



## Resumen

Los fitoquímicos biológicamente activos de *Salvia rosmarinus*, *Zingiber officinale* y *Sophora japonica* se utilizan desde hace mucho tiempo con fines sanitarios, y recientemente hemos informado sobre una combinación de estas plantas como suplemento dietético PB123. En el presente trabajo ampliamos esos estudios para evaluar la activación del factor de transcripción del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) y la expresión genética diferencial en células cultivadas HepG2 (carcinoma hepatocelular) tratadas con PB123. Determinamos los cambios en el transcriptoma mediante métodos de ARNm-seq, y analizamos las vías afectadas mediante Ingenuity Pathway Analysis y BioJupies, indicando que los efectos primarios incluían el aumento de la vía Nrf2 y la disminución de la vía de biosíntesis del colesterol. El pretratamiento de las células HepG2 cultivadas con PB123 aumentó los genes citoprotectores dependientes de Nrf2 y las defensas celulares contra el estrés oxidativo inducido por el hidróperóxido de cumeno. Por el contrario, el pretratamiento de las células HepG2 cultivadas con PB123 reguló a la baja los genes de la biosíntesis del colesterol y disminuyó los niveles de colesterol celular. Estos resultados apoyan los posibles efectos beneficiosos de la PB123 como suplemento dietético que promueve la salud.

---

## 1. Introducción

El envejecimiento y la disminución de las defensas antioxidantes del organismo relacionadas con la edad se asocian a diversos trastornos y enfermedades. La composición de la dieta influye significativamente en la capacidad del organismo para luchar contra el estrés oxidativo, lo que constituye una de las formas en que la ingesta dietética desempeña un papel en el envejecimiento saludable. En el pasado esto se atribuía en gran medida a la eliminación directa de los oxidantes por parte de los compuestos consumidos en la dieta, pero en los últimos años la atención se ha desplazado a los mecanismos de protección endógena y a la comprensión de los beneficios para la salud de los componentes de la dieta basados en su capacidad para activar las defensas endógenas, por ejemplo induciendo el aumento de la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes.

El factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) es un factor de transcripción que regula la expresión genética de una amplia variedad de enzimas de desintoxicación de fase II y enzimas antioxidantes mediante la participación del elemento de respuesta antioxidante (ARE) que se encuentra en las regiones promotoras de estos genes. Basado en un extenso trabajo previo, el ARE es un elemento promotor que regula la expresión de muchos genes antioxidantes, antiinflamatorios y citoprotectores.

El envejecimiento se asocia con una disminución de la Nrf2 citoprotectora, lo que significa que los factores de estrés relacionados con el envejecimiento coinciden con una menor capacidad de protección contra ellos. Se han observado menores niveles de Nrf2 nuclear con la edad avanzada tanto en ratas como en personas, junto con una menor capacidad de defensa y reparación antioxidante. Se ha demostrado que las especies naturalmente longevas, como la rata topo desnuda, tienen niveles notablemente elevados de activación de Nrf2. Los niveles de colesterol total y LDL tienden a aumentar con la edad y, al mismo tiempo, el riesgo de aterosclerosis y enfermedad coronaria también tiende a aumentar con la edad. En particular, investigaciones anteriores han indicado que la suplementación dietética con jengibre, un activador de Nrf2, se correlaciona con la disminución de los niveles de colesterol en sujetos humanos.

En el presente trabajo, examinamos los efectos del suplemento dietético PB123, una combinación de compuestos fitoquímicos de *Salvia rosmarinus*, *Zingiber officinale* y el bioflavonoide luteolina.

El romero (*Salvia rosmarinus*) se ha utilizado contra una variedad de problemas de salud, basándose en sus beneficios antiinflamatorios, antioxidantes y antimicrobianos. El jengibre (*Zingiber officinale*) es un miembro de la familia de plantas Zingiberaceae con más de 2500 años de uso registrado en terapias tradicionales, normalmente con énfasis en los beneficios antiinflamatorios, analgésicos y para el sistema digestivo. La luteolina (que se encuentra en muchos alimentos y fuentes vegetales) se ha utilizado con frecuencia como suplemento dietético por sus beneficios antioxidantes, neurológicos y antiinflamatorios.

En nuestro trabajo anterior, se demostró que los genes dependientes de Nrf2 estaban regulados al alza en las células epiteliales alveolares aisladas de ratas transgénicas con VIH-1 tras la administración dietética de PB123. En el presente trabajo, estudiamos la capacidad de la combinación PB123 para activar la vía Nrf2 y regular al alza los genes antioxidantes, antiinflamatorios y otros genes protectores de las células HepG2, y determinamos su protección de las células HepG2 cultivadas contra el estrés oxidativo y la dislipidemia.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Materiales y reactivos**

Extractos de plantas: el extracto de raíz de jengibre de *Zingiber officinalis* (estandarizado al 20% de gingeroles) y el extracto de romero de *Salvia rosmarinus* (estandarizado al 6% de carnosol; 15% de ácido carnósico) se obtuvieron de Flavex (Rehlingen, Alemania); la luteolina (de *Sophora japonica*, estandarizada al 98% de luteolina) se obtuvo de Jiaherb (Pine Brook, NJ, EEUU). Los extractos de disolvente del polvo de PB123 se prepararon mezclando una proporción de masa de 10:5:1 de los polvos de romero, jengibre y luteolina y, a continuación, extrayendo el polvo mezclado (50 mg/mL) durante la noche en etanol y recogiendo el sobrenadante.

Cultivo celular: los antibióticos y los medios de cultivo en polvo se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.). Reactivos y ensayos: El ensayo de tinción de lípidos intracelulares (kit de ensayo colorimétrico de esteatosis), el inhibidor de ERK1/2 (PD98059, CAS 167869-21-8) y el inhibidor de Nrf2 (AEM1, CAS 1030123-90-0) se obtuvieron de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU.). El ensayo de colesterol (Cholesterol/Cholesterol Ester-Glo) se obtuvo de Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA). El hidróperóxido de cumeno (CAS 80-15-9) y todos los demás reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

### **2.2 Cultivo celular**

Para los experimentos de genómica, lípidos y citoprotección se utilizó la línea celular de carcinoma hepatocelular humano HepG2. Para los experimentos de activación de Nrf2 utilizamos células HepG2 que habían sido transducidas de forma estable con un constructo del gen de la luciferasa dependiente de Nrf2 (células HepG2-ARE), amablemente proporcionadas por el Dr. S.O. Simmons. Las células HepG2 son apropiadas para el presente trabajo porque presentan propiedades normales de activación de Nrf2, carecen de mutaciones en Nrf2/KEAP1 y se ha

demostrado previamente que son adecuadas para estudios metabólicos. Las células HepG2 y HepG2-ARE fueron cultivadas y mantenidas por métodos estándar como se ha descrito previamente. La viabilidad de las células se determinó mediante un ensayo de kit de recuento de células-8 (CCK8) (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, USA). Brevemente, se analizó la viabilidad de las células añadiendo una solución de CCK8, incubando a 37 °C y midiendo la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Tek, Winooski, VT, EE.UU.). Los valores de absorbancia se normalizaron con respecto a las lecturas de las células de control del vehículo, y los datos se presentaron como porcentaje de células viables en relación con las células de control del vehículo.

### **2.3 Ensayos de genes indicadores de Nrf2**

Las células HepG2-ARE promotoras/reportadoras se utilizaron para ensayar la activación de Nrf2, medida como unidades luminosas relativas (RLU), tal y como se ha descrito previamente. Para los experimentos de sinergia, las células fueron tratadas con combinaciones de extractos de romero, jengibre y luteolina y con las concentraciones correspondientes de extractos de cada agente individual. La sinergia de PB123 se visualizó comparando la señal de activación de Nrf2 de la combinación de PB123 con la suma de las señales inducidas por los tratamientos con los extractos de los ingredientes individuales con un rango de concentraciones de extracto de PB123 (1, 6, 3,2, 4,8, 6,4, 8 µg/mL) o con las cantidades correspondientes de extracto de romero (1, 2, 3, 4, 5 µg/mL), extracto de jengibre (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 µg/mL) y luteolina (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 µg/mL) solos. Se realizaron cálculos de activación combinatoria de Nrf2 utilizando modelos de referencia de sinergia y datos de una disposición de estilo damero de combinaciones de extracto de romero (0-24 µg/mL) y extracto de jengibre (0-12 µg/mL) utilizando herramientas de cálculo en synergyfinder.org.

### **2.4 Ensayos de expresión genética**

#### **2.4.1 Cultivo celular y aislamiento de ARN**

Las células HepG2 se trataron durante 16h en placas de 24 pocillos con 0 (control del vehículo) o 12 µg/mL de PB123 (como extracto de 50 mg/mL en etanol 100%), con 4 réplicas biológicas por grupo de tratamiento. El cultivo celular y el aislamiento de ARN se realizaron como se ha descrito previamente. Brevemente, después del periodo de tratamiento, el ARN total se aisló de las células utilizando Trizol, y luego se purificó utilizando columnas de limpieza Qiagen RNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). La concentración de ARN en cada muestra se midió utilizando la absorbancia a 260 nm (A260) con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). La integridad del ARN en las muestras se determinó utilizando la Agilent TapeStation 4200 (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.) en las instalaciones del Centro de Genómica y Microarrays de la Universidad de Colorado.

#### **2.4.2 Ensayos de ARNm-seq**

Preparación de bibliotecas de ARNm-seq. Se utilizaron muestras que contenían 10-100 ng de ARN total para preparar las bibliotecas NGS de Illumina según las instrucciones del fabricante para el NuGEN Universal Plus ARNm-seq (Tecan Genomics, Redwood City, CA, EE.UU.). En este método, se utiliza la selección por poliA para aislar el ARNm del ARN total, que luego se fragmenta y se cebe para la creación de fragmentos de ADNc de doble cadena, que luego se amplifican, se seleccionan por tamaño y se purifican para la generación de clusters.

Secuenciación. Las bibliotecas de plantillas de ARNm se secuenciaron como lecturas de 150 pb en el Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) en el centro de genómica y microarrays de la Universidad de Colorado (Aurora, CO, EE.UU.). Secuenciamos a una profundidad que proporciona ~40M de lecturas de 2X150 bases por muestra.

Perfiles de ARNm-seq. Los datos de secuenciación se procesaron para la expresión genética diferencial como se ha descrito previamente. El proceso computacional para analizar las secuencias derivadas utilizó GSNAP, Cufflinks y

R para la alineación de secuencias y la determinación de la expresión genética diferencial. En resumen, GSNAP se utilizó para mapear las lecturas generadas en el genoma humano (GRCH38), Cufflinks se utilizó para la expresión derivada (FPKM), y R se utilizó para analizar la expresión genética diferencial con ANOVA, con una tasa de falsos descubrimientos (FDR) < 0,05 como límite. Los datos transcriptómicos se examinaron mediante el análisis de vías utilizando Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, Germantown, MD, USA). Para obtener más perfiles, los datos de secuenciación en bruto también se procesaron utilizando Biojupies para identificar qué vías de interés fueron modificadas por PB123.

## **2.5 Ensayos de proteínas**

Se utilizó el kit ELISA Human HMOX1 PicoKine (Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, EE.UU.) para determinar los niveles de proteína hemo oxigenasa-1 (HMOX1) en lisados de células HepG2 según las instrucciones del fabricante, tal y como se ha descrito previamente [67]. La proteína total en los lisados se midió utilizando el método de Lowry.

## **2.6 Ensayos de colesterol total**

El nivel de colesterol total en las células HepG2 cultivadas se midió utilizando un kit de ensayo enzimático quimioluminiscente según las instrucciones del fabricante (Cholesterol/Cholesterol Ester-Glo™ Assay kit, Promega, Madison, WI). Brevemente, después de 24 horas de tratamiento con PB123, se eliminó el medio y las células HepG2 se lavaron 2 veces con PBS y luego se lisaron utilizando la solución de lisis de colesterol. Las alícuotas del lisado celular (50 µl) se cargaron en una placa blanca y opaca de 96 pocillos junto con estándares de colesterol de concentración conocida, se añadieron 50 µL de reactivo de detección de colesterol con reactivo enzimático de esterasa a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se midió la luminiscencia de cada pocillo utilizando un luminómetro lector de placas.

## **2.7 Ensayos de lípidos intracelulares**

El nivel de lípidos intracelulares en las células HepG2 cultivadas se midió utilizando un kit de ensayo basado en la tinción Oil Red O de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Steatosis Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Brevemente, las células HepG2 se trataron durante 24 h con 0, 5 o 12 µg/mL de PB123, luego se tiñeron con Oil Red O, se lisaron y se extrajo el tinte utilizando las soluciones del kit de ensayo colorimétrico de esteatosis, seguido de la medición del tinte Oil Red O extraído por absorbancia a 492 nm utilizando el lector de placas para determinar el nivel relativo de lípidos intracelulares.

## **2.8 Ensayos de citoprotección**

Para evaluar los efectos protectores contra el estrés oxidativo, las células HepG2 fueron pretratadas con PB123, con o sin inhibición de ERK1/2 por PD98059, y luego desafiadas con hidróperóxido de cumeno (CH) como se describió previamente. Los efectos citotóxicos causados por el CH se determinaron midiendo la viabilidad celular mediante el ensayo CCK8, tal como se ha descrito anteriormente.

## **2.9 Análisis estadístico**

Los datos se presentan como la media ± SEM (error estándar de la media) de múltiples réplicas. La significación de las diferencias observadas en las medias se evaluó mediante un ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey o mediante la prueba t de Student para datos no apareados utilizando el software Prism 9

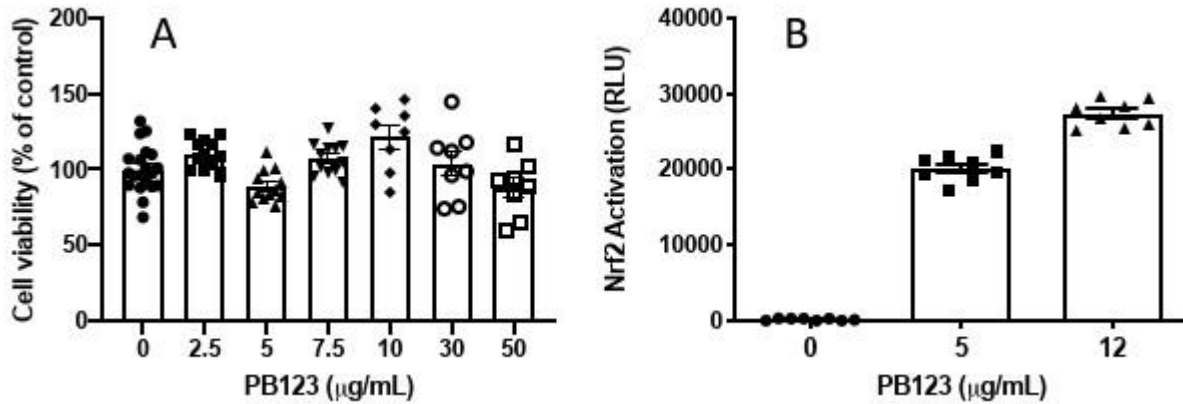
(GraphPad Software, versión 9.3.0, San Diego, CA, EE.UU.). Un valor  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

### 3. Resultados

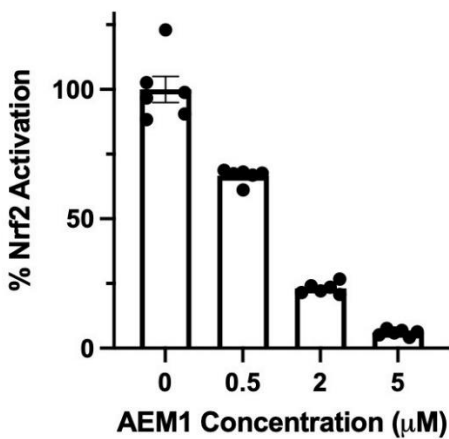
#### 3.1 Activación y sinergia de Nrf2

##### 3.1.1 Activación de Nrf2

En primer lugar, se determinó que el PB123 no era tóxico para las células HepG2 en el rango de 0-50  $\mu\text{g/mL}$ , que superaba las concentraciones utilizadas en el resto del estudio (**Imagen 1A**), midiendo la viabilidad celular. Utilizando la línea celular HepG2 transducida de forma estable con una construcción promotora de ARE/luciferasa, determinamos que PB123 activa Nrf2 de forma dependiente de la dosis (Imagen 1B). Como se esperaba, la adición del inhibidor de Nrf2 AEM1 (0,5-5  $\mu\text{M}$ ) atenuó de forma dependiente de la dosis la activación de Nrf2 ( $p < 0,05$ ) por PB123 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) (**Imagen 2**).



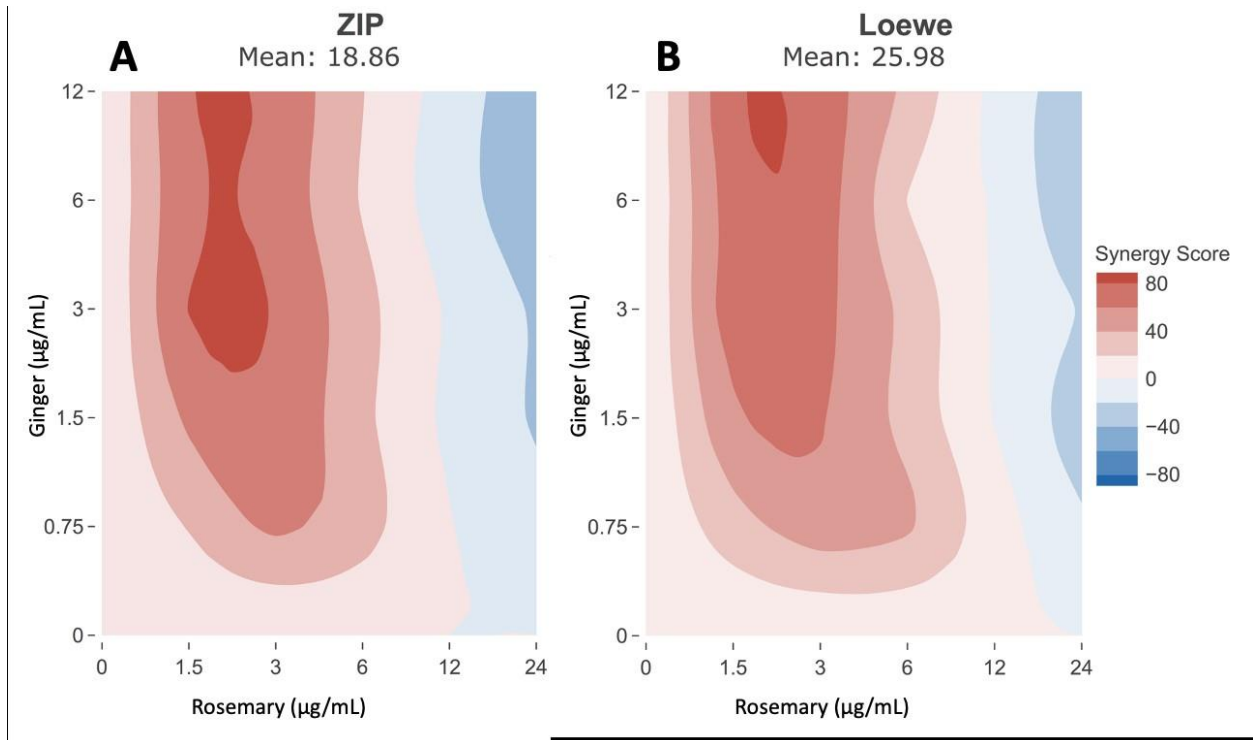
**Imagen 1** Efecto del tratamiento con PB123 en las células HepG2. (A) La PB123 no fue tóxica para las células HepG2, medido por el tratamiento de las células durante 24 horas con PB123 y luego determinando la viabilidad celular por el ensayo CCK8. (B) La PB123 activó la Nrf2 en las células HepG2-ARE de forma dependiente de la dosis ( $p < 0,05$ ) mediante 5 y 12  $\mu\text{g/mL}$  de PB123.



**Imagen 2** El inhibidor de Nrf2 AEM1 bloqueó de forma dependiente de la dosis la activación de Nrf2 ( $p < 0,05$ ) inducida en las células HepG2-ARE por el tratamiento con PB123 (10  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3.1.2 Sinergia

Utilizando la línea celular HepG2 transducida de forma estable con el promotor ARE/reportador de luciferasa, encontramos que el romero, el jengibre y la luteolina en PB123 se combinan sinérgicamente para la activación de la vía del factor de transcripción Nrf2, siendo la sinergia más notable la observada entre las combinaciones de extractos de romero y jengibre. Para modelar y visualizar la sinergia observada con el romero y el jengibre para la activación de Nrf2, medimos la activación de Nrf2 en las células HepG2-ARE con combinaciones en damero de las concentraciones de los extractos de romero y jengibre y luego utilizamos la sinergia de Zero Interaction Potency (ZIP) y Loewe. Tanto los modelos de sinergia de referencia de efecto aditivo (A) como (B) de Loewe mostraron puntuaciones de sinergia muy positivas (synergyfinder.org) (**Imagen 3**).

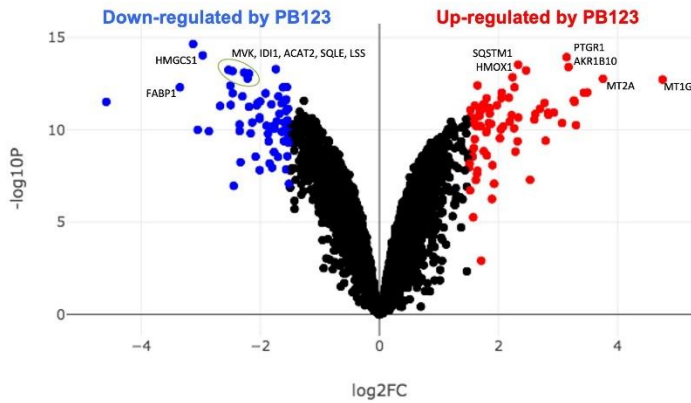


**Imagen 3** Análisis de sinergia combinatoria de las células HepG2 tratadas con extractos de romero y jengibre. La activación de Nrf2 mediante combinaciones en damero de los extractos de romero y jengibre mostró una respuesta fuertemente sinérgica, calculada utilizando tanto (A) la potencia de interacción cero como (B) los modelos de sinergia de referencia de efecto aditivo de Loewe (synergyfinder.org).

### 3.2 Expresión genética y efectos

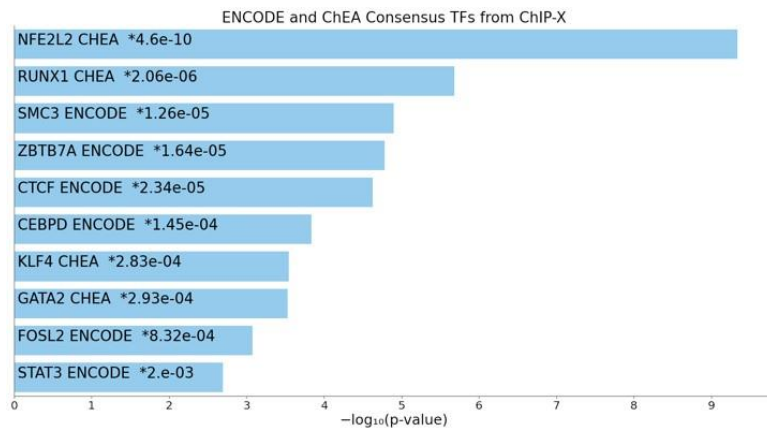
#### 3.2.1 Expresión genética de HepG2 mediante análisis de ARNm-seq

En el presente estudio, los niveles de expresión de 170 genes aumentaron y los niveles de expresión de 247 genes disminuyeron en >2 veces en las células HepG2 tratadas durante 16h con 12 µg/mL de PB123, determinado por ARNm-seq en grupos de tratamiento celular con 4 muestras biológicas replicadas por grupo (**Imagen 4**).



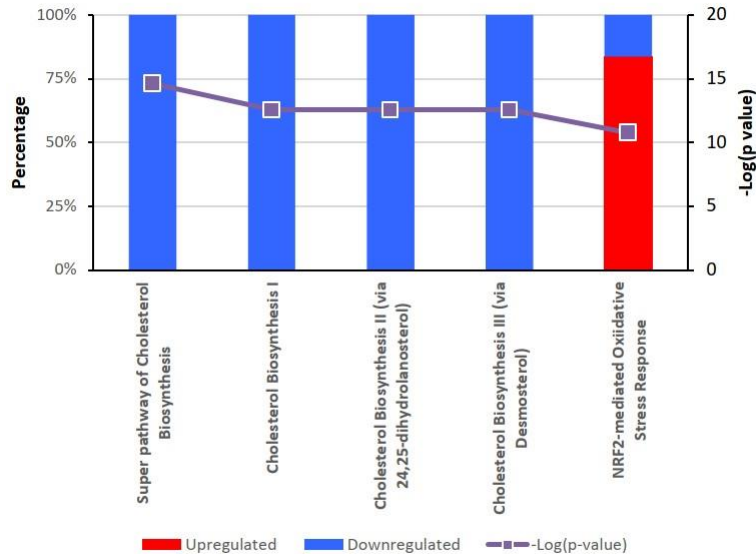
**Imagen 4** Se utilizó BioJupies para generar un gráfico Volcano de los genes expresados diferencialmente por las células HepG2 tratadas con PB123 12 µg/ml en comparación con las células HepG2 de control no tratadas. El rojo indica los genes regulados al alza y el azul los genes regulados a la baja. Los genes se seleccionaron con un umbral de cambio de 2 veces. Los símbolos de los genes en los gráficos se utilizan para marcar algunos de los genes cambiados más significativos, mostrando los genes de síntesis de lípidos y colesterol regulados a la baja y los genes dependientes de Nrf2 regulados al alza.

Para cuantificar los cambios en la expresión genética causados por el PB123, utilizamos el enfoque ARNm-seq para medir los niveles de expresión genética utilizando células HepG2 cultivadas por separado. La evaluación del conjunto de datos mediante BioJupies mostró que el principal factor de transcripción afectado era Nrf2 (NFE2L2) (**Imagen 5**).



**Imagen 5** Se utilizó BioJupies para consultar los factores de transcripción consensuados de ENCODE y ChEA con los DEG del conjunto de datos de ARNm del tratamiento con 12 µg/mL de PB123 y se reveló una dependencia prominente del factor de transcripción Nrf2 (NFE2L2).

El Ingenuity Pathway Analysis (IPA) también demostró claramente la importancia primaria de la vía del factor de transcripción Nrf2 en la expresión genética diferencial inducida por el tratamiento de las células HepG2 con PB123 (**Imagen 6**).

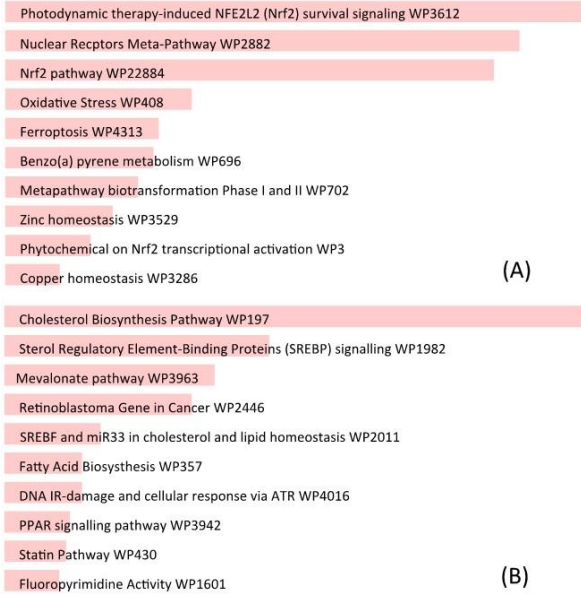


**Imagen 6** El análisis de vías de ingenuidad (IPA) indica que el PB123 regula a la baja los genes de la vía de la biosíntesis del colesterol y a la alza los genes de la vía del factor de transcripción Nrf2.

### 3.2.2 Vías implicadas

La PB123 indujo la activación de Nrf2 y la regulación al alza de los genes dependientes de Nrf2, y BioJupies e Ingenuity Pathway Analysis (IPA) identificaron la participación clave de la vía Nrf2 en los cambios de expresión genética inducidos por la PB123. El análisis de los genes expresados diferencialmente mediante IPA reveló que la PB123 regula al alza los genes de la vía del factor de transcripción Nrf2 y a la baja los genes de la vía de la biosíntesis del colesterol (Figura 6). Asimismo, el análisis de los datos mediante BioJupies de los genes expresados de forma diferencial en las células HepG2 tratadas con PB123 indicó que las vías más afectadas por el análisis de Wikipathways incluían la vía de NRF2 (arriba) y la vía de la biosíntesis del colesterol (abajo). Los resultados de Wikipathways regulados al alza y a la baja se muestran en la **Imagen 7**.

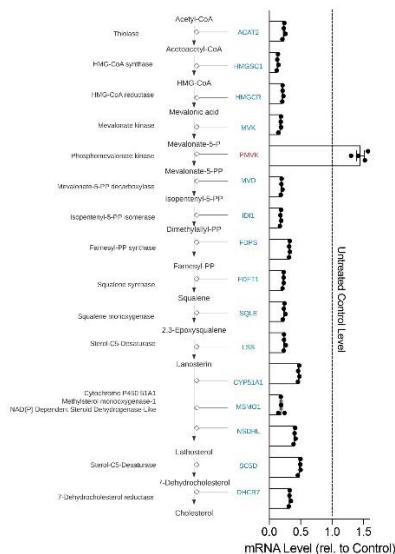




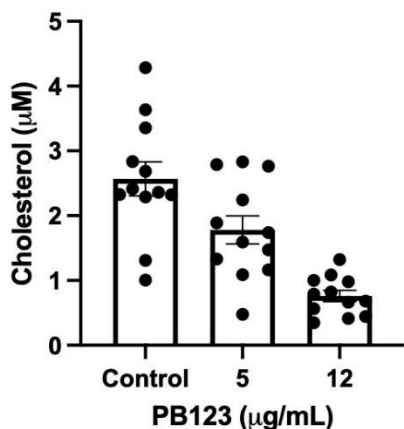
**Imagen 7** Se utilizó BioJupies para consultar Wikipathways y revelar las principales vías afectadas por los genes regulados por PB123 (A) y regulados por PB123 (B).

### 3.2.3 Lípidos celulares

La PB123 indujo una regulación a la baja de la vía de la biosíntesis del colesterol, por lo que evaluamos los genes individuales implicados en el conjunto de genes de la Wikipathway para la WP197 por sus valores de expresión genética de ARNm-seq con 4 réplicas biológicas por grupo (la vía WP197 y los datos de expresión de ARNm se muestran juntos en la Figura 8). Dado que la regulación a la baja de los genes de la vía de la biosíntesis del colesterol inducida por PB123 fue tan amplia y consistente, seguimos examinando los cambios inducidos por PB123 en los niveles de colesterol total celular. El tratamiento (24 horas) de las células HepG2 con PB123 a 5 µg/mL y a 12 µg/mL disminuyó significativamente los niveles de colesterol total intracelular en las células (Figura 9). En un trabajo relacionado, Li, et al., informaron de que el colesterol total en las células HepG2 se redujo mediante el tratamiento con 6-gingerol, que es uno de los fitoquímicos más activos del jengibre.

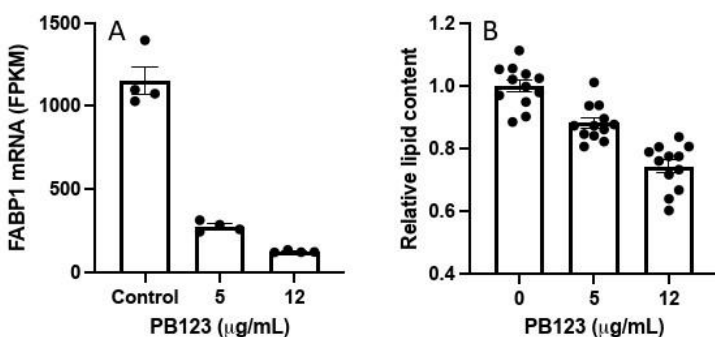


**Imagen 8** Genes de la vía de la biosíntesis del colesterol de WikiPathways (WP197, <https://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP197>). En nuestro conjunto de datos de ARNm-seq encontramos que todos los genes fueron significativamente regulados a la baja (mostrados en azul) por 12  $\mu\text{g/mL}$  de PB123 en las células HepG2, excepto el PMVK (mostrado en rojo) en comparación con las células HepG2 tratadas como control ( $p < 0,05$ ,  $n = 4$  por grupo). La HMG-CoA reductasa (HMGCR) es la enzima limitante de la vía.



**Imagen 9** Colesterol total de HepG2. Los niveles de colesterol total se redujeron significativamente en las células HepG2 mediante el tratamiento con 5 ó 12  $\mu\text{g/mL}$  de PB123 en comparación con las células HepG2 de control no tratadas ( $p < 0,05$ ,  $n = 12$  por grupo).

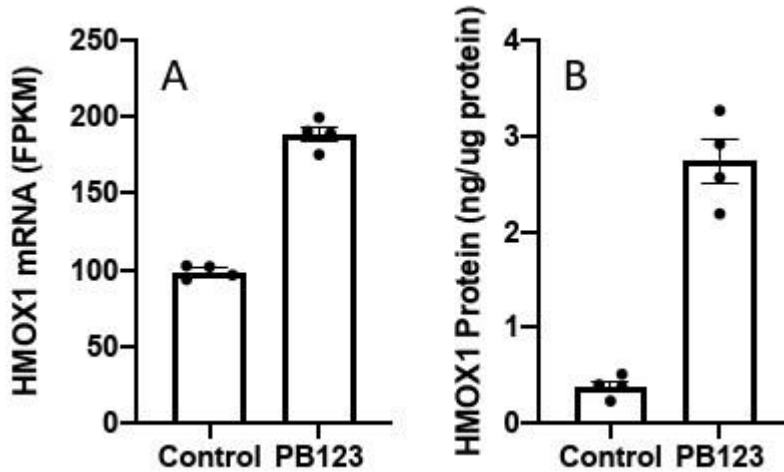
El examen de la vía de señalización PPAR WP3942 altamente desregulada (**Imagen 7B**) junto con los genes altamente desregulados en el diagrama de volcán (**Imagen 4**) indicó un posible papel para la desregulación inducida por PB123 del gen FABP1 de la proteína de unión a ácidos grasos 1. Para hacer un seguimiento, evaluamos los niveles de gotas de lípidos intracelulares en las células HepG2 tras 24 horas de tratamiento con PB123 (0, 5 y 12  $\mu\text{g/mL}$ ). El gen FABP1 fue significativamente regulado a la baja tanto por 5 como por 12  $\mu\text{g/mL}$  de PB123 en las células HepG2 en comparación con las células HepG2 de control (**Imagen 10A**), y el contenido de lípidos intracelulares de HepG2 se redujo significativamente tanto por 5 como por 12  $\mu\text{g/mL}$  de PB123 (**Imagen 10B**).



**Imagen 10** Lípidos intracelulares de HepG2. Encontramos que (A) FABP1 fue significativamente regulado a la baja tanto por 5 como por 12  $\mu\text{g/mL}$  de PB123 en las células HepG2 en comparación con las células HepG2 de control no tratadas ( $p < 0,05$ ,  $n = 4$  por grupo), y (B) que el contenido de lípidos intracelulares fue igualmente reducido significativamente tanto por 5 como por 12  $\mu\text{g/mL}$  de PB123 en las células HepG2 en comparación con las células HepG2 de control no tratadas ( $p < 0,05$ ,  $n = 12$  por grupo).

### 3.2.4 ARNm y proteína de HMOX1

El tratamiento con PB123 de las células HepG2 (24 horas) aumentó la expresión del gen HMOX1 (**Imagen 11A**). Como se preveía a partir del aumento de la expresión del gen HMOX1 inducido por PB123, los niveles de la proteína HMOX1 intracelular también se elevaron por el tratamiento de las células HepG2 durante 16h con 5 µg/mL de PB123 (**Imagen 11B**).



**Imagen 11** La expresión genética y la proteína de la hemo-oxigenasa-1 aumentaron en las células HepG2 por el tratamiento con PB123. El tratamiento de las células HepG2 con PB123 (5 µg/mL, 24 horas) aumentó tanto los niveles de expresión genética de HMOX1 determinados por ARNm-seq (A) como los niveles de proteína HMOX1 determinados por ELISA (B), como se esperaba en base al gran aumento de la activación de Nrf2 inducido por PB123 ( $p < 0,05$ ,  $n = 4$  en cada caso).

### 3.2.5 Protección contra el estrés oxidativo

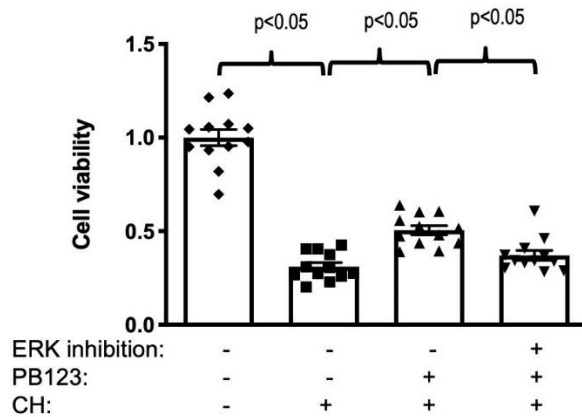
Para evaluar las defensas antioxidantes celulares, utilizamos el oxidante hidropéroxido de cumeno (CHP) para desafiar a las células HepG2 con un estrés oxidativo, con o sin pretratamiento de activación de Nrf2 con PB123. En un experimento separado, se demostró que la inhibición de la quinasa ERK1/2 con PD98059, un inhibidor selectivo y permeable a las células de la vía MEK/ERK (10 µM de PD98059, 30 minutos antes del tratamiento con PB123 o sus componentes individuales) disminuyó la activación relativa de Nrf2 por PB123 y por cada uno de los componentes de romero, jengibre y luteolina (**Tabla 1**).

**Tabla 1** Disminución de la activación de Nrf2 con la inhibición de ERK1/2.

**Table 1** Decrease of Nrf2 activation with ERK1/2 inhibition.

	Nrf2 Activator Alone	With ERK1/2 Inhibitor
Rosemary	100%	51 ± 4%
Ginger	100%	58 ± 8%
Luteolin	100%	42 ± 12%
PB123	100%	58 ± 4%

Basándose en esa aparente dependencia de ERK1/2 de la respuesta de Nrf2, las células HepG2 se cultivaron a continuación con 5 µg/mL de PB123 durante 16 horas, con o sin 10 µM de PD98059, añadida 30 minutos antes de la PB123, luego se retiró el medio y se lavaron las células con PBS antes de añadir medio de cultivo fresco para evitar la posible eliminación directa de los oxidantes aplicados por los componentes de la PB123. A continuación, las células se sometieron a hidropéroxido de cumeno durante 6 horas y se evaluó la lesión celular midiendo la viabilidad de las células. El pretratamiento con 5 µg/mL de PB123 protegió contra la pérdida de viabilidad inducida por el estrés oxidativo en las células HepG2 que posteriormente fueron desafiadas con 25 µM de hidropéroxido de cumeno (**Imagen 12**), pero esta protección se bloqueó si la quinasa ERK1/2 fue inhibida en las células con PD98059.



**Imagen 12** PB123 previno la pérdida de viabilidad celular tras el desafío de un estrés oxidativo. No se observó citotoxicidad (proliferación celular medida por el ensayo CCK8) en las células HepG2 tratadas durante 16 horas con 5 µg/mL de PB123 en comparación con las células de control no tratadas. En las células HepG2 tratadas con 5 µg/mL de PB123 o con el vehículo de control durante 18 horas, y luego desafiadas con 25 µM de hidropéroxido de cumeno (CH) o con el control no tratado durante 6 horas, la pérdida de viabilidad celular (toxicidad) fue causada por el desafío del CH, pero esta toxicidad fue parcialmente atenuada ( $p < 0,05$ ) por el pretratamiento con PB123. El efecto protector de PB123 fue bloqueado ( $p < 0,05$ ) por la inhibición de la quinasa ERK1/2 (10 µM PD98059, 30 min antes del tratamiento con PB123).

#### 4. Discusión

El envejecimiento se ha asociado con la disminución de la capacidad de respuesta a los cambios inducidos por el estrés en la expresión genética tanto en animales como en humanos. Otro factor de riesgo clave que aumenta con el envejecimiento es la dislipidemia, que desempeña un papel fundamental en las enfermedades cardiovasculares relacionadas con la edad. Debido a su bien documentado papel en la regulación de los mecanismos de defensa antioxidantes y antiinflamatorios, la activación de Nrf2 puede desempeñar un papel clave en la protección contra el deterioro fisiológico relacionado con la edad. En el presente trabajo demostramos que la combinación de suplementos dietéticos fitoquímicos PB123 basada en el extracto de romero, el extracto de jengibre y la luteolina activa sinérgicamente la vía Nrf2 (**Imagen 1**), con una sinergia especialmente fuerte entre los extractos de romero y jengibre (**Imagen 3**).

La lógica que subyace a la creación de activadores de Nrf2 consistentes en una combinación de ingredientes es triple. En primer lugar, la complejidad de la vía de activación/desactivación de Nrf2 es inusualmente grande, con docenas de puntos de control demostrados, que van desde la metilación del promotor y la acetilación de las histonas que regulan la transcripción de los genes KEAP1 y NFE2L2 (que codifican Nrf2), hasta numerosos miRNAs que

regulan la traducción de los transcritos, y la luteolina participa en este nivel epigenético de control. Una vez traducidas, la regulación de las dos proteínas implica el conjunto más conocido de modificaciones covalentes que implican el ataque electrofílico a los grupos sulfhidrilos de Keap1 que permiten su liberación de Nrf2. El ácido carnósico y el carnosol del romero sobresalen en este nivel de control, ya que se comportan como pro-fármacos que poseen poca electrofilia en sí mismos, pero que se convierten en un compuesto electrofílico por las condiciones oxidativas en el lugar de la patología que se pretende aliviar. Por el contrario, el dimetilfumarato, un activador de Nrf2 aprobado por la FDA y utilizado para tratar la esclerosis múltiple recidivante, muestra una fuerte toxicidad electrofílica y capacidad de alquilación, de forma muy parecida al activador clásico de Nrf2, el sulforafano. Su toxicidad se manifiesta debido a la reactividad inespecífica con los tioles de las proteínas celulares y a la disminución del glutatión. La regulación de Nrf2 también es el resultado de una serie de modificaciones covalentes de la proteína Nrf2 que incluyen la fosforilación por parte de quinasas como la PKC, la PI3K y la MAPK, además de la sumoilación y la ubiquitinilación, todo lo cual modifica la estabilidad de Nrf2 y su capacidad para translocarse al núcleo. Una vez en el núcleo, otros numerosos eventos regulan la capacidad de Nrf2 para regular los genes impulsados por ARE/EpRE. Estos incluyen la acetilación/desacetilación de Nrf2 por la proteína de unión Creb y Sirt1. Se descubrió que la Nrf2 acetilada tiene una mayor unión al promotor ARE, lo que establece que la acetilación es otro mecanismo regulador de la Nrf2. BACH1 es un regulador negativo de Nrf2 y su silenciamiento con siRNA aumentó la expresión de los genes regulados por Nrf2. Además, este trabajo sugirió una interesante diferencia dependiente de la edad en el perfil de expresión de los genes regulados por Nrf2 debido al aumento de la proteína Bach1 en los individuos mayores. Lo que parece ser otro importante controlador de la actividad de Nrf2 es el mecanismo que la expulsa del núcleo, terminando su actividad y marcándola para su degradación proteasomal. El proceso es impulsado por la activación y translocación nuclear de la quinasa Fyn citosólica tras su fosforilación por GSK3 $\beta$ . La Fyn activa en el núcleo marca a Nrf2 para su expulsión, ubiquitinación y destrucción proteasomal. Curiosamente, el proceso es facilitado por el acetaminofeno y es fundamental para su toxicidad. Se descubrió que la luteolina y el ácido carnósico inhiben la expulsión de Nrf2 de la siguiente manera la luteolina y el ácido carnósico activan ambos la PI3K, que no sólo fosforila la Nrf2 para facilitar su translocación al núcleo, sino que también activa la Akt; la Akt fosforila la GSK3 $\beta$ , inactivándola, lo que impide que active la Fyn citosólica; la Fyn inactiva permanece en el citosol y no puede entrar en el núcleo para contribuir a la expulsión de la Nrf2, lo que significa que la Nrf2 activa tendrá una mayor duración en el núcleo, aumentando su eficacia.

La segunda ventaja de utilizar múltiples compuestos para activar la Nrf2 es la sinergia que puede resultar. Está claro que la activación de Nrf2 no es una vía lineal con un único paso de control de la velocidad. Muchos de los puntos de control contribuyentes mencionados anteriormente pueden requerir la cooperación de otros puntos de control para lograr un efecto máximo. Por ejemplo, la liberación de Nrf2 de Keap1 es necesaria pero no suficiente para un efecto máximo-el viaje de Nrf2 requiere la modificación covalente por varios mecanismos posibles como se mencionó anteriormente para la entrada nuclear. Hemos demostrado cantidades sustanciales de sinergia al combinar ingredientes con diversas contribuciones al proceso de activación de Nrf2 como en el presente estudio.

La tercera justificación lógica para utilizar una combinación de ingredientes para activar Nrf2 radica en la apreciación de que la activación es el resultado no sólo de un gran número de puntos de control, algunos positivos y otros negativos, sino que con una red de activación de Nrf2 tan complicada (en contraposición a una vía de activación simple y lineal), uno puede ciertamente necesitar combinar agentes que actúen en múltiples puntos clave de la red, con una toxicidad mínima combinada, para esperar un resultado final útil. Como ejemplo, los compuestos individuales que actúan sólo para liberar Nrf2 de Keap1 pueden, en efecto, dar lugar a una rápida afluencia de Nrf2 al núcleo, pero irá seguida de una mayor expulsión de esa Nrf2 del núcleo a menos que se inhiba simultáneamente la exportación dependiente de Fyn. Si no se ralentiza la vía de salida, las reservas de Nrf2 en el citosol se agotarían rápidamente, especialmente en los individuos de edad avanzada, ya que la tasa de síntesis de Nrf2 se ralentiza con el envejecimiento. El paradigma obsoleto de "una enfermedad, un fármaco" que ha impulsado las últimas décadas del pensamiento farmacológico no se aplica a la farmacología de red.

En el presente trabajo, al examinar la regulación al alza de un gen bien establecido dependiente de Nrf2 para apoyar la activación de Nrf2 inducida por PB123, encontramos que los niveles del gen HMOX1 dependiente de Nrf2 (**Imagen 11A**) y la proteína HMOX1 (**Imagen 11B**) aumentaron en las células HepG2 por el tratamiento con PB123. Además, la PB123 y sus componentes individuales mostraron una dependencia de ERK1/2 para la activación de Nrf2 (**Tabla 1**), así como para la protección inducida por la PB123 contra el estrés oxidativo inducido por el hidroperóxido de cumeno y la pérdida de viabilidad celular en las células HepG2 (**Imagen 12**).

Cabe destacar la regulación a la baja de los genes de la vía de la biosíntesis del colesterol inducida por la PB123 (véase la **Imagen 8**). El tratamiento con PB123 disminuyó la expresión de quince genes implicados en la biosíntesis del colesterol (ACAT2, HMGSC1, HMGCR, MVK, MVD, IDI1, FDPS, FDFT1, SQLE, LSS, CYP51A1, MSMO1, NSDHL, SC5D y DHCR7) y aumentó la expresión de un gen de la vía (PMVK). Este resultado sugiere que la biosíntesis de colesterol en las células HepG2 podría disminuir con el tratamiento con PB123, lo que fue apoyado en un experimento de seguimiento que demostró la disminución de los niveles de colesterol total en las células HepG2 cultivadas con PB123 (**Imagen 9**). Los enfoques dietéticos pueden ser útiles para ayudar a un envejecimiento saludable, con el objetivo de atenuar la dislipidemia relacionada con la edad en combinación con la atenuación del estrés oxidativo y la inflamación relacionados con la edad.

La FABP1, también conocida como proteína de unión a ácidos grasos del hígado, tiene una gran afinidad por los ácidos grasos mediante dos sitios de unión a ácidos grasos. FABP1 desempeña un papel importante en la captación de ácidos grasos en las células HepG2, lo que lleva a la hipótesis de que FABP1 puede contribuir a la esteatosis hepática. En particular, el silenciamiento de FABP1 redujo la esteatosis hepática, la inflamación y el estrés oxidativo en un modelo de ratón de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). Además, se descubrió que el ejercicio disminuye la expresión del gen FABP1 en ratones y protege contra la NAFLD, y en sujetos humanos los niveles de proteína FABP1 en la orina eran más bajos en los sujetos más aptos, aquellos con mayores niveles de fuerza muscular y aptitud aeróbica. Recientemente, el aumento de los niveles de FABP1 en sujetos humanos ha sido identificado como un biomarcador en la nefropatía diabética. En nuestros experimentos con células HepG2, la pronunciada regulación a la baja de FABP1 por PB123 (**Imagen 10A**) fue acompañada por una disminución significativa de los niveles de ácidos grasos intracelulares en las células (**Imagen 10B**), similar a los resultados previamente reportados en células HepG2 con FABP1 eliminado usando ARN antisentido.

Un amplio trabajo previo apoya los efectos beneficiosos de los componentes individuales de PB123 (romero, jengibre y luteolina) para normalizar los niveles de lípidos y colesterol. En nuestro trabajo actual también se observan esos beneficios, junto con la activación del factor de transcripción Nrf2, los efectos beneficiosos sobre la regulación de los genes y la protección contra el estrés oxidativo.

## 5. Conclusiones

Hemos descubierto que la combinación de fitoquímicos PB123 es un potente activador de Nrf2 con una sinergia significativa entre los componentes del romero y el jengibre. El análisis de las vías de expresión de los genes expresados de forma diferencial por el tratamiento con PB123 de las células HepG2 en los experimentos de ARNm-seq revelaron una prominente regulación al alza de los genes de la vía Nrf2 y una regulación a la baja de los genes de la vía de la biosíntesis del colesterol. Además, el pretratamiento con PB123 protegió a las células HepG2 cultivadas contra el estrés oxidativo causado por la exposición al oxidante orgánico hidroperóxido de cumeno. Además, la regulación a la baja de los genes de captación de lípidos y de biosíntesis de colesterol estuvo acompañada de una disminución de los niveles de lípidos intracelulares y de los niveles de colesterol total en las células HepG2 tratadas con PB123. La activación del Nrf2, los efectos altamente sinérgicos entre los ingredientes del romero y el jengibre, la expresión genética diferencial en las vías relacionadas con el aumento de la citoprotección, la disminución de la síntesis de colesterol y la disminución de la acumulación de lípidos intracelulares por el suplemento dietético PB123 apoyan su uso para promover el envejecimiento saludable.