



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
INDUCTORES DE NRF2 EN EL TRATAMIENTO  
DEL PARKINSON.**

Autor: María Lancho Gutiérrez

Fecha: Junio 2020.

Tutor: Rafael León Martínez

Cotutor/es: Pablo Duarte Flórez, Enrique Crisman Vigil.

## **ÍNDICE**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1 Epidemiología .....	3
1.2 Etiología.....	4
1.3 Fisiopatología.....	4
1.4 Tratamiento actual .....	6
1.5 NRF2.....	7
a) Estructura molecular .....	7
b) Regulación de NRF2 .....	8
c) Función y mecanismo de acción .....	9
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>12</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>12</b>
4.1 NRF2 y enfermedad de Parkinson .....	12
4.2 NRF2 como estrategia terapéutica para la enfermedad de Parkinson .....	13
a) Inductores covalentes .....	14
b) Inductores no covalentes .....	17
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>18</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>19</b>

## **RESUMEN**

La enfermedad del Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente en el mundo, lo que representa uno de los problemas más importantes en salud pública. Además de los signos patognomónicos clásicos de la enfermedad como son una muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas y los acúmulos de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, existen numerosos mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la enfermedad. Estos mecanismos han demostrado estar altamente interconectados y se han relacionado con procesos oxidativos y neuroinflamatorios que agravan la progresión de la enfermedad.

En la actualidad solo existen tratamientos sintomáticos que no son capaces de detener el avance de la EP, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas terapias efectivas. En este sentido, el factor de transcripción NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) es considerado el regulador maestro de la defensa antioxidante de la célula. NRF2 también está involucrado en el control de numerosos mecanismos patológicos de la enfermedad como son los procesos de proteostasis o neuroinflamación por lo que es considerado una nueva y prometedora línea terapéutica para el tratamiento de la EP. En este trabajo, se exponen los diferentes aspectos que hacen de NRF2 una diana de interés y se hace una revisión de las distintas moléculas que han sido descritas como inductoras de NRF2 cuya acción ha sido evaluada en modelos in vivo e in vitro de la EP.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Epidemiología**

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente y la más común a nivel motor, afectando a alrededor de 7 millones de personas en el mundo. Además, se espera que el número total de afectados se incremente hasta más de 12 millones en 2040.<sup>1</sup>

La incidencia actual se encuentra entre 5-35 casos nuevos por cada 100.000 individuos al año.<sup>2</sup> Si bien la prevalencia en la población general se estima de un 0,3 %, aumenta hasta el 3 % si se acota el rango de edad a mayores de 80 años.<sup>2</sup> Con respecto a la tasa de mortalidad asociada a la enfermedad, el riesgo de muerte es 1,5 veces mayor en pacientes, decreciendo la tasa de supervivencia, aproximadamente, un 5 % cada año.<sup>3</sup>

La EP se caracteriza por una serie de síntomas motores tales como bradicinesia, dificultad de movimiento y descoordinación motora, así como no motores como insomnio o depresión.<sup>4</sup> Un aspecto importante a tener en cuenta es el gran impacto económico que constituye la EP. En gastos directos, una persona en su primer año supone un gasto de entre 3.000€ a 5.500€ anuales mientras que los costes ascienden a valores entre 6.600€ a 8.000€ en el último año de vida. Además, se trata de una enfermedad muy incapacitante que requiere de ayuda externa. Por ello a estos números debe sumarse la pérdida productiva de las familias y la jubilación precoz del paciente (pérdidas superiores a 6.500€ y 16.000€ por persona y año, respectivamente.)<sup>5</sup>

## 1.2 Etiología

El origen de la EP es desconocido hasta el momento. La mayor parte de los casos, entre un 90-95 %, son idiopáticos o esporádicos, habiendo numerosos factores de riesgo asociados a los mismos tales como factores ambientales, consumo de sustancias (café, alcohol o tabaco) o exposición a toxinas (herbicidas como el Paraquat, pesticidas como la rotenona o metales pesados).<sup>6</sup> La interacción compleja entre dichos factores en un contexto de envejecimiento puede desembocar en daño oxidativo, neuroinflamación, y en última instancia, la muerte neuronal que se observa en la enfermedad.<sup>6</sup>

Por otra parte, entre el 5-10 % restante de casos se atribuye a un origen genético, observándose en estos casos que el inicio de la enfermedad suele ser más temprano.<sup>2</sup> En este sentido, se han descrito numerosos loci asociados a la enfermedad, conocidos en general como PARK, cuyas mutaciones se relacionan directamente con la EP. Entre ellos destaca *PARK8*, gen que codifica la proteína LRRK2 (*leucine rich repeat kinase 2*). La mutación Gly2019Ser en esta proteína se asocia con una disfunción del sistema autofágico lisosomal (LAS), que se relaciona con una mayor agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas, una de las principales características de la enfermedad.<sup>2</sup> Cabe destacar también el gen *PARK1*, también denominado como *PARK4* o *SNCA* que codifica la proteína  $\alpha$ -sinucleína. Mutaciones autosómicas dominantes descritas en esta proteína (Ala30Pro, Glu46Lys, His50Gln, Gly51Asp, Ala53Glu o Ala53Thr) dan como resultado EP familiar, presumiblemente como consecuencia de un plegamiento incorrecto y agregación de la proteína mutada.<sup>7</sup>

## 1.3 Fisiopatología

Los agregados proteicos de  $\alpha$ -sinucleína que forman, en última instancia, los cuerpos de Lewy provocan la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas, ocasionando en torno a un 90 % de disminución de los niveles dopamina<sup>8</sup> en la *vía nigroestriada*. La pérdida neuronal afecta, en un primer momento a la *substantia nigra pars compacta* aunque según avanza la enfermedad se extiende a distintas áreas cerebrales.<sup>7</sup> Esta gran pérdida dopaminérgica se observa en los primeros estadios de la enfermedad, lo que hace pensar que la neurodegeneración se inicia antes de la aparición evidente de los síntomas motores característicos de la EP.<sup>2</sup>

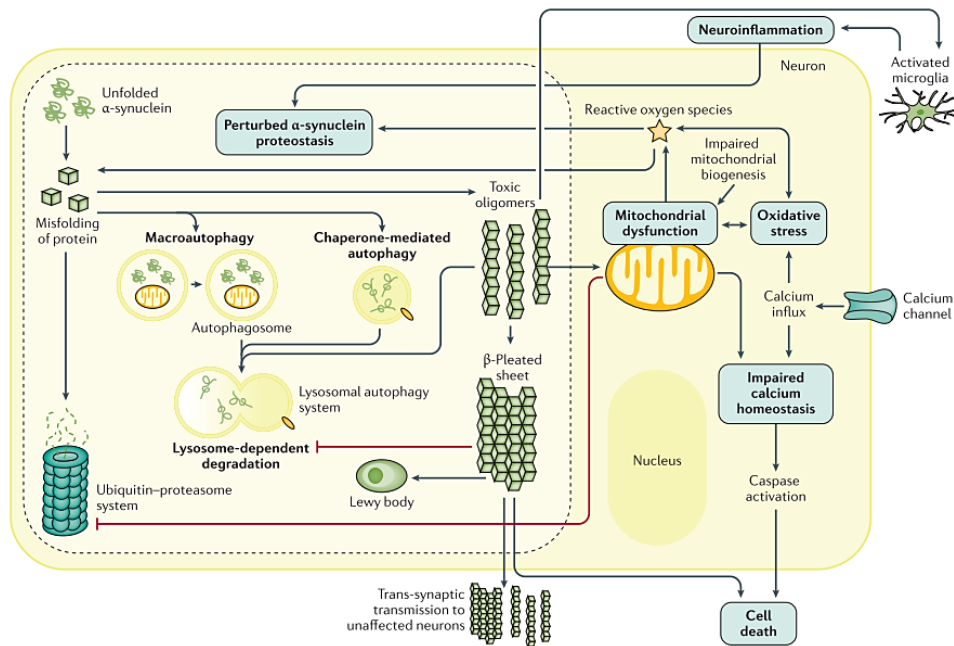
Como se ha descrito, los acúmulos proteicos de  $\alpha$ -sinucleína constituyen una de las principales características de la enfermedad. Inicialmente, se originan en el citoplasma de ciertas neuronas debido a la formación de oligómeros a partir de monómeros solubles de  $\alpha$ -sinucleína. Estos oligómeros se agregan progresivamente formando protofibrillas, que finalmente dan lugar a las fibrillas insolubles de  $\alpha$ -sinucleína, que se observan en los cuerpos de Lewy.<sup>2</sup> El declive de los sistemas de procesamiento proteico como el LAS y el sistema ubiquitina-proteasoma, encargados de mantener los niveles normales de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, se ha relacionado con la aparición de los acúmulos de la misma. Además, el envejecimiento y una retroalimentación negativa por parte de la propia  $\alpha$ -sinucleína parecen ser factores que contribuyen a la decadencia de estos sistemas, finalmente comprometiendo la supervivencia neuronal.<sup>2</sup>

Además, son numerosas las *vías* moleculares implicadas y alteradas que se relacionan con los mecanismos subyacentes a la neuropatología de la EP. Uno de los principales eventos en el desarrollo de la enfermedad es la disfunción mitocondrial. Se ha observado

una disminución del 30 % de la actividad del complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en pacientes con EP.<sup>9</sup> Esta inhibición tiene como consecuencia una disminución en la producción de ATP y un aumento significativo en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS).<sup>9</sup> Además, diversas proteínas codificadas por genes relacionados con la EP (tales como *PARK2* o *PARK8*) juegan un papel central en el mantenimiento de una correcta función mitocondrial, lo que indica que la disfunción mitocondrial es un evento clave en la aparición y desarrollo de la EP.<sup>2</sup>

Por otra parte, las neuronas son muy vulnerables al estrés oxidativo debido a su alta tasa de consumo de oxígeno.<sup>6</sup> Además, las membranas neuronales son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, que son particularmente sensibles al estrés oxidativo.<sup>6,10</sup> Concretamente, las neuronas dopaminérgicas son especialmente propensas al daño oxidativo debido a su alto contenido en dopamina y sus productos derivados. Esta puede ser metabolizada por la enzima monoamino oxidasa (MAO) o bien sufrir procesos de auto-oxidación. Ambas vías de degradación dan lugar a un incremento significativo de ROS. En particular, el proceso auto-oxidativo de la dopamina da lugar a especies tipo quinonas altamente reactivas que incrementan el daño oxidativo.<sup>6</sup>

Además, tanto el incremento de acúmulos proteicos como los elevados niveles de estrés oxidativo contribuyen a la activación glial que lleva a un estado de neuroinflamación crónica. El sistema nervioso central (SNC) dispone de su propio sistema inmune formado por la microglía y astrocitos principalmente. Ambos tipos celulares tienen un papel fundamental de defensa del SNC, sin embargo, una sobreactivación de la microglía origina la adquisición de un fenotipo tóxico. La sobreactivación glial, lleva a una liberación masiva de distintos mediadores proinflamatorios y neurotóxicos como son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) además de un aumento masivo de la producción de ROS.<sup>11,12</sup> Además, un estado alterado de los astrocitos se relaciona con una menor síntesis de glutatión (GSH), necesario para la supervivencia neuronal.<sup>13</sup> A su vez, la neuroinflamación conduce a una alteración de los mecanismos de proteostasis, lo cual desemboca en disfunción mitocondrial y aumento del estrés oxidativo, generándose un bucle patológico que acelera la progresión de la enfermedad.<sup>2</sup> En resumen, son muchos los mecanismos moleculares implicados en la EP y se desconocen las causas iniciales que desembocan en su aparición. La gran complejidad de la EP ha llevado a definirla como “enfermedad multifactorial”, con una gran variedad de rutas y procesos interconectados entre sí como puede observar en la **figura 1**.



**Figura 1.** Mecanismos moleculares involucrados en la enfermedad del Parkinson.<sup>2</sup>

#### 1.4 Tratamiento actual

Actualmente, los tratamientos empleados son meramente sintomáticos y se centran en intentar recuperar los niveles de dopamina que se encuentran disminuidos en la EP. Esto se consigue bien directamente introduciendo precursores de dopamina así como estimulando neuronas dopaminérgicas mediante el empleo de agonistas dopaminérgicos o bien indirectamente inhibiendo el metabolismo de dopamina.

- L-DOPA: se trata de un precursor de dopamina, empleado para aumentar los niveles de este neurotransmisor. Fue el primer tratamiento aprobado, que se desarrolló en los años 60, y sigue manteniéndose como el tratamiento base. Sin embargo, posee grandes inconvenientes como son las graves oscilaciones motoras y las discinesias generadas a largo plazo. Estos efectos secundarios aparecen por las variaciones en su concentración debido al metabolismo de la L-DOPA, las variaciones en su absorción gastrointestinal y en el transporte a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Para paliar dichos efectos adversos existen combinaciones de L-DOPA con carbidopa, inhibidor de la aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), enzima encargada de la formación de dopamina a partir de L-DOPA. La carbidopa no es capaz de atravesar la BHE, por lo que únicamente inhibe la AADC periférica, evitando la conversión de L-DOPA a dopamina (incapaz de atravesar la BHE) a dicho nivel y facilitando la concentración del fármaco en el cerebro.<sup>2</sup> También existen asociaciones de la L-DOPA con la entacapona, inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) enzima que lleva a cabo la degradación de L-DOPA,<sup>2</sup> o incluso combinaciones de los tres compuestos.
- IMAOB: se trata de inhibidores de la monoamino oxidasa B (MAO-B), enzima que cataliza la oxidación y degradación de monoaminas como la dopamina. Existen inhibidores tanto reversibles (safinamida) como irreversibles (selegilina o rasagilina).<sup>2</sup> Su empleo incrementa los niveles de dopamina en la hendidura sináptica y reduce el estrés

oxidativo asociado al metabolismo de dopamina por esta enzima. Además, la selegilina se ha relacionado con un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes como la NADPH quinona oxidoreductasa (NQO1, enzima implicada en la detoxificación de dopamina). Esto se debe a activa el factor de transcripción NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*).<sup>6</sup>

- Agonistas dopaminérgicos: entre ellos destaca la bromocriptina empleada principalmente para el tratamiento de los síntomas motores. Se trata de un derivado de ergolina que actúa a nivel de los receptores de dopamina (D2), aunque también sobre receptores de 5-hidroxitriptamina o serotonina (5HT), incluido 5HT2B, lo que se relaciona con fibrosis pleuropulmonar y de la válvula cardiaca lo que planteó un grave problema de seguridad.<sup>2</sup> Debido a estos efectos, comenzaron a usarse los agonistas no derivados de la ergolina, como es la rotigotina, los cuales poseen un tiempo de semivida mayor que la L-DOPA. Por ello se presentan como candidatos atractivos como terapia complementaria en pacientes con fluctuaciones motoras.<sup>2</sup>

Como se ha mencionado, es importante resaltar que todos ellos son tratamientos sintomáticos, incapaces de frenar el avance de la enfermedad, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas eficaces. Teniendo en cuenta la implicación de factores como el estrés oxidativo, la presencia de acúmulos proteicos aberrantes y la neuroinflamación crónica, el factor de transcripción NRF2, se postula como potencial diana para el desarrollo de un nuevo tratamiento que detenga la progresión de la enfermedad, dado su espectro multidiana y relación con todos estos procesos patológicos.

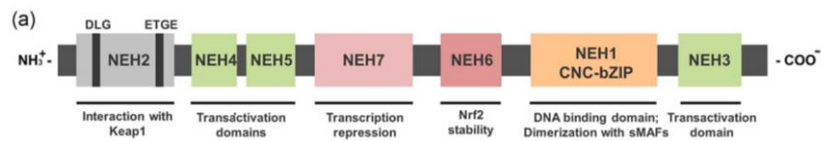
## 1.5 NRF2

### a) Estructura Molecular

NRF2 es un factor de transcripción perteneciente a una familia de proteínas caracterizadas por poseer la denominada “cremallera de leucinas” en la región C-terminal. Se encuentra dividida en 6 dominios altamente conservados (Neh1-Neh6) con funciones diferenciadas descritas en la **figura 2**.<sup>14</sup>

- Neh1: presenta la característica cremallera de leucinas indispensable para la dimerización con la proteína sMaf (*small muscle aponeurotic fibrosarcoma*), que permite su unión a promotores que contienen las secuencias ARE (*antioxidant response element*) y la consecuente inducción de los genes bajo su control.<sup>15</sup>
- Neh2: dominio altamente conservado, que permite la regulación negativa de la actividad transcripcional de NRF2 por parte de la proteína represora KEAP1, tal y como se detalla en las siguientes secciones.<sup>14</sup> Contiene dos secuencias DLG (baja afinidad) y ETGE (alta afinidad), responsables de la interacción KEAP1-NRF2.<sup>15</sup>
- Neh3: posee un papel fundamental en la activación por parte de NRF2 de los genes que presentan la secuencia ARE en su promotor.<sup>16</sup>
- Neh4 y Neh5: poseen dominios que se unen a KIX (*kinase-inducible interacting*) y CH3 (*cysteine/histidine-rich domain 3*) que inducen la transactivación de NRF2.<sup>14</sup>
- Neh6: participa como otro de los puntos de regulación negativa de NRF2, en este caso mediado por el sistema  $\beta$ -TrCP/glucógeno sintasa kinasa 3 (GSK-3), como se explica en el siguiente punto.<sup>16</sup>

- Neh7: dominio que interactúa con el receptor retinoide X alfa, el cual inhibe la señalización de la vía NRF2-ARE.<sup>14</sup>



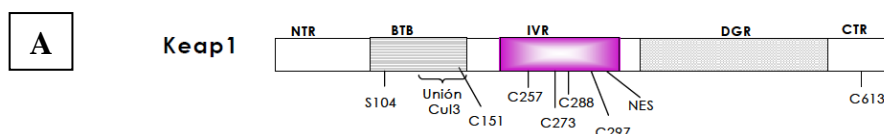
**Figura 2.** Representación de los dominios de Nrf2.<sup>16</sup>

### b) Regulación de NRF2

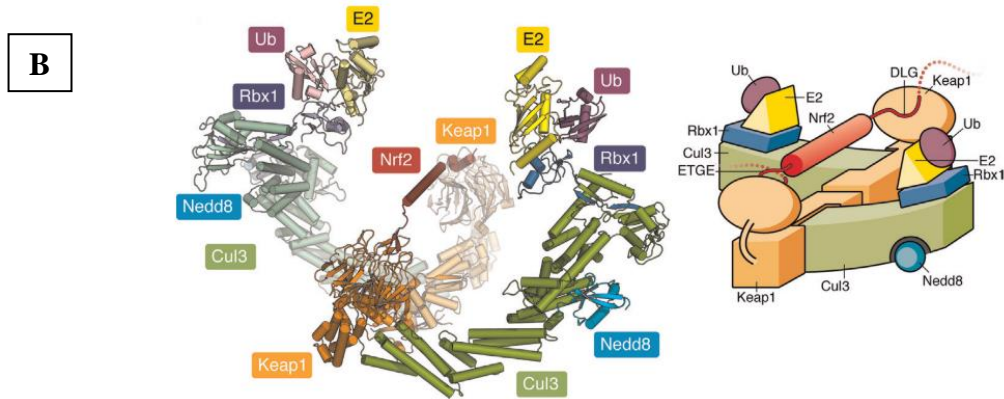
Debido al gran impacto de NRF2 en múltiples mecanismos fisiológicos y patológicos, posee un papel clave en la defensa del organismo. Su función está estrechamente controlada mediante dos adaptadores de la ligasa E3: KEAP1 y  $\beta$ -TrCP, si bien existen otros mecanismos de regulación.<sup>17</sup>

- KEAP1: es una proteína formada por 625 aminoácidos de los cuales 27 son residuos de cisteína.<sup>15</sup> Forma un homodímero capaz de unirse a la ligasa E3, para suprimir hasta en un 80 % la translocación de NRF2 al núcleo.<sup>18</sup> Está formada por 3 dominios (BTB, IVR y Kelch, ver **figura 3A**) cada uno con una función definida. El dominio Kelch es responsable de la unión con el dominio Neh2 de NRF2.<sup>15</sup> El dominio BTB se encarga de la dimerización de KEAP1 necesaria para la unión con NRF2, y presenta un sitio de unión a la ubiquitina ligasa Culina 3 (CUL3). La unión de NRF2 al dominio BTB, junto a RBX1 (*ring box protein-1*), forman un complejo para la poliubiquitinización de NRF2 que permite su posterior degradación por el proteasoma (ver **figura 3B**). Finalmente, el dominio IVR contiene gran cantidad de residuos de cisteínas que actúan como sensores en situaciones de estrés oxidativo.<sup>9</sup>

La interacción KEAP1-NRF2 ha sido descrita, entre otros, mediante el modelo de bisagra y pestillo. En condiciones basales, KEAP1, se une a las secuencias ETGE (alta afinidad) y DLG (baja afinidad) del dominio Neh2 de NRF2,<sup>19</sup> presentando NRF2 al complejo CUL3/RBX1, permitiendo su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma.<sup>15</sup> La regulación mediada por KEAP1 hace que la vida media de NRF2 sea de 15-40 minutos, variando en los diferentes tipos celulares.<sup>20</sup> Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, la modificación de los residuos de cisteína, principalmente Cys151 del dominio BTB o Cys273 y Cys288 del dominio IVR<sup>16</sup> dan lugar a un cambio conformacional que provoca la separación del motivo DLG de baja afinidad de KEAP1. La pérdida de esta interacción altera la disposición de NRF2 en el complejo multimérico hacia una conformación que no permite su ubiquitinación. De esta forma, la secuencia DLG podría actuar como un “pestillo” para permitir la degradación o no de NRF2 en función del estado redox de las células. El resultado es la translocación y acumulación de NRF2 en el núcleo,<sup>19</sup> donde forma un dímero con la proteína sMaf capaz de unirse a las regiones promotoras ARE regulando la expresión de numerosos genes antioxidantes y antiinflamatorios.<sup>15</sup>





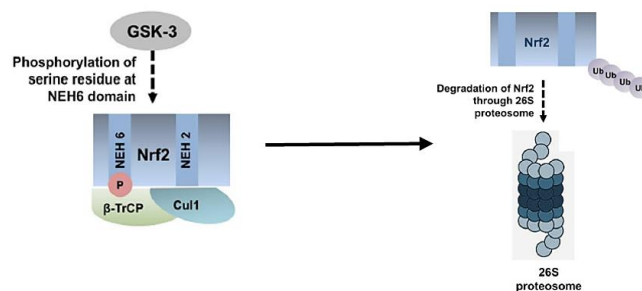


**Figura 3. A)** Representación esquemática de los dominios de KEAP1.<sup>18</sup> **B)** Modelo estructural del complejo multimérico KEAP1-NRF2.<sup>21</sup>

KEAP1 también es responsable de regular el cese de la actividad de NRF2 una vez que esta ha realizado su función. Para ello, KEAP1 es translocado al interior del núcleo donde disocia la unión de NRF2 de la región promotora ARE. Esto le permite formar un complejo con NRF2 que viaja hasta el citosol para promover su degradación, deteniendo así la activación de la *vía* NRF2-ARE.<sup>16</sup>

- B-TrCP: se trata también de un homodímero adaptador de la ligasa E3. En condiciones basales, la enzima GSK-3 es capaz de fosforilar los residuos Ser335 y Ser 338 del dominio Neh6 de NRF2, lo cual permite su reconocimiento por  $\beta$ -TrCP y se permite así la formación del complejo CUL1/RBX1 para su degradación por el proteasoma, como se representa en la **figura 4**.<sup>16</sup>

En situación de estrés oxidativo, se produce la inhibición de varias fosfatasa originando un aumento de los niveles intracelulares de inositol-3-fosfato (I3P) que activa la proteína PKB (*protein kinasa B*). Esta fosforila el dominio N-terminal de GSK-3 provocando su inactivación y permitiendo de esta manera que NRF2 se acumule y se transloque al núcleo donde activa la *vía* antioxidante de fase II.



**Figura 4. Mecanismo de regulación  $\beta$ -TrCP/GSK-3.**<sup>16</sup>

### c) Función y mecanismo de acción de NRF2

NRF2 regula la expresión de más de 250 genes que contienen en sus promotores la secuencia ARE. Estos genes codifican una gran variedad de enzimas involucradas en numerosos procesos bioquímicos como son la biotransformación de endobióticos y xenobióticos, metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas, entre otros. En el contexto de este trabajo, cabe destacar el papel que juega en el mantenimiento de la proteostasis así como en la regulación de procesos antioxidantes y antiinflamatorios.<sup>16, 20</sup> En la **figura 5** se

resume el mecanismo de actuación de NRF2, mostrando algunas de las actividades controladas por esta proteína y comentadas a continuación.

En relación con el control de los procesos antioxidantes, NRF2 se encarga de la expresión de los cuatro genes involucrados en la producción de NADPH, (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, enzima málica e isocitrato deshidrogenasa I), el cofactor crítico para gran parte de las reacciones redox en el organismo.<sup>20</sup> Además, regula la expresión de enzimas como la glutatión-S-transferasa (GST), glutamato-cisteína ligasa (GCL) o glutatión peroxidasa (GPX), necesarias para sintetizar el agente reductor más importante de nuestro organismo, el glutatión (GSH).<sup>22</sup> De igual forma, NRF2 regula la expresión de hemooxigenasa 1 (HMOX-1), enzima responsable del metabolismo del grupo hemo a monóxido de carbono (citoprotector y atenuante de la inflamación), ion ferroso y biliverdina, la cual es convertida en bilirrubina (un potente antioxidante fisiológico) por la acción de la enzima biliverdina reductasa (BVR) también regulada por NRF2. Destaca también el papel de NRF2 en la regulación de la enzima NQO1 encargada de reducir distintas quinonas a hidroquinonas.<sup>16</sup> Entre ellas se incluye la quinona derivada de dopamina, un importante promotor de daño oxidativo, de gran relevancia en el contexto de la EP.

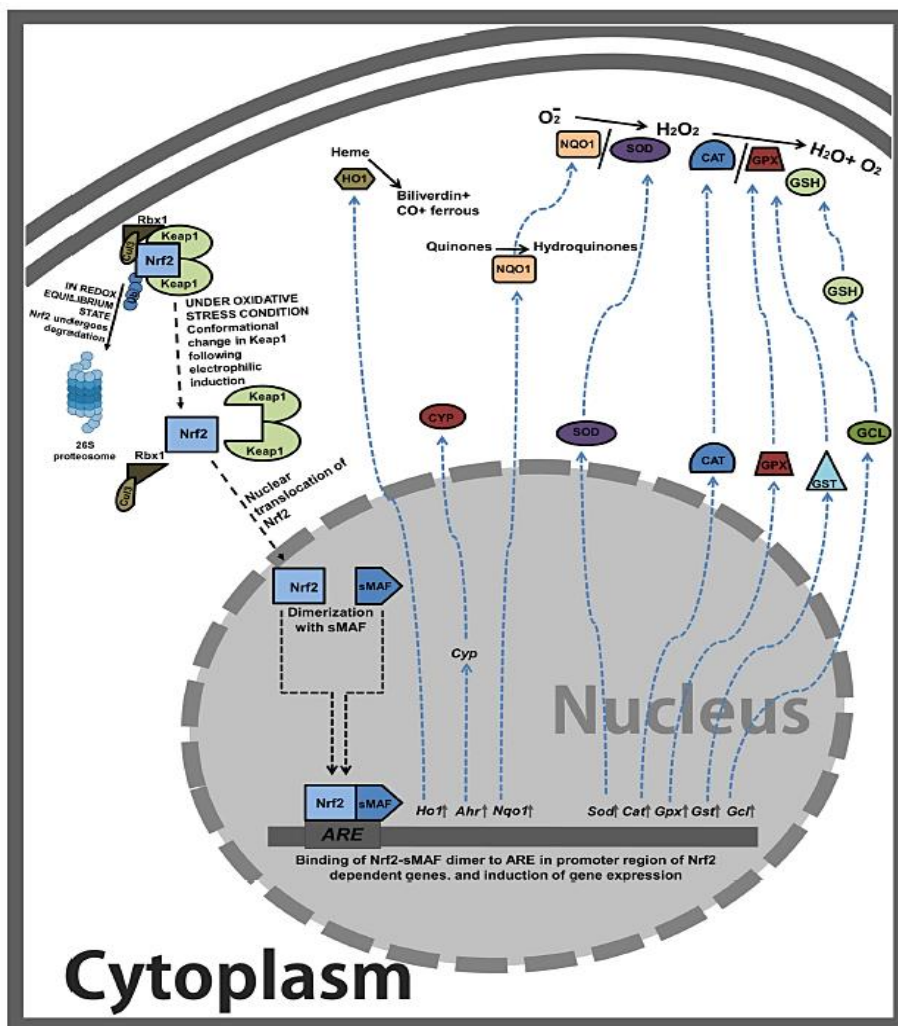
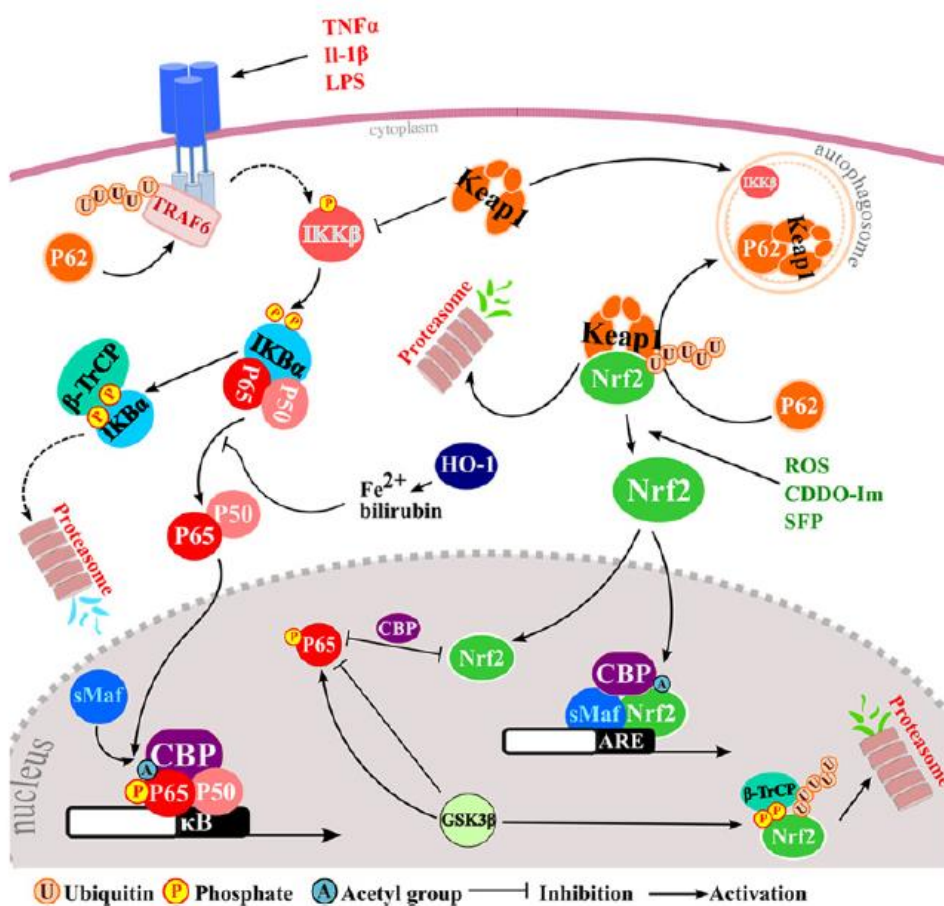


Figura 5. Diagrama de representación del mecanismo de acción de Nrf2.<sup>16</sup>

La actividad antiinflamatoria de NRF2 ha sido atribuida, al menos, a tres mecanismos independientes: i) la propia modulación del metabolismo redox; ii) la regulación directa de genes proinflamatorios; iii) y la comunicación cruzada con el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) el principal factor de transcripción de la respuesta inflamatoria.<sup>20</sup> En primer lugar, los altos niveles de estrés oxidativo que conducen al desequilibrio redox pueden contribuir al desarrollo de un estado inflamatorio que a su vez produce más estrés oxidativo, generando de esta manera un círculo patológico. Por ello, el control de la actividad antioxidante ejercido por NRF2 supone un importante regulador de dicho bucle, lo que previene de una inflamación exacerbada y su consecuente daño tisular.<sup>20</sup> En relación con la regulación directa de genes proinflamatorios, NRF2 se une a las regiones reguladoras de los genes que codifican para citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 $\beta$  evitando el reclutamiento de la RNA polimerasa II necesario para que se inicie la transcripción.<sup>20, 23</sup> Por otra parte, existen varios puntos de conexión y modulación entre la *vía* NF- $\kappa$ B y NRF2 como respuesta al estrés oxidativo y la inflamación, resumidos en la **figura 6**. Estos tienen lugar a través de complejas interacciones moleculares dependientes del tipo de célula y tejido. A modo de ejemplo el aumento de los niveles de HMOX1 en las células endoteliales permite la inhibición de la actividad transcripcional mediada por NF- $\kappa$ B. Concretamente, esta inhibición es mediada por la bilirrubina, potente antagonista de la activación de NF- $\kappa$ B y su consecuente acción proinflamatoria.<sup>24</sup>



**Figura 6.** Comunicación cruzada y esquema de los diferentes puntos de interconexión entre vías NRF2 y NF- $\kappa$ B<sup>25</sup>

En relación con el control del procesamiento proteico, de gran relevancia en enfermedades neurodegenerativas tales como la EP, NRF2 es un factor clave en la regulación de la expresión del gen *SQSTM1*, que codifica la proteína p62. Esta proteína juega un papel fundamental en la autofagia, la principal ruta de degradación de proteínas aberrantes. p62 facilita la inclusión de agregados ubiquitinizados de proteínas u orgánulos dañados por un desequilibrio redox al interior de autofagosomas o al sistema ubiquitín-proteasoma para su posterior degradación.<sup>26,27</sup> Además, la proteína p62 fosforilada compite con el motivo DLG de baja afinidad de NRF2 por la unión a KEAP1, conduciendo a esta última al autofagosoma, y por tanto induciendo la activación de la ruta NRF2. De esta manera, se origina una retroalimentación positiva entre p62 y NRF2.<sup>17,20</sup>

## 2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- Realizar una breve revisión y actualización de la EP y estado de sus tratamientos actuales.
- Plantear y justificar una posible nueva línea de tratamiento basada en el uso de inductores de NRF2.

## 3. METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de los artículos relacionados con el tema. Para ello, ha sido necesaria la búsqueda de información en portales digitales como PubMed, Google Scholar, Science Direct y MedLine empleando palabras clave como “Parkinson”, “NRF2”, “Inductor”, “estrés oxidativo”, etc.

A su vez, también se ha recurrido a la consulta en las agencias nacionales como la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) así como su herramienta de búsqueda centro de información de medicamentos (CIMA).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 NRF2 y enfermedad de Parkinson

Existe una correlación directa entre una disminución de la actividad de NRF2 y su respuesta transcripcional con la edad lo que indirectamente lo vincula con la EP.<sup>6,28</sup> Además, existen otros numerosos puntos de conexión que justifican el estudio de inductores de NRF2 como terapia para la EP. Por una parte, se ha demostrado que en los primeros estadios de la enfermedad, NRF2 se localiza preferentemente en el núcleo de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* en un intento de reducir el estrés oxidativo y neuroinflamación.<sup>6,28</sup> Además, como se comenta anteriormente el cerebro es uno de los órganos más susceptibles al daño oxidativo debido al gran contenido en lípidos, la elevada tasa de consumo de oxígeno y las numerosas reacciones redox metal-dependientes ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ) que se producen en el mismo, donde, concretamente, las neuronas dopaminérgicas son especialmente vulnerables.<sup>6,15,28</sup> Por ello, la activación de la *vía* antioxidante y antiinflamatoria mediada por NRF2 supone un sistema de protección muy relevante en el contexto de enfermedades neurodegenerativas y más concretamente de la EP.

Distintos estudios han evidenciado los mecanismos neuroprotectores responsables de eliminar los productos oxidantes del metabolismo de la dopamina. En este sentido, se ha

comprobado que los niveles de NQO1 se encuentran muy elevados en la astrogía de pacientes de EP y en las neuronas de la *substantia nigra pars compacta* en comparación con individuos sanos.<sup>28</sup> Otra proteína antioxidante controlada por NRF2, HMOX-1, también se encuentra elevada en sangre de pacientes, aunque no se han observado estos niveles aumentados en la *substantia nigra pars compacta*. Además, HMOX1 mantiene un patrón distinto de tinción alrededor de los cuerpos de Lewy evidenciando una potencial respuesta antioxidante frente a estos acúmulos.<sup>28</sup> A su vez, se ha visto que la proteína deglicasa 1 (DJ-1, codificada por el gen *PARK7*, cuyas mutaciones derivan en EP genética) protege frente al desarrollo de la enfermedad ya que estabiliza NRF2 y evita su ubiquitinación mediada por KEAP1.<sup>28</sup> Estas observaciones reflejan la relación entre la *vía* NRF2 y la EP, y parecen indicar una inducción de NRF2 dependiente de la enfermedad en un intento de reducir el estatus pro-oxidativo que se produce en esta.<sup>6</sup>

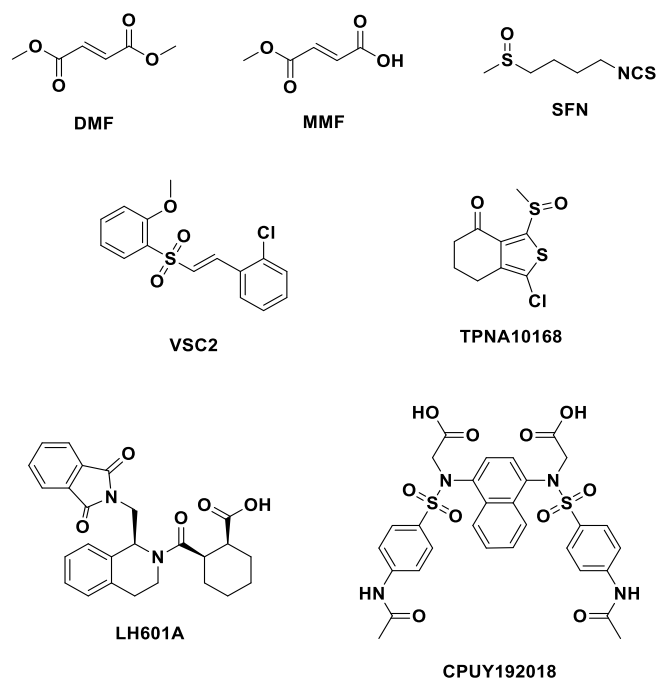
Por otra parte, estudios recientes sugieren que una variabilidad genética en los genes que codifican NRF2 puede estar relacionada con una mayor susceptibilidad para desarrollar la EP, afectando a su edad de aparición.<sup>6</sup> En este sentido, también se ha observado que la inducción NRF2 protege frente a la toxicidad derivada de mutaciones en los genes *SNCA* y *LRRK2*.<sup>20</sup>

Microglía y astrocitos juegan un papel fundamental en la regulación del daño oxidativo de las neuronas y también en los mecanismos de neuroprotección mediados por NRF2.<sup>20, 28</sup> Empleando ratones transgénicos con un gen reportador de fosfatasa alcalina bajo el control de las secuencias ARE se ha evidenciado que los astrocitos son muy sensibles a la activación de NRF2, poniendo de manifiesto la relevancia de NRF2 en el efecto positivo de los mismos al proporcionar precursores metabólicos y GSH a neuronas dañadas.<sup>20</sup> En un modelo de ratón de la EP basado en la intoxicación con la neurotoxina 1-metil-6-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) se ha observado que NRF2 regula la activación de la microglía reduciendo la producción de diversos marcadores pro-inflamatorios (IL-6, TNF o COX2: ciclooxigenasa 2) y aumentando los niveles de distintos marcadores antiinflamatorios.<sup>20</sup>

Por tanto, NRF2 se postula como una prometedora diana para el desarrollo de nuevas terapias.

#### **4.2 NRF2 como estrategia terapéutica para la enfermedad del Parkinson.**

Existen numerosas líneas de investigación basadas en la activación de la *vía* NRF2. Por un lado, los inductores covalentes, compuestos capaces de reaccionar con algunos residuos de cisteína presentes en KEAP1 son una de las estrategias más estudiadas. Por otra parte, los inductores no covalentes han ganado un notable interés dando lugar a los inhibidores de la interacción proteína-proteína KEAP1-NRF2. En la **figura 7** se recogen algunos de los principales inductores de NRF2 que serán comentados en esta revisión.



**Figura 7.** Principales inductores de NRF2.

#### a) Inductores covalentes

Los inductores covalentes son compuestos electrófilos, que producen la activación de la vía NRF2.<sup>14</sup> Ejercen su acción de manera indirecta, reaccionando covalentemente con los grupos tiol de las cisteínas Cys151, Cys226, Cys273, Cys288 o Cys613, entre otras, presentes en KEAP1.<sup>14, 15</sup>

##### Ésteres del ácido fumárico:

El principal representante de este grupo es el dimetilfumarato (DMF) (ver **Figura 7**), comercializado como Tecdifera y Fumaderm, cuyo uso está aprobado para el tratamiento de la esclerosis múltiple y la psoriasis, respectivamente.<sup>20</sup> Se trata de un dimetil éster  $\alpha,\beta$  insaturado, que es rápidamente metabolizado y transformado en monometilfumarato (MMF) (ver **Figura 7**). Este metabolito capaz de atravesar la BHE y reaccionar covalentemente con la Cys151 de KEAP1 disminuyendo la degradación de NRF2 KEAP1-dependiente.<sup>4,14</sup> De esta forma se produce la acumulación nuclear de NRF2 con la consecuente expresión de genes que codifican las distintas enzimas antioxidantes y antiinflamatorias.<sup>20</sup>

La eficacia de los ésteres de ácido fumárico, y más concretamente del DMF, para el tratamiento de la EP ha sido evaluada en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Estos modelos se describen a continuación para facilitar la comprensión de los siguientes apartados, en los que se evalúa el papel protector de los inductores de NRF2 en cada uno de ellos. Algunos de los más importantes se basan en el empleo de neurotoxinas como 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y MPTP.<sup>4, 29</sup> Tanto 6-OHDA como el metabolito generado a partir de MPTP por la acción de la enzima MAO-B (MPP+: *1-methyl-4-phenylpyridinium*) son capaces de dañar de manera selectiva las neuronas dopaminérgicas, ya que son introducidos en la célula mediante el transportador de dopamina. A nivel intracelular, inhiben el complejo I de la cadena mitocondrial (6-OHDA también es capaz de inhibir el complejo V) dando lugar a

elevados niveles de estrés oxidativo por la producción exacerbada de ROS como el peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilos y superóxido. En conjunto, el empleo de estos tóxicos es capaz de recrear los daños fisiopatológicos presentes en la EP y constituyen herramientas útiles para el estudio de compuestos con potencial terapéutico para la enfermedad.<sup>4,30</sup> Otra alternativa puede ser la evocación de la  $\alpha$ -sinucleinopatía mediante el uso de un vector vírico (rAAV-6LAFA-SYN) capaz de introducir de manera exógena  $\alpha$ -sinucleína para su sobreexpresión en determinadas zonas del cerebro. Estos modelos son capaces de reproducir los agregados de  $\alpha$ -sinucleína, la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgica y fenómenos de astrogliosis y microgliosis observados en la EP.<sup>31</sup>

Cada uno de los estudios descritos a continuación sigue distintas pautas posológicas, pero refleja resultados similares en cuanto a la activación de NRF2 y expresión de las distintas enzimas antioxidantes, así como en la modulación de la actividad microglial y astrocítica. Tras la administración de DMF, en un modelo de MPTP en ratones, aumentaron los niveles de NRF2 en el cerebro entre el 90-134 % de manera dosis dependiente.<sup>4</sup> De igual forma, también se observó un aumento de las enzimas antioxidantes reguladas por NRF2 como HMOX-1, NQO1 o SOD (superóxido dismutasa).<sup>4</sup> A su vez, el tratamiento con DMF aumentó el ratio GSH/GSSG (glutatión reducido/oxidado) evidenciando un aumento de la proporción de glutatión reducido.<sup>4</sup> Estos resultados reflejan una potenciación de la respuesta antioxidante ejercida por DMF gracias al efecto inductor de NRF2. Además, el tratamiento con DMF, también, demostró eficacia en el control de la microglía y astrocitos siendo capaz de reducir la gliosis observada en el grupo MPTP sin tratamiento, entorno al 80%, *vía* NRF2.<sup>4</sup> En esta línea, se observó una disminución de los niveles de NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$  y COX2 de manera dosis dependiente, manteniendo la actividad de I $\kappa$ B- $\alpha$  (inhibidor de NF-Kb) y evitando su degradación, lo que evidencia la capacidad antiinflamatoria de DMF.<sup>4</sup>

Además, en un modelo murino de  $\alpha$ -sinucleinopatía el tratamiento con DMF dio lugar a una elevación de los niveles de NRF2 en la corteza cerebral y cuerpo estriado, aumentando de manera dosis dependiente la expresión de los genes, NQO1 y HMOX1, entorno al doble, en dichas áreas.<sup>31</sup> El cuerpo estriado es la principal estructura de los ganglios basales y una de las primeras afectadas por la enfermedad. Las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* proyectan sus axones para hacer sinapsis en el cuerpo estriado siendo parte importante de la *vía* nigroestriada de la dopamina.<sup>2</sup> Este aumento en los niveles de NRF2 y genes relacionados se tradujo en una disminución de la microgliosis y astrocitosis, además de una potente neuroprotección evidenciada por la reducción en la muerte de neuronas dopaminérgicas. El tratamiento con DMF previno el desarrollo de disfunciones motoras como el aumento de la tensión contralateral del cuerpo en los ratones. Mediante el empleo de ratones *knockout* para NRF2, se demostró que los efectos neuroprotectores eran mediados por NRF2.<sup>31</sup>

Pese a los resultados prometedores, el DMF, presenta algunos problemas por sus efectos adversos, presumiblemente debido a su naturaleza electrofílica. Entre ellos se encuentran el dolor abdominal, diarrea o náuseas<sup>20</sup> si bien su principal efecto adverso es la leucopenia, una disminución acusada de los niveles de leucocitos al inicio de su tratamiento.<sup>14</sup> También se han descrito otros efectos adversos a dosis elevadas (> 30 mg/kg) como son ataxia, disnea, cianosis o dolores abdominales en pacientes con esclerosis múltiple.<sup>4</sup>

Actualmente, varios derivados de MMF están siendo objeto de estudio con el fin de mejorar su biodisponibilidad y reducir efectos adversos. A modo de ejemplo, el diroximel

fumarato, un profármaco de MMF con menor número de efectos adversos gastrointestinales, y que ha mostrado una mayor eficacia que el DMF se encuentra en fase III para el tratamiento de la esclerosis múltiple.<sup>14, 20</sup>

#### Sulforafano (SFN):

El SFN (ver **Figura 7**) es un compuesto de origen natural perteneciente al grupo de los isotiocionatos presente en el brócoli y en verduras de la familia de las crucíferas<sup>32</sup> Debido a la presencia de un grupo isotiocianato con notable carácter electrófilo, este compuesto es capaz de inducir NRF2 al reaccionar con los residuos de cisteínas de KEAP1. Además el SFN es capaz de atravesar la BHE<sup>14</sup> lo que le convierte en un candidato interesante para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EP. De hecho, numerosos modelos preclínicos han demostrado la eficacia de este compuesto para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

En células PC12 (células procedentes de feocromocitoma de rata que muestran características de células neurosecretoras y neuronas dopaminérgicas) sometidas al estímulo tóxico MPTP se observó como el pretratamiento con SFN fue capaz de revertir la citotoxicidad e incrementar los niveles de enzimas antioxidantes (HMOX-1 y NQO1).<sup>33</sup> Además, SFN ha mostrado capacidad neuroprotectora en modelos *in vivo* en ratones, frente a la toxicidad inducida por la administración oral crónica de rotenona. Rotenona es insecticida capaz de inhibir el complejo I la cadena de transporte de electrones produciendo gran cantidad de ROS disminuyendo los niveles de GSH. El tratamiento con rotenona es capaz de reproducir gran parte de las características propias de la EP, como una degeneración selectiva y progresiva de neuronas dopaminérgicas en la *vía* nigroestriada, daño oxidativo, alteraciones del comportamiento y la formación de acúmulos de  $\alpha$ -sinucleína. La co-administración de SFN previno los efectos prooxidativos mediante la activación de la *vía* NRF2 revirtiendo a su vez los déficits motores observados en los ratones y la neurodegeneración dopaminérgica. En este sentido, se observó que la exposición al tóxico durante 60 días daba lugar a una reducción en los niveles de NRF2 y proteínas dependientes tales como HMOX-1 y NQO1 en la corteza cerebral y el cuerpo estriado de los animales, lo cual era revertido mediante la co-administración con SFN.<sup>34</sup>

Sin embargo, teniendo en cuenta la inestabilidad a temperatura ambiente del SFN y la necesidad de un control exacto de la dosis, se están desarrollando nuevas alternativas. Entre ellas cabe destacar el complemento alimenticio encapsulado Avmacol obtenido a partir de brotes y semillas de brócoli. Posee glucorafanina, precursor del sulforafano, y enzima mirosinasa activa que ayuda a inducir la producción de SFN en el cuerpo con el objetivo de promover una mayor biodisponibilidad.<sup>35</sup> Este suplemento se encuentra en distintos ensayos clínicos frente a distintas enfermedades neurológicas como el autismo o la esquizofrenia.<sup>20</sup>

#### Derivados de Vinil sulfonas:

Se trata de un grupo terapéutico de compuestos basados en chalconas con una conversión cetona-sulfona.<sup>36</sup> Uno de los compuestos más estudiados de este grupo y que mejores resultados ha obtenido es un derivado de vinil sulfona clorado y o-metilado (nombrado como VSC2, ver **Figura 7**).

En células CATH.a una línea celular neuronal catecolaminérgica de ratón se observó un aumento de los niveles de NRF2 tras la administración de VSC2, así como de los niveles de las enzimas antioxidantes HMOX-1, NQO1 y GCL.<sup>36</sup> A su vez, el compuesto fue capaz de



proteger y revertir la toxicidad observada en neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* y en los terminales de las mismas que proyectan al cuerpo estriado en un modelo *in vivo* de MPTP. Además, el tratamiento mejoró el movimiento en los ensayos motores llevados a cabo en ratones tratados con el compuesto respecto a los tratados únicamente con el MPTP. En conjunto, VSC2 fue capaz de prevenir eficazmente los déficits motores asociados con la EP en este modelo.<sup>36</sup>

En otro estudio en ratones tratados también con MPTP se comprobó si el compuesto VSC2 era capaz de prevenir la neuroinflamación *in vivo*. Para ello se empleó un marcador de microglía (Iba-1: *ionized calcium-binding adapter molecule 1*), observándose niveles disminuidos del mismo en ratones tratados con VSC2 respecto a los no tratados. El tratamiento con VSC2 también redujo los niveles de enzimas proinflamatorias (iNOS, COX-2) así como de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ . Consecuentemente, las neuronas dopaminérgicas adyacentes y potencialmente vulnerables a los mediadores inflamatorios liberados por la microglía aumentaron su viabilidad. Para comprobar la implicación de la *vía* NRF2, se midieron los niveles de esta proteína, observándose un aumento significativo en los ratones tratados con VSC2. Ese aumento también se observó en el caso de las enzimas antioxidantes dependientes de NRF2 (HMOX-1, NQO1 y GCL).<sup>37</sup>

#### TPNA10168:

A partir de un cribado *in vitro* de 4776 compuestos, el compuesto TPNA10168 (ver **Figura 7**) mostró las mejores propiedades como inductor de NRF2.<sup>38</sup> En células PC12, indujo la activación de la *vía* NRF2 observándose un incremento de las enzimas GCL, HMOX-1 y NQO1 de forma dosis dependiente y produjo menores efectos adversos que el SFN. Experimentos adicionales determinaron el efecto de TPNA10168 en cultivos primarios de mesencéfalo. Estos cultivos contenían principalmente neuronas, incluidas neuronas dopaminérgicas, aunque también contenían astrocitos y microglía. Tras demostrar la regulación positiva de HMOX-1 en estos cultivos, fueron sometidos al tóxico 6-OHDA para evaluar las propiedades neuroprotectoras del compuesto. El co-tratamiento con TPNA10168 fue capaz de reducir en gran medida la muerte de las neuronas dopaminérgicas de manera dosis dependiente.<sup>38</sup>

#### **b) Inductores no covalentes**

Recientemente, y dados los potenciales problemas de seguridad de los inductores covalentes, se han hecho grandes esfuerzos en la investigación y desarrollo de nuevos tipos de activadores de NRF2. Este es el caso de los inhibidores de la interacción proteína-proteína KEAP1-NRF2, que son capaces de inducir de manera directa y más selectiva esta *vía*, evitando la interacción con residuos de cisteína presentes en otras proteínas del organismo.<sup>15</sup> Si bien es un grupo de compuestos novedosos y, hasta la fecha, no hay estudios concretos dirigidos a la EP, conviene hacer una referencia a ellos por su creciente interés.

En cuanto a su mecanismo de actuación, estos compuestos son capaces de establecer interacciones potentes con el dominio Kelch de KEAP1<sup>39</sup> lo que interfiere directamente con la interacción con NRF2, facilitando su translocación al núcleo y la activación de la respuesta antioxidante.<sup>15</sup> Debido a su mayor selectividad y especificidad, se les atribuye un menor riesgo "off-target" y reacciones adversas en comparación con los inductores covalentes.<sup>40</sup>

Uno de los primeros compuestos descrito como inhibidor de la interacción KEAP1-NRF2 fue el compuesto LH601A (ver **Figura 7**).<sup>41</sup> Este compuesto mostró capacidad para inhibir la interacción KEAP1-NRF2 con un valor de IC<sub>50</sub> (parámetro que indica la concentración necesaria de un compuesto capaz de inhibir el 50 % de un proceso biológico) de 3 μM. Además, LH601A presenta una K<sub>d</sub> de 1,75 μM en el ensayo de competición medido mediante resonancia de plasmón en superficie (SPR) de competición.<sup>15</sup> LH601A fue capaz de inducir la activación de NRF2 y su translocación al núcleo evaluado en ensayos celulares.<sup>41</sup>

Otro uno de los compuestos más estudiados y con mayor actividad para inhibir la interacción KEAP1-NRF2 es el compuesto CPUY192018 (ver **Figura 7**).<sup>42</sup> Este compuesto es capaz de inhibir la interacción proteína-proteína KEAP1-NRF2 con una IC<sub>50</sub> igual a 14,4 nM y una K<sub>d</sub> igual a 39,8 nM en el ensayo de calorimetría de titulación isotérmica (ITC).<sup>40, 43</sup> A su vez, mediante un ensayo reportero de luciferasa, se comprobó la capacidad de inducción de NRF2 de este compuesto en células HepG2-ARE-C8 así como el incremento en la expresión de genes ARE dependientes. La efectividad del compuesto CPUY192018 se ha evaluado en diferentes modelos de enfermedades tanto *in vitro* como *in vivo* como son la colitis ulcerosa crónica<sup>44</sup>, inflamación renal crónica<sup>43</sup> y la isquemia retiniana.<sup>45</sup> En este último estudio se observa neuroprotección en la retina tras una lesión por isquemia-reperfusión en ratas, tanto por administración sistémica como tópica del compuesto CPUY192018 lo que demuestra el potencial terapéutico de este compuesto.<sup>45</sup> En resumen, estos estudios muestran el perfil multidiana y el gran interés que suscitan los activadores no covalentes de NRF2.

## 5 CONCLUSIONES

La EP es una enfermedad neurodegenerativa asociada al envejecimiento, muy presente en nuestra sociedad y que acarrea un gran deterioro de la calidad de vida del paciente y un enorme impacto económico. Muchos de los mecanismos patológicos subyacentes a la enfermedad son aún desconocidos ya que se trata de una enfermedad compleja y multifactorial, lo cual, sumado a la existencia de tratamientos únicamente sintomáticos hace necesario el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

Los acúmulos de α-sinucleína que forman los cuerpos de Lewy y la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* constituyen las evidencias patológicas más características de la EP. Estas tiene lugar junto con otros procesos fisiopatológicos relacionados como son una alteración de la cadena de transporte mitocondrial, un aumento del estrés oxidativo y producción de niveles elevados de ROS, una sobreactivación glial y una alteración en la autofagia que desembocan, en última instancia, en la neurodegeneración típica de la enfermedad. En este contexto, el factor de transcripción NRF2, el regulador maestro de genes antioxidantes y antiinflamatorios en la célula, se muestra como una diana prometedora para el tratamiento de la EP.

Se ha demostrado en numerosos modelos de la EP que la activación de NRF2 protege frente al estrés oxidativo mediante la activación de distintas enzimas antioxidantes (NQO1, HMOX-1, GCL, etc.), la modulación de la liberación de diferentes mediadores inflamatorios y el control de los fenómenos de gliosis, entre otras actividades. Como consecuencia, el uso de compuestos inductores de la *vía* NRF2 se postula como una nueva estrategia para el tratamiento de la EP.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

1. <https://www.esparkinson.es>
2. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. Nat Rev Dis Prim. 2017;3:1–21.
3. Macleod AD, Taylor KSM, Counsell CE. Mortality in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. Mov Disord. 2014;29(13):1615–22.
4. Campolo M, Casili G, Biundo F, Crupi R, Cordaro M, Cuzzocrea S, et al. The Neuroprotective Effect of Dimethyl Fumarate in an MPTP-Mouse Model of Parkinson's Disease: Involvement of Reactive Oxygen Species/Nuclear Factor- $\kappa$ B/Nuclear Transcription Factor Related to NF-E2. Antioxidants Redox Signal. 2017; 27(8):453–71.
5. Madrid UC De. Neurodegenerativas en España y su impacto económico y social Madrid, Febrero 2016. 2016; 175.
6. Todorovic M, Mellick GD. Nrf2 and Parkinson's Disease. In A Master Regulator of Oxidative Stress-The Transcription Factor Nrf2. Xu L, Pu J. Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease : From Pathogenetic. Park Dis. 2016;(9):169-184.
7. Xu L, Pu J. Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease : From Pathogenetic. Park Dis. 2016;2016
8. Benito-León J. Epidemiología de la enfermedad de Parkinson en España y su contextualización mundial. Rev Neurol. 2018;66(4):125–34.
9. Winklhofer KF, Haass C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis [Internet]. 2010; 1802(1):29–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.08.013>
10. Cho M-R, Han J-H, Lee H-J, Park YK, Kang M-H. Emerging functional crosstalk Kyoto, Japbn.14-134 0912-5086 Original Article Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition JCBNcbn14-13c4 10.3164/jj1880 0009athe Society for Free Radical Research Japan between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria. J Clin Biochem Nutr. 2015;56(1):49–56
11. Cianciulli A, Porro C, Calvello R, Trotta T, Lofrumento DD, Panaro MA. Microglia mediated neuroinflammation: Focus on PI3K modulation. Biomolecules. 2020; 10 (1):1–19.
12. Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. Neurobiol Aging. 2008;29(11):1690–701.
13. Bergström P, Andersson HC, Gao Y, Karlsson JO, Nodin C, Anderson MF, et al. Repeated transient sulforaphane stimulation in astrocytes leads to prolonged Nrf2-mediated gene expression and protection from superoxide-induced damage. Neuropharmacology [Internet]. 2011;60(2–3):343–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.09.023>
14. Zhou H, Wang Y, You Q, Jiang Z. Recent progress in the development of small molecule Nrf2 activators: a patent review (2017-present). Expert Opin Ther Pat [Internet]. 2020;0(0):1. Available from: <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1715365>
15. Abed DA, Goldstein M, Albanyan H, Jin H, Hu L. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. Acta Pharm Sin B. 2015;5(4):285–99.
16. Shaw P, Chattopadhyay A. Nrf2–ARE signaling in cellular protection: Mechanism of action and the regulatory mechanisms. J Cell Physiol. 2020;235(4):3119–30.

17. Cuadrado A. NRF2 in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Toxicol* [Internet]. 2016;2(2016):46–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cotox.2016.09.004>
18. Xidativo O, Fainstein MK. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Rev Educ Bioquímica*. 2007;26(1):18–25.
19. Kim J, Keum YS. NRF2, a Key Regulator of Antioxidants with Two Faces towards Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
20. Cuadrado A, Rojo AI, Wells G, Hayes JD, Cousin SP, Rumsey WL, et al. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2019;18(4):295–317. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-018-0008-x>
21. Canning P, Sorrell FJ, Bullock AN. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2015;88(Part B):101–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.034>
22. Cuadrado A, Moreno-Murciano P, Pedraza-Chaverri J. The transcription factor Nrf2 as a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(3):319–29.
23. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun*. 2016;7(May):1–14.
24. Gibbs PEM, Maines MD. Biliverdin inhibits activation of NF-κB: Reversal of inhibition by human biliverdin reductase. *Int J Cancer*. 2007;121(11):2567–74.
25. Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF-κB response pathways. *Biochem Soc Trans*. 2015;43:621–6.
26. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. P62 Links the Autophagy Pathway and the Ubiquitin-Proteasome System Upon Ubiquitinated Protein Degradation. *Cell Mol Biol Lett* [Internet]. 2016;21(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s11658-016-0031-z>
27. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem*. 2010;285(29):22576–91.
28. Todorovic M, Wood SA, Mellick GD. Nrf2: a modulator of Parkinson's disease? *J Neural Transm*. 2016;123(6):611–9
29. Ahuja M, Kaidery NA, Yang L, Calingasan N, Smirnova N, Gaisin A, et al. Distinct Nrf2 signaling mechanisms of fumaric acid esters and their role in neuroprotection against 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-induced experimental parkinson's-like disease. *J Neurosci*. 2016;36(23):6332–51.
30. Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A. El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. *Neurología* [Internet]. 2017;32(8):533–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2015.06.011>
31. Lastres-Becker I, García-Yagüe AJ, Scannevin RH, Casarejos MJ, Kügler S, Rábano A, et al. Repurposing the NRF2 activator dimethyl fumarate as therapy against synucleinopathy in Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2016;25(2), 61-77.

32. Greaney AJ, Maier NK, Leppla SH, Moayeri M. Sulforaphane inhibits multiple inflammasomes through an Nrf2-independent mechanism. *J Leukoc Biol.* 2016;99(1):189–99.
33. Bao B, Zhang MQ, Chen ZY, Wu XB, Xia ZB, Chai JY, et al. Sulforaphane prevents PC12 cells from oxidative damage via the Nrf2 pathway. *Mol Med Rep.* 2019;19(6):4890–6.
34. Zhou Q, Chen B, Wang X, Wu L, Yang Y, Cheng X, et al. Sulforaphane protects against rotenone-induced neurotoxicity in vivo: Involvement of the mTOR, Nrf2, and autophagy pathways. *Sci Rep.* 2016;6(August):1–12.
35. Potential T, Effects H. Glucosinolate Phytochemicals from Broccoli ( *Brassica oleracea* L . var . *botrytis* L . ) Seeds and Their Potential Health Effects. 2011;
36. Woo SY, Kim JH, Moon MK, Han SH, Yeon SK, Choi JW, et al. Discovery of vinyl sulfones as a novel class of neuroprotective agents toward Parkinson’s disease therapy. *J Med Chem.* 2014;57(4):1473–87.
37. Lee JA, Kim JH, Woo SY, Son HJ, Han SH, Jang BK, et al. A novel compound VSC2 has anti-inflammatory and antioxidant properties in microglia and in Parkinson’s disease animal model. *Br J Pharmacol.* 2015;172(4):1087–100.
38. Izumi Y, Kataoka H, Inose Y, Akaike A, Koyama Y, Kume T. Neuroprotective effect of an Nrf2-ARE activator identified from a chemical library on dopaminergic neurons. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2018;818:470–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.11.023>
39. Kim S, Indu Viswanath AN, Park JH, Lee HE, Park AY, Choi JW, et al. Nrf2 activator via interference of Nrf2-Keap1 interaction has antioxidant and anti-inflammatory properties in Parkinson’s disease animal model. *Neuropharmacology* [Internet]. 2020;167:107989. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107989>
40. Jiang ZY, Lu MC, Xu LL, Yang TT, Xi MY, Xu XL, et al. Discovery of potent Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor based on molecular binding determinants analysis. *J Med Chem.* 2014;57(6):2736–45
41. Hu L, Magesh S, Chen L, Wang L, Lewis TA, Chen Y, et al. Discovery of a small-molecule inhibitor and cellular probe of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2013;23(10):3039–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.013>
42. Jiang ZY, Xu LL, Lu MC, Chen ZY, Yuan ZW, Xu XL, et al. Structure-Activity and Structure-Property Relationship and Exploratory in Vivo Evaluation of the Nanomolar Keap1-Nrf2 Protein-Protein Interaction Inhibitor. *J Med Chem.* 2015;58(16):6410–21.
43. Lu MC, Zhao J, Liu YT, Liu T, Tao MM, You QD, et al. CPUY192018, a potent inhibitor of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction, alleviates renal inflammation in mice by restricting oxidative stress and NF-κB activation. *Redox Biol.* 2019 Sep 1;26.
44. Lu MC, Ji JA, Jiang YL, Chen ZY, Yuan ZW, You QD, et al. An inhibitor of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction protects NCM460 colonic cells and alleviates experimental colitis. *Sci Rep.* 2016;6(December 2015):1–13.
45. Hui Q, Karlstetter M, Xu Z, Yang J, Zhou L, Eilken HM, et al. Inhibition of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction protects retinal cells and ameliorates retinal ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2020;146(October 2019):181–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.414>