as compared with WT cells. Moreover, this study also confirms the changes in the expression of *ABCB1*, *ABCC1-4*, *TOP2A* and *BIRC5* genes observed in section 7.2.2.3.



**Figure 8.** Steady-state levels of mRNA of genes involved in chemoresistance in SK-Hep1 WT and Rho<sup>0</sup> cells. Values, expressed as fold-change of human liver (A) or SK-Hep-1 WT cells (B) were determined by TLDA (Taqman Low Density Arrays). Only the genes whose change in expression levels among WT and Rho<sup>0</sup> cells may determine an increase in chemoresistance, or were measured in a previous stage of the study, are included in the graph.



One of the most remarkable findings of the present study was the abolishment of the expression of *KIT* in Rho<sup>0</sup> cells. This gene encodes c-Kit, a tyrosine kinase receptor which has been related with tumor progression and is one of the main targets of sorafenib (Lennartsson and Ronnstrand, 2012). Thus, the dramatic reduction of *KIT* expression may contribute to the resistance of Rho<sup>0</sup> cells to the toxicity induced by this drug.

Due to the important role of apoptosis in sorafenib-induced toxicity (Chiou *et al.*, 2009), the reduction of the expression of several pro-apoptotic genes in Rho<sup>0</sup> cells together with the up-regulation of the anti-apoptotic gene *BCL2* may increase cell survival after the treatment with this drug. Moreover, the modification of the apoptosis/survival balance may also contribute to the resistance of Rho<sup>0</sup> cells to the toxicity induced by other anticancer drugs.

It has been recently described that in cells derived from HCC resistant to sorafenib, the survival pathway PI3K/Akt is activated (Chen *et al.*, 2011). Although the results of our study showed that the expression of *AKT1* is reduced, we have previously found, as reported above (see section 7.2.1.3), that the survival pathway PI3K/Akt is constitutively activated in Rho<sup>0</sup> cells which may increase their resistance to sorafenib-induced toxicity.

In addition to these changes, which may play an important role in the resistance of Rho<sup>0</sup> cells to sorafenib, we also found modifications in the expression of several genes involved in the resistance to other anticancer drugs. Thus, the expression of the uptake transporters OCTN1 (*SLC10A1*) and OCTN2 (*SLC10A1*), involved in the resistance to anthracyclines (Marin *et al.*, 2010), and the nucleoside transporter ENT2 (*SLC29A2*), which participates in the uptake of several pyrimidine base analogs, were reduced in Rho<sup>0</sup> cells. Moreover, the expression of *TYMP* (thymidylate phosphorylase, TP) and *UPP1* (uridin phosphorylase subunit 1, UP1), which participates in the activation of some prodrugs (Marin *et al.*, 2010) was also lower in Rho<sup>0</sup> than in WT cells. The reduction in the expression of TP and UP1 has been related with the resistance to 5-fluorouracil (Marin *et al.*, 2010), and could reduce the sensitivity of Rho<sup>0</sup> cells to this drug.

In summary, the results obtained in this part of the project indicate that mitochondrial genome plays an important role in the regulation of the expression of several genes involved in MOCs. Thus, the presence of alterations in mtDNA may activate different mechanism of chemoresistance, limiting the efficacy of certain regimens of pharmacological therapy.

- Amuthan, G., Biswas, G., Anandatheerthavarada, H.K., Vijayasarathy, C., Shephard, H.M., Avadhani, N.G., 2002. Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene* 21, 7839-7849.
- Amuthan, G., Biswas, G., Zhang, S.Y., Klein-Szanto, A., Vijayasarathy, C., Avadhani, N.G., 2001. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *The EMBO journal* 20, 1910-1920.
- Asechi, H., Hatano, E., Nitta, T., Tada, M., Iwaisako, K., Tamaki, N., Nagata, H., Narita, M., Yanagida, A., Ikai, I., Uemoto, S., 2010. Resistance to cisplatin-induced apoptosis via PI3K-dependent survivin expression in a rat hepatoma cell line. *International journal of oncology* 37, 89-96.
- Attardi, G., Schatz, G., 1988. Biogenesis of mitochondria. *Annual review of cell biology* 4, 289-333.
- Attia, S., 2012. Modulation of irinotecan-induced genomic DNA damage by theanine. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 50, 1749-1754.
- Berndtsson, M., Hagg, M., Panaretakis, T., Havelka, A.M., Shoshan, M.C., Linder, S., 2007. Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 120, 175-180.
- Biswas, G., Adebajo, O.A., Freedman, B.D., Anandatheerthavarada, H.K., Vijayasarathy, C., Zaidi, M., Kotlikoff, M., Avadhani, N.G., 1999. Retrograde Ca<sup>2+</sup> signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *The EMBO journal* 18, 522-533.
- Block, K.I., Koch, A.C., Mead, M.N., Tothy, P.K., Newman, R.A., Gyllenhaal, C., 2008. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 123, 1227-1239.
- Bryan, H.K., Olayanju, A., Goldring, C.E., Park, B.K., 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochemical pharmacology* 85, 705-717.
- Chatterjee, A., Dasgupta, S., Sidransky, D., 2011. Mitochondrial subversion in cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 638-654.
- Chen, K.F., Chen, H.L., Tai, W.T., Feng, W.C., Hsu, C.H., Chen, P.J., Cheng, A.L., 2011. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 337, 155-161.
- Chiou, J.F., Tai, C.J., Wang, Y.H., Liu, T.Z., Jen, Y.M., Shiau, C.Y., 2009. Sorafenib induces preferential apoptotic killing of a drug- and radio-resistant Hep G2 cells through a mitochondria-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer biology & therapy* 8, 1904-1913.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127, 2893-2917.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., Yamamoto, M., 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development* 13, 76-86.

- Kim, Y.S., Jin, H.O., Seo, S.K., Woo, S.H., Choe, T.B., An, S., Hong, S.I., Lee, S.J., Lee, K.H., Park, I.C., 2011. Sorafenib induces apoptotic cell death in human non-small cell lung cancer cells by down-regulating mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent survivin expression. *Biochemical pharmacology* 82, 216-226.
- Klaassen, C.D., Aleksunes, L.M., 2010. Xenobiotic, BA, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacological reviews* 62, 1-96.
- Lee, C.K., Park, K.K., Chung, A.S., Chung, W.Y., 2012. Ginsenoside Rg3 enhances the chemosensitivity of tumors to cisplatin by reducing the basal level of nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated heme oxygenase-1/NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 and prevents normal tissue damage by scavenging cisplatin-induced intracellular reactive oxygen species. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 50, 2565-2574.
- Lennartsson, J., Ronnstrand, L., 2012. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiological reviews* 92, 1619-1649.
- Ling, X., He, Y., Zhang, G., Zhou, Y., Yan, B., 2012. Increased P-glycoprotein expression in mitochondria is related to acquired multidrug resistance in human hepatoma cells depleted of mitochondrial DNA. *International journal of oncology* 40, 109-118.
- Malhi, S.S., Budhiraja, A., Arora, S., Chaudhari, K.R., Nepali, K., Kumar, R., Sohi, H., Murthy, R.S., 2012. Intracellular delivery of redox cyler-doxorubicin to the mitochondria of cancer cell by folate receptor targeted mitocancerotropic liposomes. *International journal of pharmaceutics* 432, 63-74.
- Marin, J.J., Romero, M.R., Briz, O., 2010. Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Current medicinal chemistry* 17, 709-740.
- Marin, J.J., Romero, M.R., Martinez-Becerra, P., Herraes, E., Briz, O., 2009. Overview of the molecular bases of resistance to chemotherapy in liver and gastrointestinal tumours. *Curr Mol Med* 9, 1108-1129.
- Martinez-Becerra, P., Vaquero, J., Romero, M.R., Lozano, E., Anadon, C., Macias, R.I., Serrano, M.A., Grane-Boladeras, N., Munoz-Bellvis, L., Alvarez, L., Sangro, B., Pastor-Anglada, M., Marin, J.J., 2012. No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm* 9, 1693-1704.
- Nies, A.T., Keppler, D., 2007. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 453, 643-659.
- Peroukides, S., Bravou, V., Alexopoulos, A., Varakis, J., Kalofonos, H., Papadaki, H., 2010. Survivin overexpression in HCC and liver cirrhosis differentially correlates with p-STAT3 and E-cadherin. *Histol Histopathol* 25, 299-307.
- Pillay, V., Martinus, R.D., Hill, J.S., Phillips, D.R., 1998. Upregulation of P-glycoprotein in rat hepatoma rho(o) cells: implications for drug-DNA interactions. *Journal of cellular biochemistry* 69, 463-469.
- Pyрко, P., Soriano, N., Kardosh, A., Liu, Y.T., Uddin, J., Petasis, N.A., Hofman, F.M., Chen, C.S., Chen, T.C., Schonthal, A.H., 2006. Downregulation of survivin expression and concomitant induction of apoptosis by celecoxib and its non-cyclooxygenase-2-inhibitory analog, dimethyl-celecoxib (DMC), in tumor cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer* 5, 19.
- Sebens, S., Bauer, I., Geismann, C., Grage-Griebenow, E., Ehlers, S., Kruse, M.L., Arlt, A., Schafer, H., 2011. Inflammatory macrophages induce Nrf2 transcription factor-dependent proteasome activity in colonic NCM460 cells and thereby confer anti-apoptotic protection. *The Journal of biological chemistry* 286, 40911-40921.

Wang, X.J., Sun, Z., Villeneuve, N.F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., Wondrak, G.T., Wong, P.K., Zhang, D.D., 2008. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 29, 1235-1243.

Zollner, G., Wagner, M., Fickert, P., Silbert, D., Fuchsbichler, A., Zatloukal, K., Denk, H., Trauner, M., 2005. Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 25, 367-379.

### 7.2.3. Protective effect of biliverdin and biliverdin reductase against bile acid- and potassium dichromate-induced toxicity in liver cells

Biliverdin (BV) is generated, together with Fe and CO, in heme catabolism, in a reaction catalyzed by heme oxygenase (HO-1) (Ryter and Tyrrell, 2000). The main product of this reaction, BV IX $\alpha$  is converted into bilirubin (BR) IX $\alpha$  by biliverdin reductase  $\alpha$  (BVR $\alpha$ , gene *BLVRA*), which is expressed in many organs, mainly liver, brain, lung, pancreas, kidney, spleen and placenta (Briz *et al.*, 2006; Komuro *et al.*, 1996; McCoubrey *et al.*, 1995). The overall reduction of BV to BR is very efficient, and under physiological circumstances the concentration of serum BV is low (Feverly, 2008). Subsequently, BR is taken up by hepatocytes and conjugated with glucuronic acid before its secretion into bile (Feverly, 2008). Thus, cholestasis normally results in hyperbilirubinemia.

Although for many years it has been considered a mere mechanism for the elimination of waste products, the physiological advantages of the transformation of heme into BV and this into BR has been recently recognized. BR has beneficial antioxidant properties, although they are limited to low concentrations of this potentially toxic pigment (Gourley, 1997). An explanation for the antioxidant function of BR is a redox cycle in which BR would be oxidized to BV and then recycled back to BR by BVR $\alpha$  (Baranano *et al.*, 2002). Moreover, it has been described that BVR $\alpha$  acts as a transcription factor regulating the expression of HO-1 (Kravets *et al.*, 2004). The induction of HO-1 and the redox cycle mediated by BVR $\alpha$  may increase the antioxidant activity of BR. However, recent *in vitro* studies argue against the BVR $\alpha$ -mediated redox cycle playing an important role as a cellular antioxidant defense mechanism (Maghzal *et al.*, 2009).

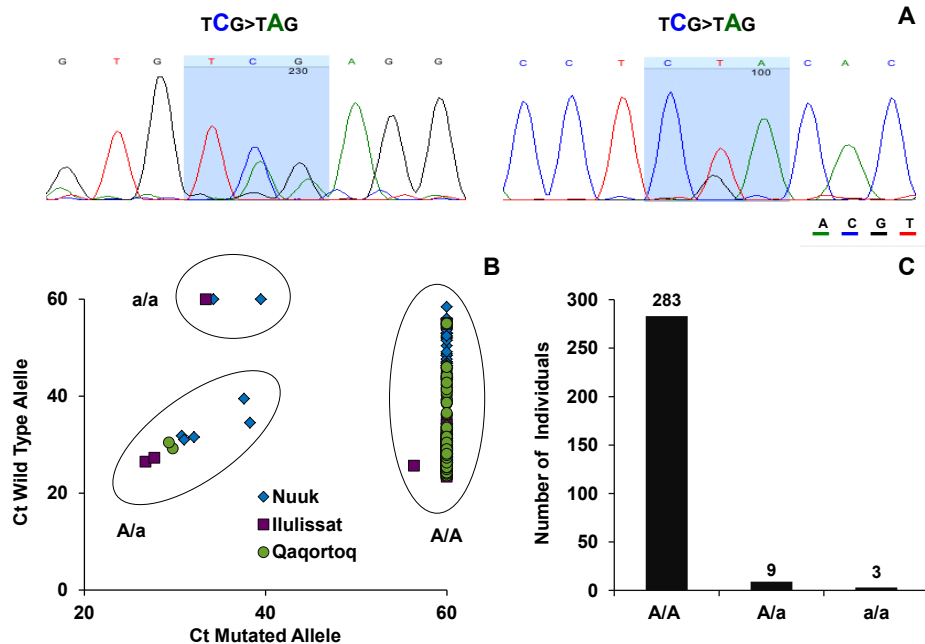
In collaboration with Dr. Nytofte (Dronning Ingrid's Hospital, Greenland), our group has described a homozygous mutation (c.214C>A) in the exon 3 of *BLVRA* in two unrelated female Inuit patients from different geographical areas of Greenland, who had suffered green discoloration of the skin and BV accumulation in plasma and urine during episodes of obstructive cholestasis. The BV concentrations in their body fluids were completely restored to normal levels after surgical correction of biliary obstruction.

Thus, the final partial aim of this Doctoral Thesis was to determine the effect of c.214C>A mutation in the human BVR $\alpha$  gene on the activity of this enzyme and analyze the role of BV, the substrate of this enzyme, against BA-induced oxidative stress in human hepatic cell lines.

Part of the results obtained in this section has been published in the article entitled: «A homozygous nonsense mutation (c.214C>A) in the biliverdin reductase alpha gene (*BLVRA*) results in accumulation of biliverdin during episodes of cholestasis», *Journal of Medical Genetics* (2011) 48:219-225. These results are shown in figures 3-5. The rest of the results, not yet published, are shown below.

### 7.2.3.1. Screening of the mutation c.214C>A in the Inuit population from Greenland

As mentioned before, the two homozygous patients for c.214C>A came from Greenland, a region with a low population density distributed in very small isolated towns and in which the rate of inbreeding is high. Like these two women, the most part of the population of this region belongs to Inuit ethnic.



**Figure 1.** Screening of c.214C>A mutation in the exon 3 of *BVRA* gene in an Inuit population from three different regions of Greenland (Nuuk, Ilulissat and Qaqortoq). Representative electropherograms obtain from an heterozygous individual (A). Determination of the presence of the SNP using specific Taqman probes by QPCR (B). Frequency histogram showing the incidence of the SNP in the studied population (C).

Based on this data, we completed the previous study by analyzing the frequency of this mutation in 295 Inuit individuals from three different geographical areas in Greenland. To determine the presence of the mutation we used specific Taqman probes for this SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”). The positive results where then confirmed by sequencing the exon 3 of the *BLVRA* gene. The screening (Figure 1) showed that the 3% of the individuals included in this study were heterozygous (9 patients) or homozygous (3 patients) for this mutation.

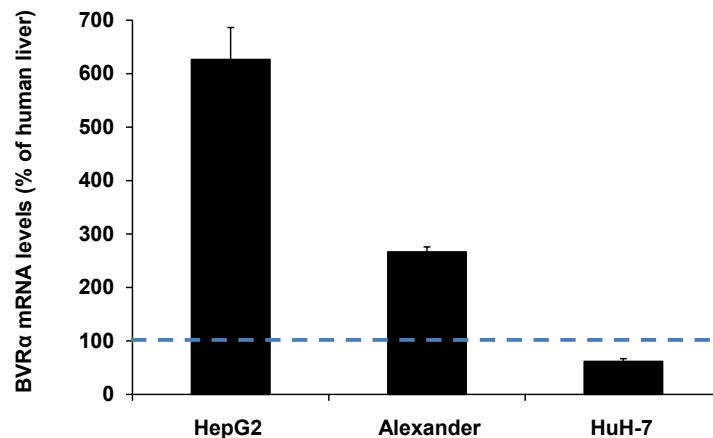
The presence of the mutation c.214C>A generates a truncated protein with no catalytic activity, which impairs the reduction of BV to BR (see the attached article). Due to the important role of *BVRα* in BV/BR redox cycle, the impairment of its enzymatic function could increase the sensitivity of individuals bearing this mutation to oxidative stress-induced cell injury.

### 7.2.3.2. Protective effect of biliverdin and *BVRα* against bile acid-induced oxidative stress in human hepatic cell lines

One of the mechanisms which may account for the cytotoxicity associated with BAs in cholestasis is oxidative stress (Sokol *et al.*, 1991; Togashi *et al.*, 1990). Under these

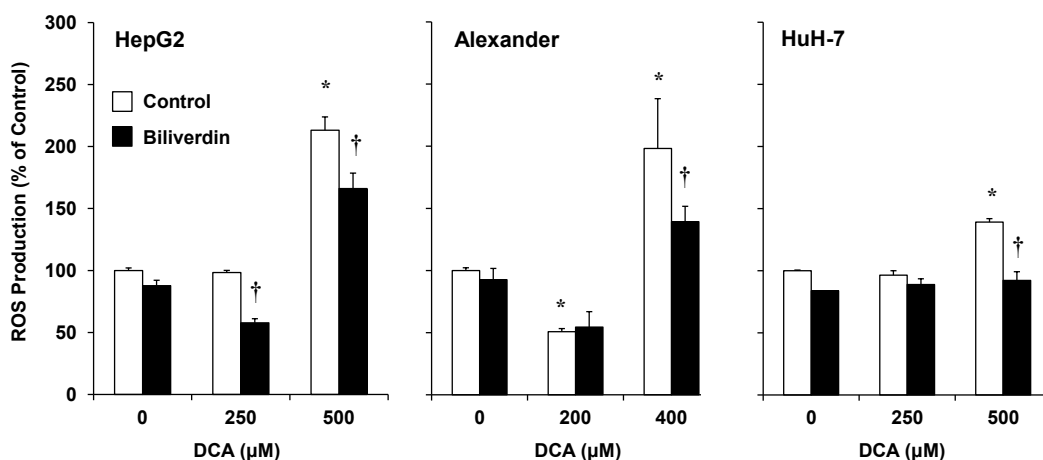
circumstances, cells activate different mechanisms in order to reduce cell injury, which include the activation of antioxidant systems. Thus, the first step of this study was to analyze the role of BV and BVR $\alpha$  in the cellular protection mechanisms against the liver damage induced during cholestasis.

The expression of BVR $\alpha$  reductase was determined in different human hepatic cell lines, among which HepG2, Alexander and HuH-7 cells were selected, due to their different expression levels of BVR $\alpha$  (Figure 2).



**Figure 2.** Steady-state levels of BVR $\alpha$  mRNA in HepG2, Alexander and HuH-7 cells, determined by RT-QPCR. Values, expressed as percentage of human liver, are means $\pm$ SEM from 3 independent experiments performed in triplicate.

These cell lines were exposed to different doses of deoxycholic acid (DCA) for 48 h in order to induce oxidative stress. Flow cytometry analysis indicated that treatment with high doses of this BA increased ROS production in HepG2, Alexander and HuH-7 cells (Figure 3). The presence of BV in the culture partially prevents the increase in ROS production in HepG2 and Alexander cells, whereas in HuH-7 cells, BV was able to completely inhibit DCA-induced ROS generation (Figure 3).

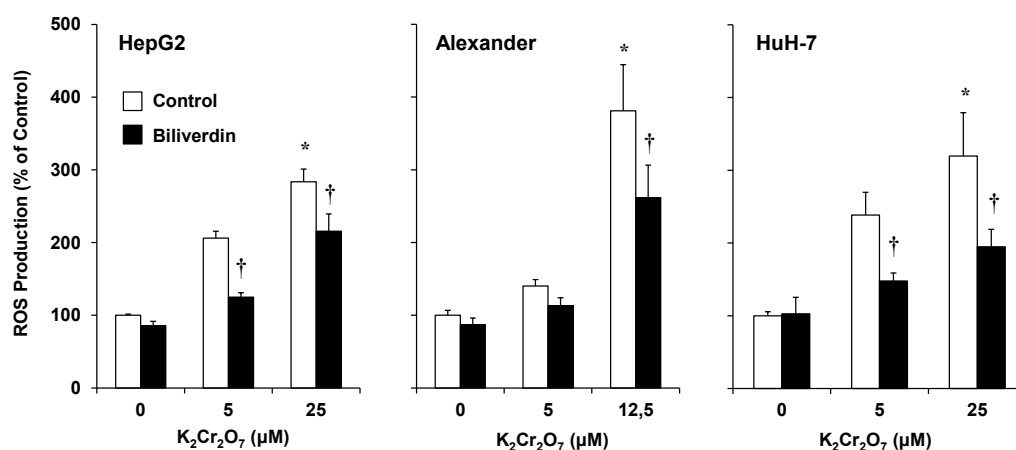


**Figure 3.** ROS production in HepG2, Alexander and HuH-7 cells treated with the indicated concentrations of deoxycholic acid (DCA) with or without 100  $\mu$ M biliverdin (BV) for 48 h. ROS production was determined by flow cytometry using dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). Values are expressed as means $\pm$ SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. \*,  $p < 0.05$ , as compared with untreated Control cells. †  $p < 0.05$ , on comparing cells treated with and without BV.



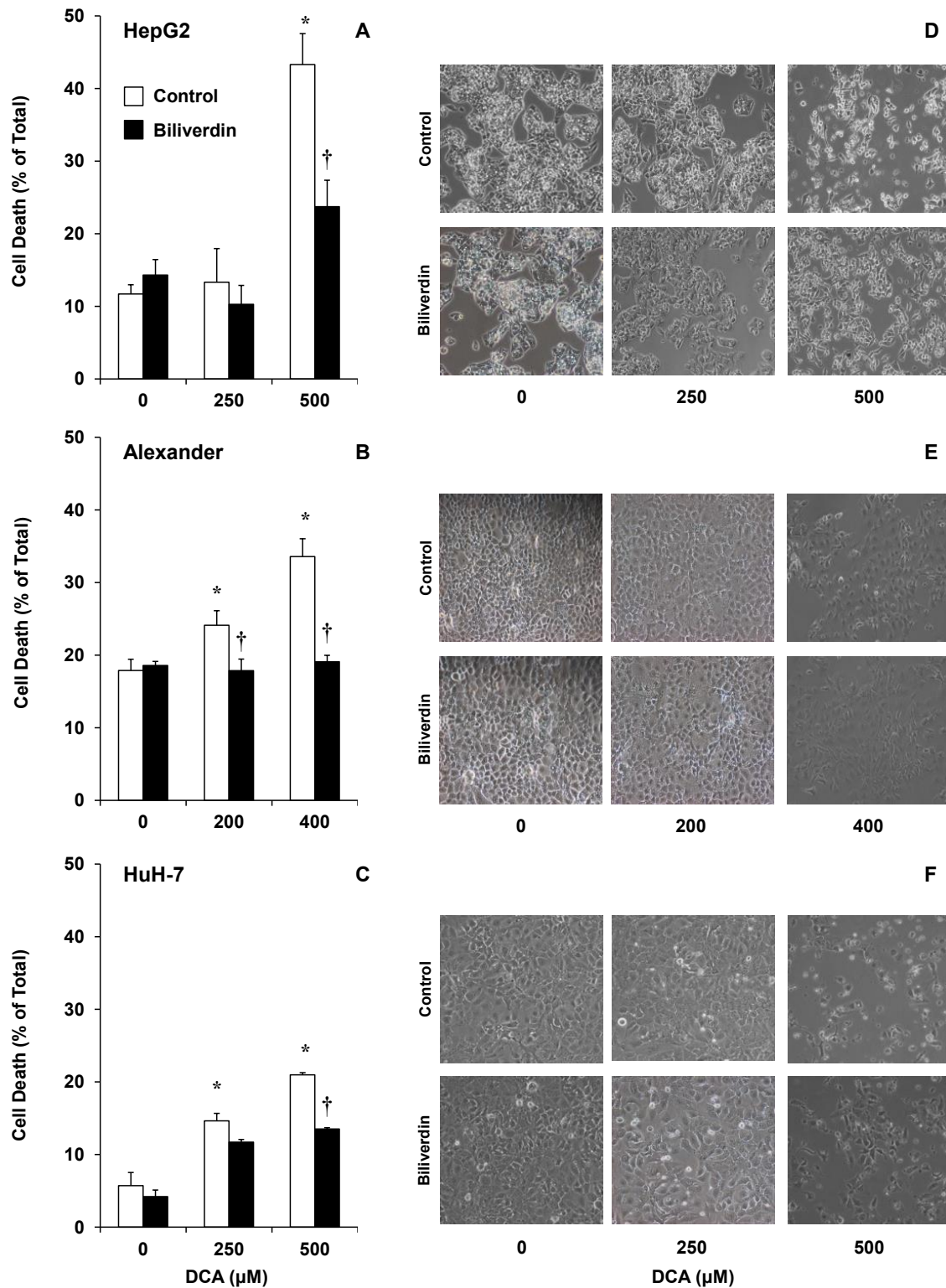
Previous reports indicated that antioxidant compounds such as BR and ursodeoxycholic acid may protect hepatic cells from BA-induced oxidative stress (Perez *et al.*, 2008). However, other studies argue against this protective effect suggesting that in hepatocytes BA-induced toxicity is not prevented by scavengers of oxidative stress (Woudenberg-Vrenken *et al.*, 2010). Our results indicate that BV may protect against BA-induced oxidative stress. Due to the low antioxidant activity of BV, this protection should be mediated by its conversion to bilirubin catalyzed by BVR $\alpha$ . Unlike BR, BV is not toxic, and could be used in higher doses.

To determine whether the protective effect of BV against oxidative stress was specific for BA-induced toxicity, HepG2, Alexander and HuH-7 cells were exposed to potassium dichromate for 48 h, a widespread industrial waste which is able to induce oxidative stress in hepatic cells (Patlolla *et al.*, 2009). The results showed a reduction in ROS production in cells treated with BV (Figure 4), which indicate that the protective effect of BV is not dependent of the prooxidant agent.



**Figure 4.** ROS production in HepG2, Alexander and HuH-7 cells treated with the indicated concentrations of potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_7$ ) with or without 100  $\mu M$  biliverdin (BV) for 48 h. ROS production was determined by flow cytometry using dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). Values are expressed as means $\pm$ SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. \*,  $p < 0.05$ , as compared with untreated Control cells. †  $p < 0.05$ , on comparing cells treated with and without BV.

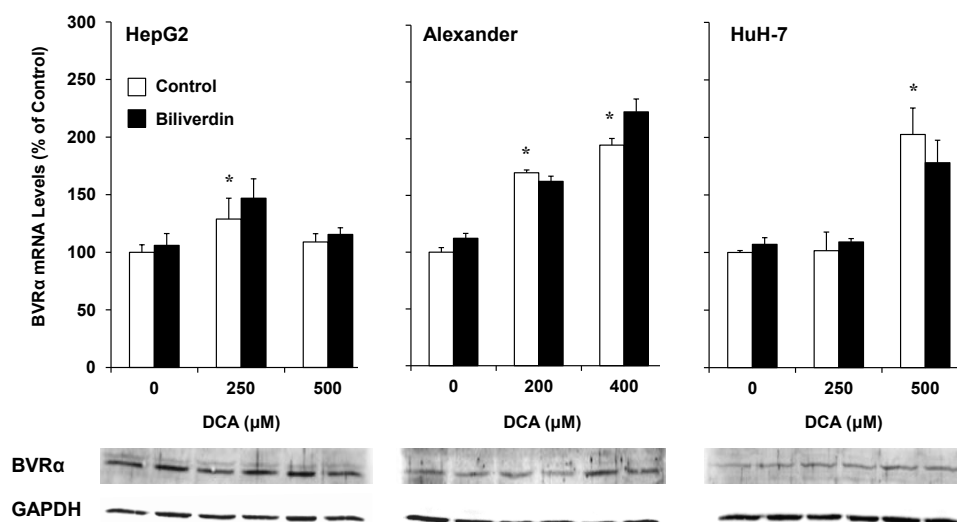
Oxidative stress induced by the accumulation of BAs during cholestasis may eventually lead to cell death in hepatocytes (Lemasters *et al.*, 1998), which increase liver injury. To determine the effect of BV-mediated reduction in ROS production, on cell viability, this parameter was determined in HepG2, Alexander and HuH-7 cells treated with DCA for 48 h. As indicated in Figure 5, BV reduced cell death in these cell lines. Besides its role in the BV/BR redox cycle, BV can also activate signaling pathways which may contribute to the protection against DCA-induced cell death (Kapitulnik and Maines, 2009).



**Figure 5.** Cell death in HepG2, Alexander and HuH-7 cells treated with the indicated concentrations of deoxycholic acid (DCA) with or without 100 μM biliverdin (BV) for 48 h. Proportion of dead cells was determined by flow cytometry after staining with propidium iodide (A-C). Values are expressed as means±SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. \*,  $p < 0.05$ , as compared with untreated Control cells. †  $p < 0.05$ , on comparing cells treated with and without BV. Representative images of phase-contrast microscopy of the same cells after DCA±BV exposure (D-F).

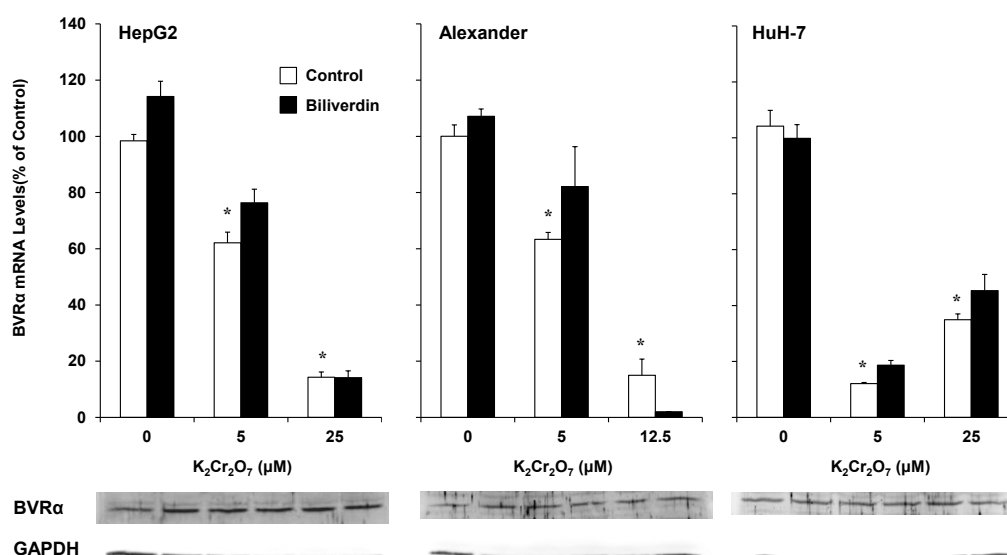
Previous reports indicated that BVR $\alpha$  is up-regulated in rat liver by cholestasis (Perez *et al.*, 2007). Moreover, taurocholic acid and ursodeoxycholic acid may induce the

expression of this enzyme in hepatic cells (Perez *et al.*, 2008). In our study DCA- induced the mRNA and protein expression of BVR $\alpha$  in HepG2, Alexander and HuH-7 cells (Figure 6). Owing to the key role of this enzyme in the BV/BR redox cycle, these results suggest that this antioxidant system may be activated in response to BA toxicity. Moreover, the induction of BVR $\alpha$  expression may contribute to the protection mediated by BV, by triggering its conversion to BR.



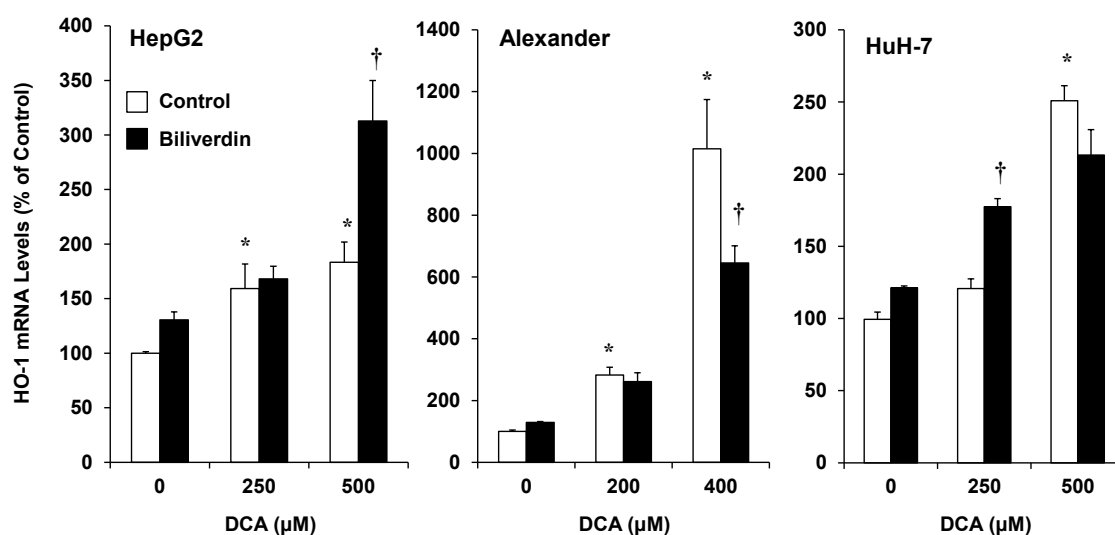
**Figure 6.** BVR $\alpha$  mRNA and protein levels in HepG2, Alexander and HuH-7 cells treated with the indicated concentrations of deoxycholic acid (DCA) with or without 100  $\mu$ M biliverdin (BV) for 48 h, determined by RT-QPCR and Western blot. GAPDH was used as normalizer. Values, expressed as percentage of untreated Control cells, are means $\pm$ SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. \*, p<0.05, as compared with untreated Control cells. † p<0.05, on comparing cells treated with and without BV.

In contrast, BVR $\alpha$  mRNA levels were reduced in HepG2, Alexander and HuH-7 cells treated with potassium dichromate although the total amount of BVR $\alpha$  protein did not change after treatment (Figure 7).



**Figure 7.** BVR $\alpha$  mRNA and protein levels in HepG2, Alexander and HuH-7 cells treated with the indicated concentrations of potassium dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) with or without 100  $\mu$ M biliverdin (BV) for 48 h, determined by RT-QPCR and Western blot. GAPDH was used as normalizer. Values, expressed as percentage of untreated Control cells, are means $\pm$ SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. \*, p<0.05, as compared with untreated Control cells. † p<0.05, on comparing cells treated with and without BV.

Finally, we determined the expression of HO-1 in HepG2, Alexander and HuH-7 cells treated with DCA and BV for 48 h. RT-QPCR analysis indicate that DCA induced the expression of HO-1 in all the cell lines studied (Figure 8). Moreover, BV increased HO-1 mRNA levels in HepG2 and HuH-7 cells, whereas this compound partially prevents the induction of HO-1 expression in Alexander cells treated with 400  $\mu\text{M}$  DCA.



**Figure 8.** HO-1 mRNA levels in HepG2, Alexander and HuH-7 cells treated with the indicated concentrations of deoxycholic acid (DCA) with or without 100  $\mu\text{M}$  biliverdin (BV) for 48 h, determined by RT-QPCR. Values, expressed as percentage of untreated Control cells, are means  $\pm$  SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. \*,  $p < 0.05$ , as compared with untreated Control cells. †  $p < 0.05$ , on comparing cells treated with and without BV.

HO-1 is one of the most important enzymes involved in the antioxidant defense. It has recently been described that BVR $\alpha$  may act as a transcription factor able to stimulate the expression of HO-1 (Kravets *et al.*, 2004). In our study, mRNA and protein levels of BVR $\alpha$  were increased in hepatic cells exposed to DCA, which can induce the expression of HO-1. The induction of BVR $\alpha$  and HO-1 expression may contribute to the antioxidant cell defense activated in hepatic cells exposed to BAs such as DCA.

In conclusion, our results indicate that, in hepatic cells treated with high doses of DCA, the BV/BR redox cycle could be involved in the cellular response against oxidative stress. Moreover, BV has a protective effect against BA-induced oxidative stress and cell death, which is probably mediated by its transformation into BR catalyzed by BVR $\alpha$ .

- Baranano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D., Snyder, S.H., 2002. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16093-16098.
- Briz, O., Macias, R.I., Perez, M.J., Serrano, M.A., Marin, J.J., 2006. Excretion of fetal biliverdin by the rat placenta-maternal liver tandem. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 290, R749-756.
- Feverly, J., 2008. Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 28, 592-605.
- Gourley, G.R., 1997. Bilirubin metabolism and kernicterus. *Adv Pediatr* 44, 173-229.
- Kapitulnik, J., Maines, M.D., 2009. Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin. *Trends in pharmacological sciences* 30, 129-137.
- Komuro, A., Tobe, T., Nakano, Y., Yamaguchi, T., Tomita, M., 1996. Cloning and characterization of the cDNA encoding human biliverdin-IX alpha reductase. *Biochimica et biophysica acta* 1309, 89-99.
- Kravets, A., Hu, Z., Miralem, T., Torno, M.D., Maines, M.D., 2004. Biliverdin reductase, a novel regulator for induction of activating transcription factor-2 and heme oxygenase-1. *The Journal of biological chemistry* 279, 19916-19923.
- Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Herman, B., 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta* 1366, 177-196.
- Maghzal, G.J., Leck, M.C., Collinson, E., Li, C., Stocker, R., 2009. Limited role for the bilirubin-biliverdin redox amplification cycle in the cellular antioxidant protection by biliverdin reductase. *The Journal of biological chemistry* 284, 29251-29259.
- McCoubrey, W.K., Jr., Cooklis, M.A., Maines, M.D., 1995. The structure, organization and differential expression of the rat gene encoding biliverdin reductase. *Gene* 160, 235-240.
- Patlolla, A.K., Barnes, C., Hackett, D., Tchounwou, P.B., 2009. Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int J Environ Res Public Health* 6, 643-653.
- Perez, M.J., Castano, B., Gonzalez-Buitrago, J.M., Marin, J.J., 2007. Multiple protective effects of melatonin against maternal cholestasis-induced oxidative stress and apoptosis in the rat fetal liver-placenta-maternal liver trio. *J Pineal Res* 43, 130-139.
- Perez, M.J., Castano, B., Jimenez, S., Serrano, M.A., Gonzalez-Buitrago, J.M., Marin, J.J., 2008. Role of vitamin C transporters and biliverdin reductase in the dual pro-oxidant and anti-oxidant effect of biliary compounds on the placental-fetal unit in cholestasis during pregnancy. *Toxicology and applied pharmacology* 232, 327-336.
- Ryter, S.W., Tyrrell, R.M., 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28, 289-309.
- Sokol, R.J., Devereaux, M., Khandwala, R.A., 1991. Effect of dietary lipid and vitamin E on mitochondrial lipid peroxidation and hepatic injury in the bile duct-ligated rat. *Journal of lipid research* 32, 1349-1357.

- Togashi, H., Shinzawa, H., Wakabayashi, H., Nakamura, T., Yamada, N., Takahashi, T., Ishikawa, M., 1990. Activities of free oxygen radical scavenger enzymes in human liver. *Journal of hepatology* 11, 200-205.
- Woudenberg-Vrenken, T.E., Buist-Homan, M., Conde de la Rosa, L., Faber, K.N., Moshage, H., 2010. Anti-oxidants do not prevent bile acid-induced cell death in rat hepatocytes. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 30, 1511-1521.



# A homozygous nonsense mutation (c.214C → A) in the biliverdin reductase alpha gene (*BLVRA*) results in accumulation of biliverdin during episodes of cholestasis

Nikolaj S Nytofte,<sup>1</sup> Maria A Serrano,<sup>2</sup> Maria J Monte,<sup>2</sup> Ester Gonzalez-Sanchez,<sup>2</sup> Zeynep Tumer,<sup>3</sup> Karin Ladefoged,<sup>1</sup> Oscar Briz,<sup>4</sup> Jose J G Marin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Queen Ingrid's Hospital, Nuuk, Greenland

<sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hepatology and Drug Targeting, CIBERhd, University of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>3</sup>Kennedy Centret, Glostrup, Denmark

<sup>4</sup>Research Unit, University Hospital, CIBERhd, Salamanca, Spain

## Correspondence to

Professor Jose J G Marin, Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, Salamanca, Campus Miguel de Unamuno E. I.D. S-09, 37007-Salamanca, Spain; jgmarin@usal.es

Received 29 January 2010

Revised 8 November 2010

Accepted 14 November 2010

Published Online First

28 January 2011

## ABSTRACT

**Background** Green jaundice is a rare finding usually associated with end-stage liver disease.

**Objective** The authors investigated two unrelated Inuit women from different geographical areas in Greenland who had episodes of green jaundice associated with biliary obstruction.

**Methods and results** The crises were accompanied by increased biochemical markers of cholestasis, together with absent or moderate hyperbilirubinaemia. In contrast, high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry showed hypercholanemia and high concentrations of biliverdin IX $\alpha$  in serum, urine, bile and milk. Hyperbilirubinaemia disappeared after surgical correction of the cholestasis. Analysis of the coding sequence of the biliverdin reductase alpha (*BVR $\alpha$* ) gene (*BLVRA*) detected three single-nucleotide polymorphisms: c.90G → A, c.214C → A and c.743A → C, which result in p.Ala3Thr, p.Ser44X and p.Gly220Gly, respectively. With the use of TaqMan probes, homozygosity for c.214C → A was found in both patients. Both parents of one of these patients were heterozygous for the inactivating mutation. Her brother was homozygous for normal alleles. Although her sister was also homozygous for the c.214C → A mutation, she had never had hyperbilirubinaemia or cholestasis. With the use of human liver RNA, the *BVR $\alpha$*  coding sequence was cloned, and the variant containing c.214C → A was generated by site-directed mutagenesis. Both proteins were expressed in human hepatoma liver cells and *Xenopus laevis* oocytes. Immunoblotting, immunofluorescence and functional assays of *BVR $\alpha$*  activity revealed that the mutated sequence generates a truncated protein with no catalytic activity.

**Conclusion** This is the first report of a homozygous *BLVRA* inactivating mutation indicating that the complete absence of *BVR $\alpha$*  activity is a non-lethal condition, the most evident phenotypic characteristic of which is the appearance of green jaundice accompanying cholestasis episodes.

## INTRODUCTION

Biliverdin is generated, together with Fe and CO, in haem catabolism, in a reaction catalysed by haem oxygenase.<sup>1</sup> The main product is biliverdin IX $\alpha$ , although, depending on the protoporphyrin IX bridge cleaved, smaller amounts of the other three isomers (IX $\beta$ , IX $\gamma$  and IX $\delta$ ) are also generated in

humans and other mammals.<sup>2</sup> Biliverdin IX $\alpha$  is converted into bilirubin IX $\alpha$  by biliverdin reductase  $\alpha$  (*BVR $\alpha$* ), which is expressed in many organs, mainly liver, brain, lung, pancreas, kidney, spleen and placenta.<sup>3–5</sup> The overall reduction of biliverdin to bilirubin is very efficient, and under physiological circumstances the concentration of serum biliverdin is low.<sup>6</sup> Subsequently, bilirubin is taken up by hepatocytes and conjugated with glucuronic acid by bilirubin uridine diphosphate glucuronosyltransferase-1A1<sup>7</sup> before its secretion into bile.<sup>6</sup> Thus, cholestasis normally results in hyperbilirubinaemia.

Although for many years it has simply been considered a mere mechanism for the elimination of waste products, recently the physiological advantages of the transformation of haem into biliverdin and biliverdin into bilirubin have been recognised. Thus, generation of endogenous CO, a potent vasodilator, may play a role in the control of local vascular tone.<sup>8</sup> Fetal biliverdin can be taken up by the placenta, where it is converted into bilirubin by *BVR $\alpha$*  before its transfer to the maternal compartment.<sup>5</sup> Moreover, bilirubin has beneficial antioxidant properties, although they are limited to low concentrations of this potentially toxic pigment.<sup>9</sup> An explanation for the antioxidant function of bilirubin is a redox cycle in which bilirubin would be oxidised to biliverdin and then recycled back to bilirubin by *BVR $\alpha$* .<sup>10</sup> However, recent in vitro studies argue against the *BVR $\alpha$* -mediated redox cycle playing a general or important role as a cellular antioxidant defence mechanism.<sup>11</sup>

Under physiological circumstances, the concentrations of biliverdin are much lower than those of bilirubin.<sup>6</sup> However, in rare cases, impairment of the biliverdin/bilirubin pathway has been reported to result in green jaundice and a green discoloration of body fluids.<sup>12–15</sup> This has been ascribed to biliverdin accumulation, but identification of the pigment responsible has been hampered by the use of non-specific biliverdin assays.<sup>12</sup> Clinically, the appearance of green jaundice has been considered to be a sign of a poor prognosis.<sup>13</sup>

In the present study, we describe two cases of green discoloration of the skin and biliverdin accumulation in plasma and urine in two unrelated female Inuit patients from different geographical areas of Greenland who had suffered from episodes of obstructive cholestasis. The biliverdin concentrations in their body fluids were completely



## Mutation report

restored to normal concentrations after surgical correction of the cholestasis. The genetic bases for this alteration have been elucidated.

### MATERIALS AND METHODS

#### Patients

The research protocol, which conformed to the ethics guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki, was reviewed and approved by the human ethics committees of the University of Salamanca (Spain) and the Queen Ingrid's Hospital (Nuuk, Greenland). Written consent was obtained from the patients in all cases.

#### Case 1 (patient PJ)

First episode: a 22-year-old pregnant woman from southern Greenland contacted the local health centre with complaints of back pain, nausea, vomiting and headache. She had previously been in good health. The local doctor noted that her urine was green. Urine microscopy revealed that the patient had a urinary infection. The patient developed contractions and was referred to the Queen Ingrid's Hospital where she was admitted to the gynaecological department on 20 April 2007. The contractions and back pain had remitted, but the patient still had nausea and bilious vomiting. Apart from penicillin, the patient had received no medication before admission.

The patient was at gestation stage 35(+1) weeks on the day of admission. She had a body mass index of 39.5 kg/m<sup>2</sup>. Blood pressure was 143/84, pulse 100/min, and temperature 37.0°C. An abdominal examination revealed a soft and initially non-tender abdomen. The skin of the patient presented a greenish hue. Both urine and plasma were green, the urine somewhat darker than the plasma (figure 1). Laboratory tests from the 2 days before the surgical intervention showed normal values, except for serum alkaline phosphatase (282 U/l) and transaminases (alanine aminotransferase 58 U/l; aspartate aminotransferase 54 U/l). Total bilirubin concentration was only moderately raised (18 µM). On 22 April, the patient complained of abdominal pain, and her nausea and vomiting had worsened. Abdominal ultrasound imaging revealed a living fetus, signs of obstructive cholestasis, and an enlarged, thin-walled gallbladder with multiple gallstones. Her blood pressure had risen (154/100 mm Hg), discrete oedema of the lower extremities was noticed, and mild proteinuria was present. On 23 April,

a healthy-looking baby was delivered by caesarean section. Neither the skin of the baby nor the amniotic fluid was green. A cholecystolithotomy was performed, and very green bile was drained from the thin-walled gallbladder, after which multiple gallstones were removed. During the operation, a cholangiography revealed a very distended biliary tree without drainage to the duodenum. One week after the operation, a second cholangiography disclosed normal drainage to the duodenum. Laboratory tests gave normal values (data not shown). Moreover, all symptoms, as well as the green discolouration of the skin, urine and plasma (figure 1), quickly regressed and the patient was discharged in good health.

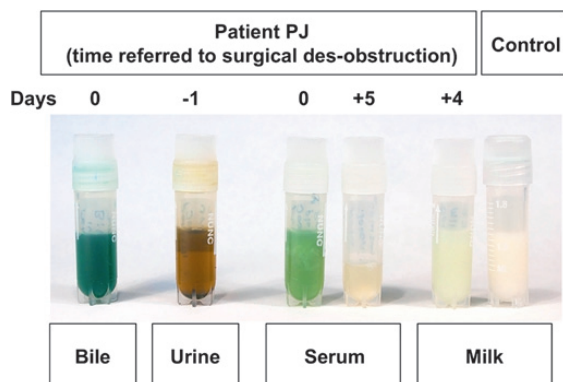
Second episode: on 15 October 2008, the patient noticed that her urine was dark green again. On the following day, she developed abdominal pain in the epigastric region accompanied by bilious vomiting. No discolouration of the skin was observed. On 17 October, she was admitted to the Queen Ingrid's Hospital. She was not febrile. The abdomen was soft but tender in the epigastric region. No skin discolouration was noted, but the urine and serum were green. Laboratory tests from 16 October to the day of surgical intervention revealed normal values except for alkaline phosphatase (370 U/l) and transaminases (alanine aminotransferase 324 U/l; aspartate aminotransferase 140 U/l). Bilirubin concentrations were within the normal range (10 µM). On 21 October 2008, a cholecystectomy was performed. The patient was well after the operation and discharged in good health during the following week.

#### Case 2 (patient EA)

A 33-year-old non-pregnant woman in previous good health contacted a settlement health station on 3 April 2008 in western Greenland complaining of epigastric pain, diarrhoea, nausea and vomiting. The patient was not febrile and the abdomen was soft but tender. On 18 April 2008, her skin developed a green colour. She also noted that her urine had turned dark green. On 21 April 2008, she was taken to the health centre because of a marked reduction (-8 kg) in body weight and continuing vomiting and diarrhoea, both described as greenish. The skin was visibly greyish green. The urine and serum were green. Laboratory tests showed normal values except for serum bilirubin (56 µM), alkaline phosphatase (422 U/l) and transaminases (alanine aminotransferase 227 U/l; aspartate aminotransferase 135 U/l). Leucocytosis was also observed ( $12.0 \times 10^9/l$ ). The following day an ultrasound examination of the abdomen revealed that the gallbladder had increased in wall thickness and contained multiple gallstones. On 9 May, the patient was admitted to the Queen Ingrid's Hospital. Her urine was still green and her skin had a greenish hue. Abdominal ultrasound showed cholelithiasis and cholestasis. On 20 May, a cholecystectomy was performed, gallstones were removed, and a drain was inserted. After surgery, the discolouration of the skin and body fluids normalised, and a cholangiography now showed normal drainage to the duodenum. The patient was discharged in good health during the following week.

#### Analytical methods

Adaptations of previously described methods for biliverdin,<sup>16</sup> bilirubin<sup>17</sup> and bile acid<sup>18</sup> measurements by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) were used in a 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), using MS2Scan to select the precursor ions. For biliverdin IX $\alpha$  and bilirubin IX $\alpha$ , we used 583.3 and 585.3 m/z as the precursor ions, respectively, whereas for bile acids the selection was based on the molecular ion in



**Figure 1** Representative images of samples collected from patient PJ during the first episode of cholestasis and after surgical removal of her biliary obstruction. The milk sample is compared with milk collected from a healthy volunteer (Control).

each case. Positive (biliverdin IX $\alpha$  and bilirubin IX $\alpha$ ) or negative (bile acid) electrospray ionisation was carried out. Precursor ions were then filtered and further fragmented in multiple-reaction monitoring (MRM) mode for use of the product ions (297.2 m/z for biliverdin IX $\alpha$ , 299.2 m/z for bilirubin IX $\alpha$ , 80.2 m/z for taurine-conjugated bile acids, 74.0 m/z for glycine-conjugated bile acids, and their own precursor ions for unconjugated bile acids) to measure the abundance of the indicated compounds.

HPLC was carried out using a Zorbax C18 column (30 mm  $\times$  2.1 mm, 3.5  $\mu$ m) or Zorbax Eclipse XDB-C18 column (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) for biliverdin/bilirubin and bile acids, respectively. The chromatographic conditions for biliverdin/bilirubin analyses were 85:15 (v/v) methanol/water, both containing 5 mM ammonium acetate and 0.1% formic acid, pH 3.2. Flow rate was 0.3 ml/min at 35°C. For bile acids, the solvents were also methanol and water, but containing 5 mM ammonium acetate and 0.01% formic acid, pH 4.6, with a flow rate of 0.5 ml/min; the chromatography was started at 80:20 (v/v) methanol/water, and the proportion of methanol was increased linearly up to 97% over 9 min. Standard biliverdin IX $\alpha$  (purity >95%) was purchased from Frontier Scientific (Logan, Utah, USA), whereas bilirubin (purity >98%) and bile acids (purity >95%) were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). All other reagents were of analytical grade.

#### Genetic analyses

Total RNA-free DNA from blood cells was obtained using a commercial kit (QIAamp DNA Mini, Spin Protocol; Qiagen, Izasa, Barcelona, Spain) after treatment of blood samples with proteinase K and RNase A. DNA from oral epithelial cells was obtained using sterile buccal swabs (Omni Swabs; Whatman, Madrid, Spain). The coding region of the BVR $\alpha$  gene was amplified by PCR using primers, the nucleotide sequence of which was located in the intronic regions of the gene. The amplicons contained both the exons and the exon–intron boundaries. The PCR products from at least three reactions of PCR per exon were purified by agarose gel electrophoresis followed by extraction of DNA from the gel bands using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). The amplicons were sequenced in both directions using forward and reverse primers. Thus, each exon was sequenced at least six times. To develop a PCR multiplex test to identify the c.214C  $\rightarrow$  A mutation found in exon 3, the two variants of this exon were cloned in pGEM-T vector and amplified in transfected *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . TaqMan probes and multiplex PCR were used for allelic discrimination (forward primer: CCTTCCTCAGCGTTCCTGAA; reverse primer: TCCATGAATTATGAAGCACAAAGAC; wild-type probe: 6FAM-CTTCGTGTCGAGGTG-MGB; C214A probe: VIC-GCTTCGTGTAGAGGT-MGB).

#### Cloning and site-directed mutagenesis of BVR $\alpha$

Using total RNA from human liver (Invitrogen, Barcelona, Spain), cDNA was synthesised by reverse transcription with random hexamers using the Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis kit (Invitrogen). The coding sequence (CDS) of BVR $\alpha$  including a Kozak sequence was then amplified by PCR, using high-fidelity AccuPrime Pfx DNA polymerase (Invitrogen) and two oligonucleotide primers specific to the sequence of GenBank accession number NM\_000712 (forward: 5'-CCAA-GATGAATGCAGAGCCCGA-3'; reverse: 5'-CTTCCTTGACAG-CAATATTTCTGGATTCTTCT-3') to which attB1 and attB2 sites were added, respectively, to obtain cDNA useful for Gateway cloning. PCR products were recombined with the attP-containing pDONR221 vector (Invitrogen) to generate

entry plasmids, which were further recombined with the pcDNA6.2/V5 destination vector (Invitrogen), containing the V5-tag downstream of the insert, to generate an expression vector with the V5 epitope located at the C-terminus of BVR $\alpha$ . Complete sequencing of cloned BVR $\alpha$  CDS revealed the presence of the same silent polymorphism c.743A  $\rightarrow$  C as found in the patients. This construct (pcDNA6.2-BVR $\alpha$ -WT) was used to carry out home-made site-directed mutagenesis of the whole plasmid<sup>19</sup> and obtain pcDNA6.2-BVR $\alpha$ -C214A containing the mutated BVR $\alpha$  CDS. The presence of the mutation c.214C  $\rightarrow$  A was confirmed by complete sequencing of the BVR $\alpha$  CDS in this new plasmid.

#### Expression of BVR $\alpha$ in cells

cRNAs for injection into oocytes were synthesised using the plasmids containing the CDS cDNA of both wild-type and mutated BVR $\alpha$ . These were linearised with the restriction enzyme *PmeI* (Promega, Madrid, Spain). Capped and poly(A)-tailed cRNAs were synthesised using the T7 mMessage mMachine Ultra Kit (Ambion; Applied Biosystems, Madrid, Spain).

Mature female frogs (*Xenopus laevis*), purchased from Regine Olig (Hamburg, Germany), were used. The animals received humane care as outlined in the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, and were treated in accordance with the indications of current Spanish (RD 223/1988) and European Union (86/609/CEE) laws. Experimental protocols were approved and supervised by the Ethics Committee for Laboratory Animals of the University of Salamanca.

Harvesting and preparation of oocytes were carried out as described elsewhere.<sup>20</sup> Oocytes were injected with 9 ng cRNA and subsequently cultured at 18°C for 2 days. The PLC/PRF/5 hepatoma cell line (Alexander, ATCC number CCL 8024) was purchased from the ATCC (LGC Standards, Barcelona, Spain). Cells growing on glass coverslips were transiently transfected with lipofectamine LTX (Invitrogen) and cultured for 3 days. V5-tagged BVR $\alpha$  was detected by immunostaining using a monoclonal antibody against V5 (Invitrogen) and an anti-mouse fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody (Invitrogen). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) was used to counterstain nuclei. Fluorescence photographs were obtained using a Nikon Eclipse TE 2000-S microscope.

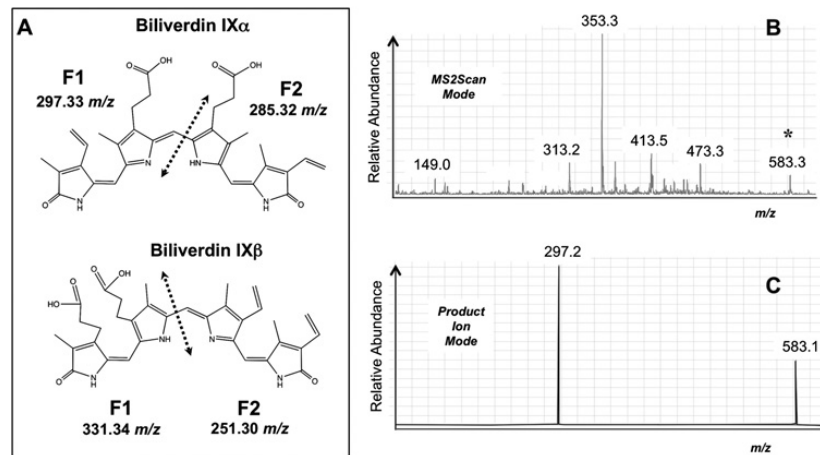
Cell lysates (10  $\mu$ g protein -Alexander cells- or 0.5  $\mu$ g -oocytes- determined using a modification of the Lowry method<sup>21</sup>) were used for immunoblotting analyses. Blots were probed with primary monoclonal antibodies against V5 epitope (Invitrogen). The appropriate horseradish peroxidase-linked secondary antibody was from Invitrogen. An enhanced chemiluminescence detection system (Hybond ECL; GE Healthcare, Madrid, Spain) was used to visualise the bands.

#### Functional study of BVR $\alpha$ activity

BVR $\alpha$  activity was assessed by studying conversion of biliverdin IX $\alpha$  into bilirubin IX $\alpha$  by oocytes expressing the enzyme. Oocytes were washed with substrate-free medium (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes, pH 7.5) and microinjected with 50 nl of similar medium but containing 300 pmol biliverdin IX $\alpha$  per oocyte and then incubated at 25°C for 1 h. The oocytes were washed with 4 ml ice-cold medium before being placed individually in phials. Production of bilirubin IX $\alpha$  was measured by HPLC-MS/MS as described above after lysing of the oocytes with 90% methanol.

## Mutation report

**Figure 2** (A) Schematic representation of the molecular structure of biliverdin IX $\alpha$  and biliverdin IX $\beta$  and the major fragments generated from these molecules in mass spectrometry (MS). (B) Representative mass spectra of biliverdin IX $\alpha$  obtained in MS2-scan mode by high-performance liquid chromatography-MS/MS using electrospray positive ionisation to select the precursor ion (583.3 m/z), indicated with an asterisk. (C) Mass spectra obtained in product ion mode by filtering the precursor ion at the first quadrupole showing the major product ion (297.25 m/z) generated in the second quadrupole, which was then used in MRM mode for quantitative analyses.



## RESULTS

Analysis of serum samples collected during green jaundice episodes in both patients revealed profiles of bile acid concentration typically associated with biliary obstruction—that is, high concentrations of conjugated bile acids (mainly taurocholic, glycocholic, taurochenodeoxycholic, glycocholic and taurosulfolithocholic acids) and low concentrations of unconjugated bile acids and secondary bile acids (data not shown).

To elucidate whether the greenish tinge of the skin, serum, urine and milk (figure 1) during the episodes of cholestasis in both patients was actually due to biliverdin, HPLC-MS/MS was carried out. This permitted us to identify and measure the concentrations of biliverdin and to distinguish between the two major isomers: biliverdin IX $\alpha$  and biliverdin IX $\beta$  (figure 2A). By filtering and following the specific ions (figure 2B,C), it was possible to identify the major form of biliverdin in body fluids,

which was biliverdin IX $\alpha$  in both patients, and to determine that this was markedly accumulated (table 1). The time course of serum biliverdin IX $\alpha$  concentration indicated that a marked reduction had occurred after surgical removal of the biliary obstruction (table 1). Accumulation of biliverdin was also seen in urine and milk (table 1). Interestingly, the bile of patient PJ collected after biliary drainage had been restored contained high amounts of biliverdin IX $\alpha$  (table 1).

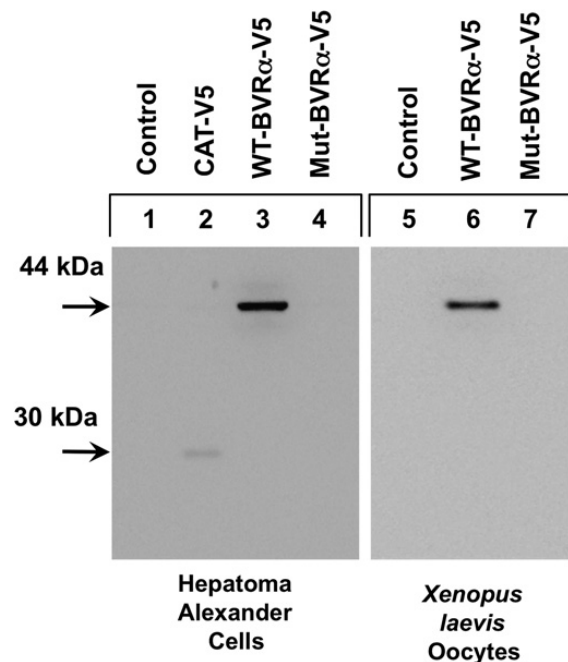
**Table 1** Biliverdin IX $\alpha$  concentrations in body fluids

Sample	Individual	Day	Biliverdin ( $\mu$ M)	
Serum	Control		0.12 $\pm$ 0.04	
	PJ's sister		<b>0.36<math>\pm</math>0.03</b>	
	Patients	EA	-1	<b>51.5</b>
		PJ	-2	<b>13.1</b>
			-1	<b>25.7</b>
		0	<b>32.4</b>	
		+5	<b>0.33</b>	
Urine	Control		<0.05	
	Patients	EA	-1	<b>14.6</b>
		PJ	+5	<b>3.13</b>
Milk	Control		0.10 $\pm$ 0.01	
	Patients	PJ	+4	<b>1.11</b>
Bile	Patients	PJ	0	<b>124.7</b>

Surgical removal of biliary obstruction was carried out on day 0. Biliverdin IX $\alpha$  was determined in triplicate by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

Control values are means $\pm$ SD from samples collected from seven volunteer women of similar age to the probands.

Four serum samples collected from the sister of patient PJ were also analysed. Values are means $\pm$ SD. Results above normal values are shown in bold.



**Figure 3** Representative western blots of wild-type (WT) and mutated (Mut) (c.214C $\rightarrow$ A; p.Ser44X) V5-tagged biliverdin reductase IX $\alpha$  (BVR $\alpha$ ) carried out with lysates of Alexander cells (10  $\mu$ g protein) and *Xenopus laevis* oocytes (0.5  $\mu$ g protein). Alexander cells expressing V5-tagged chloramphenicol acetyltransferase (CAT-V5) were used as a positive control. Detection was performed using a primary monoclonal antibody against the V5 epitope.

As our findings suggested that patient PJ may have had deficient transformation of biliverdin IX $\alpha$  into bilirubin IX $\alpha$ , we screened the coding region of the BVR $\alpha$  gene (*BLVRA*) for sequence variations. We detected three changes: c.90G→A (p.Ala3Thr, exon 2), c.214C→A (p.Ser44X, exon 3) and c.743A→C (p.Gly220Gly, exon 8). No changes in the intron–exon boundaries were observed (data not shown). Accordingly, the p.Ser44X mutation identified in this study is predicted to generate a truncated protein containing only the 43 N-terminal amino acids: MNTEPERKF GVVVVGVGRAGSVRMRDLRNPSPSSAFLNLIGFV.

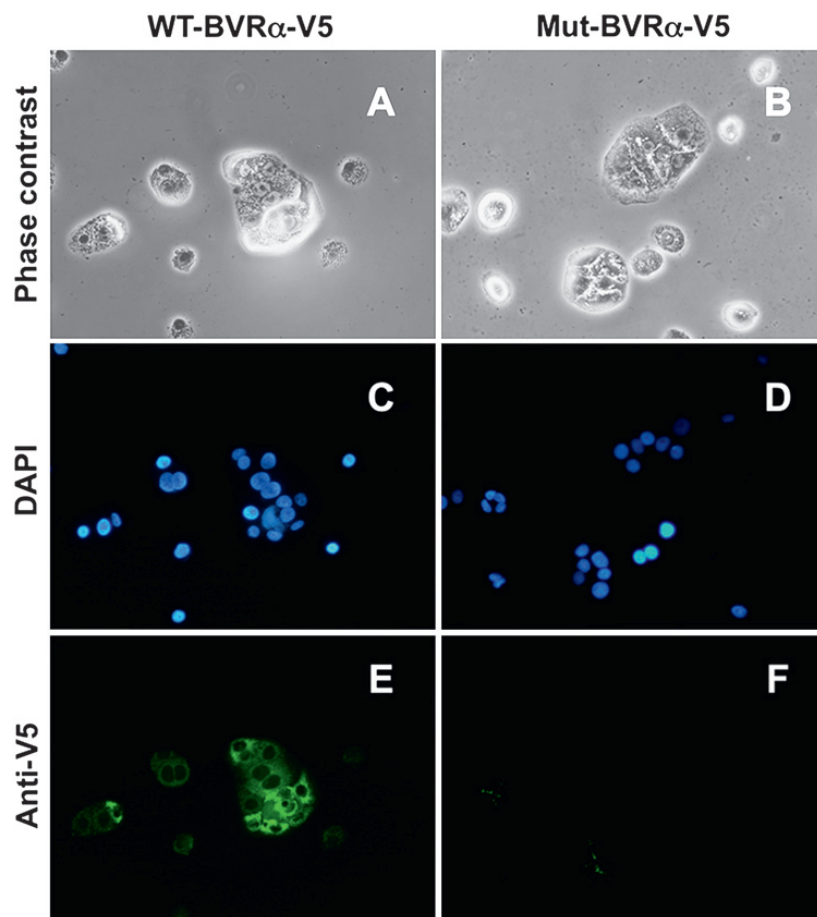
Using TaqMan probes in PCR multiplex analyses, we found both patients (PJ and EA) to be homozygous for the c.214C→A mutation. Material (oral epithelial cells) was available from only members of PJ's family. A pedigree analysis of c.214C→A in this family was carried out. This revealed that both PJ's parents were heterozygous for this mutation, whereas her brother was homozygous for the normal allele. In contrast, her sister was homozygous for the c.214C→A mutation. Although she had never had green jaundice, ultrasound investigation revealed a solitary stone in her gallbladder but no signs of biliary obstruction. Bile acid concentrations in the serum of PJ's sister were within the normal range (data not shown), and no biochemical signs of cholestasis were found (data not shown). Biliverdin concentrations in the sister's serum were low and

similar to that found in PJ in the absence of cholestatic crisis but about threefold that found in the control women (table 1).

Expression in both human hepatoma cells and *X. laevis* oocytes of the wild-type BVR $\alpha$  tagged with the V5 epitope at the C-terminus of the protein resulted in a detectable band of the expected size in western blot (figure 3) and clear labelling of the cytoplasm of the cells with green fluorescence in immunostaining assays (figure 4A,C,E). In contrast, when the construct containing the CDS of the mutated (c.214C→A) BVR $\alpha$  variant was used in the transfection of hepatoma cells or to obtain the mRNA that was injected in *X. laevis* oocytes, the result was lack of detection of the V5 epitope both in western blot (figure 3) and immunofluorescence (figure 4B,D,F).

HPLC-MS/MS was used to analyse in *X. laevis* oocytes the biotransformation of biliverdin into bilirubin by chromatographically separating them and following the disappearance and appearance, respectively, of characteristic product ions (figure 5A). The ability to generate bilirubin from endogenous biliverdin was significantly higher in oocytes expressing BVR $\alpha$  (figure 5B, D). This enhanced ability was more clearly seen when the oocytes were microinjected with a bolus of exogenous biliverdin (figure 5C,E). In this case, a marked decrease in biliverdin content was accompanied by a similar increase in the amount of bilirubin in the cells 1 h after microinjection of biliverdin.

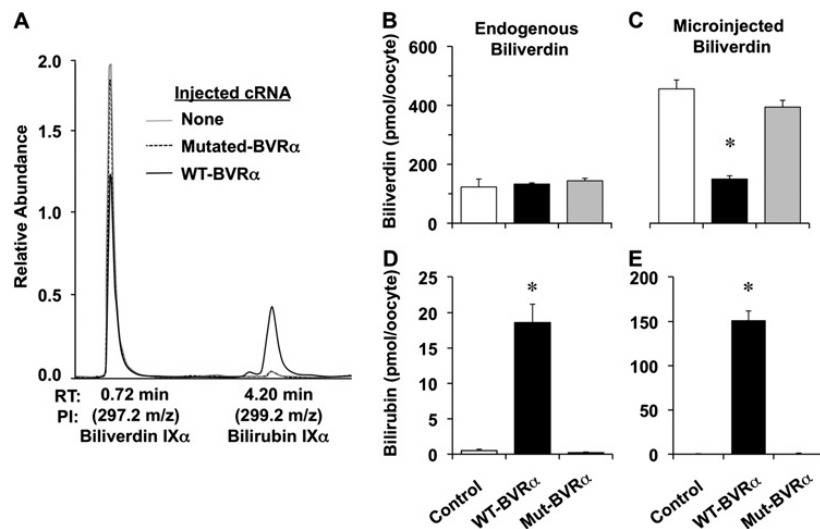
**Figure 4** Representative phase-contrast (A,B) and fluorescence (C–F) microscopy photographs of human hepatoma Alexander cells expressing wild-type (WT) and mutated (Mut) (c.214C→A; p.Ser44X) V5-tagged biliverdin reductase IX $\alpha$  (BVR $\alpha$ ). Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). Detection of BVR $\alpha$  (green) was performed using a primary monoclonal antibody against the V5 epitope and a fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody.





## Mutation report

**Figure 5** (A) Representative total ion chromatograms showing peaks corresponding to biliverdin IX $\alpha$  (product ion 297.2 m/z) and bilirubin IX $\alpha$  (product ion 299.2 m/z) obtained by injection in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) of methanol lysates from *Xenopus laevis* control oocytes (non-injected with cRNA) or expressing wild-type (WT-BVR $\alpha$ ) or mutated (c.214C $\rightarrow$ A; p.Ser44X) human biliverdin reductase alpha (Mutated-BVR $\alpha$ ). All oocytes were microinjected with exogenous biliverdin IX $\alpha$  (300 pmol/oocyte) 60 min before analysis. (B–E) Functional activity of human biliverdin reductase alpha (BVR $\alpha$ ) in *X laevis* oocytes. Oocyte contents of biliverdin IX $\alpha$  (B,C) and bilirubin IX $\alpha$  (D,E) were measured by HPLC-MS/MS in control oocytes and expressing wild-type (WT-BVR $\alpha$ ) or mutated (c.214C $\rightarrow$ A; p.Ser44X) BVR $\alpha$  (Mut-BVR $\alpha$ ) without (B,D) or with (C,E) exogenous administration of 300 pmol/oocyte biliverdin IX $\alpha$  60 min before collection for analysis. Results are means  $\pm$  SEM from at least 20 determinations per data point using oocytes from three different frogs. \* $p$ <0.05 compared with control cells by the Bonferroni method of multiple-range testing. RT, retention time; PI, product ion.



No catalytic activity of BVR $\alpha$  on either endogenous or microinjected biliverdin was observed in oocytes expressing the mutated (c.214C $\rightarrow$ A) BVR $\alpha$  variant (figure 5B–E).

## DISCUSSION

Serum biochemical markers and low concentrations of unconjugated bile acids and secondary bile acids were consistent with obstructive cholestasis—that is, reduced transit of bile acids through the intestine and their poor biotransformation by intestinal bacteria.<sup>22</sup> Obstructive cholestasis was confirmed by additional analyses and subsequent surgery. When bile drainage to the duodenum was re-established, the results of the laboratory tests and serum bile acid concentrations returned to within the normal range (data not shown). These findings support the hypothesis that biliary obstruction was the primary event, and green jaundice appeared as a consequence. The marked accumulation of biliverdin, together with moderate or absent hyperbilirubinaemia, was the most interesting sign during cholestasis crises in these patients. Accumulation of biliverdin has previously been described in rare cases associated with biliary obstruction,<sup>12,13</sup> but also associated with malnutrition<sup>14</sup> and several liver diseases,<sup>23</sup> in which the appearance of green jaundice has been considered a sign of poor prognosis.<sup>13</sup> This is because the biliverdin-induced greenish colour of the skin, serum and urine probably masks increased concentrations of bilirubin, which may be the result of profound impairment of liver function. Indeed, in previously described cases of patients with enhanced biliverdinaemia at concentrations similar to those found in patients studied here (30–40  $\mu$ M), the concentrations of serum bilirubin were 10-fold higher (300–400  $\mu$ M).<sup>24</sup> In the patients included in the present study, pure hyperbiliverdinaemia was found in one of the cases (PJ), and a moderate degree of hyperbilirubinaemia accompanying hyperbiliverdinaemia was detected in the other (EA).

Using a candidate gene approach to investigate episodes of green jaundice, we found three single-nucleotide polymorphisms, which result in: (i) p.Ala3Thr, a variant that has already been described in this gene in both human<sup>4</sup> and rat<sup>25</sup>

BVR $\alpha$  (the functional repercussions of the change in this residue are not known); (ii) p.Gly220Gly, ie, a silent mutation; (iii) p.Ser44X, which is expected to account for the synthesis of a truncated protein.

The normal BVR $\alpha$  protein consists of 296 amino acids and contains two conserved sites: (i) the Rossmann-fold NAD(P)H/NAD(P)(+) binding (NADB) domain at amino acid position 18–101, which is needed for the interaction with the cofactor; (ii) the catalytic active site at amino acid position 133–246, which is involved in the interaction with the substrate. Both sites are necessary for the ability of BVR $\alpha$  to convert biliverdin into bilirubin. When the mutated sequence, to which a V5 epitope tag was linked at the C-terminus, was transfected in human hepatoma cells and *X. laevis* oocytes, the complete protein was not synthesised. Moreover, the peptide synthesised before translation reaches the mutation-generated stop codon would lack most of the NADPH-binding site as well as the whole of the active site.<sup>26,27</sup> This was consistent with the lack of catalytic activity observed in functional assays with human hepatoma cells and *X. laevis* oocytes transfected with the mutated construct.

A heterozygous nonsense mutation in exon 3 (Arg18X) of *BLVRA* has recently been described in a male Swedish patient with end-stage liver cirrhosis.<sup>15</sup> It is interesting that this heterozygous mutation resulted in biliverdin accumulation in spite of the presence of one normal allele. The cause of hyperbiliverdinaemia in this patient was suggested to be profound impairment of liver function due to advanced cirrhosis. The authors emphasise that no human cases of a total deficiency of BVR $\alpha$  activity have so far been described. The present study fills this gap and affords interesting information on the relevance of the complete lack of BVR $\alpha$  activity in humans.

Despite the patients studied here having a complete lack of BVR $\alpha$ , they had no apparent signs of an abnormal phenotype in the absence of cholestasis. However, it cannot be ruled out that the complete absence of BVR $\alpha$  activity has any deleterious effect. For instance, it is not known whether marked biliary secretion of this pigment may be indirectly involved in favouring

formation of the gallstones that were present in both patients and PJ's sister. Moreover, one of the subjects investigated here (PJ) was pregnant and gave birth during the first episode of green jaundice and biliverdin accumulation. The baby died a few months later of unknown causes. Thus, it cannot be ruled out that accumulation of biliverdin during pregnancy may be harmful to the fetus.

In these patients, biochemical analyses of serum collected during episodes of green jaundice revealed the presence of bilirubin (<20  $\mu\text{M}$  and <60  $\mu\text{M}$  in PJ and EA, respectively). As automated methods for determining serum bilirubin concentration are based on the formation and colorimetric measurement of diazo pigments and this method does not discriminate between bilirubin isomers,<sup>28</sup> these findings were probably due to the generation in these patients of biliverdin/bilirubin isomers other than IX $\alpha$ .

It is interesting to note that, even during cholestasis, serum bilirubin concentrations were not markedly raised. This, together with the presence of a large amount of biliverdin IX $\alpha$  in the bile of this patient, suggests that the main route for elimination of haem metabolites in individuals with complete BVR $\alpha$  deficiency may be secretion of biliverdin IX $\alpha$  into bile. This keeps serum concentrations low as long as biliary function is not impaired. This may explain the interesting observation that PJ's sister, despite having a homozygous BLVRA inactivating mutation, had suffered no episodes of green jaundice. The finding of a heterozygous mutation in both PJ's parents, who had no liver disease or signs of green jaundice throughout their lives, was in agreement with the concept that green jaundice only occurs in heterozygous patients when liver function is severely deteriorated.<sup>15</sup>

In conclusion, this is the first report of a homozygous BLVRA inactivating mutation indicating that the complete absence of BVR $\alpha$  activity is a non-lethal condition, the most evident phenotypic characteristic of which is the appearance of green jaundice accompanying cholestasis episodes.

**Acknowledgements** We acknowledge laboratory management by E Keck, secretarial help from M I Hernandez, and technical help from A I Barrios-Fernandez. Revision of the English spelling, grammar and style of the manuscript by N Skinner is also gratefully acknowledged.

**Funding** This study was supported in part by the Instituto de Salud Carlos III, FIS (Grants PI070517 and PI080151), the Junta de Castilla y Leon (Grants GR75/08, SA033A08, SA03508, and SA036A08), Spain, the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (Grant BFU2006-12577 and SAF2009-08493), Spain, and the Fundación Investigación Médica, Mutua Madrileña (Convocatoria 2009), Spain. The group is member of the Network for Cooperative Research on Membrane Transport Proteins (REIT), co-funded by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain and the European Regional Development Fund (ERDF) (Grant BFU2007-30688-E/BFI) and belongs to the CIBERehd (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas) Instituto de Salud Carlos III, Spain. Ester Gonzalez-Sanchez is a recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación, Spain (Grant AP2008-03762).

**Competing interests** None.

**Patient consent** Obtained.

**Ethics approval** This study was conducted with the approval of the Human Ethics Committees of the University of Salamanca (Spain) and the Queen Ingrid's Hospital (Nuuk, Greenland).

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

## REFERENCES

- Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 2000;**28**:289–309.
- Yamaguchi T, Nakajima H. Changes in the composition of bilirubin-IX isomers during human prenatal development. *Eur J Biochem* 1995;**233**:467–72.
- McCoubrey WK Jr, Cooklis MA, Maines MD. The structure, organization and differential expression of the rat gene encoding biliverdin reductase. *Gene* 1995;**160**:235–40.
- Komuro A, Tobe T, Nakano Y, Yamaguchi T, Tomita M. Cloning and characterization of the cDNA encoding human biliverdin-IX alpha reductase. *Biochim Biophys Acta* 1996;**1309**:89–99.
- Briz O, Macias RI, Perez MJ, Serrano MA, Marin JJ. Excretion of fetal biliverdin by the rat placenta-maternal liver tandem. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;**290**:R749–56.
- Feverly J. Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver Int* 2008;**28**:592–605.
- Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Efferink RP, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 1994;**269**:17960–4.
- McLean M, Bowman M, Clifton V, Smith R, Grossman AB. Expression of the heme oxygenase-carbon monoxide signalling system in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:2345–9.
- Gourley GR. Bilirubin metabolism and kernicterus. *Adv Pediatr* 1997;**44**:173–229.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:16093–8.
- Maghazal GJ, Leck MC, Collinson E, Li C, Stocker R. Limited role for the bilirubin-biliverdin redox amplification cycle in the cellular antioxidant protection by biliverdin reductase. *J Biol Chem* 2009;**284**:29251–9.
- Greenberg AJ, Bossenmaier I, Schwartz S. Green jaundice. A study of serum biliverdin, mesobiliverdin and other green pigments. *Am J Dig Dis* 1971;**16**:873–80.
- Larson EA, Evans GT, Watson CG. A study of the serum biliverdin concentration in various types of jaundice. *J Lab Clin Med* 1947;**32**:481–8.
- Prichard JS. Biliverdin appearing in a case of malnutrition. *Br J Clin Pract* 1972;**26**:481–2.
- Gafvels M, Holmstrom P, Somell A, Sjovalf F, Svensson JO, Stahle L, Broome U, Stal P. A novel mutation in the biliverdin reductase-A gene combined with liver cirrhosis results in hyperbilirubinaemia (green jaundice). *Liver Int* 2009;**29**:1116–24.
- Niittynen M, Tuomisto JT, Auriola S, Pohjanvirta R, Syrjala P, Simanainen U, Vuolksela M, Tuomisto J. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced accumulation of biliverdin and hepatic peliosis in rats. *Toxicol Sci* 2003;**71**:112–23.
- De Matteis F, Lord GA, Kee Lim C, Pons N. Bilirubin degradation by uncoupled cytochrome P450. Comparison with a chemical oxidation system and characterization of the products by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;**20**:1209–17.
- Ye L, Liu S, Wang M, Shao Y, Ding M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;**860**:10–17.
- Laible M, Boonrod K. Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. *J Vis Exp* 2009 May 11;(27). pii:1135. doi:10.3791/1135.
- Briz O, Serrano MA, Rebollo N, Hagenbuch B, Meier PJ, Koepsell H, Marin JJ. Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholylglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol Pharmacol* 2002;**61**:853–60.
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978;**87**:206–10.
- Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006;**47**:241–59.
- Fenech FF, Bannister WH, Grech JL. Hepatitis with biliverdinaemia in association with indomethacin therapy. *Br Med J* 1967;**3**:155–6.
- Tickner TR, Gutteridge JM. A simple colorimetric method for the estimation of plasma biliverdin. *Clin Chim Acta* 1978;**85**:125–9.
- Kikuchi A, Park SY, Miyatake H, Sun D, Sato M, Yoshida T, Shiro Y. Crystal structure of rat biliverdin reductase. *Nat Struct Biol* 2001;**8**:221–5.
- Whitby FG, Phillips JD, Hill CP, McCoubrey W, Maines MD. Crystal structure of a biliverdin IXalpha reductase enzyme-cofactor complex. *J Mol Biol* 2002;**319**:1199–210.
- Maines MD. New insights into biliverdin reductase functions: linking heme metabolism to cell signaling. *Physiology (Bethesda)* 2005;**20**:382–9.
- Blumenthal SG, Stucker T, Rasmussen RD, Ikeda RM, Ruebner BH, Bergstrom DE, Hanson FW. Changes in bilirubins in human prenatal development. *Biochem J* 1980;**186**:693–700.

## 7.3. CONCLUSIONS

### FIRST CONCLUSION

Treatment with subtoxic doses of acetaminophen induces changes in the expression and the activity of several ABC proteins, involved in the removal of its metabolites, in different tissues which participate in the metabolism and excretion of this drug, such as liver, kidney, intestine and placenta.

### SECOND CONCLUSION

Treatment with subtoxic doses of acetaminophen during pregnancy impairs placental barrier in rats. More precisely, acetaminophen induced a reduction in Bcrp function which results in a weaker placental barrier for bile acids, and hence a lower protection of the fetus against the maternal hypercholanemia during cholestatic liver diseases. The accumulation of these compounds in the fetal compartment may have deleterious effects in different fetal tissues and increase the incidence of several fetal pathologies.

### THIRD CONCLUSION

Partial depletion of mtDNA in the mouse hepatoma cells Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> increases their resistance to cell death induced by potentially toxic compounds such as paracetamol and glycochenodeoxycholic acid. The resistance to the toxicity induced by these compounds is not due to an increment in the expression of ABC transporters, involved in their detoxification, but seems to be related with the lower ability to generate ROS observed in Rho<sup>-</sup> cells.

### FOURTH CONCLUSION

In Hepa 1-6 Rho<sup>-</sup> cells, the reduction of mtDNA content partially prevents the cytoplasm-to-nucleus translocation of Nrf2 in response to the treatment with paracetamol and glycochenodeoxycholic acid. Despite the activation of this transcription factor, the expression of several ABC transporters, which are target genes of Nrf2, was not modified. These results suggest that the up-regulation of these transporters requires the participation of other regulatory element(s) whose activation in response to glycochenodeoxycholic acid and paracetamol is impaired in Rho<sup>-</sup> cells.

### FIFTH CONCLUSION

The human hepatocellular carcinoma cell line SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup>, totally depleted of mtDNA, is more resistant to glycochenodeoxycholic acid-induced cell death. Among the mechanisms involved in this chemoresistance are a decrease in oxidative stress and a ROS-independent increase in the activation of the Akt/mTOR survival pathway.



## SIXTH CONCLUSION

SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cells are more resistant to the toxicity induced by doxorubicin, SN-38 and cisplatin. Several mechanisms may account for this chemoresistance including a decrease in oxidative stress, the up-regulation of several ABC transporters, which reduce the intracellular accumulation of these drugs, and an increase in the expression of Nrf2, a transcription factor which regulates different mechanisms of cellular defense. Moreover, the lack of mtDNA also stimulates the expression of survival proteins such as survivin after the treatment with these antitumoral drugs.

## SEVENTH CONCLUSION

SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cells are also more resistant to sorafenib-induced cell death. However, none of the mechanisms involved in the resistance to doxorubicin, SN-38 y cisplatin, except for the decrease in ROS production, can explain the resistance to the toxicity induced by sorafenib.

The study of the expression of 90 genes involved in chemoresistance in SK-Hep-1 Rho<sup>0</sup> cells indicated that the lack of mtDNA modifies the expression of some of these genes. One of the most important changes was the abolishment of the expression of *KIT*, one of the main target genes of sorafenib. Moreover, the expression of several pro-apoptotic genes was reduced, whereas the expression of *BCL2*, an anti-apoptotic gene was up-regulated.

## EIGHTH CONCLUSION

One of the cell antioxidant systems is the redox cycle mediated by biliverdin reductase, by which biliverdin is reduced into bilirubin. In hepatic cells treated with high doses of deoxycholic acid, the expression of this enzyme is up-regulated, suggesting that, in this situation, this mechanism could be involved in the cellular response against oxidative stress. Moreover, biliverdin has a protective effect against bile acid-induced oxidative stress and cell death, which is probably mediated by its transformation into bilirubin catalyzed by the enzyme biliverdin reductase.

## NINTH CONCLUSION

The presence of the mutation c.214C>A in exon 3 of *BLVRA* gene has been detected in 3% of the Inuit population of Greenland. This mutation generates a truncated protein with no catalytic activity, which impairs the reduction of biliverdin to bilirubin. These results suggest that individuals bearing this mutation could be more sensitive to cell injury due to oxidative stress in tissues where biliverdin reductase plays an important role among the antioxidant defense systems.

## GLOBAL CONCLUSION

Mitochondrial genome plays an important role in the regulation of the expression of several nuclear genes involved in mechanisms of cell defense, through retrograde signaling pathways. Thus, the lack of mitochondrial genome and the activation of antioxidant systems such as biliverdin/bilirubin redox cycle, mediated by biliverdin reductase, can reduce oxidative stress and increase the resistance to cell death induced by several pro-oxidant toxic compounds.



La acumulación intracelular de compuestos endógenos o xenobióticos potencialmente tóxicos puede producir alteraciones en el equilibrio redox celular y desencadenar situaciones de estrés oxidativo que finalmente conduzcan a la muerte celular por apoptosis o necrosis.

En estas circunstancias se ponen en marcha distintos mecanismos de defensa celular entre los que se incluyen la activación de diversos sistemas antioxidantes, la inducción de mecanismos de biotransformación y eliminación de sustancias tóxicas, mediados por enzimas de fase I y fase II, así como por bombas exportadoras de la superfamilia ABC (“ATP-Binding Cassette”), y la potenciación de rutas de supervivencia celular. A pesar de la importancia de estos sistemas de defensa celular, los mecanismos implicados en su regulación no se conocen en profundidad.

La coordinación de la expresión de los genomas nuclear y mitocondrial es fundamental para la correcta ejecución de funciones celulares como la respuesta a situaciones de estrés químico y oxidativo. Así, existen vías de “señalización retrógrada”, mediante las que las señales procedentes de la mitocondria pueden modular la expresión de genes nucleares. Puesto que estos orgánulos presentan una gran sensibilidad a la toxicidad inducida por compuestos endógenos y xenobióticos, la activación de rutas de señalización retrógrada podría participar en la regulación de la expresión de genes implicados en mecanismos de defensa celular lo que da lugar a un fenotipo celular caracterizado por una mayor quimiorresistencia.

Por todo ello, el objetivo global de esta Tesis Doctoral fue analizar el papel del genoma mitocondrial en la regulación de la expresión de distintas proteínas y en la activación de rutas de señalización implicadas en los mecanismos de defensa frente al daño oxidativo y la muerte celular inducidos por compuestos endógenos y xenobióticos potencialmente tóxicos.

*La frase más excitante que se puede oír en ciencia,  
la que anuncia nuevos descubrimientos, no es  
“¡Eureka!” sino “Es extraño ...”*

*Isaac Asimov*