



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN Nrf2 EN CÉLULAS HEK293
ESTIMULADAS CON PÉPTIDOS IDR**

TESIS QUE PRESENTA

MARÍA CRISTINA MALDONADO PICHARDO

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

EN EL ÁREA TEMÁTICA DE:

MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

ASESOR:

VÍCTOR MANUEL BAIZABAL AGUIRRE

MORELIA, MICH., Agosto-2018

Dedicada a:

Mis padres, por su amor y apoyo incondicional, por inculcarme valores que me
han llevado a alcanzar esta meta.

Mi hermana por estar ahí para mí cuando la necesito,
a mis sobrinos Sofi, Dani y Fer

A Israel, por brindarme su apoyo y ayuda en cualquier momento.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial, Dra. Marissa I. Gómez, Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita, Dr. Juan José Valdez Alarcón y Dr. Alfredo Saavedra Molina, por su apoyo y todas sus observaciones para enriquecer este trabajo.

Al Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre, por su apoyo y enseñanzas brindadas.

A la Dra Rosy Rico, por ser parte fundamental del análisis teórico, por su tiempo y dedicación y por los consejos que a cada paso me brindó.

Al CONACYT por la beca otorgada para estudiar la Maestría en Ciencias, durante el periodo Marzo-2016 a Febrero-2018.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Estructura de Proteínas y Transducción de Señales del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre,

INDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	V
ABSTRACT	VII

MARCO TEÓRICO

1. Estrés oxidante y el factor de transcripción Nrf2.....	1
2. Estructura de Nr2.....	3
3. Mecanismos de regulación de Nrf2.....	4
3.1 Regulación por distribución subcelular.....	4
3.2 Regulación mediada por modificación postraduccional.....	7
3.2.1 Regulación por GSK3.....	7
3.2.2 Regulación mediada por interacción con GSK3 β , Axin 1 y β - TrCP/Cullin 1.....	8
3.2.3 Regulación por CK2.....	8
3.2.4 Regulación por PKC.....	8
3.2.5 Regulación por MAP cinasas.....	9
3.3 Otras formas de regulación.....	9

3.3.1 Acetilación.....	9
3.3.2 Oncogenes.....	9
3.3.3 Modificaciones epigenéticas de Nrf2.....	9
3.3.4 MicroRNAs.....	10
3.3.5 Proteínas que compiten por la unión de Keap1–Nrf2.....	10
4. Activación de Nrf2 como una alternativa terapéutica coadyuvante en la enfermedad renal crónica.....	11
5. Importancia de los péptidos en la defensa del hospedero.....	12
6. Fármacos derivados del modelado molecular.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
1. Estudio bioquímico-experimental.....	21
1.1 Péptidos	21
1.2 Línea celular HEK293.....	21
1.3 Medio DMEM para el cultivo de la línea celular HEK293.....	22
1.4 Descongelación y resiembra de la línea celular HEK293	22
1.5 Mantenimiento de la línea celular HEK293.....	23
1.6 Análisis de la toxicidad de los péptidos IDR.....	23
1.7 Evaluación de la viabilidad celular.....	24

1.8 Estimulación de células HEK293 con los péptidos IDR 1, HH2, 1002 y 1018.....	25
1.9 Extracción de proteína.....	25
1.10 Extracción de proteína total, citoplásmica y nuclear.....	26
1.11 Detección de Nrf2 por ensayo tipo Western Blot.....	27
1.12 Análisis estadístico.....	28
2. Estudio teórico-computacional.....	29
2.1 Ensayo control de la interacción entre Nrf2 y Keap-1.....	29
2.2 Construcción <i>in silico</i> por homología de péptidos IDR	30
2.3 Acoplamiento de los péptidos IDR generados <i>in silico</i> con Nrf2.....	31
2.4 Análisis <i>in silico</i> del acoplamiento molecular de los péptidos IDR con Keap-1.....	31
2.5 Identificación <i>in silico</i> de un péptido basado en un fragmento de la proteína P21 con potencial efecto sobre la activación de Nrf2.....	32
RESULTADOS	33
1. Estudio bioquímico-experimental.....	33
1.1 Efecto de los péptidos IDR sobre eritrocitos humanos.....	33
1.2 Evaluación de la viabilidad en células HEK293	34
1.3 Abundancia relativa de Nrf2 en el extracto total de células HEK293 estimuladas con péptidos IDR.	36
1.4 Abundancia relativa de Nrf2 en citoplasma y núcleo en células HEK293 estimuladas con péptidos IDR.....	37
2. Estudio teórico-computacional.....	40
2.1 Análisis <i>in silico</i> de la interacción entre Nrf2 y Keap-1.....	40

2.2 Reproducibilidad <i>in silico</i> de la interacción Nrf2 y Keap-1 en los fragmentos con pdb 3wn7, 2dyh, ix2r, 2flu.....	44
2.3 Construcción <i>in silico</i> de péptidos IDR 1, 1002, 1018 y HH2 por homología	47
2.4 Acoplamiento de los péptidos IDR generados <i>in silico</i> con Nrf2.....	50
2.5 Análisis <i>in silico</i> del acoplamiento molecular de los péptidos IDR con Keap-1.....	54
2.6 Identificación <i>in silico</i> de un péptido basado en un fragmento de la proteína P21 con potencial efecto sobre la activación de Nrf2.....	54
DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES.....	61
PERSPECTIVAS.....	61
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de los dominios de Nrf2 y Keap-1.....	4
Figura 2. Regulación por distribución subcelular de Nrf2.....	7
Figura 3. Integridad de la membrana plasmática de eritrocitos humanos después de la interacción con los péptidos IDR 1, 1002,1018 y HH2.....	34
Figura 4. Viabilidad celular de HEK293 después de la interacción con los péptidos IDR 1, 1002, 1018 y HH2.....	35
Figura 5. Los péptidos IDR 1002 y HH2 inducen la acumulación de Nrf2 en HEK293 a bajas concentraciones.....	37
Figura 6. El péptido IDR-1002 promueve la translocación nuclear de Nrf2 en células HEK293.....	38
Figura 7. Comparación de la acumulación nuclear de Nrf2 inducida por los péptidos IDR-1002 e IDR-1018 a dos concentraciones diferentes.....	39
Figura 8. Secuencia de aminoácidos de Nrf2 de humano.....	41
Figura 9. Estructuras co-cristalizadas de Nrf2 con Keap-1.....	42
Figura 10. Alineamiento de las secuencias de las estructuras co-cristalizadas de Nrf2 con Keap-1.....	42
Figura 11. Acoplamiento con ligando (Nrf2) rígido realizado con AutoDock Vina que muestra a los aminoácidos que contribuyen en la interacción entre Nrf2 y Keap-1.....	46
Figura 12. Alineamiento de las secuencias proteicas cristalizadas homólogas a los IDR.....	48

Figura 13. Modelos de los péptidos IDR 1, 1002, 1018 y HH2 construidos por homología y diseñados con el programa Discovery Studio.....	49
Figura 14. Confórmeros de IDR-1002 interaccionando con Nrf2.....	51
Figura 15. Acoplamiento de los péptidos IDR generados <i>in silico</i> con Nrf2.....	52
Figura 16. Afinidad del motivo DLG de Nrf2 por los IDR.....	53
Figura 17. Afinidad del motivo ETGE de Nrf2 por los IDR sin hidrógenos polares con exhaustividad.....	53
Figura 18. Confórmeros obtenidos de la interacción de los IDR con Keap-1...	54
Figura 19. Comparación de la unión de Nrf2 con p21 y los IDR.....	55
Figura suplementaria 1. Ilustración esquemática del complejo Keap-1-Nrf2..	63
Figura suplementaria 2. Estructuras superpuestas de los complejos Nrf2/IDR-1002 y Nrf2/Keap1.....	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los péptidos IDR.....	14
Tabla 2. Aminoácidos que contribuyen en la interacción de Nrf2 con Keap-1..	43
Tabla 3. Afinidades de unión (kcal/mol) de Nrf2 con Keap-1.....	45
Tabla 4. Secuencias proteicas homólogas usadas para la construcción de los IDR.....	48
Tabla suplementaria. Tipos diferentes de análisis entre Nrf2 y los IDR.....	62

ABREVIATURAS

ARE	Elemento de respuesta antioxidante
BTB/POZ	Del inglés, Bric-a brac, tramtrack, broad-complex/poxovirus zinc finger
β -TrCP	Proteína adaptadora β -transducina
bZip	Zipper de leucinas
C	Citoplasma
CK2	Caseína cinasa 2
CNC	Factor de transcripción Cap-N-Collar
CTR	Región C-terminal
DGR	Repeticiones de doble glicina
DEMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DPP	Dipeptidil-peptidasa
ERC	Enfermedad renal crónica
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GSK-3 β	Glucógeno sintasa cinasa 3 beta
GST	Glutación S-transferasa
HEK293	Células de riñón de embrión humano 293
HO	Hemo-oxigenasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IDR	Péptidos reguladores de la defensa inmune innata
IKK	cinasa de I κ B
IRA	Insuficiencia renal aguda
IRC	Insuficiencia renal crónica
IVR	Del inglés, Intervening Region
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
Keap-1	Del inglés, Kelch-like ECH-associated protein 1
Maf	Muscular aponeurotic fibrosarcoma
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos

MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2-5 difeniltetrazol
N	Núcleo
Neh	Del inglés, Nrf2 ECH (chicken Nrf2) homologous domain
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NOX	NADPH oxidasa
NQO-1	NAD(P)H:quinona oxidoreductasa
Nrf2	Del inglés, Nuclear Factor Erythroid 2-related factor
O ₂	Oxígeno molecular
¹ O ₂	Oxígeno singlete
O ₃	Ozono
OH [·]	Radical hidroxilo
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PDB	Del inglés, Protein Data Bank
PDH	Péptidos de defensa del hospedero
PGAM	Fosfoglicerato mutasa
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PKC	Proteína cinasa C
p21 (WAF1/CIP1)	Inhibidor de cinasa 1 dependiente de ciclina
REAP	Del inglés, Rapid Easy and Practical
RXRα	Receptor de retinoides Xα
SFB	Suero Fetal Bovino
SN	Sobrenadante
T	Total
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
WB	Western Blot

RESUMEN

El término estrés oxidante se refiere a una condición cuando las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ERO) se elevan significativamente y sobrepasan la capacidad de las defensas celulares antioxidantes, lo que provoca alteraciones en la estructura y función de biomoléculas y con ello la probabilidad de desarrollar diversas enfermedades crónicas-degenerativas. El factor de transcripción Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor) es esencial en la expresión de genes que protegen a la célula contra el estrés oxidante. Su regulación ocurre principalmente por su asociación en el citoplasma con el complejo formado por la proteína Keap-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) y el complejo de ubiquitín ligasa E3 (formado por Cullin 3 y la proteína Rbx1) que le permiten a Nrf2, cuando hay concentraciones altas de ERO, separarse del complejo y translocarse al núcleo donde activará los genes citoprotectores antioxidantes. Se ha reportado que la ausencia de Nrf2 puede incrementar la producción de citocinas y con ello la inflamación, al favorecer la actividad del factor transcripcional NF- κ B. Los péptidos reguladores de la defensa inmunitaria innata (IDR) son péptidos sintéticos y catiónicos de doce aminoácidos derivados de péptidos de defensa de origen natural. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que IDR-1002 inhibe la translocación al núcleo de NF- κ B en macrófagos, lo cual sugiere que la inhibición de la actividad de NF- κ B por IDR-1002, podría modular también la actividad de Nrf2. Actualmente, el análisis molecular computacional es un método que permite a muy bajo costo y con aceptable efectividad analizar moléculas con potencial para inhibir la interacción de Keap-1 con Nrf2. Por lo tanto, en este trabajo se usó el modelado computacional para

analizar si los IDR podrían inhibir la interacción de Nrf2 con Keap-1 y se realizaron ensayos bioquímicos para obtener evidencia experimental de la activación de Nrf2, mediada por estos péptidos. Los resultados mostraron que los péptidos IDR 1002, 1018, 1 y HH2 inducen la acumulación nuclear de Nrf2, siendo IDR-1002 el péptido que mayor efecto inductor causó. Al reallizar los análisis de acoplamiento molecular, se observó que IDR-1002 es capaz de unirse a Nrf2 con afinidad alta y adoptar el mayor número de conformaciones físicamente cercanas a la zona de interacción de Nrf2 con Keap-1. Estos análisis indicaron que IDR-1002 bloquear la unión de ambas proteínas y con ello evitar la degradación de Nrf2, al promover al mismo tiempo su acumulación nuclear. Por otro lado, también se propone el estudio *in silico* de un fragmento peptídico de 18 aminoácidos proveniente de la proteína p21, debido a que esta proteína inhibe la interacción Nrf2-Keap-1 al competir con Keap-1 por su unión a Nrf2 y así favorecer su acumulación y actividad. Los péptidos IDR-1002 y el péptido derivado de la proteína p21 se proponen como fuertes candidatos para ser estudiados con mayor profundidad, con la finalidad de que puedan convertirse en biofármacos coadyuvantes en patologías que cursan con inflamación como la enfermedad renal crónica.

Palabras clave: Nrf2, Especies Reactivas de Oxígeno, Enfermedad Renal Crónica, Péptidos IDR, Análisis *in silico*.

ABSTRACT

Oxidative stress refers to a condition in which the concentration of reactive oxygen species (ROS) surpasses the capacity of antioxidant cellular defenses. This causes alterations in the structure and function of biomolecules and increases the probability of developing chronic degenerative diseases. Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor) is an essential transcription factor that induces the expression of genes against oxidative stress. Its regulation occurs mainly in the cytoplasm through its association with the protein Keap-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), and the E3 ubiquitin ligase complex (Cullin 3-Rbx1 proteins) that allows Nrf2 to separate from the complex and translocate to the nucleus when ROS concentrations are high. Lack of Nrf2 may increase production of pro-inflammatory cytokines by indirectly activating the NF- κ B transcription factor, leading to inflammation. The innate defense regulator (IDR) peptides are chemically synthesized and cationic constituted by twelve amino acids derived from defense peptides of natural origin. Previous studies in our laboratory showed that IDR-1002 inhibits the NF- κ B nuclear translocation in macrophages. These data suggest that the inhibition of NF- κ B activity by IDR-1002 may modulate the Nrf2 activity. Combination of biochemical experimental methods and *in silico* analysis has proved to be effective in the identification and characterization of compounds that inhibits/promotes the activity of proteins involved in important human diseases. Currently, computational chemistry analysis is a method that allows efficiently analyzing at low cost molecules that potentially inhibit the interaction of Keap-1 with Nrf2. Therefore, in this work the computational modeling was used to

analyze if IDR peptides acting as inhibitors in the interaction of Nrf2 with Keap-1 may interact in the interface of these two proteins. Moreover, biochemical assays were performed to obtain experimental evidence on the activation of Nrf2 mediated by these peptides. Results show that the IDR peptides 1002, 1018, 1 and HH2 induced the nuclear accumulation of Nrf2; however, IDR-1002 was the peptide with the highest inducing effect on Nrf2. *In silico* analysis showed, that IDR-1002 was able to bind Nrf2 with high affinity and adopt the highest number of conformations near the interaction zone of Nrf2 with Keap-1. These analyzes indicated that IDR-1002 may prevent binding of both proteins and thereby avoid Nrf2 degradation, while promoting its nuclear accumulation. On the other hand, we have also proposed the *in silico* study of an 18 amino acids peptide fragment (p21-18) from the p21 protein because data published indicate that this protein inhibits the Nrf2-Keap-1 interaction when competing with Keap-1 for its binding to Nrf2, favoring accumulation and activity of the later. In conclusion, peptides IDR-1002 and p21-18 are ideal candidates as biopharmaceuticals in pathologies that present inflammation such as chronic kidney disease.

MARCO TEÓRICO

1. Estrés oxidante y el factor de transcripción Nrf2

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se derivan del oxígeno molecular (O_2), ya sea como un producto de su ruptura o excitación, con lo cual se obtiene ozono (O_3) u oxígeno singlete (1O_2), o como el producto de una reducción parcial en la que se produce el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) (Coyoy y Morán, 2012). En la célula, la mayoría de las ERO son de origen endógeno y son un subproducto de reacciones normales como la generación de energía mitocondrial, las reacciones de detoxificación catalizadas por el citocromo P450, la degradación de los ácidos grasos de cadena larga, el catabolismo de purinas, la síntesis de leucotrienos o la actividad de la enzima NADPH oxidasa (NOX). Sin embargo, las ERO también son esenciales para regular procesos fisiológicos como el crecimiento celular, la diferenciación, la senescencia y la apoptosis (Coyoy y Morán, 2012). Entre los factores externos que inducen la generación de ERO se puede mencionar principalmente las infecciones por bacterias, hongos y virus, o los rayos UV (Castillo *et al.*, 2003).

En este contexto, el estrés oxidante, término acuñado inicialmente en 1985 por Helmut Sies, se refiere a una elevación de las concentraciones normales de ERO de tal magnitud que las defensas celulares antioxidantes no son suficientes, dando lugar a daños en un tejido (Sies 1985). Un estado celular de estrés oxidante puede causar daño al alterar la estructura o función de lípidos (por peroxidación de ácidos grasos), proteínas (por oxidación de aminoácidos) y ácidos nucleicos (por oxidación de bases nitrogenadas), lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial y apoptosis.

Estas alteraciones generalmente se asocian al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad, tales como el cáncer y trastornos neurodegenerativos y cardiovasculares. Además, el estrés oxidante está relacionado con diversas enfermedades crónicas, e incluso se ha argumentado que es una de las causas del envejecimiento celular (Reisman *et al.*, 2009).

El factor de transcripción Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor) es esencial en la expresión de genes que protegen a la célula contra los niveles anormales de ERO. Las primeras investigaciones de este factor transcripcional confirmaron su función como un activador de enzimas metabolizantes de fase II (antioxidantes y detoxificantes) de xenobióticos, como las enzimas NAD(P)H:quinona oxidoreductasa (NQO-1), glutatión S-transferasa (GST) y hemo-oxigenasa (HO) (Kundu *et al.*, 2008). En la actualidad se conoce que el sistema Nrf2 humano regula la expresión constitutiva de aproximadamente 645 genes y la expresión inducible de 654 genes (Malhotram *et al.*, 2010), que están relacionados en su mayoría con estrés oxidante, proteínas antioxidantes, enzimas detoxificantes de fases II, proteínas de transporte, subunidades del proteasoma, chaperonas, factores de crecimiento y sus correspondientes receptores, y algunos factores de transcripción, regulan procesos como apoptosis, hematopoyesis, metabolismo de lípidos, carbohidratos y supresión de la respuesta inflamatoria (Kobayashi, Yamamoto, 2005; Stepkowski *et al.*, 2011; Taguchi *et al.*, 2011; Hayes y Dinkova, 2014; Brian *et al.*, 2013; Tebay *et al.*, 2016; Kobayashi *et al.*, 2016). Es por ello, que se reconoce a Nrf2 como el regulador central de la respuesta antioxidante (Magesh *et al.*, 2012).

2. Estructura de Nrf2

Nrf2 pertenece a una familia de proteínas básicas que poseen un dominio de unión al ADN con estructura de zipper de leucinas (bZip) en la región C-terminal y posee un motivo conservado similar al del factor transcripcional de *Drosophila* denominado “cap-N-collar” (CNC) (Konigsberg, 2007). Se han incluido 4 proteínas de mamíferos dentro de esta familia: Nrf1, Nrf2, Nrf3 y NF-E2 p45, (Motohashi, 2004). Nrf1 y Nrf2 son ubicuos; sin embargo, Nrf2 muestra la actividad de transactivación más alta (Katoh *et al.*, 2001) y se expresa principalmente en órganos importantes para el metabolismo y la detoxificación como el hígado y el riñón, así como la piel, pulmón y el tracto digestivo (Motohashi, 2004). Nrf3 se expresa en placenta, células B y monocitos (Tebay *et al.*, 2016). Por último, NF-E2 p45 se expresa en tejido hematopoyético (Mignotte *et al.*, 1989).

La estructura de Nrf2 contiene siete dominios conservados, que se denominan Neh (Nrf2, ECH [chicken Nrf2] homologous domain), cada uno con función diferente. Neh1 contiene la región CNC y el zipper de leucinas (CNC-bZIP) para la unión al ADN y a las proteínas Maf pequeñas. Neh2 es el dominio que posee dos motivos, uno de alta afinidad (ETGE) y uno de baja afinidad (DLG) que se unen a Keap1. Neh3, Neh4 y Neh5 son dominios de transactivación. El dominio Neh6 posee una región rica en serinas que pueden ser fosforiladas por diversas cinasas y es una de las vías que funcionan para la regulación de Nrf2. Un dominio más de Nrf2, denominado Neh7, se ha propuesto que se une con un dominio de unión al ADN del receptor de retinoides X α (RXR α), evitando con ello el reclutamiento de dominios co-activadores Neh4 y Neh5 y causa la supresión de la actividad de Nrf2 (Wang *et al.*, 2013) **(Figura 1)**.

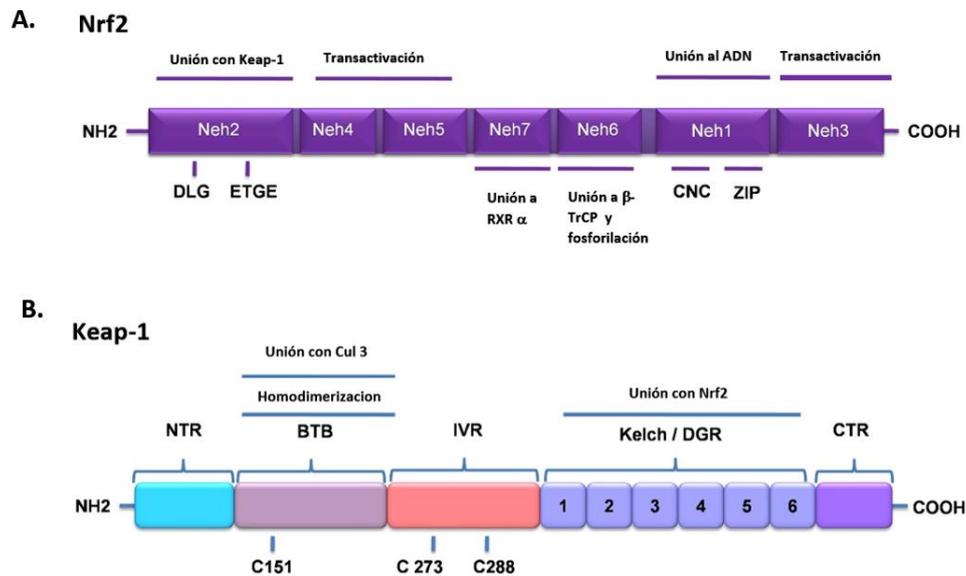


Figura 1. Representación de los dominios de Nrf2 y Keap-1 (modificado de Namani *et al.*, 2014).

3. Mecanismos de regulación de Nrf2.

El nivel de expresión y la función de Nrf2 pueden controlarse mediante varios mecanismos de regulación:

3.1 Regulación por distribución subcelular.

El mecanismo principal por el cual Nrf2 se regula está mediado por su asociación en citoplasma con el complejo formado por la proteína Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) y el complejo de ubiquitin ligasa E3 (formado por la Cullin 3 y la proteína Rbx1), que se encargan de suprimir en un 80% la translocación nuclear de Nrf2 mediante la ubiquitinación y su subsecuente degradación en el proteosoma 26S (Konigsberg, 2007; Itoh *et al.*, 1999).

La célula sintetiza y degrada a Nrf2 de manera constitutiva, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis *de novo* (Kensler *et al.*, 2007). Esta regulación es la más importante debido a que se activa por estrés oxidante y su pérdida de control está relacionada directamente con el desarrollo de un gran número de enfermedades. Esta vía regula alrededor del 1% al 10% de nuestros genes (Magesh *et al.*, 2012).

La proteína Keap1 posee 5 dominios; el dominio N-terminal (NTR); un dominio BTB/POZ (Bric-a brac, tramtrack, broad-complex/poxovirus zinc finger) que es un motivo evolutivamente muy conservado para interacciones con proteína y se encuentra presente en proteínas que unen actina y en factores de transcripción con dedos de zinc; además contiene el dominio Kelch que en ocasiones se denomina dominio de repeticiones de doble glicina (DGR); un dominio C-terminal (CTR) y la región intermedia (IVR), la cual se distingue por su alto número de residuos de cisteína. Keap1 es un homodímero que se ancla al citoesqueleto de actina, por medio del dominio Kelch que interacciona con Nrf2 en sus motivos DLG y ETGE, y por medio de su dominio BTB se une a la ligasa de ubiquitina Cul3 (**Figura 1**). Aproximadamente, el 4.3% de todos los residuos de aminoácidos de Keap1 son cisteínas, conteniendo así el doble de aminoácidos de este tipo que el promedio calculado al analizar otras proteínas (Byan *et al.*, 2012). Se ha observado por espectrometría de masa que la región comprendida entre el dominio BTB, IVR y Kelch de Keap1, es la zona que posee más cisteínas reactivas. Se ha determinado que son 27 residuos, pero siete de ellos (Cys151, Cys257, Cys273, Cys288, Cys297, Cys434 y Cys613), son especialmente reactivos (Magesh *et al.*, 2012) por lo que se proponen

como el principal mecanismo por el cual Keap1 es capaz de detectar tensiones electrofílicas u oxidativas al favorecer su oxidación (Bryan *et al.*, 2012). Además, cada uno de estos tioles de cisteína puede regular diferencialmente la expresión de genes anti-oxidantes de fase II (Satoh y Lipton, 2017). Se ha propuesto por ejemplo que Cys151 es importante en la expresión de genes regulados por Nrf2, mientras que Cys273 y Cys288 son más importantes en la represión basal de Nrf2. (Bryan *et al.*, 2012). Por ello, se ha postulado una hipótesis que hace referencia al "*código de cisteína*" que propone que diferentes clases de activadores de Nrf2 tienen preferencias únicas en la modificación de cisteínas específicas (Suzuky *et al.*, 2013).

Dependiendo entonces de cuál cisteína se oxide tendrá lugar a la estabilización de Nrf2 de dos maneras diferentes. Por un lado, puede provocar la separación de Keap1 con Cul3 o bien la separación de Keap1 con Nrf2, modelo de "*bisagra y cierre*" (Magesh *et al.*, 2012), por lo que el complejo ya no puede seguir mediando la degradación de Nrf2. Esto provoca la acumulación de Nrf2 en citoplasma y su translocación al núcleo, donde se une a las proteínas Maf pequeñas (muscular aponeurotic fibrosarcoma) MafF, MafG y MafK (Hsieh *et al.*, 2009), al formar un complejo activo que se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE, 5'-GTGACnnnGC-3') de la región promotora de los genes dependientes de Nrf2. El complejo Nrf2-Maf inicia entonces la transcripción de genes que codifican proteínas como: HO-1 (Hemo oxigenasa), NQO1 (NADPH: Quinona Oxidorreductasa 1) y GST (Glutation- S-Transferasa) (Motohashi *et al.*, 2004), por mencionar algunas (**Figura 2**).

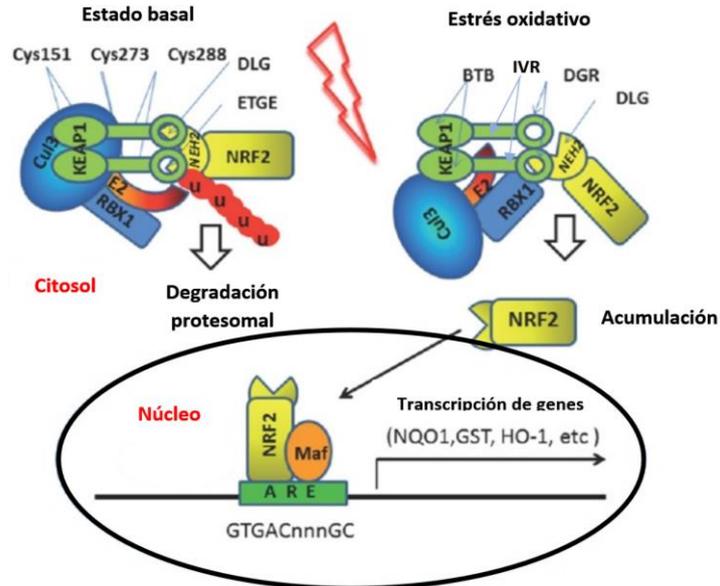


Figura 2. Regulación por distribución subcelular de Nrf2. En un estado basal Nrf2 está regulado negativamente por Keap1. Dos moléculas de Keap1 interactúan con una molécula de Nrf2 en dos sitios de unión, los motivos ETGE y DLG. Keap1 funciona como una proteína adaptadora de sustrato para el complejo E3-ligasa que contiene a la Cullin3 (Cul3) que se encarga de ubiquitinar a Nrf2 para ser así degradado en el proteosoma. En condiciones de estrés, Nrf2 se separa del complejo Keap-1-Cul3 y no puede ser degradado por lo que el Nrf2 sintetizado de novo se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo, funcionando como un factor transcripcional (modificado de Gazaryan & Thomas, 2016).

3.2 Regulación mediada por modificación postraduccional

La principal modificación postraduccional que experimenta Nrf2 es la fosforilación en sus residuos de serina, treonina y/o tirosina, que es catalizada por diversas proteínas cinasas como la glucógeno sintasa cinasa 3 beta (GSK-3 β), el fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), la proteína cinasa C (PKC) y proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Bryan *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2000).

3.2.1 Regulación por GSK3. El dominio Neh6 de Nrf2 contiene dos motivos conservados, DSGIS (334-338) y DSAPGS (373-378), los cuales son reconocidos por la proteína adaptadora β -transducina (β -TrCP) que forma un complejo con Cullin-1 y la ligasa de ubiquitina E3 (Rada *et al.*, 2011). El motivo DSGIS contiene dos residuos de Ser que pueden ser fosforilados por la GSK3

lo cual aumenta la capacidad de β -TrCP para reprimir a Nrf2 (Chowdhry *et al.*, 2013; Rada *et al.*, 2012; Rada *et al.*, 2011). GSK3 β es una proteína diana en múltiples cascadas de cinasas, como PI3K, Akt y MAPK (ERK, JNK). La activación de estas vías inhibe por fosforilación en sitios múltiples a la GSK3 β y esto promueve la estabilización de Nrf2 (Bryan *et al.*, 2012).

3.2.2 Regulación mediada por interacción con GSK3 β , Axin 1 y β -TrCP/Cullin 1 E3. Recientemente, se ha reportado que Nrf2 está regulado por la glicoproteína Wnt-3A a través de su interacción con GSK3 y AXIN1. La estabilización de Nrf2 y su posterior acumulación en citoplasma y núcleo se ve favorecida cuando algunas glicoproteínas de la familia Wnt se unen a sus receptores de membrana plasmática Frizzled y se inhibe la fosforilación de Nrf2 dependiente de GSK3 β , con lo cual se bloquea su ubiquitinación mediada por el complejo proteico SCF β -TrCP/Cul1-E3 y posterior degradación en el proteosoma 26S (Rada *et al.*, 2012; Rada *et al.*, 2013). Se ha propuesto un modelo de regulación dual entre la vía de regulación entre Nrf2-Keap1 y la vía regulada por la ubiquitinación de Nrf2 por medio del complejo SCF β -TrCP/Cul1-E3 ligasa que funcionan tanto en situaciones fisiológicas como de estrés oxidante.

3.2.3 Regulación por CK2. Nrf2 tiene aproximadamente 13 sitios potenciales (Ser/ Thr) para ser fosforilados por la caseína cinasa 2 (CK2) (Pi *et al.*, 2007). Por estudios *in vitro* se ha visto que los dominios Neh4 y Neh5 son dos regiones que pueden ser fosforiladas por CK2, lo cual provoca la translocación de Nrf2 al núcleo (Apopa *et al.*, 2008).

3.2.4 Regulación por PKC. Se ha demostrado que la proteína cinasa C (PKC) fosforila a Nrf2 en la Ser40 de su dominio Neh2, interrumpiendo la asociación

entre Nrf2 y Keap1, y promoviendo así la translocación de Nrf2 al núcleo (Huang *et al.*, 2002).

3.2.5 Regulación por MAP cinasas. Varios residuos de Ser/Thr de Nrf2 han sido identificados como sitios de fosforilación por varias MAPK (JNK1/2, ERK2, p38 y MEKK3/4) en células HEK293T. En general, la activación de JNK1 y ERK2 promueve la ruta Nrf2, mientras que la activación de p38 la inhibe (Huang *et al.*, 2015).

3.3 Otras formas de regulación

3.3.1 Acetilación. Los co-activadores transcripcionales p300/CBP que funcionan como acetilasas de histonas se pueden asociar a Nrf2 en respuesta al estrés oxidante. Esta asociación provoca la acetilación de residuos de lisina en la región de unión de Nrf2 (dominio Neh1) con el ADN, lo cual compromete la capacidad de Nrf2 para unirse al ADN (Bryan *et al.*, 2012).

3.3.2 Oncogenes. La activación de los oncogenes K-RasG12D, B-RafV619E y MycERT2 promueven la expresión del ARNm de Nrf2 y sus genes diana (DeNicola *et al.*, 2011). La regulación transcripcional positiva puede implicar la unión de Myc y Jun al promotor Nrf2, aunque no se conocen a detalle los mecanismos. La expresión de Nrf2 conduce a la reducción intracelular de ROS y puede proporcionar un entorno más favorable para la proliferación celular del tumor (Huang *et al.*, 2015).

3.3.3 Modificaciones epigenéticas de Nrf2. La transcripción de Nrf2 está suprimida en tumores de próstata de ratones TRAMP y células TRUMP-C1 tumorigénicas, debido a la hipermetilación de CpGs en el promotor de Nrf2. La metilación del ADN es reversible al tratarse con diferentes compuestos como 5-

aza-2'-desoxicitidina, tricostatina A, curcumina, tocoferoles o sulforafano [Huang *et al.*, 2015).

3.3.4 *MicroRNAs*. Los microRNAs que participan en la regulación de Nrf2 incluyen miR-144, miR-28, miR-200, miR-34, miR-153, miR-27 y miR-142-5, (Filipowicz *et al.*, 2008). La sobreexpresión de uno de ellos o de varios reduce los niveles de ARNm y proteína de Nrf2 (Bryan *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015)

3.3.5 *Proteínas que compiten por la unión de Keap 1–Nrf2*. Un estudio reciente identificó numerosas proteínas con motivos idénticos (o similares) al motivo ETGE de Nrf2, que puede competir con Nrf2 para la unión de Keap1, estabilizando así a Nrf2 (Komatsu *et al.*, 2010; Hast, *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2015). Existen proteínas que poseen un motivo STGE que les permite interaccionar y competir por su unión con Keap-1, evitando así la degradación de Nrf2 y favoreciendo su posterior acumulación. Algunas de estas proteínas son la dipeptidil-peptidasa (DPP) 3, IκB quinasa (IKK), la fosfoglicerato mutasa (PGAM) 5 y la proteína p62/SQSTM1 (Hayes y Dinkova-Kostova, 2014). El motivo STGE de p62 puede potencialmente competir con el motivo ETGE de NRF2. En consecuencia, la ubiquitinación de Nrf2 mediada por Keap1 es atenuada, y la estabilidad de Nrf2 aumenta. La evidencia experimental sugiere también que p62 tiene un papel en la regulación de la degradación de Keap1 por autofagia, alterando la capacidad de la célula para responder a diversas tensiones a través de esta vía (Bryan *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2015).

Además de unirse a Keap1, otras proteínas pueden asociarse con Nrf2. Por ejemplo, la proteína de reparación de ADN BRCA1 o la proteína p21Cip1/WAF1 (Hayes *et al.*, 2014). Esta última es una proteína inhibidora de una quinasa dependiente de ciclina, uniéndose e inhibiendo los complejos

CDK2 y CDK4, por lo que funciona como regulador del progreso del ciclo celular a nivel de la fase G1. Se ha visto que p21 contiene un motivo KRR que interacciona con los motivos DLG y ETGE de Nrf2 (Chen *et al.*, 2009) y a su vez la pérdida de p21 reduce sustancialmente los niveles basales e inducidos de proteína Nrf2 y sus genes diana en células HCT116 e hígado de ratón (Huang *et al.*, 2015).

4. Activación de Nrf2 como una alternativa terapéutica coadyuvante en la enfermedad renal crónica

El estrés oxidante y la inflamación se consideran la principal causa del desarrollo y la progresión de la enfermedad renal crónica (ERC) (Nezu *et al.*, 2017). Existen evidencias experimentales que implican a las ERO como mediadores primarios en la patogénesis del daño renal producido por procesos isquémicos, tóxicos y reacciones antígeno-anticuerpo. Las ERO producen lipoperoxidación de las membranas y orgánulos celulares, especialmente en segmentos del túbulo proximal generando daño a la integridad celular y alterando la capacidad de transporte celular y la producción de energía (Castillo *et al.*, 2003). Datos experimentales obtenidos de ratones con insuficiencia renal aguda (IRA) han mostrado que el daño se expande del túbulo renal a la médula y a la corteza, y la masa renal se reduce al quinto día con la infiltración de células inflamatorias y la muerte de las células tubulares. Para el día 14, la mayoría de los túbulos restantes están dañados (Nezu *et al.*, 2017) y el paciente desarrolla insuficiencia renal crónica (IRC). En contraste, el aumento de la actividad de Nrf2 en los túbulos renales disminuye el daño relacionado a IRA y previene la progresión de IRA a IRC (Nezu *et al.*, 2017). Además, se ha

demostrado que en el epitelio renal de embriones de ratón modificados incapaces de activar a Nrf2, el sistema tubular KEAP1-Nrf2 desempeña un papel crítico en la morfogénesis renal (Noel *et al.*, 2016).

Mientras que más personas son diagnosticadas con IRC en todo el mundo, los métodos convencionales para su tratamiento como la diálisis o el trasplante no son considerados la mejor solución para controlar la enfermedad ya que son muy costosos o ineficaces, por lo que la condición se considera un problema de salud pública que requiere una mayor investigación (Choi *et al.*, 2014). Es por ello, que el sistema Keap-Nrf2 se ha propuesto como un blanco terapéutico durante la infección renal crónica. Uno de los agentes inductores de Nrf2 que se han puesto a prueba en ensayos clínicos como agentes terapéuticos es el CDDO-metil éster o Bardoxolone, potente inductor de la vía Nrf2 cuyas propiedades se centraban en tratar la IRC avanzada en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. El aumento de la tasa de filtración glomerular en pacientes con enfermedad renal se atribuyó a este medicamento administrado a largo plazo; sin embargo, su estudio llegó hasta la fase 3 debido a problemas de seguridad (Nezu *et al.*, 2017). El estudio de posibles alternativas para mejorar la expresión de la proteína Nrf2 en células de riñón es un blanco terapéutico importante para la prevención y el control de la enfermedad renal.

5. Importancia de los péptidos en la defensa del hospedero

Se han reportado más de 2900 péptidos antimicrobianos derivados de fuentes naturales (Wang *et al.*, 2018) los cuales son componentes importantes de la respuesta inmune innata de los animales y vegetales. En los humanos este tipo

de péptidos (PDH) se clasifican, según tamaño, estructura y organización de sus aminoácidos en tres familias: defensinas, catelicidinas e histaninas (Rivas-Santiago *et al.*, 2006). Estos péptidos se caracterizan por tener una secuencia de entre 12 a 50 residuos, exceso de aminoácidos catiónicos que les confieren una carga positiva neta de +2 a +9 y además, son ricos en aminoácidos hidrofóbicos como Leu, Ile, Val, Phe y Trp (Hancock y Sahl, 2006). Estas características les permiten a los péptidos actuar sobre la membrana de los patógenos formando poros que llevan a la lisis del microorganismo, al inhibir la biosíntesis de la pared celular, la división celular o interfiriendo con procesos intracelulares uniéndose al ADN, ARN y ciertas proteínas (Haney y Hancock, 2012). La actividad biológica de los péptidos antimicrobianos a veces se pierde a concentraciones fisiológicas de sal, proteínas séricas, suero, lipoproteínas y/o glucosaminoglicanos (Hilchie *et al.*, 2013). Por ello, solo aquellos que pueden matar directamente a los microorganismos en condiciones fisiológicas se denominan péptidos antimicrobianos y aquellos que modulan el sistema inmunitario para promover la eliminación de patógenos con o sin actividad antimicrobiana en condiciones fisiológicas y simultáneamente detienen los efectos de la inflamación excesiva, se llaman péptidos de defensa del hospedero (PDH) (Wieczorek *et al.*, 2010). Los PDH se caracterizan por reducir los niveles de citocinas proinflamatorias producidas en respuesta a microorganismos, modular la expresión de quimiocinas para favorecer el reclutamiento de células inmunes, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, estimular la angiogénesis, mejorar la cicatrización de heridas, activar a los leucocitos, diferenciar a los leucocitos y macrófagos (Hilchie *et al.*, 2013) y

promover la actividad proapoptótica en células epiteliales y células T, y la actividad antiapoptótica en neutrófilos (Hancock *et al.*, 2016).

En general, los péptidos interactúan con receptores (Hilchie *et al.*, 2013), y pueden atravesar fácilmente la membrana plasmática, por lo que se unen a receptores intracelulares y esta unión conduce a la activación de múltiples vías de transducción de señales (NF- κ B, CREB1, HIF1 α , AP-1, AP-2 EGR1, PI3K, p38) (Hancock *et al.*, 2016), activando o desactivando más de 900 genes en macrófagos (Hilchie *et al.*, 2013). Como resultado de las propiedades multifuncionales de los PDH y la resistencia bacteriana creciente a los antibióticos convencionales, estas moléculas y sus derivados son candidatos potencialmente novedosos para administrarse como fármacos antiinfecciosos e inmunomoduladores terapéuticos, que presentan una baja o nula actividad bactericida directa (Hancock *et al.*, 2012). En la última década, ha habido un especial interés por diseñar y desarrollar péptidos sintéticos, tomando como referencia las características de los PDH naturales. Una clase de péptidos sintéticos con actividad antiinflamatoria demostrada la constituyen los péptidos IDR (reguladores de la defensa inmune innata) los cuales son derivados de la familia de las catelicidinas propiamente de la bacterenecina bovina (Wu y Hancock, 1999), la cual consta de 12 aminoácidos y a través de sustituciones puntuales, aleatorias y eliminaciones de aminoácidos, se fue iterativamente probando su capacidad de estimular la respuesta inmune y erradicar a los microorganismos durante las infecciones bacterianas (**Tabla 1**).

Tabla 1. Secuencias de los péptidos IDR.

IDR	Secuencia
1018	V-R-K-I-V-A-V-R-I-W-R-R-NH ₂
HH2	V-G-L-R-I-R-I-V-A-V-I-R-A-NH ₂
1002	V-G-R-W-L-I-V-W-R-I-R-L-NH ₂
1	K-S-R-I-V-P-A-I-P-V-S-L-L-NH ₂

Se ha demostrado que los péptidos IDR-1002, IDR-1018 e IDR-HH2 pueden inducir protección contra infecciones bacterianas tanto para bacterias Gram+ como Gram-, por medio de mecanismos inmunomoduladores que inhiben la desgranulación de neutrófilos mediada por LPS, la generación de ERO y la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α y IL-10 (Niyonsaba *et al.*, 2013) sin tener acción directa contra los microorganismos (Rivas-Santiago *et al.*, 2013). Además, estos péptidos causan una disminución de los efectos proinflamatorios causados por los productos microbianos, limitando la inflamación potencialmente dañina (Turner-Brannen *et al.*, 2011; Niyonsaba *et al.*, 2013).

El péptido IDR-1 actúa sobre la respuesta inmune innata del huésped. Se ha demostrado que IDR-1 mejora la inducción de quimiocinas, específicamente MCP-1, que favorece la acumulación de monocitos y macrófagos en infecciones sistémicas de bacterias multirresistentes en modelos de ratón y en células mononucleares de sangre periférica humana, y suprime las citocinas proinflamatorias estimuladas por LPS (TNF- α) (Niyonsaba *et al.*, 2013).

El péptido IDR-1002 fue identificado como potente inductor de las quimiocinas MCP-1, MCP-3, CXCL1, IL-8 y es capaz de potenciar la migración de leucocitos, neutrófilos PMN, monocitos y macrófagos al sitio de infección causada por *S. aureus* y *Escherichia coli* en ratones (Haney y Hancock, 2012; Niyonsaba *et al.*, 2013) además de proteger contra infecciones por *M. tuberculosis* (Rivas-Santiago *et al.*, 2013) e inhibir la translocación nuclear de Nf -KB (Huante *et al.*, 2016).

El péptido IDR-1018, tiene actividad antibacteriana baja, pero su capacidad inductora de quimiocinas (MCP-1 y MCP-3) es muy fuerte, lo que lleva a la supresión de TNF- α inducida por LPS en células mononucleares de sangre periférica. Algunas de las funciones que promueve este péptido son la diferenciación de los macrófagos humanos, la cicatrización de heridas, anti-malárico y protege contra las infecciones pulmonares (Haney y Hancock, 2013) causadas por cepas resistentes a múltiples fármacos como *S. aureus*, *Plasmodium berghei* y *M. tuberculosis* en ratones (Rivas-Santiago *et al.*, 2013; Niyonsaba *et al.*, 2013).

El péptido IDR-HH2 modula la adhesión de neutrófilos y marcadores de activación y también es un potencial adyuvante para vacunas (Niyonsaba *et al.*, 2013) y para el tratamiento de infecciones causadas por *M. tuberculosis* según se ha propuesto a partir de estudios realizados en ratones (Rivas-Santiago *et al.*, 2013).

Dadas las propiedades terapéuticas de los péptidos, los PDH representan una excelente opción para ser desarrollados como tratamientos farmacológicos en el control de enfermedades infecciosas y no infecciosas que cursan con procesos inflamatorios, por su seguridad y tolerabilidad, además de su baja complejidad de producción y costo.

6. Fármacos derivados del modelado molecular

La búsqueda de nuevas moléculas inductoras de Nrf2 en los últimos años se ha visto impulsada por el desarrollo de ensayos *in silico* que han proporcionado un modelo para la identificación de nuevas moléculas pequeñas activadoras de

Nrf2, con potencial terapéutico. El modelado molecular utiliza conceptos teóricos y computacionales para estudiar la estructura y el comportamiento de las moléculas cuyas estructuras tridimensionales se conocen o bien, su estructura tridimensional puede ser generada *in silico* a partir de una predicción (Pérez *et al.*, 2008). Esto conlleva a utilizar las denominadas técnicas de docking que nos permiten conocer la interacción de moléculas pequeñas (ligando) con macromoléculas biológicas (receptores) así como la conformación preferida de un ligando respecto a su receptor para adoptar una conformación estable y la afinidad de unión de la interacción, la cual es más fuerte cuanto menor es la interacción. Esto se logra mediante programas que cuentan con un importante componente matemático, para crear modelos tridimensionales de receptores y ligandos en computadora, estudiando así sus preferencias conformacionales, la naturaleza y magnitud de las fuerzas interatómicas que gobiernan su interacción, y analizando el comportamiento dinámico de cada molécula por separado y de sus respectivos complejos (Pérez *et al.*, 2008).

Un protocolo de acoplamiento molecular (docking) se caracteriza tradicionalmente por dos aspectos: el docking o método seguido para muestrear el espacio conformacional del complejo ligando-receptor y la función de *scoring* utilizada para evaluar la afinidad de la interacción ligando-macromolécula. Este tipo de análisis trae consigo ciertas ventajas al compararlo con otros métodos para descubrir moléculas con potencial terapéutico. Algunas de las ventajas son su bajo costo, reducción de tiempo de investigación y la comparación entre teoría y datos experimentales, permitiendo así tener en cuenta un gran número de compuestos *in silico*. En este sentido se ha visto que los trabajos computacionales dirigidos para encontrar pequeñas

moléculas inhibitoras de la interacción de Keap-1 con Nrf2, ya sea por *scoring* en bases de datos o por generación *in silico* de la molécula, se han realizado con éxito encontrando así agentes farmacológicos potenciales específicos (Jiang *et al.*, 2015) como el caso del inhibidor ML334 (Hu *et al.*, 2013) o el inhibidor Cdp16 (Marcotte *et al.*, 2016) por mencionar algunos.

JUSTIFICACIÓN

La inflamación y el estrés oxidante están estrechamente relacionados. Por un lado, la activación de las células que regulan la inflamación, especialmente las células fagocíticas, da como resultado un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno, que causa estrés oxidante, daño tisular y el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Por el otro, las ERO, favorecen la activación de factores de transcripción y de cascadas de señalización intracelular, siendo el factor nuclear kappa B (NF-κB) un regulador muy importante que se encarga de iniciar y perpetuar la respuesta inflamatoria. En este contexto, Nrf2, un regulador central de la expresión de los genes antioxidantes, es ampliamente visto como una molécula anti-inflamatoria. De hecho, la deficiencia de Nrf2 agrava la fisiopatología de los trastornos inflamatorios mientras que la activación de Nrf2 resulta frecuentemente en la supresión del estrés inflamatorio y la consecuente lesión de tejido. Se ha reportado que la ausencia de Nrf2 puede incrementar la actividad de NF-κB, permitiendo el incremento en la producción de citocinas y con ello la inflamación, a pesar de que NF-κB puede modular la actividad transcripcional de Nrf2. Recientemente, en nuestro laboratorio se demostró que IDR-1002 inhibe en macrófagos la translocación de NF-κB al núcleo. Estos datos

sugieren que la inhibición de la actividad de NF- κ B por IDR-1002, podría modular también la actividad de Nrf2.

El descubrimiento y desarrollo de inhibidores de la interacción entre Keap-1 y Nrf2 es importante como una estrategia para el tratamiento o prevención contra varias enfermedades como lo es la enfermedad renal crónica. Actualmente, se están desarrollando varios métodos para activar selectivamente a Nrf2 al inhibir la interacción de Keap-1 con Nrf2. Uno de estos métodos de bajo costo y muy eficiente consiste en el análisis molecular por computadora de las regiones de interacción entre Keap-1 y Nrf2, con la idea de diseñar moléculas con especificidad y afinidad alta. Se ha demostrado que los inhibidores de la interacción Keap 1-Nrf2 son más efectivos que los dirigidos a las cisteínas de Keap 1, tal es el caso de las moléculas orgánicas de bajo peso molecular, así como péptidos cuyas secuencias se derivaron de los motivos DLG o ETGE del dominio Neh2 de Nrf2. De acuerdo con el análisis *in silico*, el dominio de interacción de Nrf2 con Keap-1 es aniónico debido a la presencia de los residuos aspartato y glutamato. Por lo consiguiente, es probable que los péptidos catiónicos IDR puedan interaccionar con los motivos DLG o ETGE de Nrf2 y promover así la separación de Keap 1 y la translocación al núcleo de Nrf2, donde ejercería su actividad transcripcional.

Por los antecedentes expuestos, en este trabajo se propuso utilizar el modelado computacional para analizar la estructura de los péptidos IDR y su posible acoplamiento (docking) al dominio de interacción de Nrf2 con Keap 1. Tal estudio teórico *in silico* se complementará además con ensayos para obtener evidencia experimental de la acumulación de Nrf2 en el núcleo, activada por estos péptidos. Estos dos enfoques, teórico y experimental,

conducirán a la identificación y caracterización de una molécula que coadyuve a la activación y translocación al núcleo de Nrf2, debido a que este factor es esencial para aumentar la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes, en respuesta al estrés oxidante.

La regulación de procesos fisiológicos con la administración de moléculas que mejoren las funciones celulares, al suprimir o controlar patologías degenerativas infecciosas, inmunológicas y/o inflamatorias derivadas del estrés oxidante, representaría un avance biotecnológico importante y tendría un impacto significativo en la calidad de vida del humano.

HIPÓTESIS

Los péptidos reguladores de la respuesta inmune innata (IDR) 1, 1002, HH2 y 1018 activan la translocación al núcleo del factor de transcripción Nrf2 en células epiteliales de riñón HEK 293.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los péptidos IDR sobre la actividad del factor de transcripción Nrf2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la toxicidad de los péptidos IDR en células HEK 293 estimuladas con péptidos IDR.

2. Determinar la abundancia relativa citoplásmica y nuclear de Nrf2 en células HEK 293 estimuladas con péptidos IDR.
3. Analizar *in silico* la interacción de Nrf2 y Keap-1.
4. Evaluar *in silico* el acoplamiento molecular (docking) de los péptidos IDR con Nrf2.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudio bioquímico experimental

1.1 Péptidos

Los péptidos IDR 1 (KSRIVPAIPVSSL-NH₂), HH2 (VGLRIRIVAVIRA-NH₂), 1002 (VGRWLIVWRIRL-NH₂) y 1018 (VRKIVAVRIWRR-NH₂) son sintéticos y están amidados en el carboxilo terminal. Estos péptidos fueron gentilmente donados por el Dr. Robert EW Hancock (University of British Columbia, Vancouver, Canadá) por acuerdo de colaboración con el Dr. Víctor M. Baizabal Aguirre.

1.2 Línea celular HEK 293

Los experimentos se realizaron en la línea celular HEK 293 (ATTC-CRL1573) que proviene de células embrionarias de riñón humano (HEK, Human Embryonic Kidney). Estas células están transformadas con ADN adenoviral tipo 5 (Graham *et al.*, 1977) y cuentan con el gen adenoviral E1 integrado en su genoma, por lo que permite la replicación viral de adenovirus recombinante, que carece de la región E1.

1.3 Medio DMEM para el cultivo de la línea celular HEK 293

El medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (SIGMA No. Cat. D-5523) se disolvió en 950 mL de H₂O desionizada estéril, con agitación suave y en frasco estéril, se le añadió 20 mM de HEPES, y el pH se ajustó a 7 con HCl 1N o con NaOH 1N y se aforó a un litro. El medio de cultivo se esterilizó por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa con poro de 0.22 µm (Milipore) y se etiquetó como medio incompleto.

Para preparar el medio completo en condiciones de esterilidad, el medio de cultivo incompleto se suplementó con 10% de suero fetal bovino (SFB) (SFB Equitech-Bio), 1% de glutamina (GIBCO No. catálogo 35050-061) y 1% de antibiótico (penicilina y estreptomicina) (GIBCO No. catálogo 15240-062). El medio se esterilizó por filtración y se distribuyó en frascos estériles. Los frascos con medio se almacenaron a -20°C hasta su uso.

1.4 Descongelación y resiembra de la línea celular HEK293

El criovial con las células congeladas HEK 293 en nitrógeno líquido, fue descongelado rápidamente a 37°C. Una vez que la suspensión de células estuvo completamente líquida, se centrifugó el vial 5 min a 250 x g se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de medio DMEM completo. Las células se transfirieron a una caja de cultivo para células (CORNING 100 x 15 mm No. catálogo 430167) que contenía 9 mL de medio completo. Las células se incubaron a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂, y 95% aire. Se monitoreó el crecimiento de las células, haciendo los cambios de medio necesarios, retirando el medio, lavando con 5 mL de PBS 2 veces y añadiendo nuevamente medio completo. Cuando las células llegaron a una confluencia del 85-90% se

lavaron con PBS y se añadió 1 mL de tripsina al 0.05 % (CAISSON No. catálogo TRL04-100 mL) se incubó a 37°C por 3 min y se añadió 4 mL de medio completo; se recolectaron las células en un tubo de fondo cónico de 15 mL y se centrifugó por 5 min a 250 xg. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 5 mL de medio completo, se procedió a contarlas y se ajustó la cantidad de células requeridas por caja. Al final se completó la cantidad de medio a 10 mL y se incubaron las células a 37°C, con atmósfera de 5% de CO₂, y 95% aire.

1.5 Mantenimiento de la línea celular HEK 293

El cultivo de la línea celular HEK 293 se mantuvo en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) más 1% de glutamina y 1% de antibiótico (penicilina y estreptomina), a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ hasta llegar a una confluencia de 85-90%.

1.6 Análisis de la toxicidad de los péptidos IDR

La actividad hemolítica de los péptidos IDR 1002, HH2, 1018 y 1 se determinó en eritrocitos humanos. Se obtuvieron 4 muestras de sangre total en presencia de 0.2 mg/ mL de EDTA y el paquete celular se lavó 4 veces con PBS por centrifugación a 1120 xg durante 5 min. La pastilla celular se resuspendió en PBS, restituyendo el volumen original de la muestra sanguínea, lo que se consideró como una suspensión de eritrocitos del 100%. El volumen final del ensayo hemolítico fue de 200 µl con 1% de eritrocitos más los péptidos a las concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 µg/ mL en tubos Eppendorf. En estos ensayos se incluyeron los controles siguientes: un control negativo sin péptido y un control positivo con 1% de Tritón X-100 sin péptido. Este último control se

realizó en 7 diluciones dobles seriadas para obtener la curva estándar de hemólisis y realizar los cálculos necesarios. Para determinar la cantidad de hemoglobina liberada, las mezclas se incubaron a 37°C por 1 h, se centrifugaron a 1120 xg por 5 min, se colocaron 100 µl en una placa de 96 pozos (Corning No. de Catálogo 3598) y se midió la absorbencia del sobrenadante a 540 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Varioskan Lux. La integridad de los eritrocitos se calculó con respecto a la curva de hemoglobina total liberada (control positivo). Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

1.7 Evaluación de la viabilidad celular

La viabilidad de las células se determinó por ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT, SIGMA No. de Catálogo M2128-250MG). La reducción metabólica del MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa da lugar a la formación de un compuesto de color azul llamado formazan, que permite determinar la función mitocondrial de las células tratadas. La técnica consistió en sembrar 2×10^4 células por pozo en una caja de 96 pozos (Corning No. de Catálogo 3598) en un volumen final de 100 µl de medio DMEM completo. Las células se incubaron 24 h para permitir su adherencia y el medio DMEM completo se cambió con extremo cuidado para evitar desprender las células por medio DMEM incompleto. Se procedió a incubar las células por 4 h y se añadieron los péptidos IDR 1002, 1018, HH2 y 1 a las concentraciones de 10, 35 y 50 µg/ mL . Se incluyó un control positivo sin estímulo y uno negativo de medio DMEM sin células. Los controles y ensayos se incubaron por 24 y 48 h, al término del cual se añadieron 10 µl de MTT (5 mg/mL) a cada pozo y se incubó por 4 h. El sobrenadante se retiró y se

añadieron 100 µl de solución SDS al 10 % a cada pozo para disolver los cristales de formazan. La concentración de formazan se determinó por absorbencia a 570 nm, obtenida en el espectrofotómetro Thermo Scientific Varioskan Lux en 100 µl de las muestras colocadas en una placa de 96 pozos (Corning No. de Catálogo 3598). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

1.8 Estimulación de células HEK293 con los péptidos IDR 1, HH2, 1002 y 1018

Los experimentos se realizaron con células confluentes al 85-90% en cajas de 6 pozos en medio DMEM incompleto (sin suero, glutamina y antibiótico). Después de 4 h de incubación se agregan por separado 10, 20 o 35 µg/mL de los péptidos IDR-1002, 1018, 1 y HH2, o 10 µg/mL de los péptidos IDR-1002, 1018, 1 y HH2, o 7 y 50 µM de los péptidos IDR 1002 y 1018.

Las células se incubaron por 1 h y se recuperó la proteína (ver apartados Extracción de proteína y Extracción de proteína total, citoplásmica y nuclear). La proteína se cuantificó por la técnica de Bradford con albúmina sérica de bovino como referencia. Como control negativo las células HEK293 se incubaron sin estímulo.

1.9 Extracción de proteína

La proteína de células HEK293 control y tratadas con 0, 10, 20 y 35 µg/mL de los péptidos IDR 1002, 1018, 1 y HH2 se obtuvo colocando en hielo la caja de cultivo que contenía las células y se lavaron las células 2 veces con 1 mL de PBS frío (4°C). Después, a cada pozo se añadieron 80 µl de buffer de lisis frío (20 mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Igepal CA-930, 10 mM de

pirofosfato de sodio, 50 mM de fluoruro de sodio y 1mM de orto-vanadato de sodio) suplementado con 1X de inhibidor de proteasas (Roche No. de catálogo 04693116001) e inhibidor de fosfatasas (Sigma No. de catálogo P-5726). La proteína se recuperó raspando cada pozo con ayuda de una espátula de plástico y los 80 µL se depositaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. El lisado obtenido se centrifugó a 4500 xg por 20 min a 4°C, el sobrenadante se recuperó y se conservó en congelación (-20 ° C) hasta su uso.

1.10 Extracción de proteína total, citoplásmica y nuclear

Se procedió de acuerdo con el protocolo REAP (Rápido, Eficiente Y Practico) descrito por Suzuki *et al.*, (2010) para separar la proteína total, citoplasmática y nuclear de las células tratadas con 10 µg/mL de los péptido IDR-1002, 1018, 1 y HH2 y, 7 o 50 µM de los IDR 1002 y 1018. Las células contenidas en cajas de Petri (Corning 30 x 10 mm, No. de catálogo 430165) y a una confluencia de 85 a 90% se colocaron en hielo y se lavaron con PBS frío; la proteína se recuperó con 1 mL de PBS frío con ayuda de una espátula de plástico. El homogenado se depositó en un tubo de 1.5 mL, se centrifugó con un pulso y después de descartar el sobrenadante se añadió 1 mL de PBS-NP40 al 0.1% frío (10 mL de PBS 10X, 1 mL de NP40 al 10%, 89 mL de agua) y se homogenizó. Una alícuota de 200 µL se transfirió a otro tubo y se etiquetó como total (T). Los 800 uL restantes del homogenado se centrifugaron a un pulso. Del sobrenadante (SN) se tomó una alícuota de 200 µL y se etiquetó como citoplasma (C); el SN se desechó y se añadió 1 mL de PBS-NP40 0.1% frío a los 600 µL restantes de la muestra principal. Se procedió a centrifugar a un pulso y el SN se desechó. La pastilla se resuspendió en 80 µL de PBS-NP40 0.1% frío y se etiquetó como núcleo (N). Las fracciones correspondientes a el total (T) y el núcleo (N) se

sonicaron 10 segundos, en 2 pulsos de 5 segundos cada una y 25% de amplitud. A todas las muestras se les adicionó inhibidor de proteasas y fosfatasas al 2%. Las muestras se conservaron en congelación a - 20°C hasta su uso.

1.11 Detección de Nrf2 por ensayo tipo Western Blot

La abundancia relativa de Nrf2 en células control y estimuladas con los péptidos IDR (1, 1002, 1018 y HH2) se determinó por ensayos tipo Western blot (WB). Para esto, se procedió primero a separar las proteínas de las diferentes fracciones (total, nuclear y citoplasmática) por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes SDS-PAGE al 10% a voltaje constante de 200 V en 25 mM de Tris, 192 mM de glicina y 0.05% SDS a 4°C por 1 h. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTAN–PERKIN ELMER No.de catálogo NBA085C001EA) a corriente constante de 250 mA por 1 h en amortiguador de transferencia frío (25 mM de Tris, 192 mM de glicina y 15% de metanol) y en agitación. Al término de la transferencia, las membranas se colocaron en una solución de bloqueo compuesta de leche descremada (Bio-Rad) al 5% p/v en TTBS (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.9% NaCl p/v y 0.1 % de Tween-20) en agitación constante por 1 h.

Para detectar la abundancia relativa de Nrf2 en los extractos totales y enriquecidos en proteína citoplasmática y nuclear, se usó el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-Nrf2 (Santa Cruz, sc-722) a una dilución 1:300 en solución de bloqueo. Como control de carga se detectó β -actina con anticuerpo policlonal de ratón (Santa Cruz, sc-47778) a una dilución 1:2500 en solución de

bloqueo. Para los extractos obtenidos por fraccionamiento celular se usó también el anticuerpo primario de cabra anti-laminina A/C (Santa Cruz, sc-6215) a una dilución 1:100. Las membranas que contienen las proteínas separadas se incubaron en agitación constante a 4°C con los anticuerpos primarios durante toda la noche (18 h). Las membranas se lavaron con agua destilada y TTBS a temperatura ambiente (3 lavados de 10 min c/u). Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios a una dilución de 1:1000. Para detectar Nrf2 se usó el anticuerpo de cabra anti-IgG-HRP de conejo (Santa Cruz, sc-2004); para β -actina el anticuerpo IgG de cabra anti-IgG-HRP de ratón (Santa Cruz sc-2031) y para laminina A/C el anticuerpo IgG de conejo anti-IgG -HRP de cabra (Santa Cruz, sc-2768). Las membranas se lavaron con agua destilada y TTBS (3 lavados de 10 min c/u) y para generar la señal de quimioluminiscencia se empleó el kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Billerica, MA, USA). La quimioluminiscencia se detectó con ayuda del equipo LI-COR donde se expusieron las membranas por 12 min.

1.12 Análisis estadístico

Las señales obtenidas de los ensayos tipo Western Blot se analizaron por densitometría en el programa Image J versión 1.50i (imagej.nih.gov/ij/). Las unidades densitométricas se calcularon mediante la obtención del cociente que relaciona los valores numéricos de la intensidad de la banda correspondiente a la proteína de interés entre la intensidad de la banda utilizada como control de carga. Cada resultado fue comparado con la condición control, se calculó la media y la desviación estándar $n= 3$ como mínimo y se obtuvo el resultado

estadístico utilizando el programa GraphPad Prism 7. En todos los casos se consideró P menor de 0.05 como significativo.

2. Estudio teórico-computacional

2. 1 Ensayo control de la interacción entre Nrf2 y Keap-1

La interacción entre las proteínas Nrf2 y Keap-1 fue reportada en varios trabajos (Tong et al., 2007; Fukutomi et al., 2014; Lo et al., 2006 y Padmanabhan et al., 2006); sin embargo, para validar nuestro trabajo llevamos a cabo un análisis control *in silico* de dicha interacción de la manera siguiente: primero se obtuvo la secuencia canónica de aminoácidos de la proteína Nrf2 de humano, reportada en la base de datos UniProt (UniProtKB-Q16236-1, NF2L2_HUMAN) y se identificaron las estructuras cristalizadas reportadas de las proteínas Nrf2 y Keap-1 en formato PDB de la base de datos Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). La secuencia canónica de Nrf2 se tomó como secuencia de referencia para los posteriores alineamientos con las secuencias de aminoácidos de los fragmentos cristalizados de Nrf2 para identificar a que dominios correspondían. Los alineamientos se llevaron a cabo con el programa Mega Versión 6. Una vez identificados los fragmentos y a cuál dominio y motivos de Nrf2 pertenecían, se seleccionaron los PDBs con el mayor número de aminoácidos de la proteína Nrf2 y solo uno para cada motivo identificado. De acuerdo a lo reportado previamente en la bibliografía se identificaron los aminoácidos críticos para la interacción de Nrf2 y Keap-1 y se analizaron con el programa Discovery Studio.

Los fragmentos proteicos de las estructuras cristalizadas seleccionadas de Nrf2 y Keap-1 se separaron con el programa Discovery Studio y se guardaron sin moléculas de agua en formato PDB, en archivos separados. Para recrear la interacción entre Nrf2 y Keap-1 se utilizó el programa AutoDock Vina 1.1.2. A las estructuras proteicas guardadas como PDB se les añadieron los hidrógenos polares y se guardaron en formato pdbqt. Tomando a Keap-1 como el receptor y a Nrf2 como ligando, se llevó a cabo el análisis con el ligando rígido y flexible. El sitio de acoplamiento para el receptor y el ligando se definieron estableciendo una región con una dimensión suficiente para cubrir completamente a la proteína receptora. Se llevó a cabo el acoplamiento con el programa AutoDock Vina 1.1-2 para obtener el complejo receptor–ligando en un solo archivo y la afinidad con la que se enlazan Keap-1 y el fragmento Nrf2. Posteriormente se analizaron las interacciones de Nrf2-Keap-1 obtenidas y se compararon con los datos reportados en la literatura.

2.2 Construcción *in silico* por homología de péptidos IDR

Para la construcción de los péptidos IDR en las bases de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>) o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/) se buscaron proteínas con secuencias homólogas a la secuencia de los péptidos IDRs, y se seleccionaron aquellas que comprendían el mayor número de aminoácidos homólogos y poseían esa secuencia cristalizada. Se tomaron los fragmentos homólogos a los IDR con ayuda del programa Discovery Studio, y se procedió a introducir mutaciones o añadir aminoácidos, empezando por el extremo amino y luego el carboxilo, analizando cada cambio de aminoácido en el gráfico de Ramachandran para verificar la ubicación de los aminoácidos y la

conformación del péptido IDR que se iba generando. Se guardó el archivo del péptido generado *in silico* en formato PDB.

2.3 Acoplamiento de los péptidos IDR generados *in silico* con Nrf2

Para la generación de los confórmeros de los IDR con Nrf2, se ingresó el fragmento cristalizado de la proteína receptora Nrf2 al programa AutoDock 1.5.6 y se agregaron previamente todos los hidrógenos polares. El archivo modificado se guardó en formato pdbqt. Como ligando se tomó a cada uno de los IDR (1, 1002, 1018, y HH2) modelados *in silico* en conformación flexible y se guardaron en formato pdbqt. Se ajustó la zona de interacción en coordenadas x, y, z, de acuerdo al programa, cubriendo al receptor en su totalidad y se realizó el acoplamiento molecular con y sin exhaustividad de 20 en el programa Autodock Vina 1.1.2. De cada IDR se generaron 9 confórmeros. Posteriormente, se realizó nuevamente el acoplamiento con Nrf2 para cada uno de los 9 confórmeros de los IDR obtenidos en el paso anterior, pero ahora en conformación rígida. Se llevó a cabo este segundo acoplamiento con ligando rígido para identificar las zonas de interacción, los tipos de enlace y para obtener el valor *in silico* de la afinidad.

2.4 Análisis *in silico* del acoplamiento molecular de los péptidos IDR con Keap-1

En el programa AutoDock 1.5.6 se ingresó el fragmento de la proteína Keap-1 (obtenido de cualquiera de los PDBs seleccionados en el apartado Materiales y Métodos 2.1) como molécula receptora y se le añadieron todos los hidrógenos polares, como ligando se realizaron análisis por separado, usando los péptidos IDR modelados (ver apartado Materiales y Métodos 2.2). El análisis se hizo con

el ligando flexible (péptidos IDR) y ambos archivos de receptor y ligando se guardaron en formato pdbqt. Se ajustó la zona de interacción del ligando con el receptor en coordenadas x, y, z, de acuerdo al programa, cubriendo al receptor en su totalidad y se realizó el acoplamiento molecular sin exhaustividad en el programa AutoDock Vina 1.1.2. Posteriormente, se identificaron las zonas, los aminoácidos y los tipos de enlace de interacción en el programa Discovery Studio.

2.5 Identificación *in silico* de un péptido basado en un fragmento de la proteína P21 con potencial efecto sobre la activación de Nrf2

Se descargó la estructura cristalizada de la proteína p21 (WAF1/CIP1) de la base de datos Protein Data Bank, la cual se encontró formando un complejo con la proteína PCNA (Antígeno nuclear de células en proliferación, PDB 1AXC). Se separaron los fragmentos correspondientes a la proteína Nrf2 (PDB 3WN7) y el fragmento de la proteína P21 en el programa Discovery Studio y se guardaron en formato PDB sin moléculas de agua.

En el programa AutoDock 1.5.6 se prepararon las moléculas. Se le añadieron los hidrógenos polares a Nrf2 y se hizo interaccionar con el fragmento cristalizado de la proteína p21 (ligando) al que también se le añadieron los hidrógenos polares y se trabajó en conformación flexible. Ambos archivos, receptor y ligando se guardaron en formato pdbqt. Para conocer la afinidad de unión de las proteínas, el campo de interacción se ajustó para cubrir completamente al receptor en coordenadas x, y, z y se realizó el análisis de acoplamiento en el programa AutoDock Vina 1.1.2. Los 9 confórmeros de p21 obtenidos de la interacción con Nrf2 se volvieron a preparar en AutoDock 1.5.6,

pero ahora con el ligando en conformación rígida. El campo de interacción se ajustó para cubrir completamente al receptor en coordenadas x , y , z , y se realizó el acoplamiento molecular sin exhaustividad en el programa AutoDock Vina 1.1.2. Se obtuvo la afinidad de cada conformero de p21 con Nrf2, se identificaron las zonas de interacción, los aminoácidos y los tipos de enlace involucrados.

RESULTADOS

A continuación, se describen los resultados obtenidos en este trabajo para cumplir con los objetivos planteados.

1 Estudio bioquímico experimental

1.1 Efecto de los péptidos IDR sobre eritrocitos humanos

Conocer la actividad hemolítica de un compuesto que posee actividad biológica potente es importante cuando se están investigando nuevos candidatos a fármacos. Si las moléculas a prueba son capaces de dañar la membrana plasmática de eritrocitos, entonces pueden no ser apropiados en preparaciones farmacológicas. Es por ello, que en este trabajo se determinó la actividad hemolítica *in vivo* de los péptidos IDR 1, 1002, 1018, y HH2. Todos estos péptidos mostraron una actividad hemolítica menor del 10%, que es el valor máximo permitido recomendado (Amin, 2006). Reportamos el porcentaje de integridad de los eritrocitos a concentraciones de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Cuando se probó IDR 1 el porcentaje de integridad de los eritrocitos fue de 99% en ambos tratamientos (1% de hemólisis); Para IDR 1002 la integridad fue del 91.5% al 99% (1% a 8.5% de hemólisis); para IDR

HH2 la integridad fue del 90.1% al 98.4% (1.6% a 9.9% de hemólisis); sin embargo, para el IDR 1018, que alcanzó porcentajes de integridad de 98.5% a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1.5 % de hemólisis), la integridad disminuyó a 89.1% cuando se probaron concentraciones superiores a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10.9% de hemolisis) y un 86.5% de integridad (13.5% de hemólisis) cuando la concentración aumentó a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 3**). Estos resultados indican que los péptidos IDR 1, 1002 y HH2 causan una hemólisis moderada y aceptable (estadísticamente no significativa a $p < 0.05$) en las 5 concentraciones usadas 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Solo el IDR 1018 tuvo un efecto hemolítico significativo a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

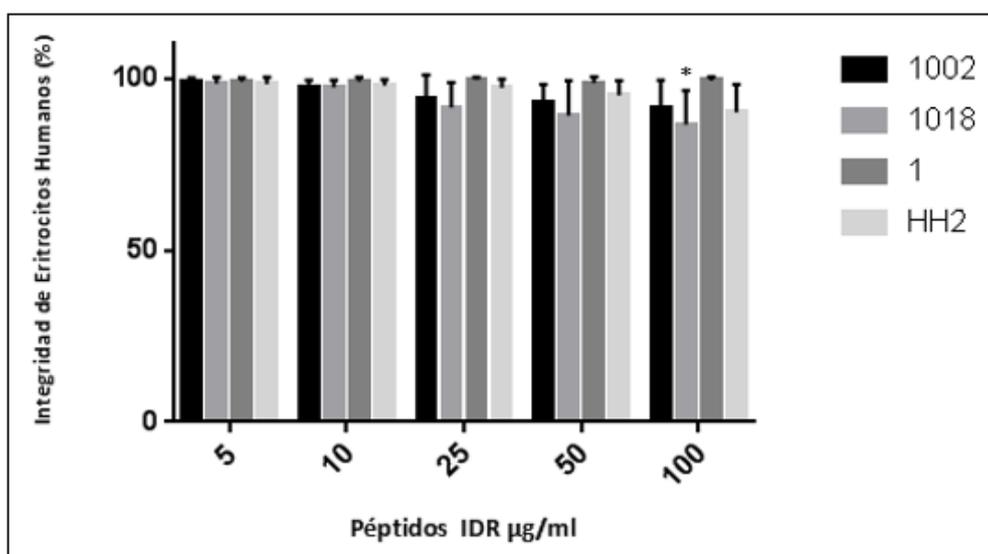


Figura 3. Hemólisis de eritrocitos humanos después de la interacción con los péptidos IDR 1, 1002, 1018 y HH2. La suspensión de eritrocitos al 1% fue incubada a 37°C con concentraciones variables de 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada uno de los IDR, por 1 h. La hemoglobina liberada en el sobrenadante se determinó por absorbencia a 540 nm. La integridad de los eritrocitos se expresa como porcentaje normalizado de hemoglobina liberada con respecto al total de hemoglobina obtenida por incubación de una mezcla de reacción incubada con 1% de Tritón X-100. Los valores se expresan como media de 4 muestras diferentes y DE * $p < 0.05$.

1.2 Evaluación de la viabilidad en células HEK293

Para conocer el efecto tóxico de los péptidos IDR en la línea celular de riñón de embrión HEK293 y cuál era el intervalo de concentraciones y de tiempo en el que los podríamos probar sin promover la muerte celular, se llevó a cabo el

ensayo de MTT, el cual nos permitió demostrar que la viabilidad celular en células HEK293 se afectó moderadamente al ser tratadas las células con concentraciones de 10, 35 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los péptidos IDR 1, 1002, 1018 y HH2 a 24 y 48 h. Los intervalos de viabilidad celular obtenidos a 24 h fueron: IDR 1 de 96 % a 100%; IDR 1002 de 94% a 100%; IDR 1018 de 93% a 100%; IDR HH2 de 96% a 100% (Figura 4A). En 48 h el intervalo de viabilidad fue: IDR 1 de 84% a 90%; IDR 1002 de 88% a 96%; IDR 1018 de 71% a 96%; IDR HH2 de 88% a 89% (Figura 4B).

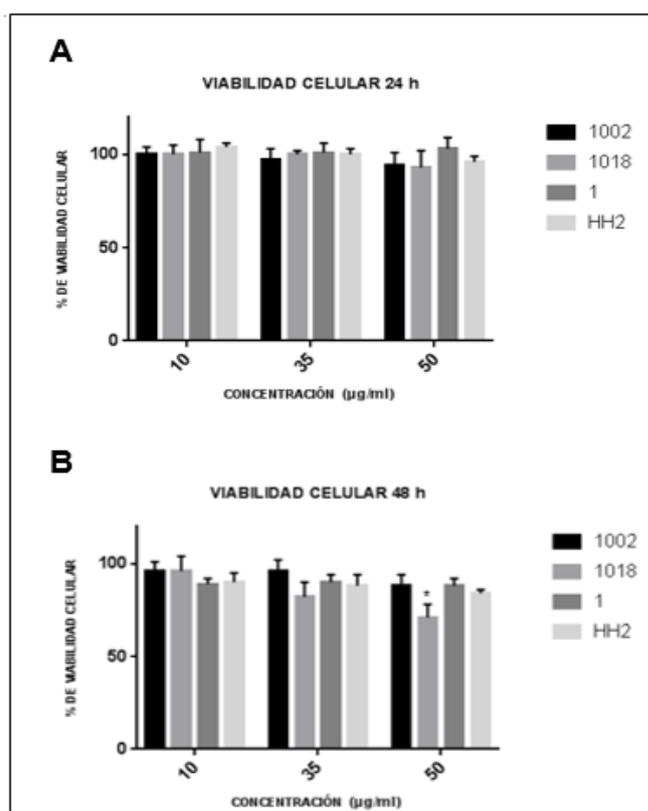


Figura 4. Viabilidad celular de HEK293 después de la interacción con los péptidos IDR 1, 1002, 1018 y HH2. Ensayo de MTT donde se trataron las células HEK293 a concentraciones de péptidos IDR de 10, 35 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 24 y 48 h. (A) La viabilidad de las células tratadas con los IDR durante 24 h se mantuvo por encima del 90%. (B) La viabilidad de las células tratadas por 48 se mantuvo por encima del 80%, cuando se trataron con los péptidos 1002, 1 y HH2, la exposición prolongada al péptido 1018 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue perjudicial para las células HEK293. Las barras representan la media, DE n=3, * p <0.05.

Estos datos nos indican que los péptidos IDR 1, 1002, 1018 y HH2 alteran solo moderadamente la permeabilidad de la membrana celular y este efecto se mantiene a concentraciones de hasta 50 µg/mL a 24 y 48 h, siendo la excepción el péptido IDR 1018 que como se aprecia en los resultados a la concentración de 50 µg/mL y a 48 h indujo una reducción significativa de la viabilidad celular del 29%.

1.3 Abundancia relativa de Nrf2 en el extracto total de células HEK293 estimuladas con péptidos IDR

Análisis previos realizados por nuestro equipo de trabajo mostraron, por una parte, que el péptido 1002 inhibe la translocación nuclear y con ello la actividad del factor transcripcional NF-kB (Huante *et al.*, 2016) el cual se conoce como un antagonista de la actividad de Nrf2 (Wardyn *et al.*, 2015), por lo que podría suponerse que en esta condición se ve favorecida la actividad de Nrf2. Por otra parte, se observó también un leve efecto acumulador de Nrf2 causado por el péptido 1002 en células RAW264.7 a 35 µg/mL por 4 h (A.H.M, datos no publicados). Estos resultados nos dieron la pauta para pensar en un posible efecto inductor de la actividad de Nrf2 por los péptidos IDR. Es así que nuestro ensayo de Western Blot mostró que la incubación por 1 h de HEK293 con 10 y 35 µg/mL del péptido IDR 1002 indujo la acumulación de Nrf2 (**Figura 5**). IDR 1018 no causó un efecto significativo de acumulación de Nrf2 a las concentraciones ensayadas, mientras que 35 µg/mL de IDR 1 produjo un leve incremento y IDR HH2 favoreció la acumulación de Nrf2 a las tres concentraciones ensayadas de 10, 20 y 35 µg/mL (**Figura 5**). Esto indicaría

que los péptidos 1002 y HH2 pueden provocar la acumulación de Nrf2 en poco tiempo (1 h) y a bajas concentraciones 10 µg/mL.

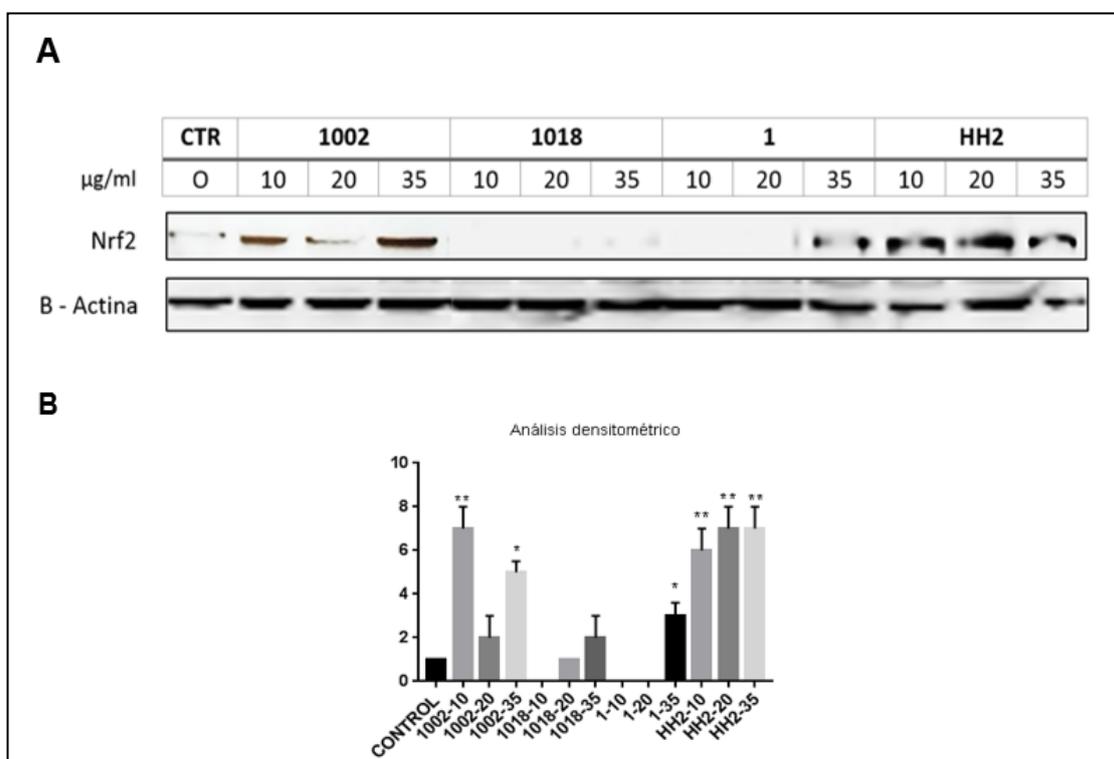


Figura 5. Los péptidos IDR 1002, HH2 inducen la acumulación de Nrf2 en HEK293 a bajas concentraciones. Las células HEK293 se trataron con los péptidos IDR 1002, 1018, 1 y HH2 a concentraciones de 10, 20 y 35 µg/mL por 1 h (A y B). Se detectó por Western blot la presencia de las proteínas Nrf2 (PM 100 kDa) y como control de carga a β-actina (PM 42 kDa). Cada Western blot es representativo de 3 experimentos independientes. Se realizaron los análisis cuantitativos de acumulación de Nrf2 normalizados en unidades densitométricas, con respecto al control sin tratamiento. Las barras representan la media, DE n=3, * p <0.05.

1.4 Abundancia relativa de Nrf2 en citoplasma y núcleo en células HEK293 estimuladas con péptidos IDR.

Se sabe que la generación de antioxidantes ocurre cuando Nrf2 se transloca al núcleo y se une al ADN, junto con las proteínas Maf pequeñas en la región promotora conocida como el elemento de respuesta antioxidante (ARE). Para conocer si los péptidos inducían la acumulación de Nrf2 en núcleo, se realizó el fraccionamiento subcelular de HEK293 con el fin de obtener proteína

citoplasmática y nuclear. Los ensayos tipo Western blot demostraron que los cuatros péptidos activaron la acumulación nuclear de Nrf2, siendo el péptido IDR-1002 el que indujo la mayor acumulación nuclear de la proteína Nrf2, seguido por los IDR HH2, 1 y 1018 (Figura 6).

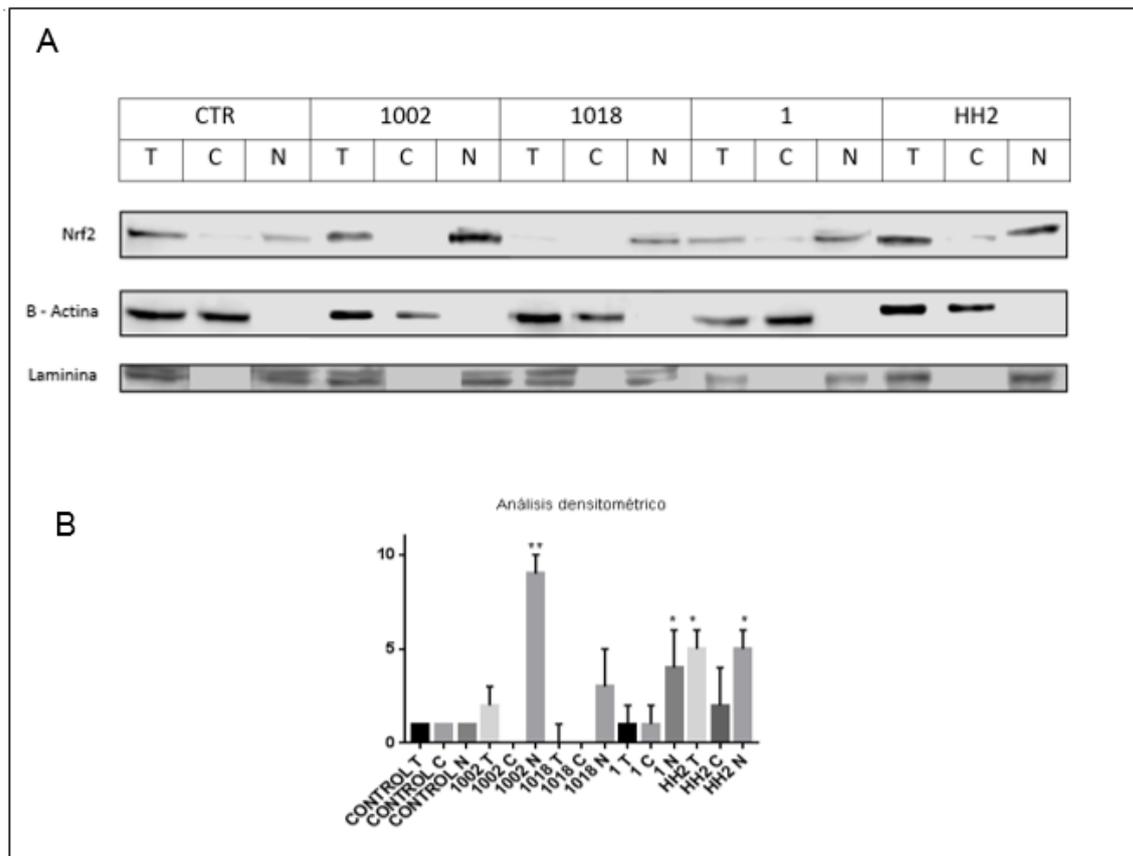


Figura 6. El péptido IDR-1002 promueve la translocación nuclear de Nrf2 en células HEK293. Las células HEK293 fraccionadas en extracto total, citoplasmático y nuclear se trataron con 10 µg/mL de cada uno de los péptidos IDR 1002, 1018, 1 y HH2 por 1 h. (A) Se detectó por Western blot la presencia de las proteínas Nrf2 (PM 100 kDa) y como control de carga a β-actina (PM 42 kDa) y Laminina (PM 70 kDa). Cada Western blot es representativo de 3 experimentos independientes. (B) Se realizaron los análisis cuantitativos de acumulación de Nrf2 normalizados en unidades densitométricas, con respecto al control sin tratamiento. Las barras representan la media ± DE, n=3, * p <0.05 .

Al ver que los péptidos 1018, 1 y HH2 mostraban un efecto activador de Nrf2 menor comparado con IDR-1002, se pensó que la concentración de péptido ensayado podría no ser suficiente para ver un efecto considerable. Por tal razón se procedió a comparar el efecto de los péptidos IDR-1002 y 1018, que son los que mayor y menor efecto inductor de Nrf2 mostraron respectivamente, para saber si a una concentración más alta el efecto de IDR-1018 era tan potente como el mostrado por IDR-1002. El efecto inductor a 10µg/mL se mantuvo igual al tratar las células con IDR-1002 y 1018 a 7 µM (**Figuras 7A y 7B**); sin embargo, al tratar las células con 50 µM no solo se observó un

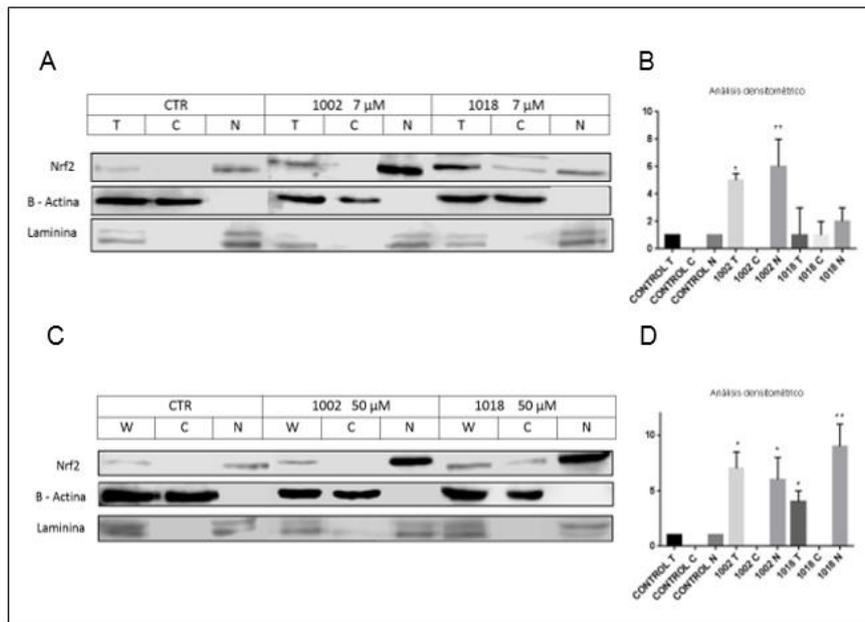


Figura 7. Comparación de la acumulación nuclear de Nrf2 inducida por los péptidos IDR-1002 e IDR-1018 a dos concentraciones diferentes. (A) A concentraciones bajas de 7 µM solo el IDR-1002 indujo significativamente la acumulación de Nrf2 en núcleo. (B) El aumento de la concentración del péptido IDR-1018 a 50 µM indujo la acumulación nuclear de Nrf2 por encima de la causada por el IDR 1002. (A) y (C) Ensayos de Western blot que muestran el efecto de los péptidos IDR-1002 y 1018 a concentraciones de 7 y 50 µM por 1 h, en células HEK293 fraccionadas en extracto total, citoplasmático y nuclear. Se inmunodetectó por Western blot la presencia de las proteínas Nrf2 (100 kDa) y como control de carga a β-actina (PM 42 kDa) y Laminina (PM 70 kDa). Cada Western blot es representativo de 3 experimentos independientes. (B) y (D) Se realizaron los análisis cuantitativos de acumulación de Nrf2 normalizados en unidades densitométricas, con respecto al control sin tratamiento. Las barras representan la media ± DE, n=3, * $p < 0.05$.

aumento en la inducción nuclear de Nrf2 por el IDR-1002, sino que también el tratamiento con el IDR-1018 mostró un aumento en la translocación nuclear de Nrf2 que fue mayor que el del IDR-1002 a la misma concentración (50 μ M) (**Figuras 7C y 7D**).

De esta manera comprobamos que los péptidos IDR-1002, 1018, HH2 y 1 activaron la acumulación nuclear de Nrf2. De estos cuatro péptidos, IDR-1002 fue el más potente. En escala descendente de mayor a menor actividad translocadora de Nrf2 al núcleo se obtuvo: IDR-1002 > IDR-HH2 > IDR-1 > IDR-1018.

2. Estudio teórico-computacional

2.1 Análisis *in silico* de la interacción entre Nrf2 y Keap-1

El análisis de docking molecular nos ayuda a predecir la interacción entre dos moléculas, un receptor y un ligando, usando métodos computacionales. Experimentalmente se ha visto que moléculas catiónicas pueden interaccionar con la región aniónica de Nrf2 (dominio Neh2, específicamente con los motivos de baja y alta afinidad DLG y ETGE, respectivamente) la cual es el punto de unión con Keap-1. Tal interferencia favorece que el complejo Nrf2-Keap-1 se mantenga separado y promueve la translocación nuclear de Nrf2. Dados los resultados previos obtenidos en la parte experimental de este trabajo, se planteó como objetivo investigar *in silico* si la acumulación nuclear de Nrf2 se debía a una posible interacción directa de Nrf2 con los IDR ensayados, lo cual evitaría su unión con Keap-1 y promoverían su translocación al núcleo.

10	20	30	40	50
MMDLELPPPG	LPSQQMDLI	DILWRQDIDL	GVSREVFDFS	QRRKEYELEK
60	70	80	90	100
QKKLEKERQE	QLQKEQEKAF	FAQLQDEET	GEFLPIQPAQ	HIQSETSGSA
110	120	130	140	150
NYSQVAHIPK	SDALYFDDCM	QLLAQTFFV	DDNEVSSATF	QSLVPDIPGH
160	170	180	190	200
IESPVFIATN	QAQSPETSVA	QVAPVLDGM	QQDIEQWEE	LLSIPELQCL
210	220	230	240	250
NIENDKLVET	TMVPSPEAKL	TEVDNYHFYS	SIPSMKEVGV	NCSPHFLNAF
260	270	280	290	300
EDSFSSILST	EDPNQLTVNS	LNSDATVNTD	FGDEFYSAFI	AEPSISNSMP
310	320	330	340	350
SPATLSHSLS	ELLNGPIDVS	DLSLCKAFNQ	NHPESTAEFN	DSDSGISLNT
360	370	380	390	400
SPSVASPEHS	VESSSYGDTL	LGLSDSEVEE	LDSAPGSVKQ	NGPKTPVHSS
410	420	430	440	450
GDMVQPLSPS	QQQSTHVHDA	QCENTPEKEL	PVSPGHRKTP	FTKDKHSSRL
460	470	480	490	500
EAHLTRDELK	AKALHIPFPV	EKIINLPVVD	FNEMMSKEQF	NEAQLALIRD
510	520	530	540	550
IRRRGKNKVA	AQNCRKRKLE	NIVELEQDLD	HLKDEKELLL	KEKGENDKSL
560	570	580	590	600
HLLKKQLSTL	YLEVFSMLRD	EDGKPYSPSE	YSLQQTRDGN	VFLVPKSKKP
DVKKK				

Figura 8. Secuencia de aminoácidos de Nrf2 de humano. Se destacan en rojo los motivos de baja afinidad (DLG) y alta afinidad (ETGE) que interaccionan con Keap-1. UniProt (Q16236-1 NF2L2_HUMAN)

Para cumplir con este objetivo la secuencia proteica de referencia de Nrf2 humano se obtuvo de la base de datos UniProt (Q16236-1NF2L2_HUMAN) la cual cuenta con 605 aminoácidos y un PM teórico de 66 kDa, aunque experimentalmente la proteína se detecta entre 95 a 110 kD (Lau *et al.*, 2013) (**Figura 8**).

Las estructuras cristalizadas de Nrf2 encontradas en la base de datos Protein Data Bank (PDB) y UniProt fueron seis, las cuales solo correspondían a estructuras co-cristalizadas del dominio Neh2 motivo DLG o ETGE de Nrf2 con el dominio Kelch de Keap-1. De estas estructuras se seleccionaron cuatro que correspondían dos a la región DLG (PDB: 3WN7 y 2DYH) y dos a la región ETGE (PDB: 2FLU y 1X2R) (**Figura 9**), según lo mostrado al hacer el alineamiento de las secuencias en el programa Mega 6, tomando como referencia la secuencia canónica de Nrf2 (**Figura 10**).

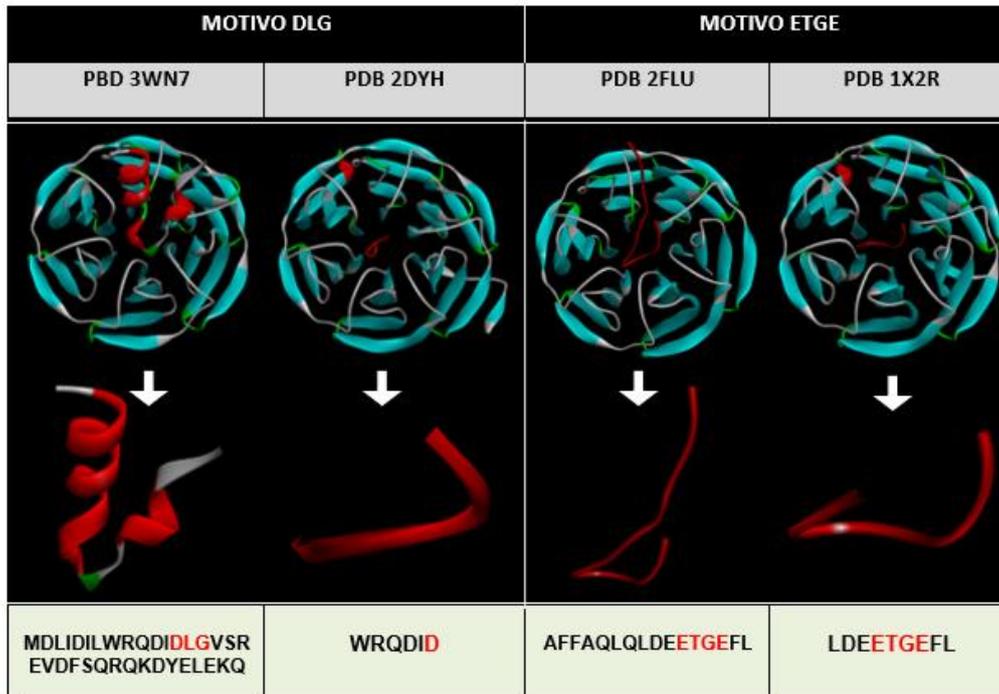


Figura 9. Estructuras co-cristalizadas de Nrf2 con Keap-1. Separación de los fragmentos de los motivos DLG y ETGE del dominio Neh2 de Nrf2 (rojo) con el dominio Kelch de Keap 1 (azul) por medio del programa Discovery studio. Se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente al fragmento de Nrf2 cristalizado de cada uno de los PDB, resaltando en rojo los motivos DLG o ETGE.



Figura 10. Alineamiento de las secuencias de las estructuras co-cristalizadas de Nrf2 con Keap-1. Comparación de los fragmentos peptídicos de Nrf2 co-cristalizados (PDB: 3WN7, 2FLU, 2DYH y 1X2R) con la secuencia original de Nrf2, donde se marcan las regiones ETGE y DLG compartidas. Análisis realizado en el programa Mega 6.

Las estructuras co-cristalizadas se analizaron en el programa Discovery Studio con el fin de identificar las interacciones relevantes para la unión de los **motivos DLG**: PDB-3WN7: MDLIDILWRQDIDLGVSREVDFSQRQKDYELEKQ; PDB-2DYH: WRQDID y **ETGE**: PDB-IX2R: LDEETGEFL y PDB-2FLU: AFFAQLQLDEETGEFL del dominio Neh2 de Nrf2 con el dominio Kelch de Keap-1. Se pudo corroborar que los aminoácidos de Keap-1: Arg415, Arg483 y

Arg380 forman interacciones electrostáticas; Ser508, Ser555, Ser602 y Ser663 forman puentes de hidrógeno y Tyr334, Tyr525, Tyr572 forman uniones hidrofóbicas con ambos motivos de Nrf2, siendo para el motivo DLG Gln26, Asp27, Asp29, Leu 30, Gly 31 y para el motivo ETGE Asp77, Glu78, Glu79, Thr80, Glu82 los aminoácidos con mayor número de interacciones con los mencionados de Keap-1 (Cheng *et al.*, 2015) (**Tabla 2**).

A pesar de que el número de aminoácidos cristalizados de Nrf2 varía de un PDB a otro, se observó que los aminoácidos de Keap-1 que interactúan con los motivos DLG y ETGE de Nrf2 son los mismos y estas interacciones se mantienen sin variación independientemente del tamaño de la región DLG o ETGE cristalizada. Además, observamos que las secuencias de unión de Nrf2 por Keap-1 son aniónicas debido a la presencia de los aminoácidos Asp y Glu, por lo que se sugiere que los péptidos IDR de característica catiónica podrían interactuar con los motivos DLG o ETGE de Nrf2.

Tabla 2. Aminoácidos que contribuyen en la interacción de Nrf2 con Keap-1.

Región, PBD y secuencia	Nrf2	Keap-1	Cita
DLG: 2DYH WRQDID	Gln 26 Asp 27 Asp 29	Ser 508 Ser 555 Ser 602 Arg 415 Asn 382 Tyr 384 Tyr 525 Tyr 572 Phe 57	Tong, K. I <i>et al.</i> , 2007
DLG: 3WN7 MDLIDILWRQDIDL GVSREVDIFSQRQ KDYELEKQ	Gln 26 Asp 27 Asp 29 Leu 30 Gly 31	Ser 508 Ser 555 Ser 602 Arg 415 Arg 483 Arg 380 Asn 382 Asn 414 Tyr 334 Gly 433 His 436 Gly 509	Fukutomi T <i>et al.</i> , 2014
ETGE: IX2R LDEETGEFL	Asp 77 Glu 78 Glu 79 Thr 80 Gly 81 Glu 82 Phe 83	Ser 508 Ser 555 Ser 602 Ser 363 Arg 415 Arg 380 Arg 483 Asn 382 Gln 530 Glu 574 Tyr 354	Padmanabhan, B <i>et al.</i> , 2006
ETGE: 2FLU AFFAQLQLDEETG EFL	Asp 77, Glu 79, Thr 80, Gly 81, Glu 82, Phe 83	Ser 508 Ser 555 Ser 602 Ser 363 Arg 415 Arg 483 Arg 380 Asn 382 Gln 530 Tyr 334 Phe 478	Lo, S-C <i>et al.</i> , 2006

2.2 Reproducibilidad *in silico* de la interacción Nrf2 y Keap-1 en los fragmentos 3WN7, 2DYH, 1X2R y 2FLU

Después de identificar las interacciones importantes para la unión de Nrf2 y Keap-1 se corroboraron estas interacciones realizando un acoplamiento *in silico* de estas estructuras en el programa AutoDock-Vina y se obtuvieron los valores de afinidad de unión de Nrf2 (motivo DLG y motivo ETGE) con Keap-1. (**Tabla 3**). En el caso del análisis con ligando (Nrf2) rígido, el programa generó una sola zona de interacción para los fragmentos con PDB 3WN7 y 2FLU y varias zonas para los PDB 2DYH y 1X2R (**Tabla 3**). Los fragmentos con mayor número de aminoácidos para los motivos DLG y ETGE tuvieron mayor afinidad (PDB 3WN7 = -23.1 kcal/mol y PDB 2FLU = -16.3 kcal/mol) para unirse al dominio Kelch de Keap-1 que los de menor número de aminoácidos (PDB 2DYH = -14.9 a -11.9 kcal/mol y PDB 1X2R = -10.8 a -9.5 kcal/mol) y coincide con los reportes que indican que las estructuras cristalizadas 2FLU y 3WN7 contienen los aminoácidos suficientes para mantener la interacción de Nrf2 con Keap-1. La pérdida de cualquiera de ellos debilitará la unión. Así mismo, el análisis flexible indicó que la afinidad de los fragmentos más grandes de Nrf2 disminuye considerablemente cuando cambia la conformación espacial de la proteína respecto a las estructuras reportadas por Fukutomi *et al.*, 2014. Tong *et al.*, 2007; Lo *et al.*, 2006 y Padmanabhan *et al.*, 2006. (**Tabla 3**).

En el caso del análisis flexible las afinidades fueron bajas y el programa arrojó varias zonas de interacción lo cual indicó que la alteración de la estructuración de los fragmentos de Nrf2 modificó la interacción con Keap-1 (**Tabla 3**).

Tabla 3. Afinidades de unión (kcal/mol) de Nrf2 con Keap

Motivo	PDB	Fragmento de Nrf2 en el PDB	Análisis Rígido		Análisis Flexible	
			Afinidad (kcal/mol)	No. de zonas de interacción	Afinidad (kcal/mol)	No. de zonas de interacción
DLG	3WN7	MDLIDILWRQDIDLGVSR VDFSQRQKDYELEKQ	-23.1	1	-4.6 a -4.2	9
	2DYH	WRQDID	-10.8 a -9.5	9	-7.0 a -6.5	9
ETGE	2FLU	AFFAQLDEETGEFL	-16.3	1	-5.8 a -5.0	9
	1X2R	LDEETGEFL	-14.9 a -11.9	5	-7.3 a -6.8	9

Para el análisis de las interacciones, cuando el ligando Nrf2 es rígido, se mantuvieron las interacciones importantes para la unión de Nrf2 con Keap-1 reportadas para ambos motivos (**Figura 11**) las cuales se mencionaron en la **Tabla 2**, mientras que en el flexible ninguna de las interacciones de los aminoácidos de Keap-1 (Ser 508, Ser 555, Arg 415, Arg 483, Ser 602, Ser 363, Asn 382, Arg 380) que interaccionan con Nrf2 se mantuvieron, disminuyendo así la afinidad de unión de ambas proteínas.

Al igual que los reportes de la literatura, observamos que el motivo DLG y ETGE de Nrf2 se unen a Keap-1, principalmente por puentes de hidrógeno. Solo en el análisis rígido las interacciones importantes entre Keap-1 y Nrf2 se mantuvieron, observando además que los aminoácidos participantes para sostener las interacciones se mantienen constantes independientemente del tamaño del fragmento peptídico tomado para el motivo DLG o ETGE; sin embargo, la afinidad de unión de Nrf2 por Keap-1 sí cambia proporcionalmente al aumentar el número de aminoácidos de ambos motivos participantes de Nrf2.

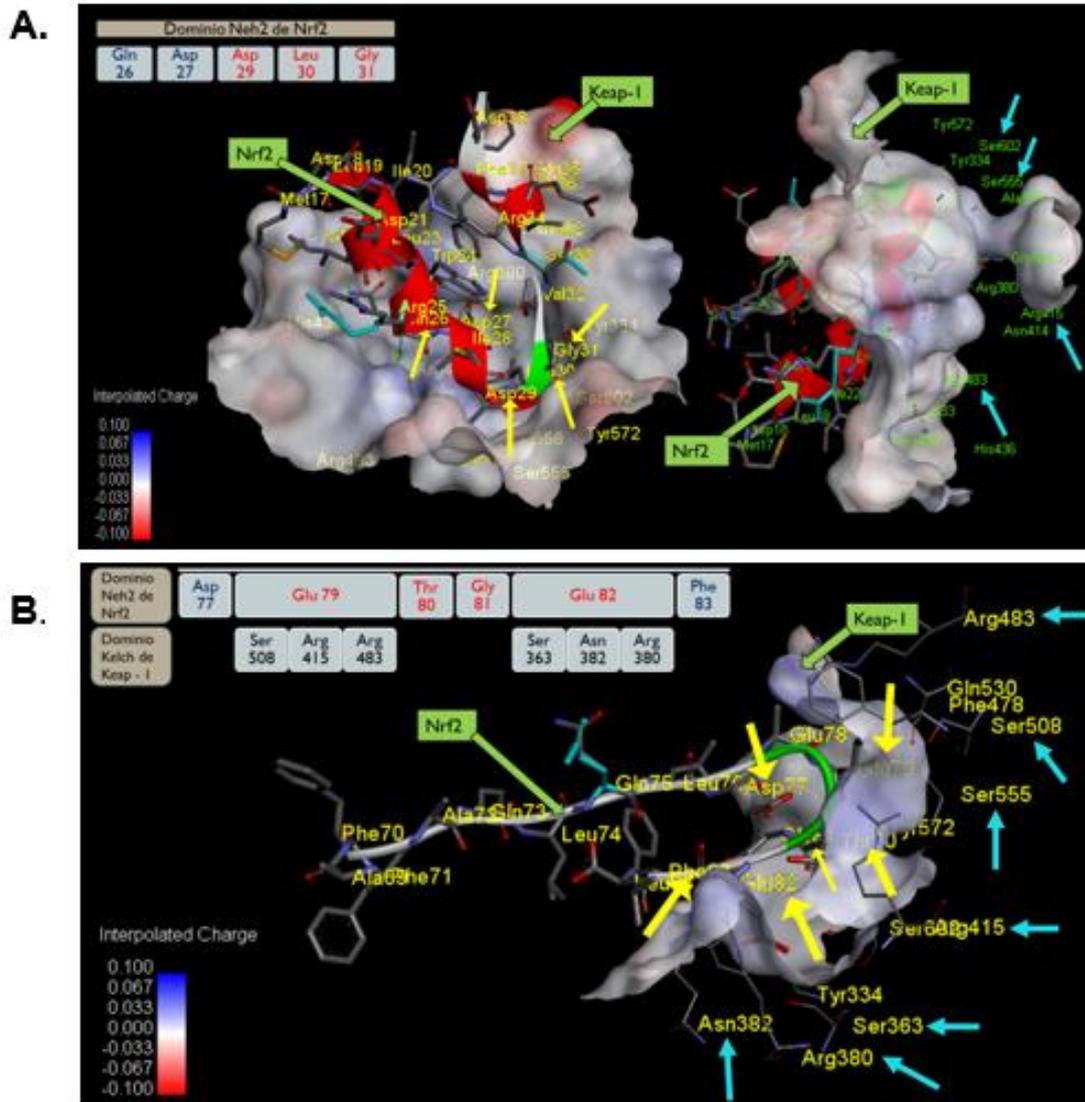


Figura 11. Acoplamiento con ligando (Nrf2) rígido realizado con AutoDock Vina que muestra a los aminoácidos que contribuyen a la interacción entre Nrf2 y Keap-1. Las flechas amarillas señalan los aminoácidos importantes de Nrf2 para mantener las interacciones con los aminoácidos de Keap-1 señalados con flechas azules. (A) Motivo DLG de Nrf2 interaccionando con Keap-1 dominio Kelch (nube en gris); PDB 3WN7. (B) Motivo ETGE de Nrf2 interaccionando con Keap-1, dominio Kelch (nube en gris); PDB 2FLU. Archivo analizado en Discovery Studio.

Dado que para impedir la retención y ubiquitinación de Nrf2 y favorecer su actividad basta con separar el motivo de baja afinidad DLG de Nrf2 de Keap-1 , después de realizar el alineamiento, corroborar las interacciones importantes y de obtener la afinidad de unión de Nrf2 con Keap-1 de cada PDB, se decidió trabajar principalmente con la estructura 3WN7

(MDLIDILWRQDIDLGVSRÉVDFSQRQKDYELEKQ) ya que es el fragmento que posee mayor número de aminoácidos y la mejor afinidad de unión de Nrf2 con Keap -1. Para algunos análisis se utilizó el PDB 2FLU correspondiente a la región ETGE.

2.3 Construcción *in silico* de péptidos IDR 1, 1002, 1018 Y HH2 por homología

Para poder analizar si los péptidos IDR podrían interaccionar con Nrf2 se realizó el modelado *in silico* por homología secuencia-estructura de los mismos. Se revisaron el mayor número de proteínas con las secuencias más parecidas para validar la estructuración de los péptidos y se tomaron los que contenían el mayor número de aminoácidos consecutivos, con un porcentaje alto de identidad y cuya estructura estuviera cristalizada (**Figura 12**). Este último factor redujo significativamente el número de secuencias a considerar.

La búsqueda de estructuras homólogas nos permitió ver un patrón de estructuras que se repetían. Para el caso de las proteínas con secuencias similares a los IDR 1002 y 1018, las secuencias se tornaban más como alpha hélice, lo cual concuerda en el caso del IDR 1018 con el tipo de estructura reportada por Wieczorek *et al.* (2010), y para el IDR 1 y HH2 como beta láminas, con ligeras curvaturas en los extremos amino y carboxilo, y la región central.

1. IDR 1002	V Q R W L I V W R I R K	1. IDR HH2	Q L R I R V A V I R A
2. 4JYJ	V - R W L - - W R - - -	2. 5SZ0	Q L R I R V - - - - -
3. 2OVP	- - - - - V W R I R -	3. 1U00	- - R I R V A V - - -
1. IDR 1018	V R L I V A V R I W R R	1. IDR 1	K S R I V P A I P V S L L
2. 5UMO	- - - - - V R I W R R	2. 1XAO	- - R I V P A I P - - - -
3. 4BIN	- - - V A V R - W - -	3. 3JQX	- - - I V P - I P V S - -
4. 3QPT	- R L - - - V R I W R -	4. 5LQ3	- - - - - A - P V S L L
5. 5E06	V R L - V A - R - - - -	5. 2Y38	- S R I V P - - - - - -
6. 1V4A	- - L I V A - R - W - -	6. 5TOQ	- - - - - A - P V S L L
7. 2M72	V R L I - - - - - - - -	7. 3CMM	- - R I - P A I - V S L L
8. 1N1B	- - L I V - V R I - - - -	8. INUP	K S R I - - - - P V - L L

Figura 12. Alineamiento de las secuencias proteicas cristalizadas homólogas a los IDR.

Tomando como molde la secuencia que abarcara la mayor identidad a los IDR, se procedió a mutar (en rojo) y completar la secuencia con los aminoácidos correspondientes a los péptidos IDR (en verde). Dado que estos péptidos fueron sintetizados amidados, se añadió un grupo amino terminal (en amarillo) (Tabla 4).

TABLA 4. Secuencias proteicas homólogas usadas para la construcción de los IDR. En rojo se muestran los aminoácidos mutados, en verde los añadidos y en amarillo un grupo amino agregado

Péptido IDR	PDB	Secuencia de las proteínas homólogas	Secuencia de los IDR
1002	4JYJ	V - R W L - - W R - - -	V Q R W L I V W R I R K - NH ₂
1018	1V4A	- - L I V A - R - W - -	V R L I V A V R I W R R - NH ₂
1	1XAO	- - R I V P A I P - - - -	K S R I V P A I P V S L L - NH ₂
HH2	1U00	- - R I R V A V - - -	Q L R I R V A V I R A - NH ₂

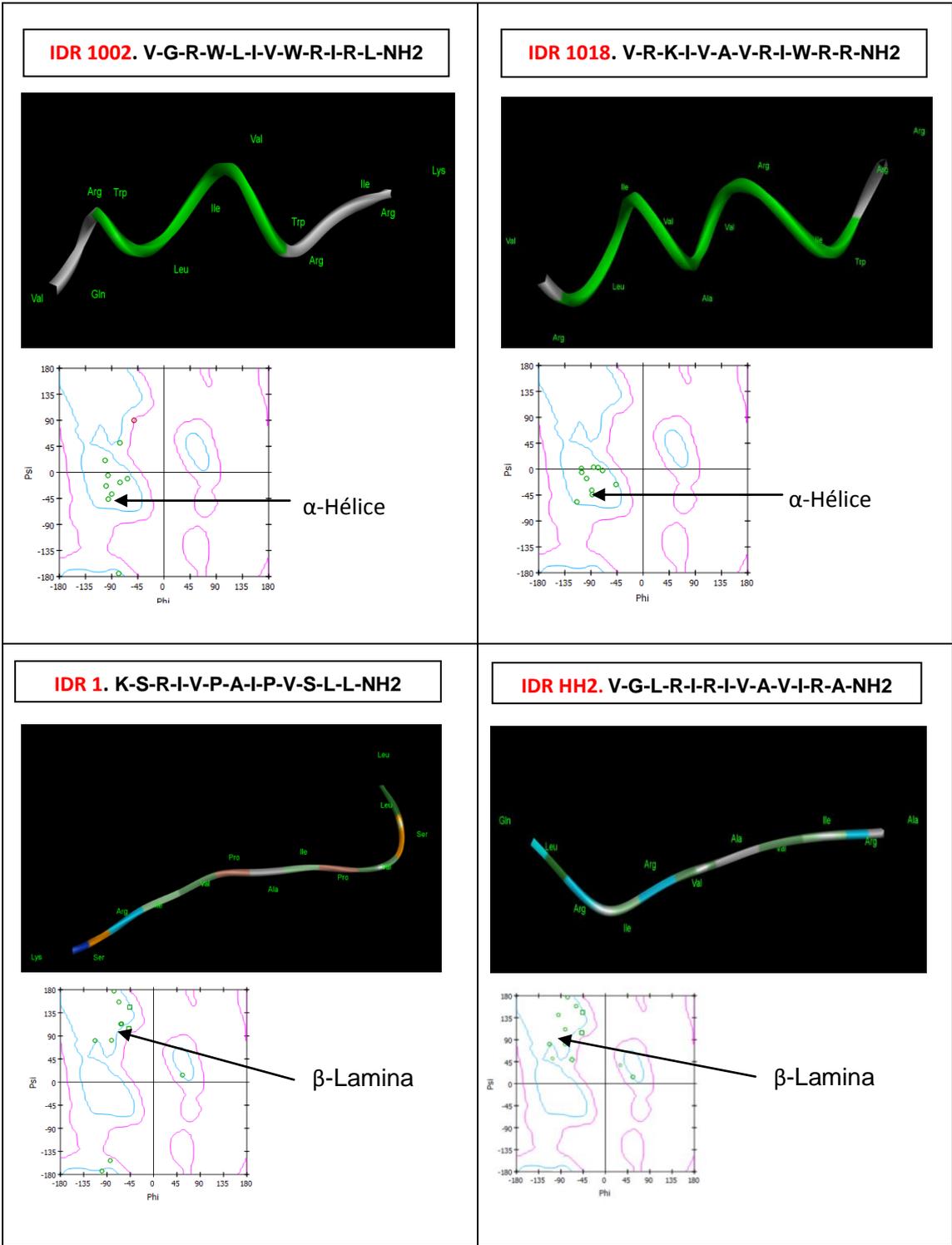


Figura 13. Modelos construidos por homología de los péptidos IDR 1, 1002, 1018 y HH2 diseñados con el programa Discovery Studio. En la parte superior se aprecian los IDR modelados y en la parte inferior el gráfico de Ramachandran de cada uno. Las zonas blancas en el gráfico corresponden a regiones estéricamente no permitidas para la unión entre aminoácidos. Las regiones contorneadas en azul corresponden a conformaciones donde no hay impedimentos estéricos, es decir estas son zonas permitidas llamadas conformaciones β -laminares (1º cuadrante) y α -hélices (3º cuadrante). Las zonas contorneadas en rosas muestran las regiones que permite que los átomos puedan estar un poco más cercanos y corresponde a una hélice con giro hacia la izquierda. Cada punto corresponde al ángulo de unión entre aminoácidos.

Conforme se completaba la secuencia homóloga, para validar la estructura de los péptidos se analizó en el gráfico de Ramachandran la conformación que iba adoptando. El gráfico mostró que la estructuración de los péptidos era estable y probable, ya que los ángulos de torsión ϕ (N-C α) y ψ (C α -C) de los aminoácidos no mostraron restricciones conformacionales, pues los ángulos de unión tuvieron valores dentro de las zonas permitidas (contorno azul y rosa). Además, se indica, según la posición de los puntos, el tipo de estructura a adoptar, α -hélice o β -laminar como se observa en la [Figura 13](#).

2.4 Acoplamiento de los péptidos IDR generados *in silico* con Nrf2

Después de realizar el diseño de los péptidos IDR, se procedió a realizar el análisis tipo docking de estos con Nrf2 y ver si había una posible interacción. Para ello se analizó la interacción de Nrf2 (motivo DLG) con los péptidos IDR. El programa Autodock Vina 1.1.2, arrojó 9 conformeros en cada caso ([Figura 14](#)). Cada uno de estos conformeros se analizó con un docking rígido de Nrf2 con el péptido para conocer si alguno de sus aminoácidos interaccionaba con los aminoácidos de Nrf2 que son importantes para su unión con Keap-1 y obtener los valores de afinidad a Nrf2. Se analizaron cada uno de los conformeros arrojados por el programa, en base a criterios de afinidad, interacción del péptido con aminoácidos importantes de la unión Nrf2–Keap-1 y la conformación del péptido ([Figura 14](#)).

Criterios de selección : <ul style="list-style-type: none"> • Afinidad. • Aminoácidos de Nrf2 (DLG) que interactúan con el péptido. • Conformación del péptido. 						
IDR 1002		Modelo 1 Afinidad = -20.1 kcal/mol		Modelo 2 Afinidad = - 21.1 kcal/mol		Modelo 3 Afinidad = -19.8 kcal/mol ASP29
		Modelo 4 Afinidad = -22.2 kcal/mol ASP29		Modelo 5 Afinidad = -19.4 kcal/mol ASP29		Modelo 6 Afinidad = - 20.0 kcal/mol ASP 29
		Modelo 7 Afinidad = - 19.8 kcal/mol		Modelo 8 Afinidad = -13.9 kcal/mol GLN26		Modelo 8 Afinidad = -17 kcal/mol

Figura 14. Confórmeros de IDR-1002 interactuando con Nrf2. Se muestra su afinidad con Nrf2 y su unión con los aminoácidos del motivo DLG importantes para su interacción con Keap-1.

Se observó que los 4 IDR modelados se unieron a Nrf2 con una alta afinidad y en la zona de interacción de Nrf2 con Keap-1 (**Figura 15**); sin embargo, el péptido 1002 es el que más confórmeros posee con uniones en los aminoácidos de Nrf2 que interactúan con Keap-1 (Glu26, Asp29, Leu30, Gly31) con las afinidades de unión más negativas (-22.2 a -13.9 kcal/mol) cercanas a las de la interacción de Nrf2 y Keap-1 (-23.1 kcal/mol).

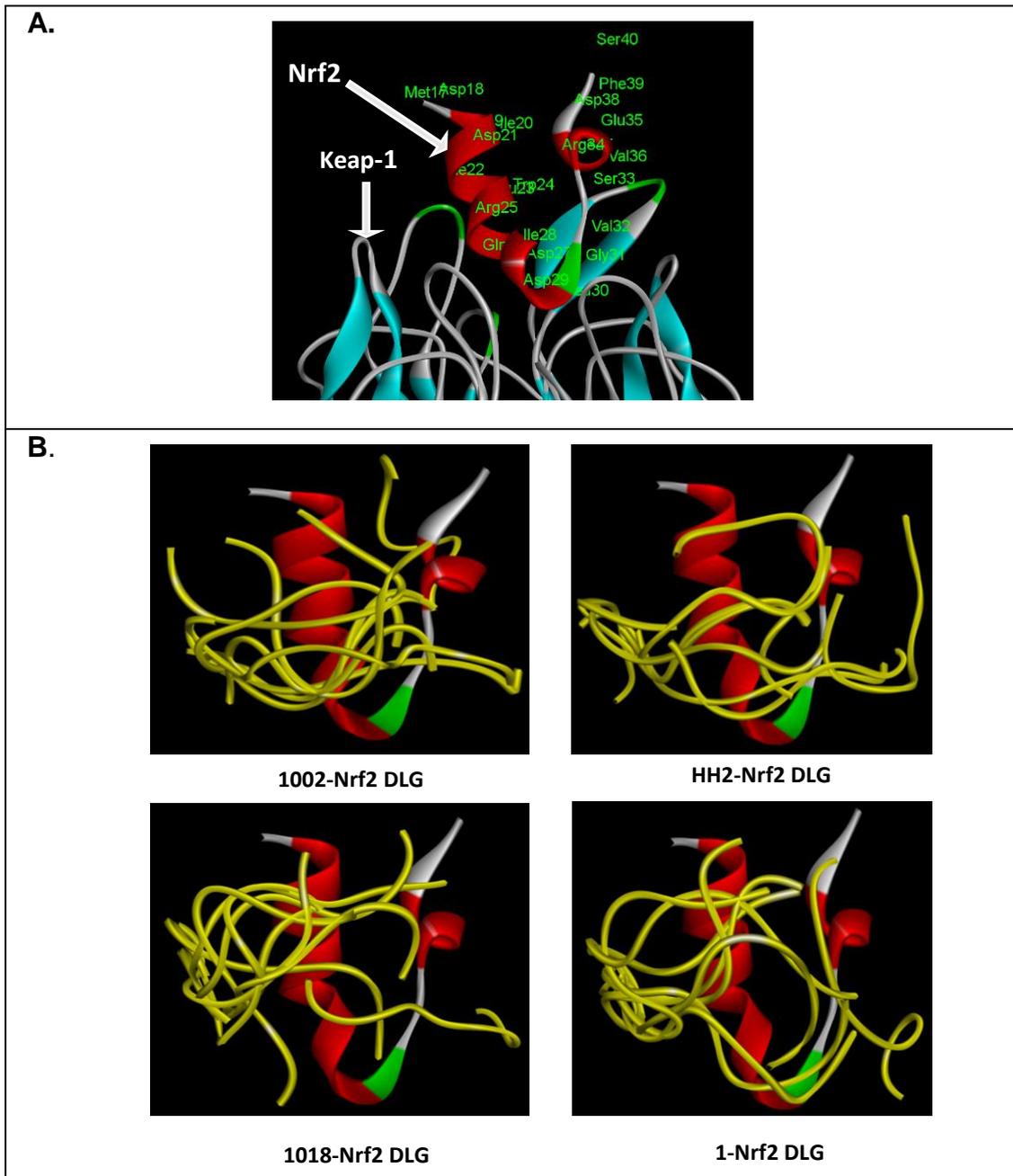


Figura 15 .Acoplamiento de los péptidos IDR generados *in silico* con Nrf2. (A) Unión del motivo DLG de Nrf2 (rojo) con Keap-1 (azul). (B) Diferentes conforméros (amarillo) obtenidos de los IDR al interactuar con Nrf2 (rojo). Análisis con exhaustividad de 20.

De esta manera se tendría en orden decreciente de afinidad y en número de conforméros que se unen a Nrf2 en su motivo DLG a los IDR 1002, IDR 1018, IDR HH2 e IDR 1 (**Figura 16**). Este efecto jerárquico y de unión del IDR 1002 se mantuvo al realizar diferentes tipos de análisis flexibles y rígidos con Nrf2 y los péptidos (**Material suplementario**).

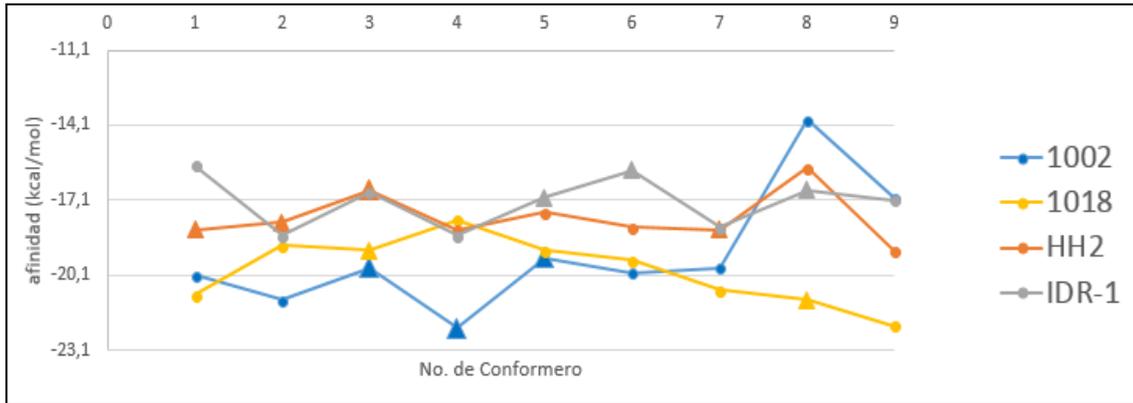


Figura 16. Afinidad del motivo DLG de Nrf2 por los IDR. Análisis exhaustivo sin hidrógenos polares.

Para poder dilucidar mejor el comportamiento de los péptidos IDR se analizó solo la afinidad de unión de los mismos con la zona ETGE (PDB 2FLU) sin hidrógenos polares en un análisis flexible con exhaustividad, observando el mismo comportamiento de los péptidos. Al comparar su unión con el motivo DLG siendo el IDR 1002 el que mayor afinidad tiene por la unión a Nrf2 (**Figura 17**). Estos resultados teóricos y los datos obtenidos experimentalmente concuerdan e indican que IDR 1002 podría unirse a Nrf2 y bloquear su unión con Keap-1 y por ello sería considerado el péptido IDR con mayor capacidad para inducir la acumulación de Nrf2.

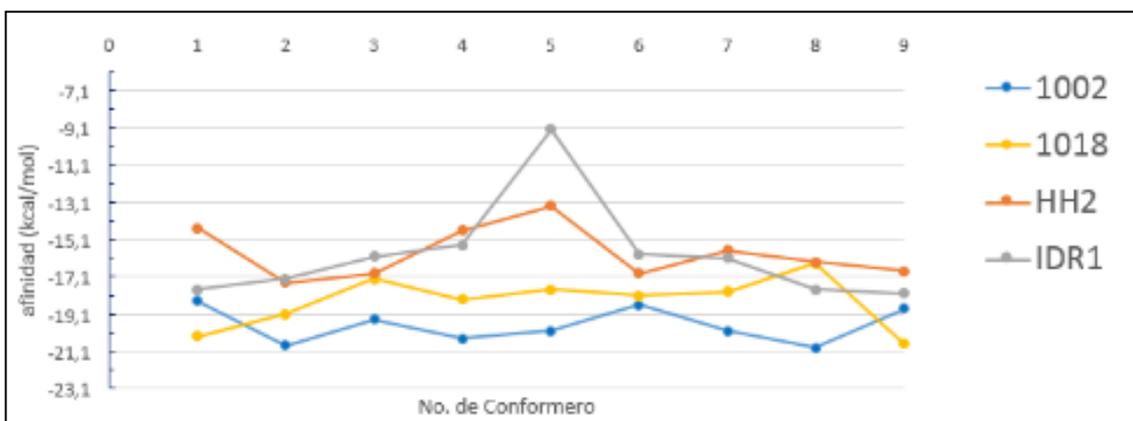


Figura 17. Afinidad del motivo ETGE de Nrf2 con los IDR. Análisis exhaustivo sin hidrógenos polares

2.5 Análisis *in silico* del acoplamiento molecular de los péptidos IDR con KEAP-1

Para conocer a que proteína del complejo Nrf2-Keap-1 se unían preferentemente los péptidos IDR, se hizo un análisis *in silico* del acoplamiento de Keap-1 con los IDR. Se observó que la afinidad de unión de los IDR por Keap-1 es mucho menor comparado con los obtenidos con Nrf2, lo que concuerda con el hecho de que los péptidos, al ser catiónicos prefieren unirse a las regiones aniónicas de Nrf2 (Figura 18).

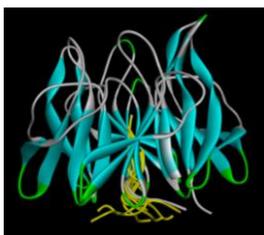
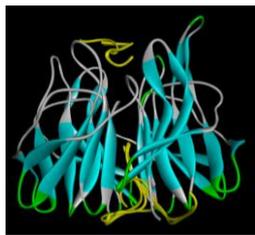
1002	1018	1	HH2
			
Rango de afinidad (kcal / mol)			
- 6.1 a – 5.4	-6.0 a -5.4	- 5.8 a -5.0	-7.0 a -5.6

Figura 18. Confórmeros obtenidos de la interacción de los IDR con Keap-1. Análisis no exhaustivo sin hidrógenos polares. Se muestra el dominio Kelch de Keap-1 en azul y los conformeros en amarillo.

2.6 Identificación *in silico* de un péptido basado en un fragmento de la proteína P21 con potencial efecto sobre la activación de NRF2

Un comportamiento muy similar al de los IDR con Nrf2 es el reportado experimentalmente para la proteína P21 (Chen *et al.*, 2009) que contiene un motivo KRR que puede interactuar con los motivos DLG y/o ETGE de Nrf2 y unirse a este para impedir su unión con Keap-1, y favorecer así la acumulación nuclear de Nrf2. En este contexto se decidió probar *in silico* si el fragmente de

18 aminoácidos (RQTSMTDFYHSKRRLIFS) cristalizado de P21 podría tener un efecto similar a los IDR en cuestión de afinidad y estructuración por Nrf2.

Los resultados de la interacción de Nrf2 con P21 flexible mostraron una afinidad de unión en un rango mayor (-17.4 a -26.2 kcal/mol) a los reportados con los IDR en este trabajo por Nrf2 y Keap-1 (-23.1 kcal/mol). Así mismo, los valores abarcan los reportados para la interacción de Nrf2 e IDR 1002, 1018, HH2 y 1, siendo los de 1002 los más altos (-23.3 kcal/mol) por lo que podríamos decir que los péptidos IDR *in silico* tienen un comportamiento muy similar en estructura, acomodo y afinidad a la interacción de P21 con Nrf2 y esto nos permite proponer un nuevo fragmento peptídico con posibilidad de ser analizado como un candidato para el desarrollo de un activador de Nrf2, dirigido para unirse a esta proteína y así evitar su unión a Keap-1 y favorecer con ello su acumulación y actividad (**Figura 19**).

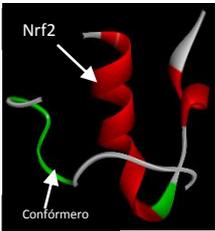
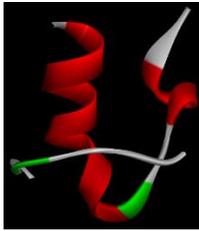
Afinidad de unión (kcal/mol) de NRF2 motivo DLG +				
P21	1002	1018	1	HH2
-24.4	-23.3	-19.8	-17.2	-19.3
GLN26, ASP29, GLY31	GLN26, ASP27, ASP29, GLY31	LEU30, GLY31	GLN26, ASP27, ASP29	GLN26, ASP27, ASP29
				

Figura 19. Comparación de la unión de Nrf2 con P21 y los IDR. Análisis del mejor conformero obtenido de cada péptido IDR (en blanco) interaccionando con Nrf2 (en rojo), con respecto a un conformero de P21 interaccionando con Nrf2. Análisis no exhaustivo con hidrógenos polares.

DISCUSIÓN

Nrf2 es un factor transcripcional de suma importancia para el control del estrés oxidante. Se ha visto que su deficiencia se relaciona con el desarrollo de enfermedades que cursan con inflamación crónica, cuyos pronósticos de recuperación son muy bajos. Tal es el caso de la insuficiencia renal aguda donde la poca o nula actividad de Nrf2 conduce a la insuficiencia renal crónica que, según registros del INEGI en 2016, se encuentre entre las 10 primeras causas de muerte en nuestro país.

Varios estudios experimentales han demostrado que la actividad de Nrf2 en etapas tempranas de la lesión renal previene y detiene la muerte celular (Nezu *et al.*, 2017). Por lo tanto, Nrf2 representa una proteína cuya modulación tiene un potencial farmacológico muy importante para el control de este tipo de patologías.

Existen compuestos naturales o sintéticos (Curcumina, Sulforafano, Bardoxolon) activadores de Nrf2 que se encuentran disponibles para la venta al público y se caracterizan por ser reguladores de la principal vía de control de Nrf2, es decir, en la que interviene Keap-1. Los tres compuestos mencionados son principalmente inhibidores indirectos de la interacción de Keap-1 y Nrf2, pues al ser electrofílicos reaccionan con los residuos de Cys de Keap-1 y favorecen la disociación del complejo y la actividad de Nrf2. A pesar de que estos compuestos tienen valores inducibles aceptables de Nrf2, presentan la desventaja de interaccionar no solo con Keap-1 sino también con las Cys de otras proteínas (Sun *et al.*, 2014). Por ello, se ha tratado de investigar más profundamente sobre posibles activadores de Nrf2 con alta especificidad de unión como lo son las pequeñas moléculas orgánicas o péptidos, dirigidos para

intercalarse en la zona de interacción de Nrf2 y Keap-1 (Bertrand *et al.*, 2015).

En relación con esta búsqueda, una de las técnicas adoptadas para estudiar si una molécula tiene esta propiedad es aplicar técnicas computacionales (Pérez *et al.*, 2008).

En este contexto, este trabajo se enfocó a investigar si los péptidos reguladores de la respuesta inmune innata, también conocidos como IDR, promovían la actividad de Nrf2, mediante técnicas bioquímicas e *in silico*. La razón de probar estos péptidos surge de la observación de que los IDR pueden controlar una infección no matando directamente al microorganismo que la esté causando, sino modulando la respuesta inmune para atraer quimiocinas al punto de infección y destruir al patógeno, evitando con ello una respuesta inflamatoria exacerbada (Wieczorek *et al.*, 2010). Dado que la inflamación es una consecuencia del estrés oxidante y los IDR tiene propiedades antiinflamatorias, se pensó que también podrían modular la actividad de Nrf2, al ser éste un factor transcripcional que modula negativamente la inflamación. Esta hipótesis también se basa en que el factor de transcripción pro-inflamatorio NF- κ B es inhibido por efecto del IDR-1002 en macrófagos (Huante *et al.*, 2016) y a su vez se sabe que la disminución de la actividad de NF- κ B cursa con un aumento de la actividad de Nrf2 (Wardyn *et al.*, 2015).

Aunque se observó que los cuatro IDR ensayados indujeron la translocación de Nrf2 al núcleo, el péptido que mayor efecto tuvo fue 1002, seguido de HH2, 1 y 1018. La capacidad inductora de 1002 sobre Nrf2 se obtuvo a concentraciones tan bajas como de 10 μ g/mL. La estandarización de concentraciones en μ M para dilucidar si el efecto era el mismo para los péptidos con mayor y menor acumulación nuclear detectada de Nrf2, utilizando a los IDR 1002 y 1018

respectivamente, mostró que a bajas concentraciones (7 μM) no hubo cambio en lo mostrado anteriormente. Sin embargo, el incremento de la concentración a 50 μM (en los límites permitidos para ser usado el IDR 1018) provocó un aumento considerable de la acumulación de Nrf2. Estos datos indican que probablemente las concentraciones probadas deban variarse en cada péptido para obtener el incremento de la concentración nuclear de Nrf2 sin llegar a afectar la viabilidad celular.

Debido a que los IDR mostraron efecto de activación de Nrf2, se procedió al análisis computacional para conocer más detalladamente las interacciones que conducen a la acción inductora de los IDR. Los análisis teóricos de este tipo han mostrado ser efectivos para conocer la manera como interaccionan dos proteínas y a la vez han ayudado al descubrimiento de nuevos inhibidores de la interacción proteína-proteína como en el caso de Nrf2 y Keap-1. Dado que los péptidos IDR son ricos en aminoácidos catiónicos se pensó que estos podrían competir con Keap-1 para unirse a Nrf2, cuya región de interacción es de naturaleza aniónica. Para probar esta hipótesis se identificaron los principales aminoácidos responsables de la interacción de Nrf2 con Keap-1. Nrf2 posee en su dominio Neh2, el motivo DLG de baja afinidad de unión con Keap-1 y el motivo ETGE cuya afinidad es alta por Keap-1. El motivo DLG se une a Keap-1 por medio de los aminoácidos Gln26, Asp27, Asp29, Leu30 y Gly31, y el motivo ETGE se une a Keap-1 por los aminoácidos Asp77, Glu78, Glu79, Thr80 y Glu82 a una región rica en Arg, Ser y Tyr de Keap-1 (Cheng *et al.*, 2015). Los análisis de acoplamiento molecular del motivo DLG de Nrf2 generaron valores de afinidad por Keap-1 de -23.1 Kcal/mol. Al realizar los acoplamientos de los IDR con Nrf2, los confórmeros de los IDR se analizaron en base a la

conformación estructural, a la afinidad y a los puntos de contacto con los aminoácidos que son importantes para la unión a Keap-1. Esta forma de clasificar si un conformero podría tener la capacidad de provocar algún efecto en Nrf2 indicó que los cuatro IDR podían unirse a Nrf2 en su región DLG y con afinidades de unión en algunos conformeros superiores a las de Nrf2-Keap-1. Los análisis de diferentes tipos de acoplamientos y la clasificación de los conformeros con base en estos tres criterios, mostró en primer lugar al IDR-1002 de manera consistente con afinidades de -23.3 a -18.5 Kcal/mol e interacciones en Gln26, Asp27, Asp29 y Gly31. Le siguió IDR-1018 con afinidades de -21.2 a -19.1 Kcal/mol e interacciones en Gln26, Asp27, Asp29 y Gly31. Después, IDR-HH2 con afinidades de -18.7 a -17.2 Kcal/mol e interacciones en Gln26, Asp27 y Asp29, por último, IDR-1 con afinidades de -19.3 a -16.7 Kcal/mol e interacciones en Gln 26, Asp27 y Asp29. Estos resultados revelaron que los IDR podrían intervenir como péptidos inhibidores de la interacción proteína-proteína, al competir con Keap-1 por Nrf2 (**Figuras suplementarias 1 y 2**) y dados los resultados bioquímicos experimentales se observó que hay una relación directa entre la acumulación observada de Nrf2 en núcleo y las afinidades, interacciones y conformaciones obtenidas excepto para el caso del IDR 1018, cuya acumulación nuclear fue la menor de los 4 péptidos y en afinidad ocupó el 2º lugar, recordando que los análisis in silico se realizan simulando un ambiente aislado, esta discrepancia entre análisis teóricos y experimentales podría deberse a que el ambiente en el que se encuentra actuando el péptido in vivo genera cambios en las interacciones de unión del péptido con respecto a Nrf2. Este comportamiento también sugiere que el número de conformaciones probables de los IDR y la afinidad respecto a

Nrf2 podrían ser la causa de los resultados experimentales. Por ejemplo, al incrementar la concentración de IDR-1018 de 7 μM a 50 μM , el número de microestados (confórmeros) de este péptido se elevarían (de acuerdo con la distribución de energía de Boltzmann), dando como resultado un cambio de entropía positivo y un aumento significativo de la probabilidad de que el péptido adopte una conformación apropiada inhibidora de la interacción entre Keap-1 y Nrf2.

A la fecha no se ha descrito un activador comercial que compita con Keap-1 por su unión a Nrf2, que es el tipo de efecto que vemos causarían los IDR. Recientemente, se identificó a la proteína P21 como un activador de Nrf2. Al parecer P21 interacciona directamente con Nrf2, desplazando así la interacción con Keap-1 (Chen *et al.*, 2009). Por consiguiente, se planteó obtener la estructura cristalizada de los 18 aminoácidos de P21 que forman la región de unión con Nrf2 y analizar el acoplamiento con Nrf2, con el fin de comparar estos resultados con los obtenidos con los IDR. El análisis de esta región peptídica mostró confórmeros con una afinidad superior (-24.4 kcal/mol) comparándolas con la de Nrf2 por Keap-1 y los valores de interacción un poco inferiores de los IDR con Nrf2. Además, el péptido de 18 aminoácidos de P21 adoptó una conformación similar a los IDR y se pudo detectar también interacción con los aminoácidos de Nrf2, Gln26, Asp29 y Gly31. P21 posee un motivo altamente positivo formado por los aminoácidos KRR, que son fundamentales para unirse a Nrf2. Este motivo se parece a un motivo RIWRR de IDR 1018 y RIR del IDR 1002, lo cual pudiera explicar la similitud de unión con Nrf2. Los análisis *in silico* para el análisis de la interacción de los péptidos con Nrf2 permitió proponer al motivo DLG de Nrf2 como el lugar de acción de

los péptidos IDR. Indudablemente, se requieren más estudios teóricos y experimentales para confirmar estos primeros hallazgos, por lo que en un futuro se pretende analizar si la translocación nuclear de Nrf2 observada realmente está ejerciendo un efecto antioxidante, para lo cual ensayos de Western Blot y/o PCR pueden indicarnos la actividad de enzimas antioxidantes activadas por Nrf2 y con ello darle mayor sustento al uso terapéutico de estos péptidos.

CONCLUSIÓN

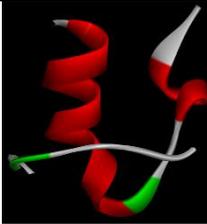
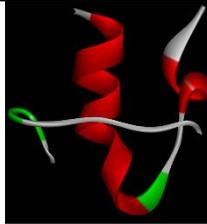
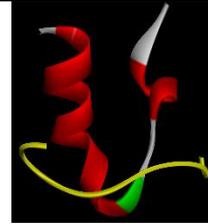
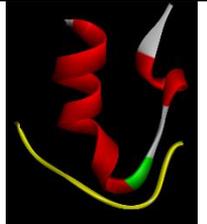
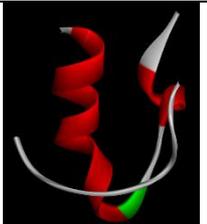
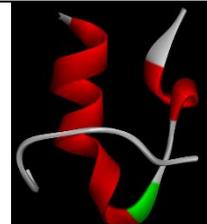
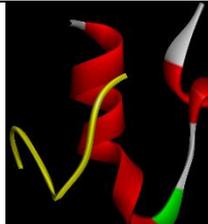
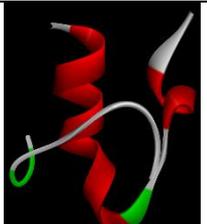
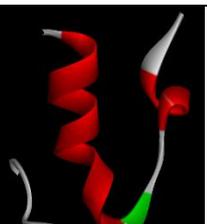
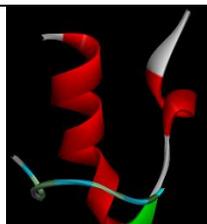
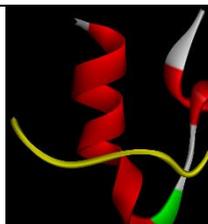
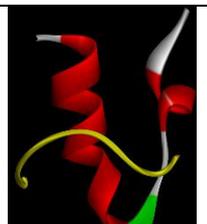
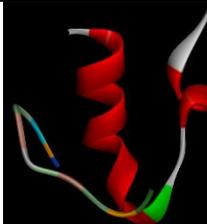
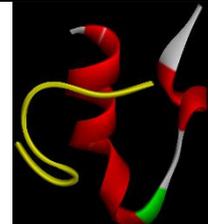
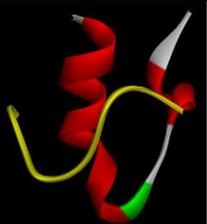
Los IDR 1002, HH2, 1 y 1018 inducen la translocación nuclear de Nrf2, lo cual es un paso importante para la activación de enzimas antioxidantes. Así mismo, los 4 péptidos modelados computacionalmente pueden interactuar con la proteína Nrf2 en la región de unión con su proteína reguladora Keap-1, siendo el IDR-1002 el que más y mejores conformaciones y afinidades de unión presentó.

PERSPECTIVAS

De este trabajo se obtuvo que el IDR-1002 es el péptido candidato líder para seguir siendo estudiado *in silico* y experimentalmente como activador de Nrf2, al inducir un efecto potente sobre la translocación de Nrf2 al núcleo a baja concentración. Además, nuevos péptidos derivados de la proteína P21 se visualizan como excelentes candidatos para ser diseñados y analizados *in vivo*, con potencial para activar la respuesta antioxidante mediada por Nrf2.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria. Diferentes tipos de análisis entre Nrf2 y los IDR. Se muestran los conformeros más representativos de cada tipo de análisis.

PÉPTIDO	Nrf2 DLG +IDR HIDROGENOS POLARES FLEXIBLE SIN EXAHUSTIVIDAD	Nrf2 DLG+IDR HIDROGENOS POLARES FLEXIBLE CON EXAHUSTIVIDAD	Nrf2 DLG +IDR SIN HIDROGENOS POLARES FLEXIBLE CON EXAHUSTIVIDAD	Nrf2 DLG +IDR SIN HIDROGENOS POLARES FLEXIBLE SIN EXAHUSTIVIDAD
1002	-23,3 GLN26,ASP27, ASP29,GLY31	- 23.2 GLN26, ASP 29	-22.2 ASP29	-18.5 GLN26, ASP29
				
1018	-19.8 LEU30,GLY31	-21.2 GLN26,ASP27,ASP29	-19.1 GLN26,ASP27,ASP29	-20.3 ASP29
				
HH2	-17.2 GLN26,ASP27, ASP29	-18.7 GLN26,ASP29,GLY 31	-18.3 GLN26,ASP29	-18.6 ASP29
				
1	-19.3 GLN26, ASP27, ASP2	-18.6 GLN26, ASP27,ASP29	-16.7 GLN29,GLN26	-17.7 GLN26, ASP29
				

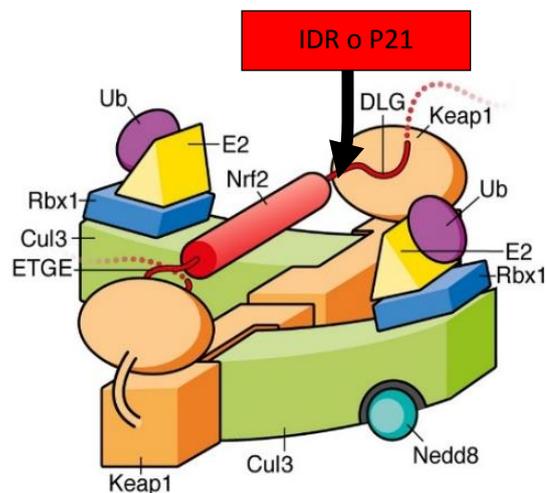


Figura suplementaria 1. Ilustración esquemática del complejo Keap-1 - Nrf2. La flecha negra indica la zona donde se predice que los IDR o P21 se intercalan para separar el complejo Keap-1 – Nrf2 (modificado de Canning *et al.*, 2015).

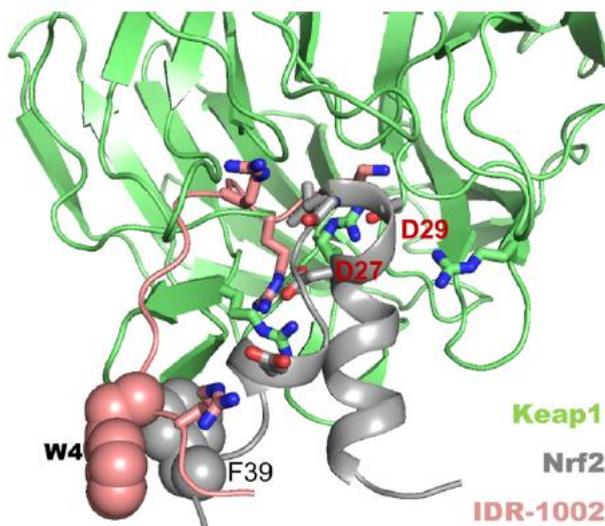


Figura suplementaria 2. Estructuras superpuestas de los complejos Nrf2 / IDR-1002 y Nrf2 / Keap1. Las estructuras de los dos modelos de acoplamiento usaron la misma interfaz de proteína en Nrf2 que la utilizada por Keap1. Por lo tanto, las interacciones entre Nrf2 / Keap1 y Nrf2 / IDR-1002 serían mutuamente excluyentes, lo que es coherente con la hipótesis actual. Análisis realizado en Rosetta, obtenidos por Pérez Aguilar JM., 2018 (datos no publicados).

BIBLIOGRAFÍA

Amin, K., Dannenfelser, RM. (2006). *In vitro* hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist. *J Pharm Sci*, 95:1173–1176

Apopa, PL., He, X., Ma, Q. (2008). Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J Biochem Mol Toxicol*, 22:63–76

Bertrand, HC., Schaap, M., Baird, L., Georgakopoulos, ND., Fowkes, A., Thiollier, C., Kachi, H., Dinkova-Kostova, AT., Wells, G. (2015). Design, Synthesis, and Evaluation of Triazole Derivatives That Induce Nrf2 Dependent Gene Products and Inhibit the Keap1-Nrf2 Protein-Protein Interaction. *J Med Chem*, 24;58(18):7186-94

Bryan, H., Olayanju, A., Goldring, C., Park, K. (2012). The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol*, 85: 705–717

Canning, P., Sorrell, F., Bullock, A. (2015). Structural basis of Keap-1 interactions with Nrf2. *Free Radic Biol Med*, 88: 101-107

Castillo, R., Huerta, Patricio., Carrasco, Rodrigo., Rodrigo, R. (2003). Estrés oxidativo y daño renal. *CIMEL*, 8 (1) : 44-53

Chen, W. (2009). Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/ WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol. Cell*, 34: 663–673

Cheng, C., Chen, YJ., Ku, CW., Huang, YW., Yang, CN. (2015). Structural and Dynamic Characterization of Mutated Keap1 for Varied Affinity toward Nrf2: A Molecular Dynamics Simulation Study *J. Chem. Inf. Model.*, 55 (10): 2178–2186

Choi, B., Kang, K., Kwak, M. (2014). Effect of Redox Modulating NRF2 Activators on Chronic Kidney Disease. *Molecules*, 19: 12727-12759

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

Coyoy, A., Morán, J. (2012). Papel de las ERO producidas por la NOX en procesos fisiológicos. *REB* 31(3): 100-109

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. et al. (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475: 106–109

Dorado C., Rugerio C. & Rivas S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la facultad de medicina UNAM*, 46(6): 229-235.

Filipowicz ,W., Bhattacharyya, SN., Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight. *Nat Rev Genet*, 9:102–114.

- Gazaryan, I., Thomas, B. (2016). The status of Nrf2 based therapeutics: current perspectives and future prospects. *Neural Regen Res*, 11 (11): 1708-1711
- Graham, F., Smiley, J., Russell, W., Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol*, 238 (36): 59-72
- Hancock, R., Sahl, HG. (2006). *Nat Biotechnol*; 24:1551–1557
- Hancock, R., Bertrand, H., Tsujita, T., Naz, S., El-Bakry, A., Laoruchupong, J., Hayes, J., Wells, G. (2012). Peptide inhibitors of the Keap1–Nrf2 protein–protein interaction. *Free Radic Biol Med*. 52: 444–451
- Hancock, R., Schaap, M., Pfister, H., and Wells, G.(2013). Peptide inhibitors of the Keap1–Nrf2 protein–protein interaction with improved binding and cellular activity. ***Org. Biomol. Chem*, 11: 3553-557**
- Hancock, R., Haney, E., Gill, E. (2016). The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nature reviews*, 16: 321- 334
- Hast, B.E., Goldfarb, D., Mulvaney, K.M., Hast, M.A., Siesser, P.F., Yan, F., Hayes, D.N. and Major, M.B. (2013) Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination. *Cancer Res*. 73: 2199–2210
- Hayes, J., Dinkova-Kostova, A., (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Cell Press*, 39(4): 199-218
- Hilchie, A., Wuerth, K., Hancock, R. (2013). Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol*, 9: 761-76
- Hsieh, C., Hsiao, H., Wu, W., Li, C., Tsai, Y., Chao, Y., Wang, D. & Hsieh, H. (2009). Regulation of shear-induced nuclear translocation of the Nrf2 transcription factor in endothelial cells. *J. Biomed. Sci*, 16(1): 12
- Hu, L., Magesh, S., Chen, L., Wang, L., Lewis, TA., Chen, Y., Khodier, C., Inoyama, D., Beamer, LJ., Emge, TJ., Shen, J. (2013) Discovery of a small-molecule inhibitor and cellular probe of Keap1–Nrf2 protein– protein interaction. *Bioorg Med Chem Lett*, 23(10):3039–3043
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. (2002). *J Biol Chem*, 277:42769–74.
- Huang, Y., Li, W., Yuan Su, Z., Tony Kong, A. (2015). The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response . *J Nutr Biochem*, 26(12): 1401-1413
- Huante M, A., Silva G, O., Oviedo B, J., Hancock, Baizabal A, VM. (2016). Peptide IDR-1002 Inhibits NF-κB Nuclear Translocation by Inhibition of IκBα Degradation and Activates p38/ERK1/2–MSK1-Dependent CREB Phosphorylation in Macrophages Stimulated with Lipopolysaccharide. *Front Immuno*, 7(533) 1-7

Hilchie, A., Wuerth, K., Hancock, R. (2013). Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol*, 9: 761-76

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, JD., Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*, 13(1), 76–86

Jiang Z-Y, Chu H-X, Xi M-Y, Yang T-T, Jia J-M, Huang J-J. (2013). Insight into the intermolecular recognition mechanism between Keap1 and IKK β combining homology modelling, protein-protein docking, molecular dynamics simulations and virtual alanine mutation. *PLoS One*. 8:75076

Jiang T, Harder B, Rojo de la Vega M. (2015), p62 links autophagy and Nrf2 signaling. *Free Radic Biol Med.*; 88(Pt B): 199–204

Kang, K. W., Ryu, J. H., & Kim, S. G. (2000). The essential role of phosphatidylinositol 3-kinase and of p38 mitogen-activated protein kinase activation in the antioxidant response element-mediated rGSTA2 induction by decreased glutathione in H4IIE hepatoma cells. *Mol Pharmacol* 58(5): 1017–25

Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M.(2001). Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells*. 6:857–868

Kensler, TW., Wakabayashi, N., Visual, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:6.1-6.28

Kobayashi, M., Yamamoto, M. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal*, 7(3-4):385–394

Kobayashi,E., Suzuki,T., Fnayama, R., Nagashima, T., Hayashi,M., Sekine, H., Tanaka, N., Moriguchi, T., Motohashi,H., Nakayama,K., Yamamoto,M. (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun* , 7:1-14

Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*, 12:213–223

Konigsberg, M. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés. *REB* 26(1): 18-25

Kundu, J.K., Surh, Y.J. Inflammation: Gearing the journey to cancer. (2008). *Mutat. Res.*, 659:15–30

Lo, SC., Li, X., Henzl, M., Beamer, L., Hannink, M. (2006). Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *The EMBO Journal*, 25: 3605 – 3617

Magesh, S., Chen, Yu., Hu, L. (2012). Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med Res Rev*, 00: 1–40

Marcotte, D., Zeng, W., Hus, JC., McKenzie, A., Hession, C., Jin, P., Bergeron, C., Lugovskoy, A., Enyedy, I., Cuervo, H., Wang, D. (2013). Small molecules inhibit the interaction of Nrf2 and the Keap1 Kelch domain through a non-covalent mechanism. *Bioorg Med Chem* 21(14): 4011–4019

Malhotra, D., Portales-Casamar, E., Singh, A., Srivastava, S., Arenillas, D., Happel, C., Shyr, C., Wakabayashi, N., Kensler, T., Wasserman, W., Biswal S. (2010). Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res* .38(17): 5718–5734

Mignotte, V., Wall, L., DeBoer, E., Grosveld, F., Romeo, PH. (1989). Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res*, 17:37–54

Motohashi, H. & Yamamoto, M. (2004). Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*, 1783(10),1847-1856

Namani, A., Li, Y., Wo, X. (2014). Modulation of Nrf2 signaling pathway by nuclear receptors: implications for cancer. *BBA*. 1843: 1875 -1885

Nezu, M., Suzuki, N., Yamamoto, M. (2017). Targeting the KEAP1-NRF2 System to Prevent Kidney Disease Progression. *Am J Nephrol*, 45: 473-483

Niyonsaba, F., Madera, L., Afacan, N., Okumura, K., Ogawa, H., Hancock, R., (2013). The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. *J Leukoc Biol*, 94: 159-170

Noel, S., Arend, LJ., Bandapalle, S., Reddy, SP., Rabb, H. (2016). Kidney epithelium specific deletion of kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) causes hydronephrosis in mice. *BMC Nephrol*; 17: 110

Padmanabhan, B., Tong, T., Ohta, T., Nakamura, Y., Scharlock, M., Ohtsuji, M., Kang, M., Kobayashi, A., Yokoyama, S., Yamamoto, M. (2006). Structural Basis for Defects of Keap1 Activity Provoked by Its Point Mutations in Lung Cancer. *Mol Cell*, 21-. 689-700

Peréz, V., Pettersson, S., Ritchie, D., Borrell, J., Teixido, J. (2009). Discovery of Novel HIV Entry Inhibitors for the CXCR4 Receptor by Prospective Virtual Screening. *J Am Chem Soc*, 49 (4): 810-824

Rada, P., Rojo, A.I., Chowdhry, S., McMahon, M., Hayes, J.D., Cuadrado, A. (2011). SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol Cell Biol*, 31:1121–1133

Rada, P., Rojo, A.I., Evrard-Todeschi, N., Innamorato, N.G., Cotte, A., Jaworski, T. (2012). Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP axis. *Mol Cell Biol*, 32:3486–3499

Reisman, S., Buckley, D., Tanaka, Y. & Klaassen, C. (2009). CDDO-Im Protects from Acetaminophen Hepatotoxicity Through Induction of Nrf2-Dependent Genes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 236(1): 109–14

Rivas-Santiago, B., Castañeda, J., Rivas, C., Waldbrook, M. & Gonzalez, C. (2013). Ability of Innate Defence Regulator Peptides IDR-1002, IDR-HH2 and IDR-1018 to Protect against Mycobacterium tuberculosis infection in Animal Models, *PLoS One*, 8(3), 1-10

Satoh, T., Lipton, S. (2017). Recent advances in understanding NRF2 as a druggable target: development of pro-electrophilic and non-covalent NRF2 activators to overcome systemic side effects of electrophilic drugs like dimethyl fumarate [version 1; referees: approved]. *F1000Research*, 6: 1-10

Sies, H. & Cárdenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans of R Soc Lond*, 311(1152), 617-631

Stepkowski, T.M., Kruszewski, M.K. (2011). Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 50(9):1186–1195

Sun, H., Jiang, Z., Zhang, M., Lu, M., Yang, T., Pan, Y., Huang, H., Zhang, X., You, Q. (2014). Novel protein–protein interaction inhibitor of Nrf2–Keap1 discovered by structure-based virtual screening. *Med. Chem. Commun*, 5: 93–98

Suzuki. (2010). REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Research Notes*, 3(294): 1-6

Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. (2013). *Trends Pharmacol Sci*, 34:340–6

Taguchi, K., Motohashi, H., Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*, 16(2):123–140

Tebay, L., Robertson, H., Durant, Vitale, S., Penning, T., Dinkova-Kostova, A., Hayes, J., (2016). Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through

which it attenuates degenerative disease *Free Radic Biol Med.* 88(0 0): 108–146.

Tong, K., Padmanabhan, B., Kobayashi, A., Shang, C., Hirotsu, Y., Yokoyama, S., Yamamoto, M. (2007). Different Electrostatic Potentials Define ETGE and DLG Motifs as Hinge and Latch in Oxidative Stress Response. *J Cell Biol Mol*, 27 (21):7511-7521

Turner-Brannen, E., Choi, K., Lippert, D., Cortens, J., Hancock, RE., El-Gabalawy, H. & Mookherjee, N. (2011). Modulation of interleukin-1 β -induced inflammatory responses by a synthetic cationic innate defence regulator peptide, IDR-1002, in synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther*, 13(4),1-14

Velichkova, M. & Hasson, T. (2005). Keap1 Regulates the Oxidation-Sensitive Shuttling of Nrf2 into and out of the Nucleus via a Crm1-Dependent Nuclear Export Mechanism. *Mol Cell Biol*, 25(11), 4501–4513

Wieczorek, M., Jenssen, H., Kindrachuk, J., Scott, W., Elliott, M., Hilpert, K., Cheng, J., Hancock, R., Straus, S. Structural Studies of a Peptide with Immune Modulating and Direct Antimicrobial Activity. (2010). *Cell*, 17: 970 -980

Wang, H., Liu, K., Geng, M., Gao, P., Wu, X., Hai, Y. (2013). RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res*, 73:3097–3108

Wang, G., Li, X., Wang, Z. (2016) APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res* 44, D1087-D1093

Wang, G., Li, X., Wang, Z., (2009) *Nucleic Acids Res*, 37:D933–D937

Wardyn, D., Ponsford, M. & Sanderson, C. (2015). Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans*, 43(4), 621–626

Wu, M., Hancock, R., (1999). Interaction of the Cyclic Antimicrobial Cationic Peptide Bactenecin with the Outer and Cytoplasmic Membrane. *J Biol Chem*, 274:29-35

Yu, S., Khor, TO., Cheung, KL., Li, W., Wu, TY., Huang, Y., (2010). Nrf2 expression is regulated by epigenetic mechanisms in prostate cancer of TRAMP mice. *PLoS One*, 5:e8579