



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: INDUCTORES DE NRF2 EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Autor: Lucía Abeal Navarro

Fecha: 30/07/2020

Tutor: Rafael León Martínez

Co-tutor: Paloma Mayo Mariscal de Gante

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Tratamiento actual de la EA	3
1.2. Fisiopatología de la EA	3
1.2.1. Hipótesis amiloide e hiperfosforilación de tau	4
1.2.2. Hipótesis de estrés oxidativo	5
1.2.3. Neuroinflamación crónica	5
1.2.4 Hipótesis colinérgica	6
1.3. Nrf2-Keap1	7
2. OJETIVOS	10
3. METODOLOGÍA	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1 Inductores de Nrf2	10
4.1.1 Compuestos modificadores de Keap1	10
Ésteres de ácido fumárico.	11
Compuestos polifenólicos	11
Sulforafano y sus derivados	13
Melatonina	13
Terbutilhidroquinona (tBHQ)	14
4.1.2 Inducción Keap1-independiente de Nrf2	15
4.2 Desafíos y consideraciones. Selectividad de los fármacos	17
5. CONCLUSIONES	17
6. BIBIOGRAFÍA	18

RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas (NDDs) serán el mayor problema de salud en este siglo y la segunda causa de muerte en el año 2050. El principal factor de riesgo de estas enfermedades es el envejecimiento, a medida que aumenta la esperanza de vida de la población la prevalencia aumenta exponencialmente. A pesar de los esfuerzos para encontrar una cura, los tratamientos actuales, en los casos en que existen, son únicamente tratamientos sintomáticos. Las evidencias más recientes apuntan al estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la neuroinflamación crónica como posibles mecanismos patológicos subyacentes a la neurodegeneración. El factor de transcripción Nrf2 regula la expresión de numerosos genes que codifican enzimas antioxidantes y detoxificantes mediante su unión a las secuencias del ADN conocida como ARE. La inducción de Nrf2 puede suponer un efecto preventivo y terapéutico para enfermedades relacionadas con el aumento del estrés oxidativo e inflamación como la enfermedad de Alzheimer. La respuesta antioxidante regulada por Nrf2 se puede activar mediante la inhibición del represor natural, la proteína Keap1, así como la modulación de diferentes proteínas que regulan su actividad siendo GSK-3 β la más estudiada actualmente.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central que actualmente supone la principal causa de demencia en personas mayores de 65 años, siendo responsable del 60-70 % de los casos, según la Organización Mundial de la Salud (OMS).¹ Se define como un trastorno cerebral progresivo e irreversible que paulatinamente afecta tanto a la memoria como a las habilidades de pensamiento y, finalmente, a la capacidad para llevar a cabo tareas simples.² Este síndrome presenta una muerte neuronal progresiva que afecta principalmente al sistema colinérgico.³

Esta enfermedad se caracteriza por un conjunto de alteraciones cognitivas y neuropsiquiátricas, se produce la pérdida de la capacidad para pensar, recordar o razonar hasta el punto de interferir con la vida y las actividades diarias. En el transcurso de la enfermedad se asocian cambios en el estado de ánimo con alteraciones psicológicas y de la conducta. Los síntomas de conducta más relevantes son apatía, depresión, conductas motoras sin finalidad, alteración del sueño, ansiedad, agresividad y alucinaciones. Además, se produce la pérdida progresiva de la memoria, atención, capacidad comunicativa, orientación visoespacial y el ejercicio de funciones ejecutivas.⁴

El principal factor de riesgo de la EA es el envejecimiento, por lo que las sociedades con mayor esperanza de vida son las que más están sufriendo su impacto.⁵ En 2019, la Asociación Internacional de EA estimó que más de 50 millones de personas sufren EA en todo el mundo y valoró que en 2050 esta cifra podría aumentar hasta los 152 millones. Los factores de riesgo más importantes, por un incremento de la prevalencia, son la edad, sexo femenino, factores hereditarios (genes implicados en la proteína precursora amiloide (APP), presenilina 1 y 2 ó Apolipoproteína E-4 (ApoE-4) y depresión. Por el contrario, se relaciona un efecto protector frente a la EA el consumo de dieta mediterránea o ejercicio físico moderado.⁶

1.1 Tratamiento actual de la EA

A pesar de los grandes avances científicos y clínicos sobre la EA en los últimos 30 años, los tratamientos disponibles actualmente son solo sintomáticos, es decir, alivian los síntomas de la enfermedad, actuando en diferentes niveles del proceso neuropatológico. Aunque mejoran la calidad de vida de los pacientes, ninguno consigue realmente prevenir o detener el progreso de la enfermedad.⁷ Las estrategias terapéuticas para el tratamiento farmacológico de la EA presentan cuatro objetivos: retrasar el deterioro, mantener las funciones cerebrales y mejorar la calidad de vida del paciente.⁴

Actualmente, los inhibidores de colinesterasas (ChE) constituyen los fármacos de primera línea que se utilizan en los casos leves o moderados de la EA con el objetivo de aumentar la transmisión colinérgica. Para ello se utilizan tres medicamentos: donepezilo, rivastigmina y galantamina (Figura 1). La tacrina fue el primer fármaco aprobado por la FDA (Food and Drug Administration of the United States) para el tratamiento de la EA, no obstante, fue retirado debido a su hepatotoxicidad.⁸

El último tratamiento en ser aprobado fue la memantina (Figura 1). Éste se caracteriza por ejercer un bloqueo no competitivo y reversible del receptor de glutamato de tipo NMDA (*N*-metil-D-aspartato), en función de su concentración, evitando la activación excesiva.⁴ La memantina aminora de manera significativa el ritmo y la intensidad del deterioro clínico en pacientes de Alzheimer moderados o graves, aunque únicamente durante un corto espacio de tiempo al inicio del tratamiento.⁸

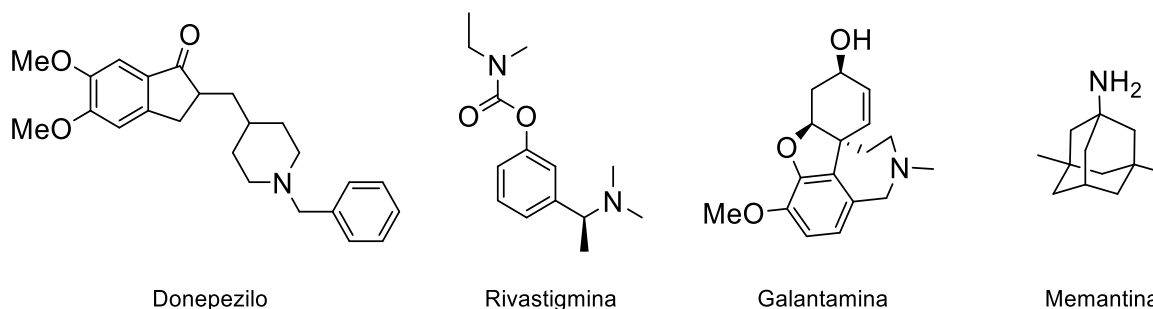


Figura 1. Fármacos actuales para el tratamiento de la EA

En las primeras etapas de la enfermedad, el tratamiento se realiza con un inhibidor de colinesterasa y, a medida que la enfermedad evoluciona, se puede añadir memantina. Por otro lado, los síntomas conductuales suelen ser tratados con antidepressivos serotoninérgicos o, si son lo suficientemente intensos, con un antipsicótico atípico.⁸

1.2. Fisiopatología de la EA

Actualmente se desconoce la etiología de la EA, aunque se han propuesto diferentes hipótesis que permiten comprender el complejo proceso neurodegenerativo de esta enfermedad. En su fisiopatología destaca la atrofia de la corteza cerebral con pérdida de neuronas a nivel cortical y subcortical, la formación de “placas seniles”, formadas principalmente por péptido β -amiloide (β A), y la degeneración neurítica por formación de ovillos neurofibrilares, compuestos por la agregación de filamentos helicoidales de proteína tau hiperfosforilada. Además, existen otras alteraciones histopatológicas como la disfunción mitocondrial, que induce daño oxidativo, la neuroinflamación, el metabolismo de la insulina o la desregulación

del homeostasis del calcio (Ca^{2+}), entre otros. Todo ello confirma la complejidad de esta enfermedad.⁴

1.2.1. Hipótesis amiloide e hiperfosforilación de tau

La hipótesis amiloide sugiere que el proceso neurodegenerativo se produce como consecuencia de los eventos citotóxicos desencadenados por la formación, agregación y depósito del péptido βA .

Se han descrito dos procesos de proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP). En condiciones fisiológicas tiene lugar la *vía* no amiloidogénica, en la que la enzima α -secretasa escinde la APP, liberando el fragmento soluble α -APPs y un fragmento C-terminal asociado a membrana de 83 residuos (C83). Posteriormente, C83 es procesado por γ -secretasa dando lugar a p3 y al dominio intracelular de la APP (AICD). Sin embargo, en condiciones patológicas, tiene lugar la *vía* amiloidogénica, donde APP es procesada por la enzima β -secretasa para formar β -APPs y un fragmento carboxiterminal de 99 residuos asociado a la membrana (C99). Finalmente, la γ -secretasa escinde el fragmento C99 para formar a AICD y el péptido βA ($\beta\text{A}_{1-40}/\beta\text{A}_{1-42}$) capaz de formar oligómeros, agregados insolubles y finalmente las placas seniles extracelulares, características de la EA (Figura 2).⁴

La función de la proteína APP no está completamente dilucidada, no obstante, se relaciona con la regulación de la supervivencia neuronal, la protección frente a estímulos externos tóxicos, el crecimiento de neuritas, la plasticidad sináptica y la adhesión celular. En condiciones patológicas, su procesamiento aberrante da lugar a los péptidos $\beta\text{A}_{1-40}/\beta\text{A}_{1-42}$ que interfieren en la sinapsis, disminuyen la plasticidad neuronal, alteran el metabolismo energético y el de la glucosa, inducen estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, perturban la homeostasis del Ca^{2+} celular e inducen la activación glial.⁹

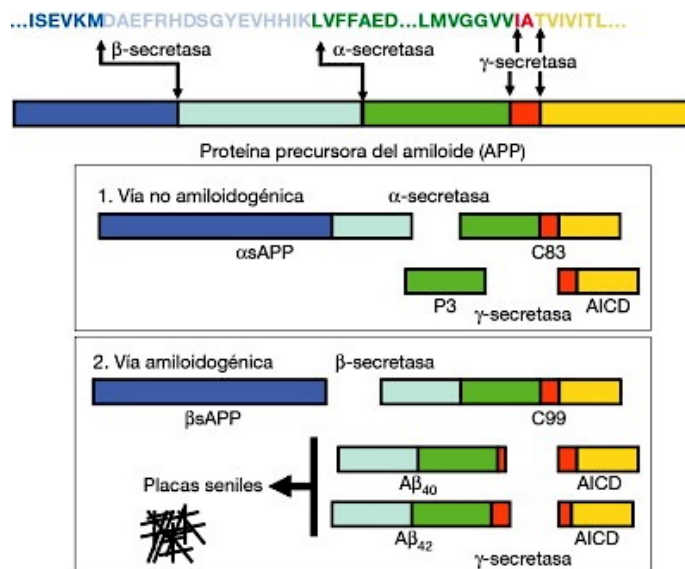


Figura 2. Proteólisis de APP. 1) Vía no amiloidogénica en situación fisiológica 2) Vía no amiloidogénica en situación patológica⁴

Por otra parte, en la EA se produce un aumento en la cantidad de tau total y tau fosforilada, tanto en el cerebro como en el líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, el mecanismo que desencadena su agregación y sus consecuencias no están totalmente establecidas. Tau se encuentra en el sistema nervioso central y periférico, participando en la estabilización de los

microtubulos, imprescindibles para mantener la estructura del citoesqueleto, así como un correcto transporte axonal y plasticidad sináptica.¹⁰

El estado y la función de tau se encuentran regulados por diferentes modificaciones postraduccionales mediadas por múltiples quinasas y fosfatasas, siendo GSK-3 β (glucógeno sintasa quinasa-3 β) las más importante. GSK-3 β se encuentra aumentada en la EA, produciendo una mayor hiperfosforilación de tau y desestabilizando de los microtúbulos, dando lugar a la disfunción del transporte axonal y, en último término, a la muerte neuronal por apoptosis.⁹

1.2.2. Hipótesis de estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) participan en funciones esenciales de la señalización celular, la homeostasis celular, la autofagia y la división celular. En condiciones fisiológicas, se mantienen niveles bajos de ERO por una estricta regulación denominada “homeostasis rédox”. El envejecimiento, factores genéticos o ambientales pueden alterar esa homeostasis, generando una situación de estrés oxidativo por una acumulación excesiva de ERO/ERN. Este aumento puede ser debido al incremento de su producción o por un fallo en los sistemas de detoxificación. Esta situación permite que estas especies altamente reactivas puedan interaccionar y alterar componentes celulares como ADN, proteínas y lípidos contribuyendo al daño celular.¹¹

La señalización rédox está involucrada en la consolidación de la memoria, diferenciación neuronal y plasticidad. Las neuronas son particularmente sensibles al estrés oxidativo debido a su alto consumo de oxígeno, bajos niveles de antioxidantes y altos niveles de hierro y lípidos poliinsaturados, entre otros. El incremento de ERO conduce a la muerte neuronal y con ello a una función cerebral alterada. Entre los factores de transcripción que se activan por ERO y ERN destaca el factor nuclear κ B (NF- κ B), la proteína activadora 1 (AP1) y el factor nuclear eritroide-2 (NF-E2) conocido como Nrf2 (nuclear factor E2- related factor 2). Nrf2 es un factor ubicuo que modula la respuesta antioxidante de fase II a estrés oxidativo a través de su unión a los Elementos de Respuesta Antioxidante (ARE), secuencia presente en las regiones reguladoras de genes antioxidantes y anti-inflamatorios.¹¹

En la EA, se ha observado que el péptido β A induce una alteración del potencial de membrana mitocondrial, lo que produce un aumento del daño oxidativo. Además, el fragmento β A₁₋₄₂ es capaz de coordinar Cu²⁺ y este complejo, β A₁₋₄₂-Cu²⁺, puede reducir el oxígeno molecular produciendo H₂O₂, incrementando de forma notable el daño oxidativo.¹³

1.2.3. Neuroinflamación crónica

La sobreproducción de radicales libres se asocia a un proceso inflamatorio desregulado que activa de forma anómala la vías de señalización pro-inflamatorias.¹³ La neuroinflamación crónica produce daño celular y destrucción de tejidos, se encuentra regulada tanto por la vía de señalización activada por los receptores “toll-like receptors” (TLR) entre otros, así como por la vía Nrf2.¹³

La señalización inducida por la activación de TLRs conduce a la expresión de numerosas citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-6), quimioquinas (IL-8, MIP2), así como interferones (tipo I) con el objetivo de reparar el tejido dañado y restaurar la homeostasis. Sin embargo, la activación descontrolada de la señalización mediada por TLRs produce una respuesta inflamatoria exacerbada y trastornos inflamatorios crónicos.¹⁴

Por otro lado, la vía de señalización de Nrf2-ARE es un importante sistema regulador que controla la expresión de enzimas antioxidantes y anti-inflamatorias que modulan la activación glial.¹⁴

1.2.4 Hipótesis colinérgica

En la EA se produce una disminución del número de neuronas colinérgicas y de diversos marcadores como las enzimas colina-acetiltransferasa (CAT) y acetil-colinesterasa (AChE) en la corteza cerebral y el hipocampo, relacionándose con los síntomas más característicos de la EA, especialmente con las alteraciones de la memoria y el aprendizaje¹¹

La acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor del sistema colinérgico. La funcionalidad del sistema colinérgico se asegura mediante la síntesis de ACh a partir de acetil coenzima A y colina por acción de la enzima CAT, quedando almacenada en vesículas sinápticas. Mediante un proceso de exocitosis dependiente de Ca^{2+} se libera ACh al espacio sináptico, produciéndose su unión a los receptores muscarínicos y nicotínicos presentes en la membrana pre-sináptica y post-sináptica (Figura 3).⁴

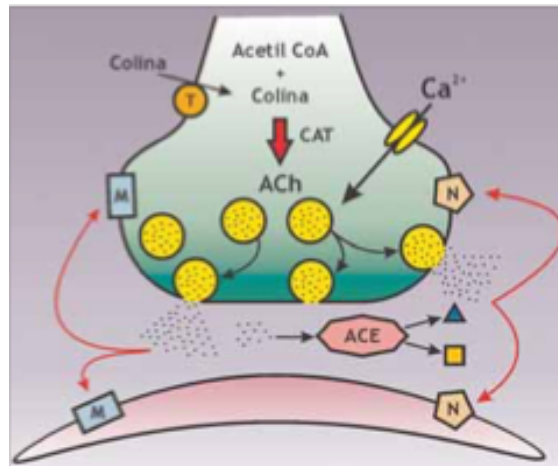


Figura 3. Sinapsis colinérgica: 1) Síntesis a partir de colina y acetil Coa catalizado por la enzima CAT 2) Almacen en vesículas que son liberadas a la sinapsis por la entrada de calcio 3) Acción de la ACh en receptores postsinápticos y presinápticos 4) Degradación y recaptación⁴

La activación de los receptores muscarínicos post-sinápticos M1 se relaciona con procesos de aprendizaje, mientras que la activación de receptores muscarínicos pre-sinápticos M2 tiene un efecto de retroalimentación negativa, reduciendo la liberación de ACh.¹² La única estrategia farmacoterapéutica que ha demostrado cierta eficacia para mejorar la sintomatología del paciente es aquella dirigida a evitar la degradación de ACh, con el fin de contrarrestar su déficit cerebral.⁴

La acetilcolina (ACh) es inactivado por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en la hendidura sináptica. La AChE contiene dos sitios de unión para la ACh: la región aniónica periférica, donde se fija el grupo amonio cuaternario, y la región catalítica, que hidroliza el enlace éster. Los fármacos donepezilo y galantamina se unen en el sitio aniónico de forma reversible, mientras que la unión de rivastigmina es pseudorreversible, por lo que se disocia lentamente. La unión de estos fármacos a la AChE interrumpe la unión de ACh y con ello su degradación. La galantamina, además de su acción inhibitoria sobre AChE, actúa como modulador de receptores nicotínicos, potenciando así su acción.²

Algunos datos indican que también los niveles del neurotransmisor glutamato se encuentran disminuidos contribuyendo a aumentar la gravedad del deterioro cognitivo y funcional, puesto que el sistema glutamatérgico está implicado en los mecanismos de potenciación a largo plazo de aprendizaje y la memoria, así como en la supervivencia neuronal.¹⁵

1.3. Nrf2-Keap1

El factor de transcripción Nrf2 pertenece a la familia de factores de transcripción con estructura de tipo cremallera básica de leucina (bZIP: basic región leucine zipper). Nrf2 regula la expresión de aproximadamente 250 genes precedidos por secuencias ARE, estando implicado en procesos de respuesta a inflamación y daño tisular.¹⁴ Estos genes participan en reacciones de detoxificación de fase I, II y III, metabolismo de glutatión, producción de NADPH, oxidación de ácidos grasos, metabolismo del hierro y procesos autofágicos, entre otros. Nrf2, una vez se trasloca al núcleo, heterodimeriza con proteínas sMAF para unirse a las secuencias ARE y activar un amplio rango de procesos defensivos celulares mediante proteínas antioxidantes, desintoxicantes y anti-inflamatorias. Así, Nrf2 puede coordinar una respuesta eficaz bajo condiciones de estrés como envejecimiento celular o estrés oxidativo.^{13,16}

La proteína Keap1 es el principal represor de Nrf2, un adaptador de la ubiquitina ligasa E3 que actúa como sensor de estrés oxidativo en el interior de la célula. Keap1 y la proteína β -TrCP (β —Transducin Repeat Containing) son los dos mecanismos de control principales que brindan la oportunidad para regular farmacológicamente Nrf2.

1.3.1. Estructura Nrf2

Nrf2 contiene 605 aminoácidos que se encuentran formando siete dominios homólogos Nrf2-ECH (NEH: Nrf2-ECH homology) (NEH) (Figura 4),¹⁴ cada uno de los cuales realiza una función específica:

- NEH1 incluye las siguientes estructuras:
 - bZIP, crucial para la dimerización de Nrf2 con proteínas sMAF y su unión al ADN. Puede interactuar con UbcM2, enzima conjuradora de ubiquitina E2, responsable de regular la estabilidad de Nrf2.
 - Señal de localización nuclear esencial para la translocación nuclear de Nrf2 que se descubre tras su liberación de Keap1.
- NEH2 implicado en la unión a Keap1 y la conjugación con ubiquitina,¹² siendo responsable de la degradación por el proteosoma mediada por Keap1.
- NEH3, NEH4, NEH5 son responsables de activación transcripcional de genes con secuencia ARE en su promotor.
- NEH6 tiene una región rica en serina involucrada en la regulación negativa independiente de Keap1.
- NEH7 interactúa con el receptor X retinoico α (RXR α) que actúa como represor de Nrf2. Los péptidos 545 y 554 presentan una señal de exportación nuclear.¹⁴

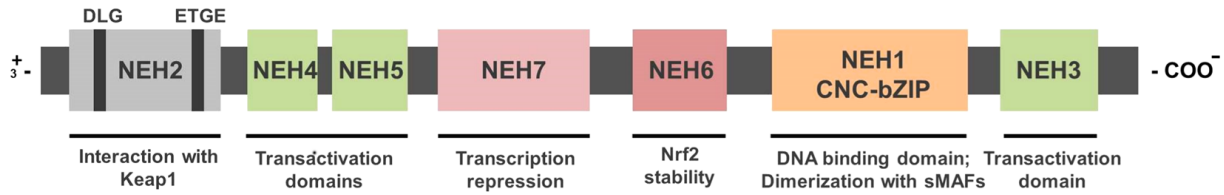


Figura 4. Representación de los dominios estructurales de Nrf2.¹⁴

1.3.2. Estructura Keap1

Estudios por microscopía electrónica muestran que Keap1 presenta una estructura de tallo bifurcado que comprende dos grandes esferas donde se encuentran los dominios IVR (intervening región), Kelch y carboxiterminal.¹³ El dominio IVR contiene los residuos de cisteína que actúan como sensores del estatus redox de la célula. La dimerización de Keap1 se encuentra mediada por el dominio BTB. Este homodímero Keap1 se une al factor de transcripción Nrf2 dos motivos uno de baja afinidad y otros de alta afinidad, para dirigir a éste a la ubiquitinización y degradación por el proteasoma (dominio DRG) (Figura 5). Las estrategias terapéuticas actuales para interrumpir la interacción Nrf2-Keap1 incluyen compuestos electrófilos que modifican químicamente los grupos tiol de las cisteínas C151, C273 y C288, cruciales para la ubiquitinación de Nrf2 mediada por Keap1, y compuestos inhibidores de la interacción proteína-proteína (iIPP) entre Nrf2 y Keap1.

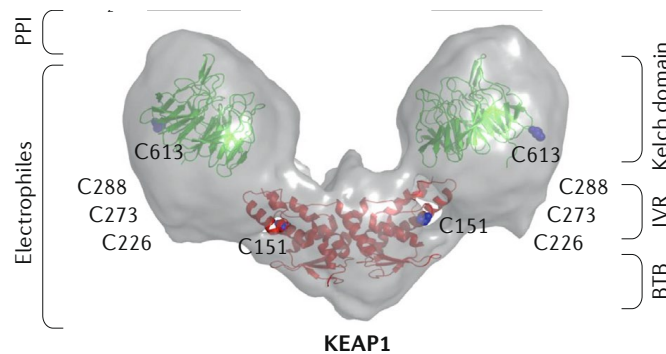


Figura 5. Representación estructural por microscopía electrónica del dímero Keap1¹⁴

1.3.3. Regulación Nrf2-Keap1

En condiciones basales, en ausencia de estrés oxidativo, Nrf2 se localiza en el citoplasma en concentraciones bajas, con una vida media de entre 15-40 min a través de su rápida degradación proteasómica mediada por Keap1. Keap1 se une al complejo ubiquitina ligasa E3 (Rbx-1) a través de cullin-3 que actúa como subunidad de reconocimiento y unión al sustrato, facilita la ubiquitinización eficaz y específica de Nrf2 y su posterior degradación por el proteosoma 26S (Figura 6A).¹²

En condiciones de estrés oxidativo, las especies oxidantes y electrófilas modifican las cisteínas presentes en Keap1 induciendo un cambio conformacional que libera Nrf2, impidiendo finalmente su degradación. Nrf2 también puede liberarse por la inhibición directa de la unión de Keap1-Nrf2 a través de moléculas pequeñas. Posteriormente Nrf2 se transloca al núcleo donde forma heterodímeros con proteínas sMAF o JUN, induciendo genes que contengan las secuencias ARE (Figura 6B). Además, se produce un proceso de retroalimentación donde Nrf2 regula la transcripción de Keap1, Cullin-3 y Rbx-1 y estos a su vez la degradación de Nrf2. También induce la expresión de genes que codifican subunidades del proteosoma 20S y 19S.¹²

Nrf2 también está estrechamente regulado por otros mecanismos como es el caso de la activación mediada por el receptor nicotínico $\alpha 7$ de ACh (nAChR- $\alpha 7$). La activación de este receptor conduce a la activación de PI3K y posterior activación de Akt, quinasa capaz de fosforilar a GSK-3 β , inhibiendo su actividad. GSK-3 β actúa como regulador negativo de Nrf2, fosforilando su dominio NEH6, lo que genera un dominio de degradación reconocido por β -TrCP. Una vez unida este complejo une la E3 ubiquitina ligasa a través de cullin1. Así, se produce la ubiquitinación de Nrf2, dirigiéndolo a la degradación proteosómica.¹⁸ Por tanto, al inhibir GSK-3 β , se detiene una de las vías de degradación de Nrf2, que se acumula en el citosol y se transloca al núcleo para activar la expresión de genes de fase II. Nrf2 también puede activarse mediante la proteína ERK (extracelular signal-regulated kinase), que se activa mediante señalización desencadenada por la activación de nAChR- $\alpha 7$ (Figura 6C).¹²

En condiciones de inflamación crónica, muchas quinasas se activan o se sobre-expresan continuamente como GSK-3 β y la P38-MAPK (mitogen-activated protein kinase). Esta última estabiliza la interacción entre Keap1 y Nrf2 evitando así la translocación de Nrf2 al núcleo. En estas condiciones, GSK-3 β activa directamente a la enzima Fyn, que a su vez fosforila a Nrf2 y hace que se transloque fuera del núcleo, induciendo su degradación (Figura 6D) y deteniendo la expresión de genes antioxidantes y anti-inflamatorios.¹²

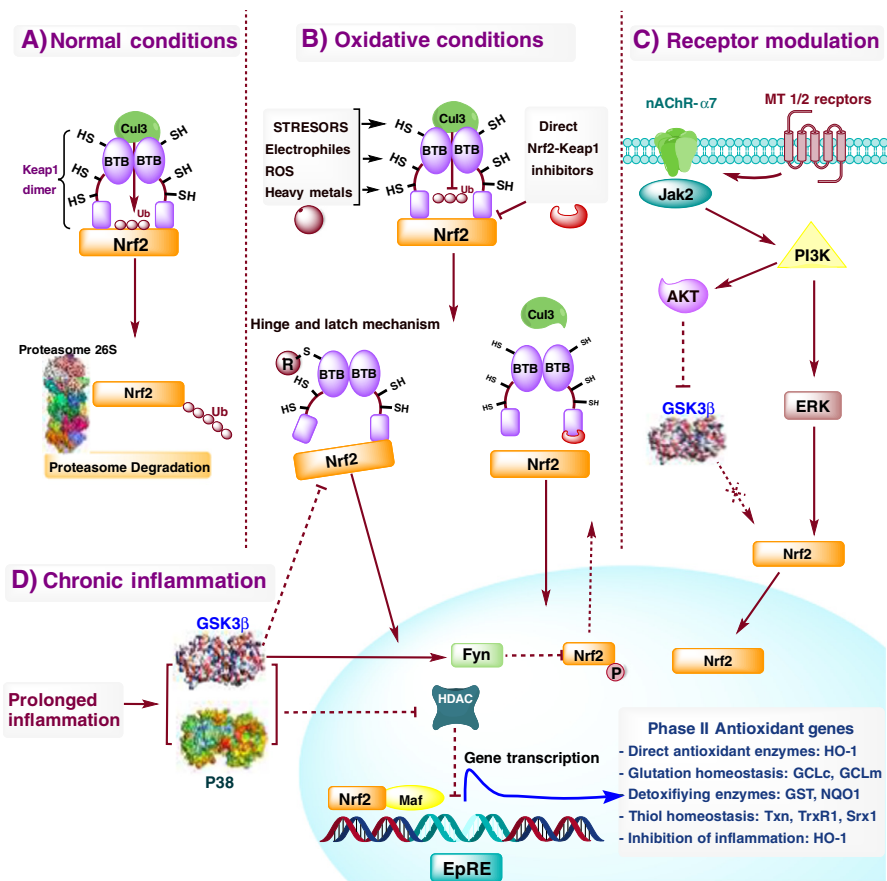


Figura 6. Regulación de la vía Nrf2-ARE. A) condiciones normales, b) estrés oxidativo, c) receptor nicotínico, d) inflamación crónica.¹³

Por tanto, la deficiencia en la actividad de Nrf2 puede agravar el daño oxidativo y la neuroinflamación, por lo que el desarrollo de activadores de la vía Nrf2-ARE como agentes preventivos y terapéuticos para la EA han recibido gran interés en los últimos años.¹⁸ No

obstante, la sobreexpresión descontrolada de Nrf2 se asocia con una variedad de tumores, y confiere una ventaja selectiva a las células cancerosas ya que presentan un exceso de mecanismos de defensa antioxidantes, retardo de la apoptosis y multiplicación de la proliferación y metabolismo celular. Por lo tanto, es necesario controlar de forma efectiva la potencia de los inductores de Nrf2 para evitar los potenciales efectos secundarios derivados de su sobreactivación.

2. OJETIVOS

La EA representa un problema sociosanitario, siendo una de las causas más habituales de discapacidad durante el envejecimiento. Debido al aumento de la esperanza de vida en los países más desarrollados, se prevé un aumento exponencial de la incidencia de esta enfermedad. Además, las limitaciones actuales de su tratamiento ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar una terapia modificadora que detenga el avance de esta terrible enfermedad. El objetivo de este trabajo consiste en el estudio y análisis de los principales inductores de la *vía* Nrf2 como estrategia terapéutica para el tratamiento de la EA, desarrollando ejemplos de cada tipo.

3. METODOLOGÍA

Para el presente trabajo se ha llevado a cabo una amplia revisión bibliográfica empleando buscadores científicos como: NCBI-Pubmed, Elsevier, Neurología y SciFinder-Chemical. Las palabras clave empleadas en la búsqueda han sido: “Nrf2”, “Alzheimer disease”, “Keap1”, “elemento de respuesta antioxidante (ARE)”. Además, se consultaron libros especializados de farmacología y se realizó una búsqueda de ensayos clínicos en la página web “clinicaltrials.gov”. El programa Chemdraw fue utilizado para representar estructurar químicas de los compuestos en estudio.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El factor de transcripción Nrf2 es crítico en el mantenimiento del estado redox, el metabolismo y la homeostasis proteica, así como la regulación de la inflamación. Por lo tanto, la activación de Nrf2 proporciona citoprotección contra numerosas patologías. Tanto Keap1 como GSK-3 β y β -TrCP son objetivos farmacológicos que proporcionan un medio para inducir Nrf2. Los inhibidores de GSK-3 β se han desarrollado hace un par de décadas principalmente en el contexto de EA, ya que GSK-3 β se ha identificado como una de las quinasas más importantes en la hiperfosforilación de tau. Por otro lado, la regulación del sistema Nrf2-Keap1 se ha convertido en una diana muy útil siendo el dimetilfumarato (DMF) **1**, el sulforafano (SFN) **2** y los triterpenoides sintéticos (Figura 7), los compuestos que presentaron los resultados más prometedores.¹⁶

4.1 Inductores de Nrf2

4.1.1 Compuestos modificadores de Keap1

La *vía* Nrf2–ARE puede ser inducida por productos químicos, especialmente compuestos que contienen grupos electrófilos en su estructura. Estos agentes pueden suprimir

la ubiquitinación de Nrf2 al reaccionar con los grupos tioles de las cisteínas reactivas de Keap1 para inducir, posteriormente, la expresión de enzimas antioxidantes y citoprotectoras.¹⁶

Ésteres de ácido fumárico.

El caso más exitoso hasta ahora es DMF 1, aprobado en 1994, para el tratamiento de psoriasis. Mas recientemente, fue aprobado en el año 2013 para el tratamiento de la esclerosis múltiple. DMF cruza la barrera gastrointestinal y se metaboliza a monometilfumarato (MMF), **3** (Figura 7), en poco tiempo, por lo que DMF se considera un profármaco que se escinde en MMF y fumarato a través de las esterasas del intestino delgado. Ambos ésteres de ácido fumárico modifican covalentemente Keap1 a través de la formación de aductos con C151 liberando Nrf2, y activando la expresión de genes de fase II.^{13,16}

Diferentes estudios *in vivo* han mostrado que DMF actúa como activador de Nrf2, activando la expresión de enzimas implicadas en la síntesis de glutatión como glutatión S-transferasa (GST) y la detoxificación de especies electrofilas como la NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1 (NQO1).¹⁵ Sin embargo, no todos los efectos de DMF están mediados por la inhibición de Keap1, ya que se ha encontrado que su valor de CD, la concentración necesaria para duplicar la actividad de NQO1, es superior a 10 μ M, lo que indica que existe activación de Nrf2 independiente de Keap1 y evidencias de que algunos efectos antiinflamatorios del DMF podrían ser debidos a ella.^{16,18}

En cuanto a la EA, Paraiso *et al.*¹⁹ comprobaron que DMF suprime la activación inflamatoria de la microglía a través de mecanismos dependientes e independientes de Nrf2 en modelos *in vivo* de la enfermedad. Durante el tratamiento se redujo la toxicidad neuronal, así como la supresión de las citoquinas inflamatorias, lo que deduce el efector supresor de DMF sobre la neuroinflamación. Además, el tratamiento con DMF alivió los déficits de memoria a largo plazo.

En cuanto a su uso clínico, DMF exhibió un perfil favorable de seguridad y tolerabilidad (109MS301, 109MS302 y 109MS303),^{9,10} aunque presenta algunos efectos adversos como dolor abdominal, sofocos y diarrea.¹⁴ Debido a esta conversión metabólica, se están desarrollando compuestos con liberación lenta y sostenida de DMF que mostrarían una biodisponibilidad mejorada y menores efectos secundarios.^{13,16} Ejemplos avanzados de estos nuevos análogos de DMF son:

- Fumarato de diroximel, profármaco de DMF con efectos gastrointestinales reducidos que se encuentra en ensayo clínico de fase III para EM (NCT03093324).¹³
- Fumarato de tepilamida, profármaco de DMF que presenta mayor solubilidad, permeabilidad y absorción tras la administración oral, mejor eficacia y menores efectos secundarios gastrointestinales en modelos preclínicos.¹³ Actualmente se encuentra en ensayo clínico de fase II para la psoriasis en placas (NCT02173301)
- Conjugado de DMF y ácido docohexanoico con potencial para una mejor especificidad, eficacia, seguridad y tolerabilidad en comparación con el efecto de las moléculas bioactivas por separado. Enzimas específicas liberan los dos componentes dentro de la célula, donde modulan simultáneamente múltiples dianas farmacológicas, incluidos Nrf2 y NF- κ B. En células y modelos animales son prometedores para el tratamiento de NDDs como la ataxia de Friedrich o la esclerosis lateral amiotrófica.¹³

Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos son la familia de productos naturales ampliamente estudiados como inductores de Nrf2.

La curcumina (**4**, Figura 7), un compuesto natural derivado de la *cúrcuma longa*, es uno de los inductores de Nrf2 polifenólicos más estudiados para el tratamiento de la EA. A nivel molecular, **4** contiene dos grupos carbonilo α,β -insaturados que le confieren un alto carácter electrofílico capaces de reaccionar con nucleófilos como los grupos tiol de las cisteínas presentes en Keap1 liberando así Nrf2. El compuesto **4** presenta un valor de CD de 2.7 μM .²⁰ El interés de **4** para el tratamiento de la EA radica en la interacción con Keap1 y en la desestabilización de las fibrillas del péptido βA , sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Los estudios epidemiológicos han demostrado que las poblaciones con alto consumo de este producto natural mostraron menor incidencia de EA y un mejor rendimiento mental.¹³ Sin embargo, los resultados de estos ensayos clínicos para la EA han sido limitados debido a la insolubilidad de este compuesto en agua y su escasa biodisponibilidad por vía oral, por lo que el desarrollo de nuevas estrategias de administración esta siendo investigada.¹¹ Actualmente existe un estudio observacional en China que está evaluando la eficacia adicional de la combinación del tratamiento clásico de EA (donepezilo, galantamina) con complementos alimenticios basados en **4** (NCT00164749).

El resveratrol (**5**, Figura 7) es un compuesto polifenólico natural identificado en más de 70 especies de plantas, que ha demostrado capacidad inductora de la *vía* Nrf2-ARE, con un valor de CD de 21 μM .²⁰ Du *et al.*²¹ demostraron en modelos preclínicos de EA inducidos por estreptozotocina, que la administración de **5** (30 mg/kg/día intraperitoneal durante 8 semanas) redujo los niveles de tau hiperfosforilada, y mejoró la capacidad de aprendizaje espacial. El compuesto **5** es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, aunque se metaboliza rápidamente, disminuyendo así su biodisponibilidad. Para mejorar la biodisponibilidad se han desarrollado varios derivados, como el pterosetilbeno, que presenta una mayor eficiencia para modular el estrés celular y la cognición.¹² Actualmente existe un estudio clínico como medida de prevención secundaria donde se trata de evaluar la utilización de **5** en personas con deterioro cognitivo leve que tienen riesgo significativo de sufrir EA (NCT02502253).

Galato de epigallocatequina (EGCG, **6**, Figura 7) ha demostrado efecto neuroprotector en estudios celulares y experimentales en animales,¹³ basado en la modulación de varias *vías* de transducción de señales, la influencia en la expresión de genes que regulan la supervivencia celular, así como la modulación de la función mitocondrial. Aunque su valor de CD es superior a 50 μM ,²⁰ presenta perfil antioxidante en diferentes modelos de EA e induce α -secretasa y la enzima convertidora de endotelina. Además, previene la agregación de βA para formar oligómeros tóxicos al unirse directamente al péptido desplegado. Estudios *in vivo* mostraron que el tratamiento con **6** a una dosis de 2-6 mg/día durante 4 semanas redujo los niveles de βA_{1-42} en el hipocampo, favoreciendo el aprendizaje y la memoria.²² Actualmente, dos ensayos clínicos están reclutando participantes para dilucidar si **6** puede retrasar el deterioro cognitivo tanto en pacientes en estadios tempranos de la EA como en personas con síndrome de Down (NCT01699711).

Finalmente, Ozarowski *et al.*²³ mostraron que la administración de extractos de *Rosmarinus officinalis* mejoró la memoria a largo plazo en ratas. Sus componentes principales, el carnosol (**7**) y su derivado el ácido carnósico (CA, **8**, Figura 7) son diterpenos fenólicos, pro-electrofílicos que se convierten en su forma activa en condiciones de elevado estrés oxidativo.¹² Estos compuestos son capaces de aumentar la translocación nuclear de Nrf2 y la sobreexpresión de las enzimas de fase II (cisteína-glutamato ligasa, CGL, y hemo-oxigenasa-

1, HO-1). El compuesto **8** muestra una mayor solubilidad, disminución de la toxicidad y un mejor efecto neuroprotector que **7**, capaz de activar Nrf2 en células ARE³² con un valor de EC₅₀ superior a 50 µM.²⁴ En relación con la EA, el compuesto **8** ha mostrado resultados interesantes en modelos *in vivo* de EA, reduciendo la muerte neuronal y mejorando el rendimiento en la prueba de aprendizaje.¹²

Sulforafano y sus derivados

Sulforafano (SFN, **2**, Figura 7) es un isotiocianato activador de Nrf2 debido a su potente carácter electrófilo. SFN es un compuesto natural aislado de vegetales crucíferos como el brócoli. Es un potente inductor de Nrf2 con un valor de CD de 0.2 µM.²⁰ Su mecanismo de acción se basa en la reacción covalente de su grupo isotiocianato con el grupo tiol del residuo C151 de Keap1, evitando su unión a Nrf2 y así su proteólisis. SFN es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y tiene efectos protectores en numerosos modelos preclínicos de afecciones neurológicas. El compuesto **2** ejerce protección contra la toxicidad inducida por Aβ mediante la activación de la respuesta antioxidante de fase II *in vitro*.^{25,26} Además, es capaz de mejorar el déficit cognitivo en dos modelos animales de EA, inducida por D-galactosa y aluminio, reduciendo el número de lesiones, los niveles de aluminio en cerebro y los déficits de memoria espacial y placas amiloides.^{27,28}

Sin embargo, SFN es inestable a temperatura ambiente por lo que se ha desarrollado una nueva formulación farmacéutica mediante su encapsulación en una ciclodextrina, el principio activo sulforadex® SFX-01, para crear una píldora o cápsula estable de forma sólida con biodisponibilidad mejorada. Actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico en China con 160 pacientes para evaluar tanto su efectividad en síntomas clínicos básicos como su seguridad (NCT0421339).

El compuesto ITH12674 (**9**) fue desarrollado recientemente como híbrido de SFN y melatonina (**10**, Figura 7) diseñado para ejercer un mecanismo de acción de tipo dual “fármaco-profármaco”. El compuesto ITH12674 fue capaz de incrementar 1.4 veces la inducción de Nrf2 respecto a las condiciones basales a una concentración de 1 µM. Además, mostró un perfil neuroprotector mejorado, en comparación con el de SFN y melatonina, en diferentes modelos *in vitro* de estrés oxidativo relacionados con isquemia cerebral. El compuesto **9** presenta un efecto protector en neuronas corticales sometidas a estrés oxidativo, disminuyendo la producción de ERO, y aumentando la viabilidad celular con valores de protección del 40 – 44 % de manera dependiente a la concentración (a 100 nM se observó una protección del 20 % y a 0,3 µM, un 41 % de protección). Además, respecto a las condiciones basales, obtuvieron niveles de GSH del 17 % y el 20 % para **10** y **2**, respectivamente, mientras que **9** aumentó estos valores al 22 y el 25 % a 0,3 y 1 µM, respectivamente.²⁶

Melatonina

Melatonina (**10**, Figura 7) es una hormona natural que regula los ciclos de sueño, además de ejercer un potente efecto antioxidante y neuroprotector. Los trastornos del sueño son característicos de los pacientes con EA y, además, la secreción de melatonina disminuye drásticamente en estos pacientes, por lo que se ha propuesto como tratamiento potencial para la EA. Melatonina es capaz de inducir Nrf2 con un valor de CD de 66.4 µM.^{30,31} El metabolismo de la melatonina podría contribuir a generar una línea de defensa contra los xenobióticos y el estrés oxidativo a través de componentes de desintoxicación de fase I y de la inducción de genes relacionados con la fase II.³² La terapia con melatonina a largo plazo proporciona beneficios

cognitivos en ratones, e implica la supresión de la agregación de A β , la expresión de enzimas antioxidantes y la reducción de las citoquinas pro-inflamatorias.^{32,33}

Actualmente se están realizando varios ensayos clínicos para evaluar una mejora en la función cognitiva en pacientes con deterioro cognitivo leve. En el ensayo clínico NCT00940589 se evaluaron los efectos del complemento de liberación prolongada (PRM) (2 mg) respecto a la terapia estándar sobre el funcionamiento cognitivo. Se observó que los paciente tratados con PRM tuvieron un rendimiento cognitivo mejor que los tratados con placebo según el IADL (Instrumental activity of daily living) (P = 0.004) donde se mide la capacidad de una persona para ser independiente en las actividades de la vida diaria, y MMSE (Mini-Mental de Folstein) (P = 0.044) que, a través de una escala de puntuación, evalúa el deterioro cognitivo. La evaluación con ADAS-cog (escala cognitiva para evaluar la EA) no difirió entre los grupos.

Triterpenoides

Los triterpenoides pentacíclicos desarrollados a partir del producto natural ácido ursólico, extraído de *Salvia officinalis*, y el ácido oleanólico, se han estudiado ampliamente como agentes protectores debido a sus propiedades inductoras de Nrf2. Wang *et al.*³⁴ demostraron *in vitro* que el ácido oleanólico mejora la pérdida de memoria inducida por A β donde los animales tratados con ácido oleanólico presentaron menor tiempo de latencia (P = 0.0001) al realizar el recorrido.

Dumont *et al.*³⁵ comprobaron que los triterpenoides sintéticos facilitan la respuesta antioxidante y reducen la inflamación en varios modelos. El ácido triterpenoide 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic-methylamida (CDDO-Me, **11**, Figura 7) se evaluó en ratones con alteraciones de la memoria y placas amiloides. El análisis de estructura-actividad demostró que los grupos carbonilo α,β -insaturados de la molécula son esenciales para sus propiedades inductoras de Nrf2 ya que reaccionan mediante adición de Michael con los grupos tiol presentes en residuos de cisteína de Keap1.¹² Presenta un valor de CD de 0,0033 μ M, por lo que es un potente inductor. El compuesto **11** mejoró significativamente la retención de memoria espacial y redujo la carga de placas amiloideas, los niveles de β A₁₋₄₂, la microgliosis y el estrés oxidativo.³⁶ A pesar de los buenos resultados *in vitro* todavía no existen estudios clínicos con triterpenoides en la EA.

Terbutilhidroquinona (tBHQ)

En modelos *in vivo* de EA se ha demostrado que una dieta rica en antioxidantes fenólicos como tBHQ (**12**, Figura 7) redujo drásticamente la cantidad de A β cerebral y aumentó la producción de GSH ayudando así la detoxificación contra el daño oxidativo. El compuesto **12** es un potente inductor de Nrf2 con un valor de CD de 0.6 μ M.³¹ Nouhi *et al.*³⁸ mostraron que la formación de placas A β en respuesta a H₂O₂/FeSO₄ y/o 4-hidroxi-2-nonenal puede inhibirse en presencia de **12** y producir un aumento de los niveles de glutatión necesarios para la detoxificación. Este estudio comprobó que **12** induce Nrf2 aumenta los niveles de glutatión de forma significativa. No obstante, actualmente no existen ensayos clínicos activos para la investigación de **12** en la EA ni otra patología.

Además, algunos estudios han demostrado que otros compuestos activadores de Nrf2, como el β -hidroxibutirato, orientina, antroquinonol, la metisticina y el azul de metileno (cloruro de metiltiononio) tienen efectos positivos en los modelos de EA, reduciendo los déficits

cognitivos, la inflamación y el estrés oxidativo o protegiendo contra la toxicidad mediada por $A\beta$ con un mecanismo de acción dependiente de la activación de Nrf2.¹¹

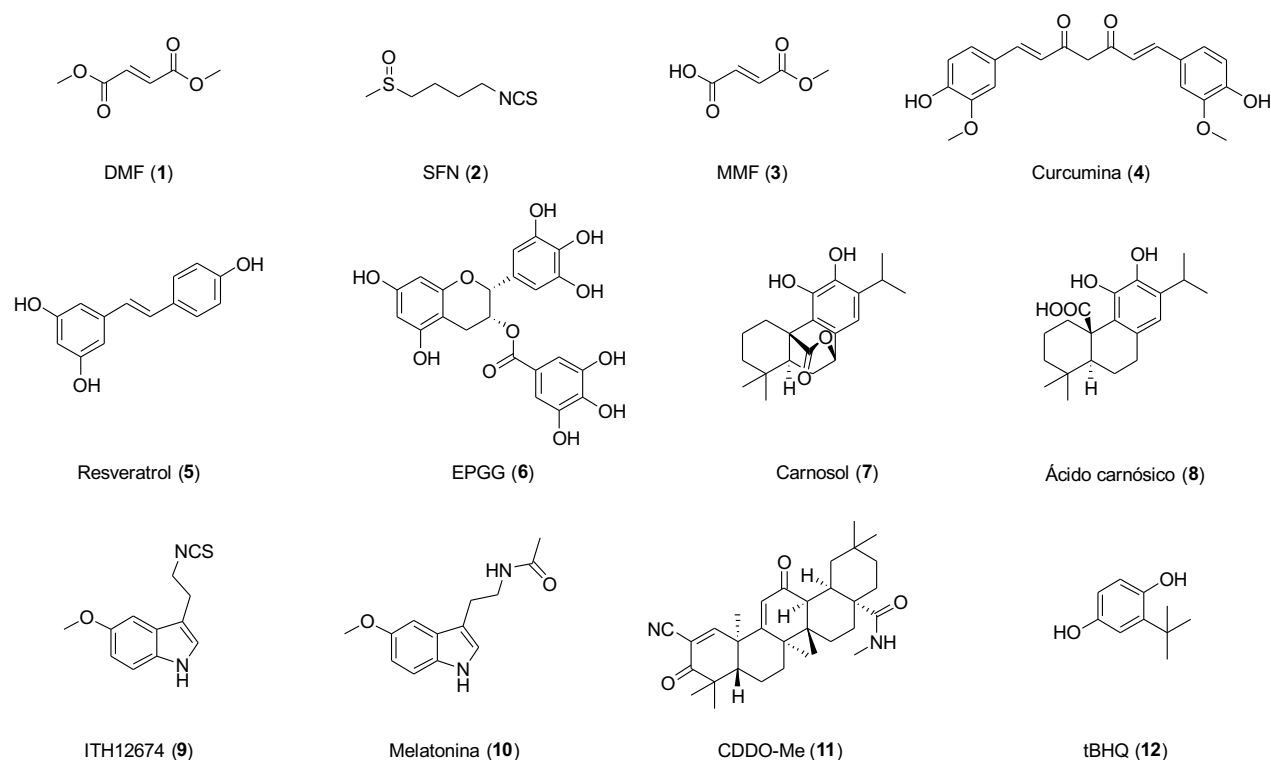


Figura 7. Compuestos inductores de Nrf2 – modificadores de Keap1

Recientemente, se han desarrollado compuestos no electrófilos que evitan la unión covalente a Keap1 como mecanismo de acción. Estos nuevos derivados interfieren la IPP entre Keap1 y Nrf2, o Keap1 y CuL3.¹³ Hasta el momento se han descrito varios tipos de inhibidores de la IPP: los compuestos de naftaleno bis-sulfonamida; ácido bis-carboxílico o compuestos de plomo que contienen sulfonamida. Además, existen híbridos de tetrahidroisoquinolina-bencimidazol como agentes multifuncionales con aplicación en la EA por su inhibición de la neuroinflamación y la disminución de $A\beta$ al inhibir β -secretasa. Para determinar la capacidad neuroprotectora de distintos híbridos se trataron células con glutamato en presencia o ausencia de los diferentes compuestos observando un aumento de la viabilidad de entre el 71.1 - 98,8 % respecto al tóxico *per se*.³⁹

Actualmente, el diseño y síntesis de inhibidores de IPP que posean propiedades farmacocinéticas y de metabolismo farmacológico adecuadas sigue siendo un desafío importante en aplicaciones del sistema nervioso, puesto que se requieren activadores Nrf2 con un fuerte perfil de seguridad para su administración crónica.

4.1.2 Inducción Keap1-independiente de Nrf2

Nrf2 exhibe múltiples formas de regulación, además de la ejercida por Keap1, a nivel post-transcripcional, epigenético, degradación del proteosoma de manera independiente de Keap1 y regulación a través de la unión a secuencias ARE. De manera indirecta, también se puede inducir la actividad del factor de transcripción Nrf2 a través diferentes enzimas como las

quinasas (p38 PKC, GSK-3 β o MAPK) y NF-kB, siendo GSK-3 β y la ruta implicada PI3K/Akt/GSK-3 β las más estudiadas.

La formación de ovillos neurofibrilares intracelulares, el estrés oxidativo y la neuroinflamación se han convertido en objetivos clave para el tratamiento de la EA. Estas alteraciones se encuentran estrechamente relacionadas con la actividad excesiva de GSK-3 β . Además, como se ha comentado anteriormente, GSK-3 β está involucrada en la regulación de Nrf2 a través de la fosforilación de los residuos Ser³³⁴⁻³³⁸ de Nrf2, lo que lleva a su degradación de una manera independiente de Keap1.⁴¹ En cerebros de pacientes con EA, se ha comprobado que se produce una sobreexpresión de GSK-3 β , que conduce a pérdida neuronal y déficit de memoria.^{41,42} La inhibición de GSK-3 β produjo un retraso en la acumulación de A β ,⁴³ por lo que se trata de una posible estrategia terapéutica para el tratamiento de la EA que ha sido ampliamente estudiada.

En este sentido, distintos inhibidores de GSK-3 β están siendo reevaluados para estudiar su efecto sobre la respuesta de fase II. El litio, un inhibidor de GSK-3 β , promueve la actividad de transcripción de Nrf2 en células de neuroblastoma N2A⁴⁴ y disminuye la acumulación de A β *in vivo*.⁴³ Además, también se demostró que el ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC, **13**, Figura 8), una molécula pequeña con propiedades antioxidantes que inhibe GSK-3 β , induce la activación de Nrf2-ARE y previene el deterioro cognitivo en ratones APP / PS1.⁴⁵ El compuesto **1** inhibió la actividad de GSK-3 β en el hipocampo de un modelo de tauopatía de ratón, modulando la fosforilación de tau, el deterioro neuronal y procesos inflamatorios involucrados en la astrogliosis, la microgliosis y la producción de citocinas proinflamatorias.⁴⁶

Además, la vía PI3K/Akt, que regula negativamente a GSK-3 β y favorece la actividad de Nrf2,⁴⁷ se encuentra reducida en los cerebros de pacientes con EA. El aumento de la activación de la vía PI3K/Akt por el compuesto Gypenoside XVII (GP-17, **14**, Figura 8), inhibió la actividad de GSK-3 β y aumentó la translocación de Nrf2 al núcleo con la consiguiente activación de las expresiones de genes diana en células PC12 tratadas con A β ₂₅₋₃₅.⁴⁸ Además, se obtuvieron resultados similares con sulfuretina en neuronas del hipocampo tratadas con A β ₂₅₋₃₅. Hesperidina y el ácido vanílico mostraron resultados similares tras la inyección intraretroventricular de A β ₁₋₄₂ en el cerebro del ratón.^{49,50}

Debido al carácter multifactorial de la EA se han desarrollado compuestos multidiana, que los que una sola estructura química es capaz de ejercer su acción sobre dos o más dianas terapéuticas. Actualmente se ha estudiado una nueva familia de compuestos químicos, 2,4-dihidropirano[2,3-*c*]pirazoles capaces de inhibir GSK3 β e inducir Nrf2 simultáneamente a nivel micromolar.⁵¹ La asociación de ambas actividades biológicas ha proporcionado un perfil neuroprotector frente al estrés oxidativo, una disminución de la fosforilación de tau y reducción de la neuroinflamación crónica, siendo el derivado *p*-bromo sustituido **15** el compuesto que presentó un mejor perfil farmacológico, con un valor de CD de 9.37 μ M. El porcentaje de protección significa el aumento de la supervivencia celular, mostrando una actividad neuroprotectora superior al 50 % en todos los compuestos respecto al control (melatonina o el inhibidor de GSK-3 β SB216763)

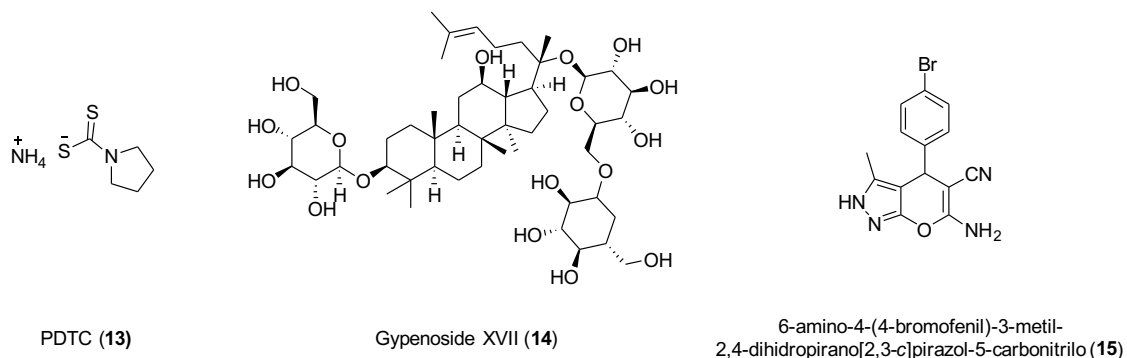


Figura 8. Compuestos inductores de Nrf2 – modificadores de Keap1

4.2 Desafíos y consideraciones. Selectividad de los fármacos

La identificación de cisteínas altamente reactivas en Keap1 es crucial para la comprensión del mecanismo por el cual los compuestos electrofílicos interactúan covalentemente con este adaptador de sustrato de ubiquitina ligasa. La información estructural sugiere que los fármacos que actúan sobre C151 pueden interrumpir la interacción con Cul3-Rbx1 dejando así el conjunto Keap1 saturado con Nrf2, permitiendo que Nrf2 recién sintetizado evite la degradación. Otros compuestos pueden modificar Keap1 para que no sea capaz de interactuar con Nrf2.

Una ventaja potencial importante de los inhibidores de IPP Keap1-Nrf2 es que presentan una mejor selectividad. Sin embargo, los efectos secundarios no se pueden desestimar por completo. Además, Keap1 también está involucrada en el procesamiento de proteínas distintas de Nrf2 para la ubiquitinación, y éstas también podrían verse afectadas.¹³

5. CONCLUSIONES

El daño oxidativo y la neuroinflamación da lugar al desarrollo de patologías severas como la EA. La inducción de enzimas detoxificantes a través de Nrf2 es una estrategia interesante como diana terapéutica y/o preventiva para el tratamiento de la misma. Se han desarrollado inductores de Nrf2 a través de diferentes mecanismos como la inhibición de su principal represor Keap1. Los compuestos más estudiados son **1**, **2** y sus derivados para una mejora de la biodisponibilidad. A pesar de los buenos resultados y aunque muchos de los compuestos ya presentan estudios clínicos, actualmente ninguno de estos compuestos se ha aprobado para la EA.

6. BIBIOGRAFÍA

- ¹ Organización Mundial de la Salud. *Demencia*, 19 septiembre 2019. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- ² National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). Alzheimer's disease Fact Sheet. 2006. <https://www.ninds.nih.gov>.
- ³ Selkoe, J. Amyloid protein and Alzheimer's disease. *Sci. Am.* **1991**, 265 (5), 68–79.
- ⁴ Flórez, J. *Farmacología Humana*, 2014, 6ª edición, capítulo 34, 568-577.
- ⁵ Garcés, M. Estudio sobre las enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y social, 2016.
- ⁶ Gobierno de España, Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e Igualdad. Estrategias en Enfermedades Neurodegenerativas del Sistema Nacional de Salud, 2016.
- ⁷ Folch, J.; Ettcheto, M.; Petrov, D.; Abad, S.; Pedrós, I.; *et al.* Una revisión de los avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer: estrategia frente a la proteína β -amiloide. *Neurología* **2018**, 33(1), 47-58.
- ⁸ Orta-Salazar, E.; Cuellar-Lemus, C.A.; Díaz-Cintra, S.; Feria-Velasco, A.I. Marcaje colinérgico en la corteza cerebral y el hipocampo en algunas especies animales y su relación con la enfermedad de Alzheimer. *Neurología* **2014**, 29(8), 497-503.
- ⁹ Simón, A.M.; Fechrilla, D.; del Río, J. Perspectivas sobre la hipótesis de la cascada del amiloide en la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Neurología* **2010**, 50 (11), 667.
- ¹⁰ Masters, C.L.; Bateman, R.; Blennow, K.; Rowe, C.C.; Sperling, R.A.; Cummings, J.L. Alzheimer's Disease. *Nat. Rev.* **2015**, 1, 15056.
- ¹¹ Fao, L.; Mota, S.I.; Rego, A.C. Shaping the Nrf2-ARE-related pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ageing Res. Rev.* **2019**, 54, 100942.
- ¹² Buendia, I.; Michalska, P.; Navarro, E.; Gameiro, I.; Egea, J.; León, R. Nrf2-ARE pathway: an emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Therapeut.* **2016**, 157, 84-104.
- ¹³ Cuadrado, A.; Rojo, A.I.; Wells, G.; Hayes, J.D.; Cousin, S.P.; Rumsey, W.L. *et al.* Therapeutic targeting of the Nrf2 and Keap1 partnership in chronic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, 18(4), 295-317.
- ¹⁴ Shaw, P.; Chattopadhyay, A. Nrf2-ARE signaling in cellular protection: mechanism of action and the regulatory mechanisms. *J. Cell. Physiol.* **2019**, 235(4).
- ¹⁵ Lu, M.C.; Ji, J.A.; Jiang, Z.Y.; You, Q.D. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update. *Med. Res. Rev.* **2016**, 36(5), 924-963.
- ¹⁶ Cuadrado, A. Nrf2 in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Toxicol.* **2016**, 1, 46-53.
- ¹⁷ Taguchi, K.; Yamamoto, M. The Keap1-Nrf2 system in cancer. *Front. Oncol.* **2017**, 7, 85.
- ¹⁸ Nakagami, Y. Nrf2 is an attractive therapeutic target for retinal diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 7469326.
- ¹⁹ Paraiso, H.C.; Kuo, P.C.; Curfman, E.T.; Moon, H.J.; Swazey, R.D.; Yen, J.H. *et al.* Dimethyl fumarate attenuates reactive microglia and long-term memory deficits following systemic immune challenge. *J. Neuroinflammation* **2018**, 15, 100. 469326.
- ²⁰ Houghton, C.A.; Fassett, R.G.; Coombes, J.S. Sulforaphane and other nutrigenomic Nrf2 activators: can the clinician's expectation be matched by the reality? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 7857186.
- ²¹ Du, L.L.; Xie, J.Z.; Cheng, X.S.; Li, X.H.; Kong, F.L.; Jiang, X. *et al.* Activation of sirtuin 1 attenuates cerebral ventricular streptozotocin-induced tau hyperphosphorylation and cognitive injuries in rat hippocampi. *Age (Dordr)* **2014**, 36(2), 613-623.

- ²² Dragicevic, N.; Smith, A.; Lin, X.Y.; Yuang, F.; Copes, N.; Delic, V. *et al.* Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and other flavonoids reduce Alzheimer's amyloid-induced mitochondrial dysfunction. *J. Alzheimers Dis* **2011**, *26*(3), 507-521. 469326.
- ²³ Ozarowski, M.; Mikolajczak, P.L.; Bogacz, A.; Gryszczynska, A.; Kujawaska, M. Jodynis, J. *et al.* Rosmarinus officinalis L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia* **2013**, *91*, 261-271.
- ²⁴ Wu, K.C.; McDonald, P.R.; Liu, J.; Klaassen, C.D. Screening of natural compounds as activators of the Keap1-Nrf2 pathway. *Planta Med.* **2014**, *80*(1), 97-104.
- ²⁵ Lee, C.; Park, G.H.; Lee, S.R.; Jang, J.H. Attenuation of β -amyloid-induced oxidative cell death by sulforaphane via activation of NF-E2-related factor 2. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 313510.
- ²⁶ Egea, J.; Buendia, I.; Parada, E.; Navarro, E.; Rada, P.; Cuadrado, A. *et al.* Melatonin-sulforaphane hybrid ITH12674 induces neuroprotection in oxidative stress conditions by a "drug-prodrug" mechanism of action. *Br J. Pharmacol.* **2015**, *172*(7), 1807-1821.
- ²⁷ Kim, H.V.; Kim, H.Y.; Ehrlich, H.Y.; Choi, S.Y.; Kim, D.J.; Kim, Y.S. Amelioration of Alzheimer's disease by neuroprotective effect of sulforaphane in animal model. *Amyloid.* **2013**, *20*(1), 7-12.
- ²⁸ Zhang, R.; Miao, Q.W.; Zhu, C.X. *et al.* Sulforaphane ameliorates neurobehavioral deficits and protects the brain from amyloid β deposits and peroxidation in mice with Alzheimer-like lesions. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.* **2015**, *30*(2), 183-191.
- ²⁹ Luchetti, F.; Canonico, B.; Betti, M.; Arcangeletti, M.; Pilolli, F.; Piroddi, M. *et al.* Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J.* **2010**, *24*(10), 3603-3624.
- ³⁰ Pachón-Angona, I.; Martin, H.; Chhor, S; Oset-Gasque, M.J.; Refouvelet, B. *et al.* Synthesis of new ferulic/lipoic/comeric acid-melatonin hybrids as antioxidants and Nrf2 activators via Ugi reaction. *Future Med. Chem.* **2019**, *11*(24), 3097-3108.
- ³¹ Buendia, I.; Navarro, E.; Michalska, P.; Gameiro, I.; Egea, J. *et al.* New melatonin-cinnamate hybrids as multi-target drugs for neurodegenerative diseases: Nrf2-induction, antioxidant effect and neuroprotection. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 15.
- ³² Olcese, J.M.; Cao, C.; Mori, T.; Mamcarz, M.B.; Maxwell, A. *et al.* Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J. Pineal Res.* **2009**, *47*(1), 82-96.
- ³³ Ali, T.; Badshah, H.; Kim, T.H.; Kim, M.O. Melatonin attenuates D-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF-KB/JNK signaling pathway in aging mouse model. *J. Pineal Res.* **2015**, *58*(1), 71-85.
- ³⁴ Wang, K.; Sun, W.; Zhang, L.; Guo, W.; Xu, J.; Liu, S. *et al.* Oleanolic acid ameliorates A β ₂₅-injection-induced memory deficit in Alzheimer's disease model rats by maintaining synaptic plasticity. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* **2018**, *17*(5), 389-399.
- ³⁵ Dumont, M.; Wille, E.; Calingasan, N.Y.; Tampellini, D.; Williams, C.; Gouras, G.K. *et al.* Triterpenoid CDDO-methylamide improves memory and decreases amyloid plaques in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2009**, *109*(2), 502-512.
- ³⁶ Tran, T.A.; McCoy, M.K.; Sporn, M.B.; Tansey, M.G. The synthetic triterpenoid CCDO-methyl ester modulates microglial activities, inhibits TNF production, and provides dopaminergic neuroprotection. *J. Neuroinflammation* **2008**, *5*, 14.
- ³⁷ Wang, Y.Y.; Yang, Y.X.; Zhe, H.; He, Z.H.; Zhou, S.F. Bardoxolone methyl (CDDO-Me) as a therapeutic agent: an update on its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Drug Des. Devel. Ther.* **2014**, *8*, 2075-2088.

- ³⁸ Nouhi, F.; Tusi, S.K.; Abdi, A.; Khodaghali, F. Dietary supplementation with tBHQ, a Nrf2 stabilizer molecule, confers neuroprotection against apoptosis in amyloid β -injected rat. *Neurochem. Res.* **2011**, *36*(5), 870-878.
- ³⁹ Fang, Y.; Zhou, H.; Gu, Q.; Xu, J. Synthesis and evaluation of tetrahydroisoquinoline-benzimidazole hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *167*, 133-145
- ⁴⁰ Rada, P.; Rojo, A.I.; Chowdhry, S.; McMahon, M.; Hayes, J.D.; Cuadrado, A. SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31*, 1121-1133.
- ⁴¹ Engel, T.; Hernández, F.; Avila, J.; Lucas, J.J. Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of Glycogen Synthase Kinase-3. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 5083-5093.
- ⁴² Hernández, F.; Borrell, J.; Guaza, C.; Avila, J.; Lucas, J.J. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 β in the brain but do not form tau filaments. *J. Neurochem.* **2002**, *83*(6), 1529-1533.
- ⁴³ Piel, C.J.; Wilson, C.A.; Lee, V.M.Y.; Klein, P.S. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. *Nature* **2003**, *423*, 435-439.
- ⁴⁴ Rojo, A.I.; Rada, P.; Egea, J.; Rosa, A.O.; López, M.G.; Cuadrado, A. Functional interference between glycogen synthase kinase-3 β and the transcription factor Nrf2 in protection against kainite-induced hippocampal cell death. *Mol. Cell. Neurosci.* **2008**, *39*(1), 125-132.
- ⁴⁵ Malm, T.M.; Iivonen, H.; Goldsteins, G.; Keksa-Goldsteine, V.; Ahtoniemi, T. *et al.* Pyrrolidine dithiocarbamate activates Akt and improves spatial learning in APP/PS1 mice without affection β -amyloid burden. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 3712-3721.
- ⁴⁶ Cuadrado, A.; Manda, G.; Hassan, A.; Alcaraz, M.J.; Barbas, C. *et al.* Transcription factor Nrf2 as a therapeutic target for chronic diseases: a systems medicine approach. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70*(2), 348-383.
- ⁴⁷ Kang, K.W.; Lee, S.J.; Park, J.W.; Kim, S.G. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*(5), 1001-1010.
- ⁴⁸ Meng, X.; Wang, M.; Sun, G.; Ye, J.; Xhou, Y. *et al.* Attenuation of A β ₂₅₋₃₅-induced parallel autophagic and apoptotic cell death by Gypenoside XVII through the estrogen receptor-dependent activation of Nrf2/ARE pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *279*(1), 63-75.
- ⁴⁹ Hong, Y.; An, Z. Hesperidin attenuates learning and memory deficits in APP/PS1 mice through activation of Akt/Nrf2 signaling and inhibition of RAGE/NF- κ B signaling. *Arch. Pharm. Res.* **2018**, *41*(6), 655-663.
- ⁵⁰ Amin, F.U.; Shah, S.A.; Kim, M.O. Vanillic acid attenuates A β ₁₋₄₂-induces oxidative stress and cognitive impairment in mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40753.
- ⁵¹ Gameiro, I.; Michalska, P.; Tenti, G.; Cores, A.; Buendia, I.; Rojo, A.I. *et al.* Discovery of the first dual GSK3 β inhibitor/Nrf2 inducer. A new multitarget therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45701.