



Efecto in vitro de las moléculas de señalización redox en la regulación de la vía Nrf2

Resumen de estudios realizados por:

Universidad de Bath, Reino Unido

Universidad del Oeste de Sydney, Australia

Principales hallazgos

Universidades de renombre internacional han investigado el impacto de las moléculas de señalización redox en diferentes tipos de células.

- La investigación realizada independientemente por ambas universidades encontró que la vía Nrf2 se vio afectada significativamente por la oxidación-reducción. Moléculas de señalización.
- Nrf2 es una vía genética que desempeña un papel vital en la regulación de los genes que apoyan la respuesta y la resiliencia a una variedad de factores estresantes. Estos factores estresantes pueden incluir fatiga, estrés emocional, inflamación, contaminación ambiental e incluso factores de estilo de vida como una mala alimentación o un comportamiento sedentario.
- Un hallazgo clave en la investigación fue que la suplementación con moléculas de señalización redox aumentó la actividad de Nrf2 hasta en un 60%. Esto es importante dado que la vía Nrf2 mejora el sistema de protección antioxidante dentro de las células de nuestro cuerpo (véase la figura 7B).
- Otro hallazgo clave es que la suplementación con moléculas de señalización redox aumentó la producción de proteínas protectoras como el glutatión, que desempeñan papeles importantes en la promoción del equilibrio general. La investigación reveló que la suplementación con moléculas de señalización redox aumentó la producción de glutatión en un 40% en células sanas y que restableció la producción de glutatión en células dañadas aún más, en un 55%. (Véase las figuras 12A y 12B).

Introducción

Nrf2 – un factor de transcripción

El factor nuclear 2 específico de eritroides (NF-E2) fue caracterizado, descrito y clonado por primera vez en ratones por Andrews et al., en 1993. Este polipéptido era un nuevo miembro específico de células hematopoyéticas de la familia de factores de transcripción de cremallera de leucina de región básica (b-zip) (1). NF-E2 es una de las proteínas que se unen a la repetición en tandem AP1 (proteína activadora 1)-NF-E2, que representa el potenciador central dentro de HS2 (2).

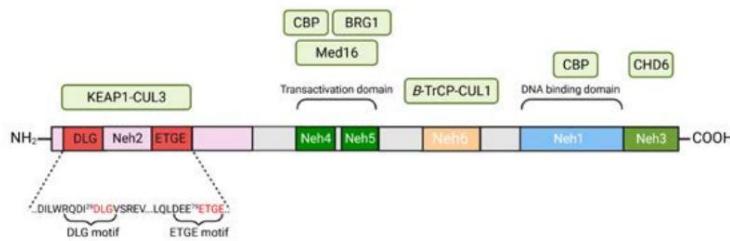
En 1994 se descubrió que el Nrf2 (o factor 2 relacionado con NF-E2) era miembro de la familia de factores de transcripción humanos CNC-bZIP para la estimulación transcripcional de los genes de beta-globina. Se describió por primera vez como un activador transcripcional de cremallera de leucina básica similar a Nf-E2 que pertenece a la familia Cap'n'Collar (CNC) (p45-NFE2, Nrf1, Nrf2 y Nrf3) y se expresa de forma ubicua en varios tejidos (2, 53). Es interesante observar que, a diferencia de NF-E2, la expresión de Nrf2 no se limita a los tejidos hematopoyéticos. En ese momento, no se sabía qué papel desempeñaba Nrf2 en los tejidos no hematopoyéticos, donde se expresaba en niveles elevados. El alto grado de conservación entre los genes Nrf2 de ratón y humano sugirió que, curiosamente, tienen una función importante (2). Nrf2 está codificado por el gen nuclear factor (eritroide-derivado 2)-like 2 (NFE2L2) ubicado en la banda citogenética 2q31.2 del cromosoma 2 en humanos (identificación del gen: 4780). El NFE2L2 consta de cinco exones interrumpidos por cuatro intrones que dan lugar a 8 variantes de transcripción que codifican 6 isoformas de Nrf2 (3).

Décadas después, se sabe mucho más sobre esta proteína. Según Cancer.gov/National Institute of Health, Nrf2 es una proteína que controla la expresión de ciertos genes. Estos genes ayudan a proteger las células del daño causado por los radicales libres (nuestro cuerpo genera especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno mediante diversos sistemas endógenos, 4). Estos radicales libres son compuestos importantes porque pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de ciertas enfermedades. También están relacionados con el proceso de envejecimiento (5). La evidencia actual muestra que Nrf2 se encuentra en el centro de una red reguladora compleja y establece a Nrf2 como un factor de transcripción verdaderamente pleiotrópico (6).

Nrf2 es un regulador maestro de la respuesta antioxidante y del metabolismo xenobiótico a través de la regulación de una amplia gama de genes antioxidantes y de desintoxicación de fase II. En consecuencia, Nrf2 protege a las células de diferentes tipos de factores estresantes, sustancias endógenas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y agresiones ambientales. (7).

La actividad de Nrf2 está regulada por KEAP1 (proteína asociada a ECH similar a Kelch 1), una subunidad adaptadora de la ligasa de ubiquitina E3 basada en Cullin 3 que actúa como un sensor para el estrés oxidativo y electrofílico (8). KEAP1 actúa como un sensor clave del estrés oxidativo y electrofílico. En condiciones homeostáticas, KEAP1 forma parte de una ligasa de ubiquitina E3, que regula estrechamente la actividad del factor de transcripción Nrf2 al dirigirlo a la ubiquitinación y la degradación dependiente del proteasoma. En respuesta al estrés, un intrincado mecanismo molecular facilitado por las cisteínas sensoras dentro de KEAP1 permite que Nrf2 escape a la ubiquitinación, se acumule dentro de la célula y se transloque al núcleo, donde puede promover su programa de transcripción antioxidante, regulando la expresión génica citoprotectora (9).

Nrf2 domain



KEAP1 domain



Figura 1: Estructuras de dominio de Nrf2 (A) y KEAP1 (B). Nrf2-KEAP1. Las moléculas que interactúan se muestran en cuadros verdes y se colocan encima de sus dominios de interacción (adaptado y modificado de la referencia 10).

La conservación filogenética de la estructura de Nrf2 entre especies reveló la presencia de seis dominios funcionales: Neh1 (dominio de homología Nrf2-ECH-1) a Neh6. Neh1 contiene los dominios CNC y bZIP que median la unión del ADN y la formación de dímeros, mientras que Neh3, Neh4 y Neh5 son dominios de transactivación. De los dominios de transactivación, Neh4 y Neh5 hacen una contribución importante a la activación transcripcional al reclutar la proteína de unión al elemento sensible a AMPc de la acetiltransferasa de histonas y el complejo mediador (9).

KEAP1 actúa como un sensor rico en tiol de cisteína de las agresiones redox, mientras que Nrf2 es un factor de transcripción que transduce de forma robusta señales químicas para regular una batería de genes citoprotectores. KEAP1 reprime la actividad de Nrf2 en condiciones de reposo, mientras que Nrf2 se libera de la represión mediada por KEAP1 al exponerse a factores de estrés. El sistema KEAP1-Nrf2 es un aparato eficaz para mantener la homeostasis redox y el mecanismo de defensa contra las agresiones ambientales (10).

La investigación intensiva sobre el sistema KEAP1-Nrf2 demostró la importancia crítica de la actividad de Nrf2 y sus mecanismos reguladores para el mantenimiento de nuestra salud. Es importante destacar que la desregulación de este sistema subyace a la patogénesis de varias enfermedades humanas (11).

La característica más importante de Nrf2 es su inducibilidad. KEAP1 crea la naturaleza inducible de la función de Nrf2 al servir como un componente de reconocimiento de sustrato del complejo de ubiquitina ligasa E3 en cooperación con CUL3 y RBX. En condiciones normales, Nrf2 ubiquitinado sufre degradación proteasomal, y es esta degradación constitutiva de Nrf2 la que mantiene la cantidad y la actividad de Nrf2 a un nivel bajo. La actividad de ubiquitina ligasa E3 del complejo KEAP1-CUL3 se interrumpe con la exposición a electrófilos y ROS que modifican los residuos de cisteína de KEAP1, lo que permite que Nrf2 recién sintetizado se acumule en el núcleo y active la transcripción. Por lo tanto, la posesión de residuos de cisteína altamente reactivos convierte a KEAP1 en un biosensor eficiente y sensible de la alteración redox al activar o desactivar la actividad de ubiquitina ligasa E3 del complejo KEAP1-CUL3 (10).

Tras la exposición de las células al estrés oxidativo o a compuestos quimiopreventivos, Nrf2 se transloca al núcleo, forma un heterodímero con su pareja obligatoria Maf y se une a la secuencia ARE para activar la transcripción de varios tipos diferentes de genes. La mayoría de los genes dependientes de Nrf2 contienen una secuencia ARE en el promotor (12).

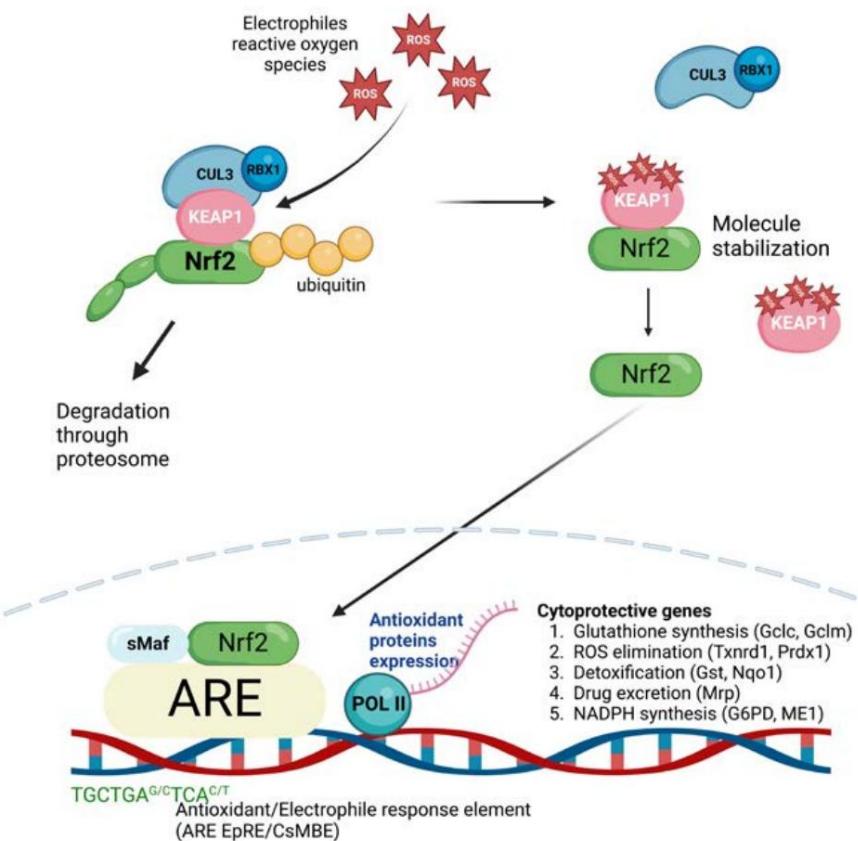


Figura 2: KEAP1-NRF2 es un sistema de dos componentes. En el citoplasma, NRF2 es ubiquitinado por el complejo KEAP1-CUL3 ubiquitina E3 ligasa para marcarlo para su degradación por el proteasoma. Cuando las células se exponen a electrófilos o especies reactivas de oxígeno, KEAP1 se modifica y la actividad de la ligasa de ubiquitina E3 KEAP1-CUL3 disminuye, lo que da como resultado la estabilización de NRF2. Estabilizado y acumulado NRF2 se transloca al núcleo y activa una batería de genes citoprotectores (adaptado y modificado de la referencia 10).

Una de las características más importantes de la transcripción mediada por Nrf2 es la inducibilidad en respuesta a estreses xenobióticos y oxidativos. En condiciones normales, la actividad de la transcripción mediada por Nrf2 es baja, ya que la mayor parte de la proteína Nrf2 se degrada en el proteasoma (Itoh et al., 2003). Cuando las células se exponen a electrófilos o ROS, Nrf2 se estabiliza y se acumula en el núcleo, lo que da como resultado la activación robusta de los genes diana de Nrf2. Por lo tanto, el mecanismo subyacente a la degradación de Nrf2 en condiciones normales y la estabilización de Nrf2 después de la exposición al estrés son pistas fundamentales para la revelación de la base molecular de nuestro sistema de defensa (13).

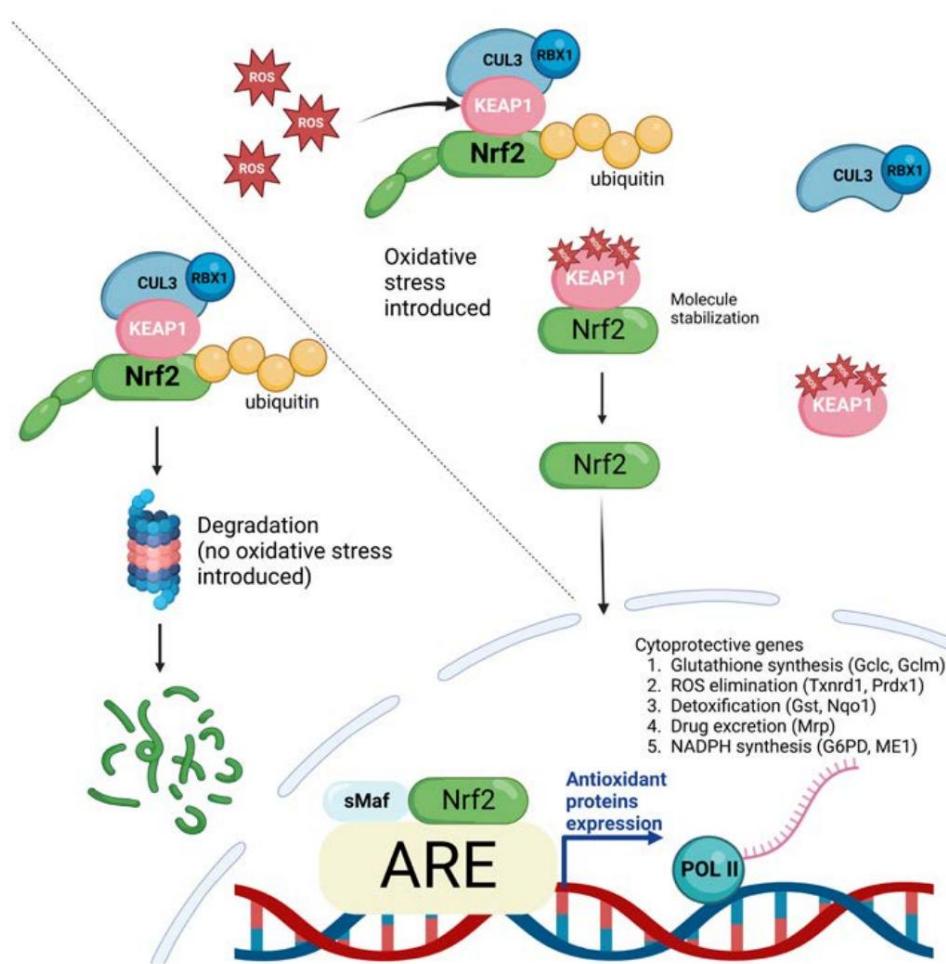


Figura 3: El sistema KEAP1–NRF2. En condiciones normales, Nrf2 se ubiquitina constantemente a través de KEAP1 y se degrada en el proteasoma. Después de la exposición a electrófilos o estrés oxidativo, KEAP1 se inactiva. Nrf2 estabilizado se acumula en el núcleo y activa muchos genes citoprotectores (adaptado y modificado de la referencia 13).

Al final de la historia, el sistema KEAP1-Nrf2 es un aparato eficaz para mantener la homeostasis redox. Es una combinación perfecta en la que KEAP1 actúa como un sensor de las agresiones redox y Nrf2 actúa como un factor de transcripción que transduce de manera robusta las señales químicas para regular una batería de genes citoprotectores. La relación entre ellos se resume de tal manera que KEAP1 reprime la actividad de Nrf2 en condiciones de reposo, mientras que Nrf2 se libera de la represión mediada por KEAP1 al exponerse a estreses (10).

Vía y regulación de Nrf2-KEAP1

La vía Nrf2-KEAP1 es fundamental para detectar y responder al estrés oxidativo y electrofílico. En la vía de señalización clásica Nrf2-KEAP1, KEAP1 es un represor clave de Nrf2 y desempeña un papel fundamental en la regulación de la vía de señalización de Nrf2. KEAP1 actúa como un puente entre Nrf2 y la ligasa de ubiquitinación Cullin-3. Los estresores oxidativos o electrófilos inhiben la degradación dependiente de la ubiquitinación y aumentan la acumulación nuclear de Nrf2. Como proteína rica en cisteína, KEAP1 es un excelente sensor para inductores químicos (14).

El Nrf2 es un factor de transcripción que afecta la expresión de muchos genes diferentes involucrados en el estrés antioxidante y el metabolismo de fármacos. Por lo tanto, la regulación de la expresión del Nrf2 es un objetivo importante para el tratamiento o la prevención de enfermedades y se ha informado que esta regulación está influenciada por la epigenética (15).

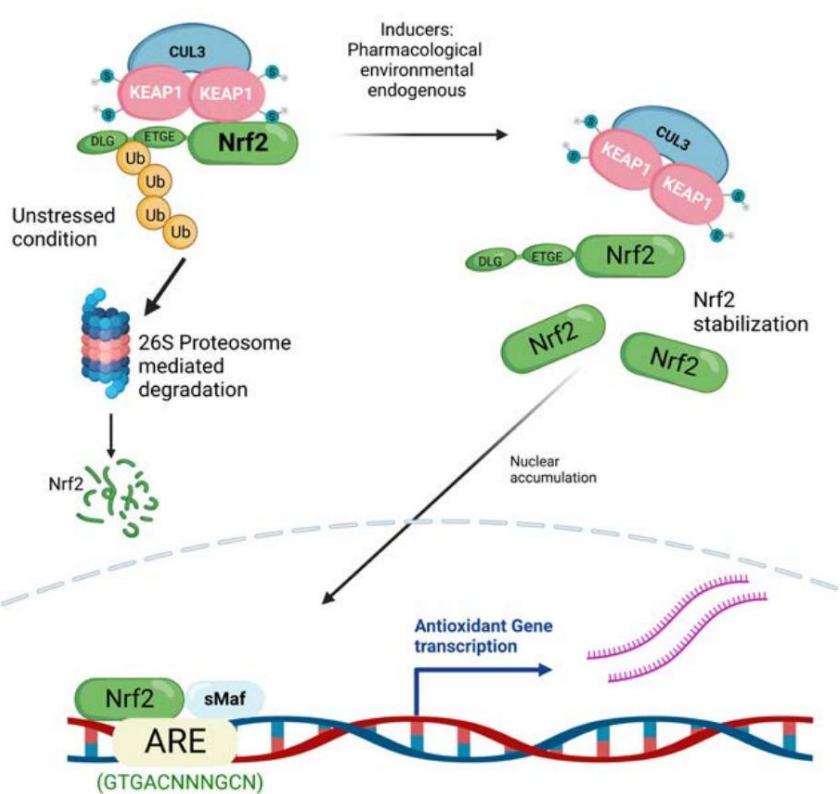


Figura 4: Diagrama esquemático de la vía de señalización de Nrf2 (adaptado y modificado de la referencia 16).

La expresión de Nrf2 es inherente a las células, lo que garantiza una respuesta protectora al estrés oxidativo y la inflamación. En condiciones fisiológicas, Nrf2 tiene una rápida renovación como resultado del sistema de proteosoma ubiquitina. La estabilidad de Nrf2 está controlada por KEAP-1, conocido como un sensor redox para señales oxidativas endógenas y ambientales, así como para reacciones electrofílicas (17). El gen Nrf2 también puede regularse a nivel transcripcional. El promotor del gen NFE2L2 presenta varias secuencias reguladoras (18). Es interesante decir que los llamados activadores de Nrf2 deberían llamarse inhibidores de "KEAP1". En circunstancias normales, KEAP1 existe como dímero dentro de las células, funcionando como una proteína de enlace de sustrato para la interacción de Cul3/

El complejo de la ligasa de ubiquitina E3 basada en Rbx1 con Nrf2 conduce a la ubiquitinación continua de Nrf2 y su posterior degradación proteosómica. Esto mantendría niveles bajos de antioxidantes regulados por Nrf2. Bajo estrés celular o exposición a estrés oxidativo leve, Nrf2 se disocia de KEAP1, se estabiliza, se transloca a los núcleos donde interactúa con otros factores proteicos y se une a ARE, lo que conduce a un aumento de la transcripción de genes antioxidantes (10). En los mamíferos, incluidos los humanos, el eje KEAP1-Cul3-Rbx1 se conoce como el mecanismo regulador más crítico de la actividad de Nrf2 (19).

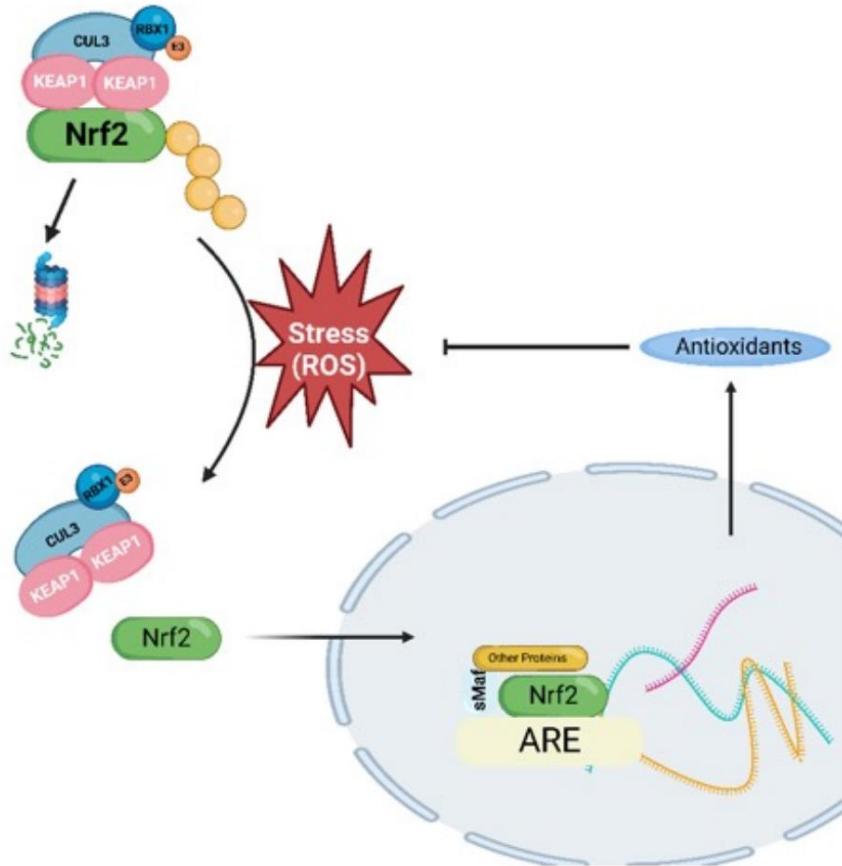


Figura 5: KEAP1 como regulador principal de la activación de Nrf2 y la consiguiente expresión del gen antioxidante impulsado por ARE (adaptado y modificado de la referencia 19).

Los mecanismos predominantes por los cuales las condiciones de estrés (por ejemplo, estrés oxidativo y electrofílico) y los inductores químicos provocan la disociación de Nrf2 de KEAP1 es la oxidación de los residuos de cisteína de KEAP1.

Los grupos sulfhidrilo de cisteína pueden oxidarse para formar un puente disulfuro, ácido sulfénico o ácido sulfónico. Estas modificaciones redox provocan la separación de KEAP1 de Nrf2, lo que conduce a la estabilización de Nrf2 y la translocación nuclear (19).

La desregulación de la actividad transcripcional de Nrf2 se ha descrito en la patogénesis de múltiples enfermedades, y el gen Nrf2/El eje KEAP1 ha emergido como un modulador crucial de la homeostasis celular. Si bien la importancia de Nrf2 en la modulación de los procesos biológicos ha sido bien establecida y ampliamente discutida en detalle, el enfoque en KEAP1 rara vez va más allá de la regulación de la actividad de Nrf2 y la detección redox (20).

Es importante considerar que la dieta humana proporciona un amplio conjunto de compuestos activos que pueden afectar y activar la vía de señalización Nrf2 (52). Entre ellos, algunos incluso se consideran potentes activadores de Nrf2. Estos compuestos naturales pueden estimular varias quinasas anteriores, interferir en la interacción KEAP1-Nrf2 y/o alterar el equilibrio redox celular, lo que da como resultado la activación de la vía Nrf2 (14).

Compuestos como la curcumina, presente en la cúrcuma, y el sulforafano, encontrado en vegetales crucíferos como el brócoli, activan directamente la vía Nrf2-KEAP1 (22).

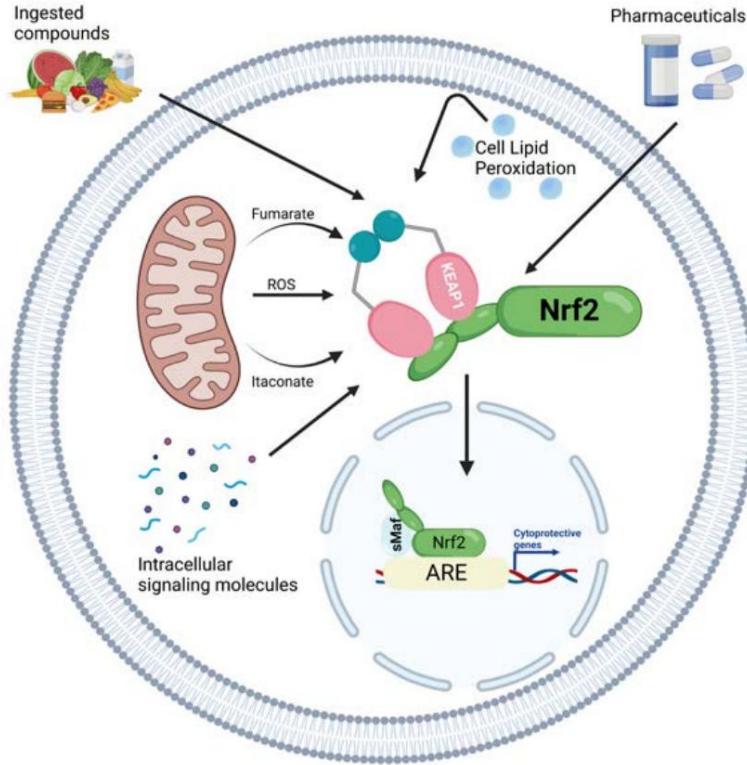


Figura 6: La vía KEAP1-NRF2 integra la detección de una amplia gama de factores de estrés celulares con la regulación positiva de la expresión de genes citoprotectores. Las moléculas de estrés endógenas y exógenas pueden unirse directamente a los residuos de cisteína reactivos dentro de KEAP1, lo que da como resultado la estabilización de NRF2 y la regulación positiva de su programa de transcripción citoprotector (adaptado y modificado de la referencia 21).

Nrf2 y proteínas desintoxicantes

Glutatión, GCLC/GCLM

El glutatión fue descubierto por J. de Rey-Paihade en 1888 a partir de extractos de levadura y muchos tejidos animales y en clara de huevo fresca. De Rey-Paihade denominó a esta sustancia filotión, que significa amor y azufre en griego. En 1921, Hopkins sugirió que el filotión aislado del hígado, el músculo esquelético y la levadura es un dipéptido que consiste en cisteína y glutamato, pero estos autores pasaron por alto la presencia de glicina en el filotión, posiblemente debido a una mala interpretación de los datos de aminoácidos de Van Slyke. Honrando la historia del descubrimiento del filotión, Hopkins denominó a la sustancia "glutatión" (23). El glutatión, también conocido como GSH, es un componente endógeno del metabolismo celular, un triplete compuesto de glicina, cisteína y ácido glutámico. La conjugación del glutatión contribuye a la desintoxicación mediante la unión de electrófilos que, de otro modo, podrían unirse a proteínas o ácidos nucleicos, lo que provocaría daño celular y mutaciones genéticas (24). Se encuentra en muchos tejidos en concentraciones relativamente altas, concretamente 1–10 mM en las células, de manera similar a la glucosa, el potasio y el colesterol, con un papel fundamental en varios procesos fisiológicos, como la preservación del equilibrio redox, la reducción del estrés oxidativo a través de la desintoxicación de compuestos xenobióticos y endógenos y la modulación del sistema inmunológico.

La acción del glutatión sobre el estrés oxidativo ha llevado a especular sobre el posible papel terapéutico de esta molécula para varias enfermedades crónicas con equilibrio redox alterado (25). El GSH está implicado en varias funciones, incluida la defensa antioxidante con reducción del estrés oxidativo y mantenimiento del equilibrio redox, desintoxicación metabólica de xenobióticos y compuestos exógenos, regulación del ciclo celular y modulación del sistema inmunológico, así como fibrogénesis (26). Su función principal es proteger a las macromoléculas celulares de las especies reactivas de oxígeno (ROS) endógenas y exógenas y de las especies nitrogenadas. En particular, el GSH desintoxica catalíticamente de hidroperóxidos, peroxinitrito y peróxidos lipídicos y elimina directamente varias moléculas oxidantes, como el anión superóxido, el radical hidroxilo, el óxido nítrico y los radicales de carbono (26; 27). Básicamente, el GSH neutraliza las ROS al donar H⁺ y mantiene la cisteína proteica en forma reducida activa al ofrecer e⁻. La capacidad del GSH como agente reductor depende de la relación GSH/GSSG y de la concentración total de glutatión, que se ven afectadas negativamente por las condiciones de estrés (28). El GSH mantiene el estado redox celular y afecta la señalización redox, la proliferación celular, la muerte y la homeostasis del GSH se regula mediante la síntesis de novo, así como el estado redox del GSH. De esta manera, Nrf2 es fundamental para mantener el estado redox del GSH a través de la regulación transcripcional de GSR y proteger a las células contra el estrés oxidativo (29).

La glutamato cisteína ligasa (GCL) es una enzima que desempeña un papel fundamental en la síntesis de GSH. La subunidad catalítica de GCL es un componente clave de esta enzima. Además, el primer paso en la síntesis de GSH lo lleva a cabo la GCL, que está compuesta por subunidades catalíticas (GCLC) y modificadoras (GCLM) (30). Por lo tanto, la glutamato-cisteína ligasa, también conocida como gamma-glutamilcistina sintetasa, es la primera enzima limitante de la velocidad de la síntesis de glutatión (31).

Hemooxigenasa 1

La hemooxigenasa-1 (HO-1) es una enzima citoprotectora que responde a estímulos oxidativos y/o inflamatorios y tiene la capacidad de reducir el estrés oxidativo. Una de las principales funciones de la HO-1 es metabolizar el hemo que se acumula en los tejidos como resultado del recambio de glóbulos rojos (32). HO-1 es un gen regulado por Nrf2, ya que se encuentra entre los genes objetivo de Nrf2, que se expresa significativamente en diferentes tipos de células (33). En condiciones homeostáticas, la expresión de HO-1 es baja o nula en la mayoría de las células y tejidos. Sin embargo, la mayoría de las células regulan al alza la HO-1 en respuesta a una gran cantidad de estímulos prooxidantes y brinda protección contra el daño oxidativo.

La expresión de HO-1 está en gran medida bajo el control del Nrf2 sensible al redox, que se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en la región promotora de muchos genes antioxidantes, incluido HMOX1 (HO-1 codificado por el gen HMOX1 en humanos) (34).

Señalización redox

La transducción de señales por transferencia de electrones, o señalización redox, requiere que un electrófilo (una molécula que atrae electrones) reaccione con un nucleófilo (una molécula que cederá electrones). La señalización redox implica reacciones en las que un electrófilo quita electrones y deja al nucleófilo en un estado más oxidado (reacción de oxidación). En esta situación, el electrófilo se denomina oxidante (35). Por otra parte, el estrés reductivo se caracteriza por un exceso de donantes de electrones celulares. Cuando las condiciones dan lugar a proporciones en las que los antioxidantes superan a los prooxidantes, se produce estrés reductivo con la consiguiente acumulación excesiva de equivalentes reductores como el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) reducido, por ejemplo, superando las actividades compensatorias de las oxidoreductasas reguladoras (54). En resumen, la oxidación y la reducción por pérdida o ganancia de un electrón inducen cambios en las características estructurales y funcionales de las moléculas, modificando así los procesos de señalización (36).

La señalización redox es parte de la fisiología normal de todas las células, incluido el crecimiento estimulado por flujo de las células endoteliales, y también desempeña un papel importante en las respuestas fisiopatológicas, como las que se producen en la lesión por isquemia/reperfusión. A diferencia de la señalización por segundos mensajeros como el AMPc, la señalización por especies reactivas, que incluye la modificación química de un residuo de cisteína de la proteína de señalización diana, en lugar de la unión no covalente a una proteína (35). Los eventos relacionados con la señalización redox se desencadenan bajo niveles fisiológicos de estrés oxidativo y nitrosativo, y los flujos temporales en la homeostasis se restauran a través de la desglutatión de los sensores redox y el aumento de los niveles de GSH/GSSG (37). Las principales moléculas que participan en la señalización redox son las especies reactivas de oxígeno (ROS) (36). Las ROS son compuestos que se generan como subproductos de la fosforilación oxidativa (metabolismo aeróbico) en las mitocondrias o mediante oxidases NADPH inducidas por señalización celular en el citosol (38). Incluye moléculas como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo, todos los cuales tienen propiedades químicas inherentes que confieren reactividad a diferentes objetivos biológicos. Las ROS a menudo se asocian con el estrés oxidativo, lo que sugiere que inducen daños en los lípidos, las proteínas y el ADN. Sin embargo, en las últimas dos décadas se ha vuelto evidente que las ROS también sirven como moléculas de señalización para regular los procesos biológicos y fisiológicos. Parece que, al principio de la evolución, la naturaleza seleccionó a las ROS como un mecanismo de transducción de señales para permitir la adaptación a los cambios en los nutrientes ambientales y el entorno oxidativo. De hecho, en los procariotas, existen mecanismos bien descritos por los cuales las ROS activan directamente los factores de transcripción para la adaptación al estrés (39).

Estudios de moléculas de señalización redox

Un ensayo doble ciego controlado con placebo de ocho semanas de duración en humanos demostró que el consumo de moléculas de señalización redox (MRS) desempeñaba un papel en la modulación de la expresión génica, vinculándola a funciones clave y vías importantes en las células. Se demostró que algunos de estos genes estaban regulados positivamente y conectados a la transcripción de genes cruciales. Despues de un análisis del perfil transcripcional, se observó que cinco genes presentaban un cambio significativo en su expresión, en comparación con los sujetos que no recibieron MRS: KCTD12, EGR1, PYROXD1, IRAK3 y CCR10.

Es interesante observar que la expresión de estos genes volvió a sus valores iniciales cuando se suspendió el consumo de RSM, lo que sugiere que es necesario el uso continuo de estas moléculas para mantener la modulación del perfil transcripcional.

Los genes KCTD12, EGR1, PYROXD1, IRAK3 y CCR10 se analizaron utilizando PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) y Wikipathways para identificar su relación con diferentes vías. Algunas de las vías son la vía de señalización del factor neurotrófico derivado del cerebro, la vía de señalización de la hormona estimulante de la tiroídes humana, la vía Nrf2, la vía de señalización VEGFA-VEGFR2 y otras. Estas y otras vías relacionadas con estos genes son cruciales para la salud y el funcionamiento celular.

Se descubrió que la vía Nrf2 es responsable de activar y desactivar genes que son esenciales para producir proteínas protectoras, como el glutatión, que combatirán los compuestos dañinos en el cuerpo. Esta vía es capaz de activar y desactivar la expresión genética (40; 41; 42).

También se entiende que Nrf2 es un regulador crucial de la respuesta antioxidante (43; 42), promoviendo la resiliencia celular al estrés (44; 45).

Cuando se activa esta vía, las células pueden enfrentarse a amenazas, responder y restaurar sus funciones porque la activación de la vía Nrf2 promueve la homeostasis celular (46; 47; 48).

Además, los genes que responden a la vía Nrf2 están involucrados en la protección de las células contra el estrés oxidativo (43). De hecho, la vía Nrf2 es una de las principales vías implicadas en la adaptación al estrés (49; 50). Cuando se activa Nrf2, se producen más proteínas antioxidantes en el cuerpo para combatir el estrés oxidativo (51).

Las moléculas de señalización redox funcionan en AREC32

(línea celular reportera derivada de MCF7 mamaria humana) Y CÉLULAS HEPG2 (línea celular no tumorígena de hepatoma humano)

1- Método

Cultivo celular en células AREc32 y HepG2

La línea celular AREc32 es una línea celular MCF7 transfectada de manera estable que contiene una construcción del gen de la luciferasa bajo el control de ocho copias del gen ARE Gsta2 de rata. Las células hepáticas humanas HepG2 poseen muchas de las funciones especializadas que caracterizan a los hepatocitos humanos normales. Ambas células se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Australia) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Sigma-Aldrich, Australia), 1% de penicilina (Sigma-Aldrich, Australia) en un entorno de cultivo de tejidos humidificado a 37 °C con 5% de CO₂. Las células cultivadas con más del 90% de confluencia se digirieron con 0,25% de tripsina (Thermo Fisher Scientific, Australia) para los siguientes bioensayos.

Preparación de solución de agua electrolizada.

Los RSM se generaron y estabilizaron de acuerdo con un proceso electroquímico patentado. La presencia de RSM se determinó utilizando métodos analíticos apropiados. Se prepararon diferentes muestras de RSM y se analizaron para detectar la actividad de Nrf2 (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras de RSM proporcionadas

Etiqueta	Información
Control negativo 0,27 % NaCl	
RSM	Moléculas de señalización redox

Ensayo de lucifera Nrf2 en células AREc32

Las muestras de RSM se sometieron a un ensayo de lucifera Nrf2 utilizando células AREc32 para el examen de la actividad de Nrf2, donde la expresión de lucifera se induce a través de una construcción del gen reportero Nrf2 transfectado de manera estable. La terc-butilhidroquinona (tBHQ), el aditivo alimentario sintético que activa potente Nrf2, se utilizó como control positivo. El control utilizado consistió en la mezcla de NaCl al 0,27 %, recolectada antes de la electrólisis.

Las células AREc32 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1 x 106 células/pocillo y se trataron con muestras de RSM cuando alcanzaron una confluencia del 90%. Después de 24 h, todos los sobrenadantes se llevaron a placas nuevas de 96 pocillos para el ensayo de glutatión. Las células de las placas originales se mezclaron con tampón de lisis Triton (20 µL). Los lisados celulares se obtuvieron agitando la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente y se congelaron durante 20 minutos a -20 °C. Finalmente, se recogieron los lisados celulares (15 µL) y se transfirieron a una placa blanca de 96 pocillos de microtiro. Se añadió tampón de luciferina (100 µL) al 96-WP y se registró la bioluminiscencia en 5 minutos [19]. La activación de Nrf2 se calculó mediante el cambio de pliegue en comparación con el control negativo (células con medio solamente).

Viabilidad celular

La viabilidad celular de las células AREc32 después del tratamiento de muestras de RSM durante 24 h se controló mediante el ensayo Alamar Blue, que se utiliza ampliamente para las pruebas de viabilidad celular. Después de la eliminación de los sobrenadantes, las células AREc32 se expusieron a 100 µL de solución de colorante Alamar Blue. Posteriormente, la placa se incubó durante 2 h más en una incubadora humidificada a 37 °C. La densidad óptica de cada pocillo se determinó a partir de la medición de la excitación a 545 nm y la emisión a 595 nm utilizando un lector de microplacas. La absorbancia en el grupo de control (células con medio únicamente) se consideró como una viabilidad celular del 100 %, y la viabilidad celular después del tratamiento se calculó normalizando la absorbancia en relación con el control para determinar el porcentaje.

Medición de glutatión mediante cromatografía líquida de alto rendimiento y detección de fluorescencia

La derivatización del glutatión en muestras y estándares mediante 4-fluoro-7-amino sulfonilbenzofurazano (ABD-F) se realizó como se describe en Steele et al., 2012 y Afzal et al., 2023.

Se preparó una solución estándar compuesta por 800 mM de cisteína y 50 mM de cisteína-glicina, homocisteína y glutatión (GSH) y luego se diluyó secuencialmente dos veces en agua o DMEM. Cada solución se mezcló con un volumen igual de ácido 5-sulfosalicílico al 1 % que contenía 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), antes de centrifugar a 14 000 g durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, el sobrenadante se trasladó a tubos nuevos y se almacenó a -80 °C, antes de su uso en reacciones de derivatización de ABD-F.

El sobrenadante recolectado de las células AREc32 después de varios tratamientos se retiró del congelador y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente. Los viales se colocaron en un bloque de calentamiento ajustado a 35 °C y luego se agregaron 50 µL del sobrenadante. La reducción de los enlaces de sulfuro se logró con la adición de 30 µL de clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina 1 mM y, posteriormente, se agregaron 30 µL de N-acetil cisteína 50 mM para que actuara como estándar interno. A esto le siguió una incubación a 35 °C durante 5 minutos. Se agregaron a la muestra 100 µL de tampón de borato seguido de 30 µL de ABD-F. Luego, la muestra se incubó a 35 °C durante 10 minutos adicionales, antes de que se detuviera la reacción de derivatización mediante la adición de 50 µL de ácido clorídrico 2 M. Para eliminar cualquier partícula, los viales de microcentrifuga se centrifugaron a 14.000 g durante 5 minutos a 4 °C.

Las soluciones mezcladas se colocaron luego en viales de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y se cargaron en el muestreador automático de un sistema HPLC Dionex que consta de un inyector de muestra automático WPS-3000, bombas Ultimate 3000, un muestreador automático ACC-3000, un compartimento de columna y un detector de fluorescencia FLD-3100. El sistema estaba equipado con un Luna RP-18 con tapa protectora en el extremo mediante un cartucho SecurityGuard C18 en un soporte de cartucho SecurityGuard suministrado por Phenomenex. El sistema de datos de cromatografía Chromeleon 7.0 de Dionex se utilizó para controlar los instrumentos, adquirir datos y cuantificar las áreas de los picos.

Análisis de transferencia Western

Las células HepG2 se cultivaron en matraces T75 hasta la confluencia. Luego, las células se trataron con medio, 50 µM tBHQ, V10 v1, V10 v2 a una concentración eficaz para la activación de Nrf2. Después de la incubación durante 24 h, los pellets celulares se recolectaron mediante centrifugación a 500 g durante 5 min a 4 °C. Los pellets celulares se mezclaron con un tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación con inhibidores de proteinasa al 1% y sus concentraciones se dilucidaron utilizando el kit de ensayo de proteínas PierceTM BCA. Las proteínas totales de cada muestra a 10 mg/mL fueron

Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y luego se transfirieron a la membrana PVDF mediante el dispositivo de transferencia de gel iBlot 2. Las membranas se incubaron con 3% de albúmina de suero bovino (BSA) disuelta en PBST [tampón PBS más 1% de Tween 20 durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios contra GCLC, HO-1 durante la noche a 4 °C. La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (conocida como GAPDH) se utilizó como control de carga. Los anticuerpos primarios se sondearon con anticuerpos secundarios conjugados con HRP anti-conejo a temperatura ambiente durante 2 h. Todos estos anticuerpos se adquirieron de Cell Signaling Technology. Las bandas de inmunorreactividad en las membranas se incubaron con el kit SuperSignal West Pico Plus ECL y se visualizaron con el iBright CL750. Se analizaron bandas específicas y se cuantificó la intensidad utilizando el software ImageJ.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., EE. UU.). Los datos se presentaron como media ± error estándar de la media (SEM) de al menos tres experimentos individuales. La comparación estadística entre grupos se realizó mediante ANOVA de una vía con la prueba de Tukey, y se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

2- Resultados y conclusiones

Viabilidad celular

Inicialmente se evaluó la viabilidad celular en función de la dosis-respuesta para comprender cómo responderían las células AREc32 a concentraciones variables de moléculas de señalización. Esto determinó la concentración en la que el RSM podría ser tóxico para las células y también identificó las pruebas de rango de dosis óptimas.

La prueba evalúa la capacidad de las células para sobrevivir y funcionar cuando se exponen a RSM. Los resultados mostraron que estaban vivas y pudieron mantener su integridad estructural y funcional durante todo el experimento (Figura 7).

Activación de Nrf2

La mayoría de las muestras mostraron una leve activación de Nrf2 en comparación con las células inactivadas. Se observó una activación perceptible de la vía Nrf2 en las células tratadas con RSM. Las células expuestas a RSM exhibieron un aumento en la activación de Nrf2 (Figura 7), lo que sugiere que el suplemento presentó un potencial para inducir una respuesta antioxidante celular a través de la vía Nrf2, contribuyendo a la defensa celular contra el estrés oxidativo y promoviendo la salud celular general.

Las pruebas sobre la viabilidad celular y la activación de Nrf2 resultantes del tratamiento con RSM se realizaron por triplicado en dos laboratorios de investigación diferentes (Tabla 2).

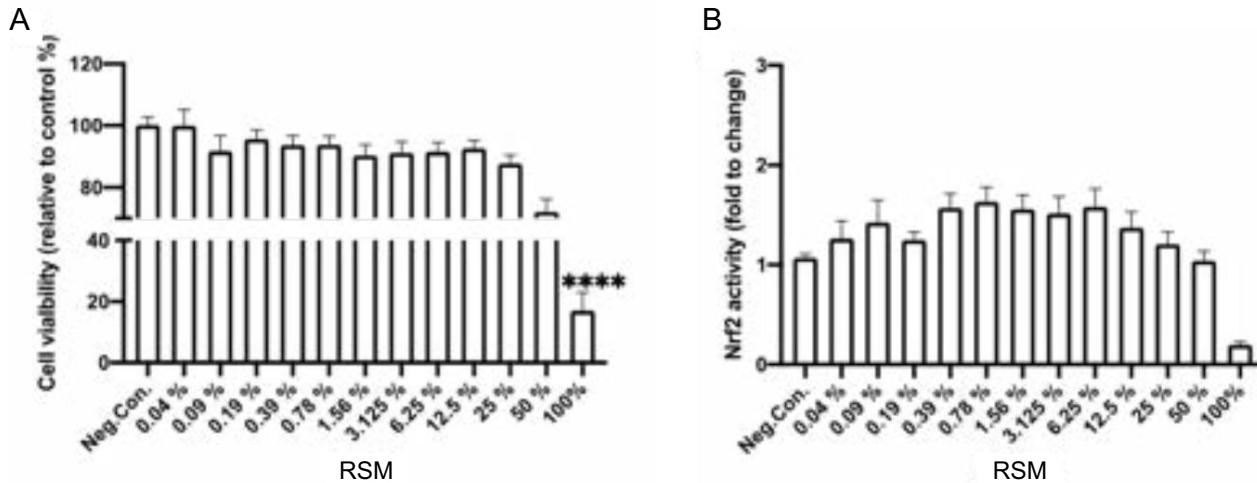


Figura 7: Viabilidad celular cuando se añadió RSM al medio de cultivo en diferentes concentraciones (A). Activación de Nrf2 por RSM (B).

**** p<0,0001 vs. Negativo. Control negativo en el que las células no recibieron RSM. Las estadísticas se realizaron mediante ANOVA de una vía. análisis en GraphPad Prism 9.

Además, otro laboratorio de investigación ha analizado la actividad de Nrf2 de las muestras para verificar los resultados. En general, los resultados de la investigación son similares. Los resultados detallados y la comparación entre los dos investigadores para la activación de Nrf2 se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. RSM de los efectos máximos de Nrf2 a nivel nacional

Instituto de Medicina Complementaria (NICM) y Facultad de Medicina (SOM).

Etiqueta	Resultados Nrf2 de NICM	Resultados Nrf2 de SOM
Control negativo 1	1	
RSM	1,63 ± 0,52	2,25 ± 0,19
Control positivo	12,43 ± 2,93	16,89 ± 3,62

Los resultados muestran el cambio en la activación de Nrf2 en comparación con el control negativo en el que no se añadió ningún tratamiento al cultivo. Se demuestra una activación perceptible de la vía Nrf2 en las células tratadas con RSM.

En la Tabla 2, dos laboratorios independientes han obtenido resultados comparables al analizar la actividad de Nrf2. Estos hallazgos consistentes han llevado a la selección de la muestra para realizar más experimentos mecanísticos destinados a investigar el potencial antioxidante regulado por Nrf2.

Aumento de la expresión de GSH regulada por Nrf2

Para investigar un posible aumento de la producción de GSH por parte de moléculas de señalización redox, se determinaron los niveles extracelulares de GSH y del tiol CysGly derivado en células AREc32 mediante HPLC con detección de fluorescencia. La activación con RSM resultó en un aumento de 1,52 veces. También notamos una disminución significativa en las producciones de cisteína y CysGly por RSM. Estos resultados sugirieron que RSM indujo el metabolismo para aumentar la expresión de GSH.

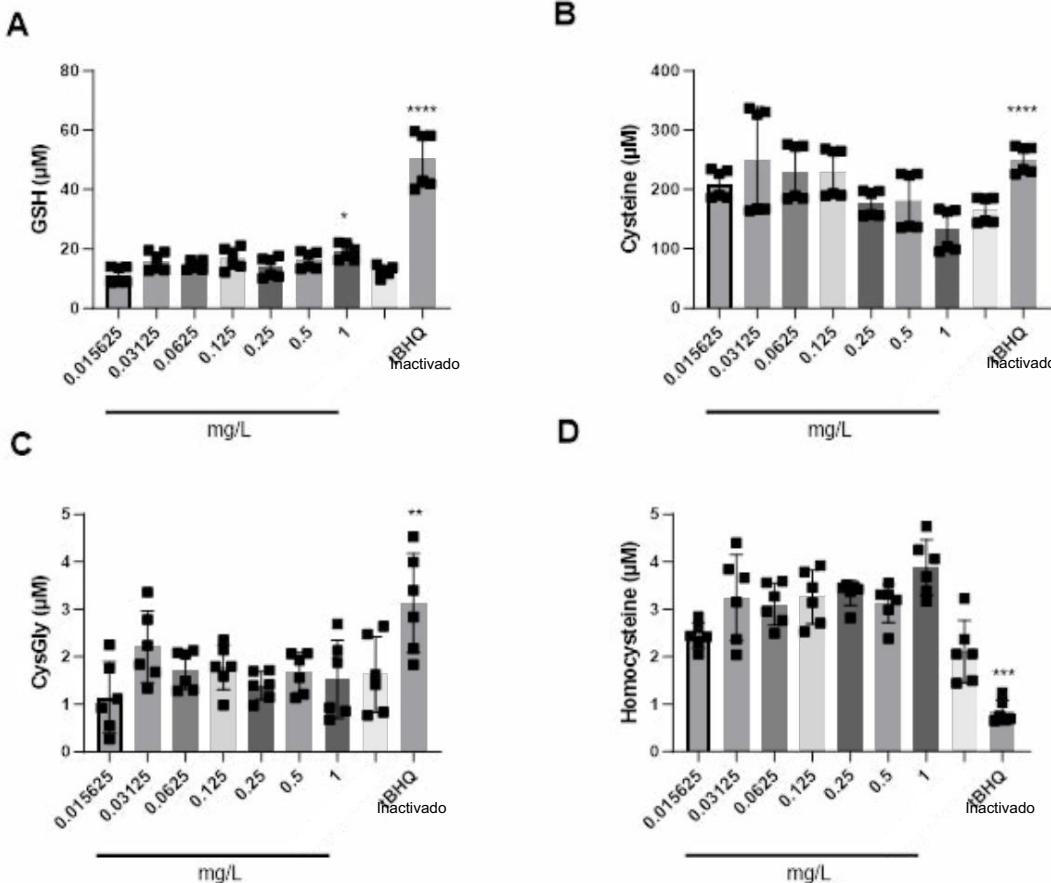


Figura 8: Expresiones de (A) GSH, (B) Cisteína, (C) CysGly y (D) Homocisteína inducidas por RSM en células AREc32. Las células inactivadas representan células sin tratamiento con RSM. tBHQ (terc-butilhidroquinona): control positivo. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ en comparación con las células inactivadas mediante ANOVA de una vía.

Aumento de la expresión de GCLC y HO-1 regulada por Nrf2

Para complementar la medición de la actividad de la luciferasa de Nrf2, se investigó mediante Western blot el efecto de RSM en la expresión de las proteínas diana reguladas por Nrf2, GCLC y HO-1. Para estos experimentos se utilizaron células HepG2, una línea celular de hepatoma humano que se utiliza habitualmente en estudios de metabolismo de fármacos y hepatotoxicidad. El control positivo tBHQ (50 μM) aumentó significativamente la expresión de GCLC y HO-1 (Figura 8). El análisis Western blot para la expresión de las proteínas antioxidantes GCLC demostró que RSM exhibió expresiones más altas de esta proteína en comparación con el control negativo ($p<0,01$). Además, RSM a la concentración de 0,25 mg/L indujo una HO-1 significativamente mayor, lo que sugiere actividades antioxidantes prominentes.

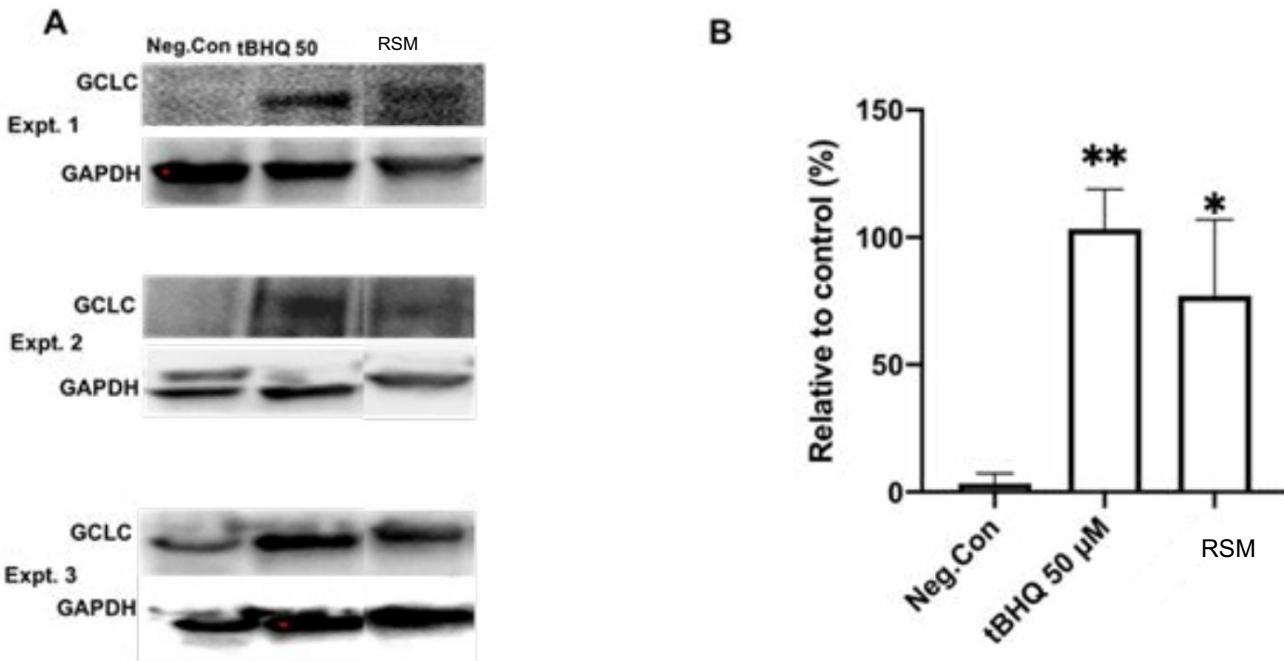


Figura 9: Expresión de proteína GCLC mediante análisis Western blot. Las células HEGP2 se cultivaron en matraces T75 y se trataron con RSM durante 24 horas. (A) Niveles de expresión de proteína de GCLC con experimento n=3. (B) Los datos se analizaron con ImageJ y se ingresaron en Graphpad Prism 9. *p<0,05, ** p<0,01 frente al control negativo (Neg. Con; células cultivadas solo con medio).

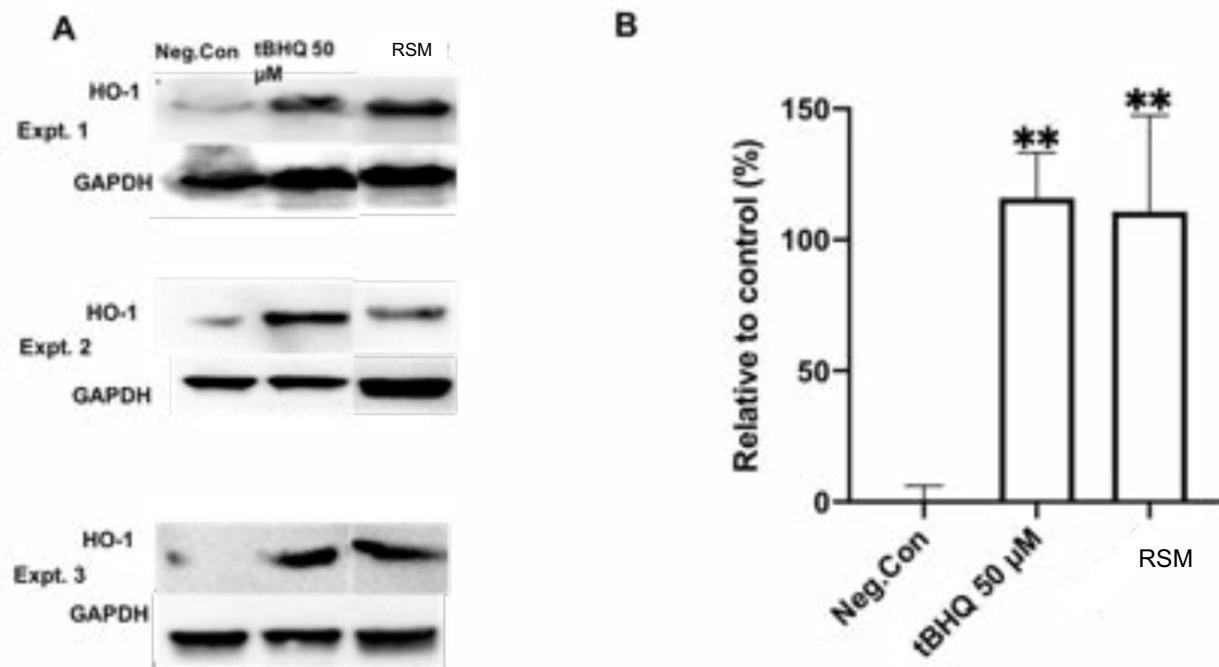


Figura 10: Expresión de la proteína HO-1 mediante análisis Western blot. Las células HEGP2 se cultivaron en matraces T75 y se trataron con RSM durante 24 horas. (A) Niveles de expresión de proteína de HO-1 con un experimento de n=3. (B) Los datos se analizaron mediante ImageJ y se ingresaron en Graphpad Prism 9. *p<0,05, ** p<0,01 frente al control negativo (Neg. Con; células cultivadas solo con medio).

En resumen, las células que fueron expuestas a RSM mostraron una regulación positiva de GCLC y HO-1 en comparación con los controles a los que no se añadió RSM, lo que significa que el RSM está aumentando la tasa a la que se producen estas proteínas.

El aumento de la expresión de GCLC es parte de la respuesta adaptativa de la célula para contrarrestar el estrés oxidativo y mantener el equilibrio redox. GCLC cataliza la formación de un dipéptido, gamma-glutamilcisteína, que es un precursor para la síntesis posterior de GSH. Como GSH desempeña un papel vital en la neutralización de ROS, la desintoxicación de sustancias nocivas y la protección de las células del daño inducido por el estrés oxidativo, la regulación positiva de GCLC podría servir como un mecanismo de protección para mejorar la capacidad antioxidante celular y promover la supervivencia celular en condiciones de mayor estrés oxidativo.

La regulación positiva de HO-1 puede considerarse una respuesta protectora y adaptativa a diversos factores estresantes celulares, incluido el estrés oxidativo, y una parte de los mecanismos de defensa celular contra el estrés que pueden contribuir a mantener la homeostasis celular y promover la supervivencia celular en condiciones difíciles.

Las moléculas de señalización redox funcionan en las células FEK4

(fibroblastos primarios del prepucio humano)

1- Método

Cultivo celular y ensayo MTT

Las células FEK4 se cultivaron durante 48 horas en medio sérico al 15 % durante la noche. Se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 10 min, se permeabilizaron con tritón al 0,1 % durante 15 min, se bloquearon con BSA al 2 % durante 45 min y se cultivaron con anticuerpo polyclonal Nrf2 (1:100) en BSA al 0,1 % a 4 °C durante la noche, luego se tiñeron con Alexa fluor plus 488 (1:2000) en BSA al 0,1 % durante 45 min y una gota de DAPI antes de la obtención de imágenes.

Las células FEK4 de fibroblastos primarios de piel humana se sembraron el día 0. Después de 48 h en cultivo, se cambió el medio y se añadió RSM al cultivo en una proporción de dilución de 1:1 en el medio. Después de 24 horas en cultivo en presencia de RSM, las células se fijaron y se procedió a la inmunocitoquímica con el anticuerpo Nrf2 y el marcador nuclear DAPI.

Viabilidad celular

El ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es un método comúnmente utilizado para evaluar la viabilidad y proliferación celular *in vitro*. Brevemente, las células se cultivaron en un medio (en presencia o no de RSM) en condiciones estándar (37 °C, 5 % de CO₂) hasta que alcanzaron la confluencia deseada. Se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se agregó solución de MTT a cada cultivo. Las células metabólicamente activas redujeron el MTT a formazán. El MTT se aspiró cuidadosamente, se reemplazó con DMSO para disolver los cristales de formazán y se pipeteó hacia arriba y hacia abajo para mezclar. Despues de mezclar, se midió la absorbancia de cada pocillo con un lector de microplacas. La absorbancia se correlaciona con el número de células viables. Los datos recopilados se analizaron para determinar y calcular los porcentajes de viabilidad.

Ensayo de glutatión

Las células se cultivaron en un medio normal hasta que se alcanzó la confluencia. El medio se retiró y se reemplazó por un medio nuevo que contenía RSM en una proporción de 1:1 que contenía 50 µM de sulfóxido de butionina (BSO). Los controles se cultivaron sin BSO, un inhibidor bien conocido de la gamma-glutamilcisteína sintasa, que es el primer paso de la síntesis de GSH. Después de 24 horas en cultivo, se realizó el ensayo de glutatión utilizando Bio-Rad (ensayo de Bradford). El ensayo de proteínas de Bradford es un procedimiento colorimétrico simple y preciso para determinar la concentración de proteína (glutatión en este caso) en solución. Cuando el colorante se une a la proteína, se convierte en una forma azul no protonada estable (A_{max} = 595 nm). Es la forma de colorante de proteína azul la que se detecta a 595 nm en el ensayo utilizando un espectrofotómetro o un lector de microplacas.

Activación/translocación nuclear de Nrf2

Se sembraron células FEK4 de fibroblastos primarios de piel humana y se cultivaron en un medio en condiciones estándar (37°C , 5 % de CO₂). Una vez que las células alcanzaron la confluencia deseada, se añadió RSM al cultivo a una tasa de dilución de 1:1 en el medio. Las células se cultivaron en el medio.

presencia de RSM durante 24 h. Después de ese período, se retiró el medio, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron en formaldehído. Las células fijadas se permeabilizaron con Triton X-100 y los sitios de unión no específicos se bloquearon con BSA. Las células se incubaron con anticuerpo primario (anti-Nrf2), luego se lavaron con PBS y se incubaron nuevamente con anticuerpo secundario. Las células también se tiñeron con DAPI, para la localización nuclear. Las células cultivadas se montaron en portaobjetos de microscopio utilizando medio de montaje y las células teñidas se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia.

2- Resultados y conclusiones

Viabilidad celular

Los datos obtenidos con los ensayos MTT mostraron que los tratamientos nocturnos de las células con RSM en diferentes proporciones de dilución utilizadas no disminuyeron la viabilidad celular de las células tratadas, en comparación con el control no tratado (Figura 11).

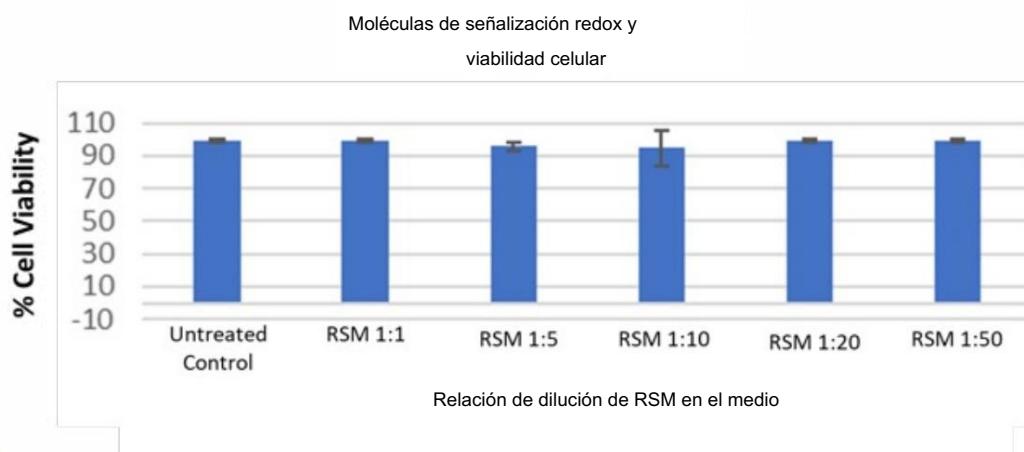


Figura 11: Datos expresados como porcentaje de viabilidad celular de células tratadas con diferentes concentraciones de RSM en comparación con el grupo de control sin tratar, que representa el 100 %. Datos presentados como promedio de al menos 3 experimentos independientes (n=3) +/- desviaciones estándar mostradas como barras de error.

Ensayo de glutatión

Las células que estuvieron expuestas a RSM durante la noche mostraron un aumento en los niveles intracelulares de GSH del 40% (un aumento de 0,4 veces) en comparación con el control no tratado (Figura 12A).

La butionina sulfoximina (BSO) es un inhibidor conocido de la gamma-glutamilcisteína sintasa, que es el primer paso de la síntesis de GSH.

El tratamiento de las células con BSO solo redujo el nivel intracelular de GSH a 0,5 veces el de los fibroblastos de control no tratados. Sin embargo, en las células tratadas con BSO, la adición de RSM mostró capacidad para restaurar el nivel intracelular de GSH hasta 0,55 veces (55%). Por lo tanto, la adición de moléculas de señalización demostró restaurar la producción de GSH en las células cultivadas (Figura 12B).

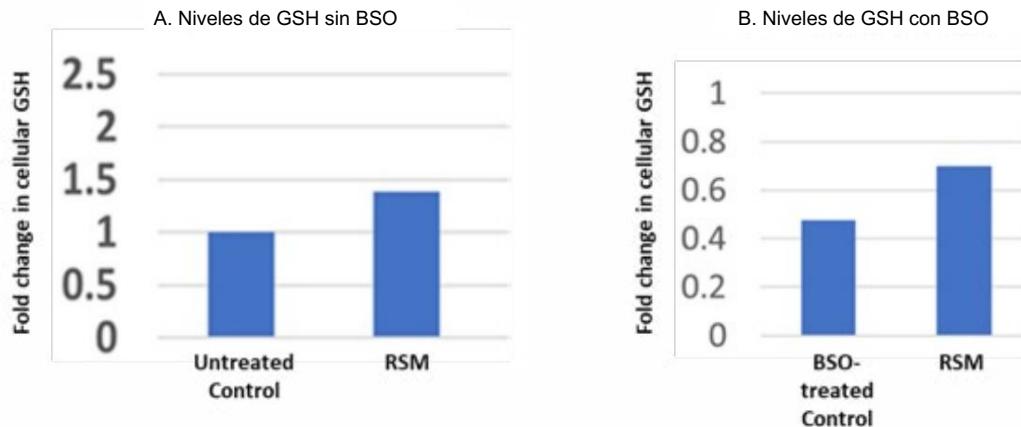


Figura 12: A. Niveles de glutatión (GSH) en células expuestas a moléculas de señalización redox (RSM) en comparación con células no tratadas (control sin tratamiento). B. Las células tratadas con butionina sulfoxima (control tratado con BSO) y RSM mostraron una mayor expresión de GSH en comparación con las células tratadas con BSO. Los datos se calibraron como nanomoles de GSH por mg de proteína y luego se graficaron como cambio en el GSH en comparación con el control sin tratamiento, que se estableció arbitrariamente como 1. Los datos se presentaron como un promedio de al menos 3 experimentos independientes ($n = 3$).

Translocación de Nrf2 al núcleo

La figura 15 muestra que las moléculas de señalización redox pudieron promover la translocación de Nrf2 al núcleo (columna 3, coloración aguamarina del núcleo) cuando las células estuvieron expuestas al tratamiento durante la noche. Estos resultados son consistentes con las capacidades superiores de las moléculas de señalización redox para aumentar los niveles intracelulares de GSH.

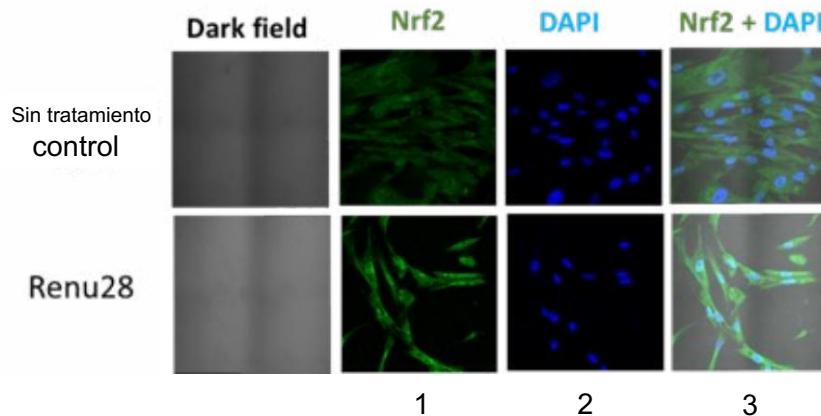


Figura 13: Análisis de inmunofluorescencia de fibroblastos primarios de piel humana FEK4 tratados con moléculas de señalización redox (RSM) o en comparación con células no tratadas (control no tratado). Columna 1, inmunocitoquímica para localizar proteínas Nrf2 y translocación de Nrf2 al núcleo. Columna 2, tinción nuclear con DAPI. Columna 3, imagen fusionada de la localización de la proteína Nrf2 y tinción nuclear. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. Intensidad de fluorescencia media (MFI). La cuantificación de la translocación de Nrf2 al núcleo se realizó utilizando el software Image J.

RSM y Nrf2 – comentarios finales

La investigación sobre el papel de las moléculas de señalización redox (RSM) en las células AREc32 y HepG2, así como en las células FEK4, ha arrojado resultados esclarecedores sobre su impacto en las vías que protegen a las células del estrés oxidativo. Los experimentos proporcionaron información sobre las respuestas celulares de Nrf2 a las RSM y también demostraron la capacidad de las RSM para aumentar la producción de glutatión en las células.

Los resultados indicaron que el RSM induce una activación perceptible de la vía Nrf2 en las células AREc32 y HepG2, lo que contribuye a la defensa celular contra el estrés oxidativo. La activación constante de Nrf2, verificada por laboratorios independientes, refuerza la fiabilidad de nuestros hallazgos. Además, la investigación sobre el potencial antioxidante regulado por Nrf2 reveló un aumento de las expresiones de GCLC y HO-1, lo que sugiere una respuesta adaptativa celular para mejorar la capacidad antioxidante [\(43\)](#).

Además, la exploración sobre el papel de la RSM se extendió a las células FEK4, donde las moléculas de señalización redox no demostraron toxicidad celular ni deterioro de la viabilidad celular. Los resultados mostraron que la RSM fue capaz de aumentar y/o restaurar los niveles intracelulares de glutatión, después del tratamiento con BSO, así como de promover la translocación de Nrf2 al núcleo. Estas observaciones sugieren el potencial de la RSM para apoyar la salud celular y los mecanismos de defensa antioxidante.

Los resultados positivos obtenidos a partir de diferentes líneas celulares y ensayos han proporcionado una perspectiva integral sobre el impacto multifacético de las moléculas de señalización redox en las funciones celulares. Estos hallazgos contribuyen al creciente corpus de conocimientos en el campo de la señalización redox y pueden allanar el camino para futuros estudios que permitan desentrañar las vías subyacentes implicadas en la respuesta de la RSM al estrés celular.

Estos estudios demostraron resultados consistentes y prometedores que vinculan el papel del RSM con la resiliencia celular y la defensa antioxidante. De hecho, esta investigación puede sentar las bases para futuras investigaciones, lo que podría conducir al desarrollo de enfoques innovadores para la mejora de la salud celular y el manejo del estrés oxidativo.

Bibliografía

1. Andrews, Carolina del Norte, Erdjument-Bromage, H., Davidson, MB, Tempst P, Orkin SH. El factor de transcripción eritroide NF-E2 es una proteína con cremallera de leucina básica específica de la hematopoyesis. *Nature*. 22 de abril de 1993;362(6422):722-8. doi: 10.1038/362722a0. PMID: 8469283.
2. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Aislamiento de NF-E2-factor relacionado 2 (Nrf2), un activador transcripcional de cremallera de leucina básica similar a NF-E2 que se une al tandem NF-E2/Repetición AP1 de la región de control del locus de beta-globina. *Proc Natl Acad Sci US A*. 11 de octubre de 1994;91(21):9926-30. doi: 10.1073/pnas.91.21.9926. PMID: 7937919; PMCID: PMC44930.
3. Zgorzynska E, Dziedzic B, Walczewska A. Una descripción general de la vía Nrf2/ARE y su papel en las enfermedades neurodegenerativas. *Int J Mol Sci*. 4 de septiembre de 2021;22(17):9592. doi: 10.3390/ijms22179592. Número de identificación personal: 34502501; Número de identificación personal: PMC8431732.
4. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Radicales libres, Antioxidantes y alimentos funcionales: Impacto en la salud humana. *Pharmacogn Rev*. 2010 julio;4(8):118-26. doi: 10.4103/0973-7847.70902. Número de identificación del paciente: 22228951; Número de identificación del paciente: PMC3249911.
5. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/nrf2>
6. He F, Ru X, Wen T. NRF2, un factor de transcripción para el estrés Respuesta y más allá. *Int J Mol Sci*. 6 de julio de 2020;21(13):4777. doi: 10.3390/ijms21134777. PMID: 32640524; PMCID: PMC7369905.
7. Huang Y, Li W, Su ZY, Kong AN. La complejidad de Nrf2 Vía: más allá de la respuesta antioxidante. *J Nutr Biochem*. 2015 diciembre;26(12):1401-13. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.001. Publicación electrónica 8 de agosto de 2015. PMID: 26419687; PMCID: PMC4785809.
8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9817#:~:text=KEAP1>
9. Baird L, Yamamoto M. Los mecanismos moleculares Regulación de la vía KEAP1-NRF2. *Mol Cell Biol*. 15 de junio de 2020;40(13):e00099-20. doi: 10.1128/MCB.00099-20. PMID: 32284348; PMCID: PMC7296212.
10. Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H. El sistema KEAP1-NRF2: un aparato sensor-efector basado en tiol para mantener la homeostasis redox. *Physiol Rev*. 1 de julio de 2018;98(3):1169-1203. doi: 10.1152/physrev.00023.2017. PMID: 29717933; PMCID: PMC9762786.
11. Matsumaru D, Motohashi H. El sistema KEAP1-NRF2 en Envejecimiento saludable y longevidad. *Antioxidantes (Basilea)*. 30 de noviembre de 2021;10(12):1929. doi: 10.3390/antiox10121929. PMID: 34943032; PMCID: PMC8750203.
12. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Funciones duales de Nrf2 en el cáncer. *Pharmacol Res*. 2008 Nov-Diciembre;58(5-6):262-70. doi: 10.1016/j.phrs.2008.09.003. Publicación electrónica del 13 de septiembre de 2008. PMID: 18838122; PMCID: PMC2652397.
13. Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. El KEAP1-Sistema Nrf2 en cánceres: respuesta al estrés y metabolismo anabólico. *Front Oncol*. 26 de diciembre de 2012;2:200. doi: 10.3389/fonc.2012.00200. PMID: 23272301; PMCID: PMC3530133.
14. Huang Y, Li W, Su ZY, Kong AN. La complejidad de Nrf2 Vía: más allá de la respuesta antioxidante. *J Nutr Biochem*. 2015 diciembre;26(12):1401-13. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.001. Publicación electrónica 8 de agosto de 2015. PMID: 26419687; PMCID: PMC4785809.
15. Cheng D, Wu R, Guo Y, Kong AN. Regulación de la señalización KEAP1-Nrf2: el papel de la epigenética. *Curr Opin Toxicol*. Diciembre de 2016;1:134-138. doi: 10.1016/j.cotox.2016.10.008. Publicación electrónica 5 de noviembre de 2016. PMID: 29057383; PMCID: PMC5645054.
16. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Regulación transcripcional por Nrf2. Señal redox antioxidante. 10 de diciembre de 2018;29(17):1727-1745. doi: 10.1089/ars.2017.7342. Publicación electrónica 20 de octubre de 2017. PMID: 28899199; PMCID: PMC6208165.
17. Sihvola V, Levonen AL. KEAP1 como sensor redox de la respuesta antioxidante. *Arch Biochem Biophys*. 1 de marzo de 2017;617:94-100. doi: 10.1016/j.abb.2016.10.010. Publicación electrónica 18 de octubre de 2016. Número de identificación personal: 27769838.
18. Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, Cuadrado A. Activadores e inhibidores de NRF2: una revisión de su potencial para el desarrollo clínico. *Oxid Med Cell Longev*. 14 de julio de 2019;2019:9372182. doi: 10.1155/2019/9372182. Número de modelo: PMID31396308; Número de modelo: PMID6664516.
19. Li R, Jia Z, Zhu H. Regulación de la señalización de Nrf2. *React Oxyg Species (Apex)*. Noviembre de 2019;8(24):312-322. PMID: 31692987; Número de identificación del producto: PMC6830569.
20. Kopacz A, Kloska D, Forman HJ, Jozkowicz A, Grochot-Przeczek A. Más allá de la represión de Nrf2: una actualización sobre KEAP1. *Free Radic Biol Med*. 2020 septiembre;157:63-74. doi: 10.1016/j.

freeradbiomed.2020.03.023. Publicación electrónica 28 de marzo de 2020.
PMID: 32234331; PMCID: PMC7732858.

21. Baird L, Yamamoto M. Los mecanismos moleculares

Regulación de la vía KEAP1-NRF2. Mol Cell Biol. 15 de junio de 2020;40(13):e00099-20. doi: 10.1128/MCB.00099-20. PMID: 32284348; PMCID: PMC7296212.

22. Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS. Sulforafano y otros activadores nutrigenómicos de Nrf2: ¿Pueden coincidir las expectativas del médico con la realidad? Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:7857186. doi: 10.1155/2016/7857186. Publicación electrónica 6 de enero de 2016. PMID: 26881038; PMCID: PMC4736808.

23. Alanazi AM, Mostafa GA, Al-Badr AA. Glutatión. Perfiles de sustancias farmacológicas. Excip. Rel. Methodol. 2015;40:43-158. doi: 10.1016/bs.podrm.2015.02.001. Publicación electrónica 31 de marzo de 2015. PMID: 26051685.

24. Shayne C. Gad. Glutatión. Editor(es): Philip Wexler.

Enciclopedia de toxicología (cuarta edición). Academic Press. 2024. Páginas 1001-1002. ISBN 9780323854344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00478-4>.

25. Santacroce G, Gentile A, Soriano S, Novelli A, Lenti MV, Di Sabatino A. Glutatión: aspectos farmacológicos e implicaciones para el uso clínico en la enfermedad del hígado graso no alcohólico. Front Med (Lausana). 22 de marzo de 2023;10:1124275. doi: 10.3389/fmed.2023.1124275. PMID: 37035339; PMCID: PMC10075255.

26. Pizzorno J. ¡Glutatión! Integr Med (Encinitas). 2014 febrero; 13 (1): 8-12. PMID: 26770075; PMCID: PMC4684116.

27. Lee DH, Jacobs DR Jr. Hormesis y salud pública: ¿puede ¿Se puede mitigar la depleción de glutatión y la disfunción mitocondrial debidas a la exposición crónica a dosis muy bajas de contaminantes orgánicos persistentes? J Epidemiol Community Health. Marzo de 2015;69(3):294-300. doi: 10.1136/jech-2014-203861. Publicación electrónica del 30 de septiembre de 2014. PMID: 25271248.

28. Khan M, Samrana S, Zhang Y, Malik Z, Khan MD, Zhu S.

El glutatón reducido protege los compartimentos subcelulares de las lesiones por ROS inducidas por Pb en hojas y raíces de algodón americano (*Gossypium hirsutum* L.). Front Plant Sci. 15 de abril de 2020;11:412. doi: 10.3389/fpls.2020.00412. PMID: 32351527;

Número de identificación del producto: PMC7176022.

29. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. El reciclaje de glutatón regulado por Nrf2 independientemente de la biosíntesis es fundamental para la supervivencia celular durante el estrés oxidativo.

Radic Biol Med. 15 de febrero de 2009; 46 (4): 443-53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040. Publicación electrónica 5 de noviembre de 2008. PMID: 19028565; PMCID: PMC2634824.

30. Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ. Estructura, función y regulación postraduccional de las subunidades catalíticas y modificadoras de la glutamato cisteína ligasa. Mol Aspects Med. 2009 feb-abr;30(1-2):86-98. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.009. Publicación electrónica 6 de septiembre de 2008. PMID: 18812186; PMCID: PMC2714364.

31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2729>

32. AG Osman, AG Chittiboyina, IA Khan. Capítulo tres: Función citoprotectora de los fitoquímicos dietéticos contra el desarrollo del cáncer mediante la inducción de enzimas antioxidantes y de fase II. Editor(es): JC Fishbein, JM Heilman. Avances en toxicología molecular. Elsevier. Volumen 10. 2016. Páginas 99-137. ISSN 1872-0854. ISBN 9780128047002. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804700-2.00003-9>.

33. Araujo JA, Zhang M, Yin F. Hemooxigenasa-1, oxidación, inflamación y aterosclerosis. Front Pharmacol. 19 de julio de 2012;3:119. doi: 10.3389/fphar.2012.00119. PMID: 22833723; Número de identificación del producto: PMC3400084.

34. Campbell NK, Fitzgerald HK, Dunne A. Regulación de inflamación por la enzima antioxidante hemo oxigenasa 1. Nat Rev Immunol. 2021 Jul;21(7):411-425. doi: 10.1038/s41577-020-00491-x. Publicación electrónica 29 de enero de 2021. PMID: 33514947.

35. Forman HJ, Ursini F, Maiorino M. Una visión general de los mecanismos de la señalización redox. J Mol Cell Cardiol. Agosto de 2014;73:2-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.018. Publicación electrónica 8 de febrero de 2014. PMID: 24512843; PMCID: PMC4048798.

36. Lee MY, Griendlung KK. Señalización redox, vascular función e hipertensión. Señal Antioxid Redox. 2008 Jun;10(6):1045-59. doi: 10.1089/ars.2007.1986. PMID: 18321201; Número de identificación del producto: PMC2828811.

37. Zhang J, Grek C, Ye ZW, Manevich Y, Tew KD, Townsend DM. Funciones pleiotrópicas de la glutatión S-transferasa P. Adv Cancer Res. 2014;122:143-75. doi: 10.1016/B978-0-12-420117-0,00004-9. Número de serie: 24974181; Número de serie: PMC5079281.

38. Sinenko SA, Starkova TY, Kuzmin AA, Tomilin AN. Funciones de señalización fisiológica de las especies reactivas de oxígeno en células madre: desde las moscas hasta el hombre. Front Cell Dev Biol. 6 de agosto de 2021;9:714370. doi: 10.3389/fcell.2021.714370. PMID: 34422833; PMCID: PMC8377544.

39. Schieber M, Chandel NS. Función de las ROS en la señalización redox y el estrés oxidativo. *Curr Biol*. 19 de mayo de 2014;24(10):R453-62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034. PMID: 24845678; PMCID: PMC4055301.
40. He F, Ru X, Wen T. NRF2, un factor de transcripción para el estrés Respuesta y más allá. *Int J Mol Sci*. 6 de julio de 2020;21(13):4777. doi: 10.3390/ijms21134777. PMID: 32640524; PMCID: PMC7369905.
41. KM Kim, SH Ki. Capítulo 28 - Nrf2: un regulador clave de la señalización redox en enfermedades hepáticas. Editor(es): Pablo Muriel. *Fisiopatología hepática*. Academic Press. 2017. Páginas 355-374. ISBN 9780128042748. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00028-X>.
42. Ma Q. Función de nrf2 en el estrés oxidativo y la toxicidad. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:401-26. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320. PMID: 23294312; PMCID: PMC4680839.
43. Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B, von Knethen A. Nrf2, el regulador maestro de las respuestas antioxidantes. *Int J Mol Sci*. 20 de diciembre de 2017;18(12):2772. doi: 10.3390/ijms18122772. Número de modelo: PMID29261130; Número de modelo: PMID5751370.
44. Kreß JKC, Jessen C, Hufnagel A, Schmitz W, Xavier da Silva TN, Ferreira Dos Santos A, Mosteo L, Goding CR, Friedmann Angeli JP, Meierjohann S. El efecto integrado de respuesta al estrés ATF4 es un activador metabólico obligatorio de NRF2. *Representante celular* 25 de julio de 2023; 42 (7): 112724. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112724. Publicación electrónica 4 de julio de 2023. PMID: 37410595.
45. Zhang JC, Yao W, Dong C, Han M, Shirayama Y, Hashimoto K. La vía de señalización KEAP1-Nrf2 confiere resiliencia frente a susceptibilidad al estrés eléctrico ineludible. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2018 Dic;268(8):865-870. doi: 10.1007/s00406-017-0848-0. Publicación electrónica 8 de noviembre de 2017. PMID: 29119264.
46. Kerins MJ, Ooi A. Los roles de NRF2 en la modulación de la homeostasis celular del hierro. *Antioxid Redox Signal*. 10 de diciembre de 2018;29(17):1756-1773. doi: 10.1089/ars.2017.7176. Publicación electrónica 21 de septiembre de 2017. PMID: 28793787; PMCID: PMC6208163.
47. Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK. La vía de defensa celular de Nrf2: mecanismos de regulación dependientes e independientes de KEAP1. *Biochem Pharmacol*. 15 de marzo de 2013;85(6):705-17. doi: 10.1016/j.bcp.2012.11.016. Publicación electrónica, diciembre de 2012.
5. Número de identificación personal: 23219527.
48. Petsouki E, Cabrera SNS, Heiss EH. AMPK y NRF2: ¿jugadores interactivos en el mismo equipo para la homeostasis celular? *Free Radic Biol Med*. 2022 Sep;190:75-93. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.07.014. Publicación electrónica 2022 Jul 31. PMID: 35918013.
49. Calabrese EJ, Kozumbo WJ. La relación dosis-respuesta hormética mecanismo: activación de Nrf2. *Pharmacol Res*. 2021 Mayo;167:105526. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105526. Edición electrónica 2021 2 de marzo. PMID: 33667690.
50. Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C, Traverso N. Hormesis y estrés oxidativo: fisiopatología de las especies reactivas de oxígeno y la cuestión abierta de la modulación y suplementación de antioxidantes. *Antioxidantes (Basilea)*. 19 de agosto de 2022;11(8):1613. doi: 10.3390/antiox11081613. Número de serie: 36009331; Número de serie: PMC9405171.
51. Ngo V, Duennwald ML. Nrf2 y estrés oxidativo: una descripción general de los mecanismos y las implicaciones en las enfermedades humanas. *Antioxidants (Basilea)*. 27 de noviembre de 2022;11(12):2345. doi: 10.3390/antiox11122345. PMID: 36552553; PMCID: PMC9774434.
52. Zhao F, Ci X, Man X, Li J, Wei Z, Zhang S. Moduladores farmacológicos derivados de los alimentos de la vía Nrf2/ARE: su papel en el tratamiento de enfermedades. *Moléculas*. 2021 15 de febrero;26(4):1016. doi: 10.3390/molecules26041016. PMID: 33671866; ID del PMC: PMC7918973.
53. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Aislamiento de Factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2), un activador transcripcional de cremallera de leucina básica similar a NF-E2 que se une a la repetición en tandem NF-E2/AP1 de la región de control del locus de beta-globina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 de octubre de 1994;91(21):9926-30. doi: 10.1073/pnas.91.21.9926. PMID: 7937919; PMCID: PMC44930.
54. Zhang L, Zhang J, Ye ZW, Muhammad A, Li L, Culpepper JW, Townsend DM, Tew KD. Cambios adaptativos en células tumorales en respuesta al estrés reductor. *Biochem Pharmacol*. Enero de 2024;219:115929. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115929. Publicación electrónica 22 de noviembre de 2023. PMID: 38000559.