



Humanidades, Ciencia, Tecnología e Innovación en Puebla

ISSN 2644-0903 online

Vol. 3. No. 1, 2021

www.academiajournals.com

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN AUSPICIADO POR EL
CONVENIO CONCYTEP-ACADEMIA JOURNALS



Gobierno de Puebla

Hacer historia. Hacer futuro.



Secretaría
de Educación
Gobierno de Puebla

CONCYTEP
Consejo de Ciencia
y Tecnología del Estado
de Puebla

RAFAEL FLORES LARRAÑAGA

ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LAS INTERACCIONES ENTRE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF₂ Y PÉPTIDOS CATIONICOS

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

DIRECTORES DE TESIS:

DR. FRANCISCO JAVIER MELÉNDEZ BUSTAMANTE

DR. JOSÉ MANUEL PÉREZ AGUILAR

COMITÉ REVISOR:

PRESIDENTE: DR. FRANCISCO JAVIER MELÉNDEZ BUSTAMANTE

SECRETARIO: DRA. NORMA ANGÉLICA CABALLERO CONCHA

VOCAL: DRA. LORENA MILFLORES FLORES



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estudio Computacional de las Interacciones
entre el Factor de Transcripción Nrf2 y Péptidos
Catiónicos

Tesis para obtener el título de
Licenciado en Biología

Presenta:
Rafael Flores Larrañaga

Directores de Tesis:
Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante
Dr. José Manuel Pérez Aguilar

Comité revisor:
Presidente: Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante
Secretario: Dra. Norma Angélica Caballero Concha
Vocal: Dra. Lorena Milflores Flores



Puebla, Pue., 21 de agosto 2020

Estudio computacional de las interacciones entre el factor Nrf2 y péptidos catiónicos.

Rafael Flores Larrañaga

La vía Keap1-Nrf2 se ha convertido en un tema relevante en el ámbito de la salud humana, dada la gran cantidad de evidencia de estar involucrada en muchas enfermedades. Se han realizado numerosas investigaciones que muestran las propiedades médicas y terapéuticas asociadas a la inhibición de esta vía, debido a que permite la expresión de genes ARE con efectos antioxidantes y citoprotectores. Generalmente, los inhibidores indirectos son especies electrofílicas que tienen la capacidad de reaccionar con los grupos tiol de los residuos de cisteína de Keap1. Sin embargo, dichos inhibidores carecen de especificidad y selectividad, lo que supone un riesgo debido a que pueden interactuar con otros blancos y producir efectos tóxicos. La inhibición directa de la interacción Keap1-Nrf2 ha surgido como una estrategia atractiva para la activación de Nrf2. El descubrimiento de pequeñas moléculas que actúen como inhibidores directos de esta vía vislumbra un camino muy prometedor, donde los inhibidores tendrían los beneficios de disminuir los efectos tóxicos e incrementar su estabilidad y biodisponibilidad dentro del organismo. Gracias a las mejoras en el campo de la informática, el estudio computacional de estos inhibidores, bajo el marco de la dinámica molecular, es una herramienta factible, rápida y confiable que nos permite modelar el comportamiento de péptidos al interactuar con Nrf2, permitiendo la predicción de la eficacia y estabilidad del péptido. Con este estudio, se vislumbra un panorama que facilita el diseño de fármacos inhibidores directos de Nrf2.

"Lo sorprendente de dejar entrar a la muerte, descubres que esta cosa llamada amor es un apoyo que nos sostiene. Tiene una calidad de benevolencia que podríamos no haber notado. Y nos preguntamos, ¿Qué es eso? ¿Qué es lo que tiene esa calidad de benevolencia? y la única palabra en la que puedo pensar es realidad. La realidad, de hecho, tiene esa cualidad de benevolencia. Incluso benevolencia, es una palabra muy pequeña para lo que hace. Es tan intensa, que esta experiencia de la energía del amor es tan poderosa que para combatirla construimos una vida entera, un ego completo para tratar de no sentirlo, porque es realmente abrumador. Es un asesino, es la muerte del ego, y por eso duele, tu corazón se abre y es la muerte del ego, es una transfiguración, una transfiguración alquímica porque ¿Quién quería cargar con este maldito peso?"

Deneen Fending

Agradecimientos

Esta Investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla.

Los agradecimientos de esta tesis trascienden las metas logradas o el proceso de su realización. Es un pequeño obsequio de mi persona.

A mi madre y a mi padre, por haberme enseñado la paradoja más importante, que tan pronto renuncias a todo puedes tenerlo todo. Y por enseñarme que el amor no es darlo ni recibirlo, sino sentirlo. Sentir amor en vez de dar o tomarlo, es lo único que provee estabilidad.

A mi hermano Rodrigo, por compartir la etapa más hermosa y sincera de mi vida. Además de haberme mostrado que lo más importante de las palabras no es escucharlas, sino el silencio que encuentras tras ellas.

A mi Vale, que me ama solo por ser quien soy, solo por existir, sin hacer algo para ganarlo y que nadie puede quitarle ese amor y siempre estará ahí.

A mis directores de tesis, el Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante y el Dr. José Manuel Aguilar Pérez, quienes han depositado su confianza y me han apoyado para continuar mi formación académica. Pero, sobre todo, a ambos agradezco que me han enseñado a que es importante no esperar nada a cambio, porque cada paso, por negativo que sea, es un paso en el camino de la vida.

Al Laboratorio de Química Teórica de la Facultad de Ciencias Químicas, por la calidez con la que me han recibido y me han integrado no solo a su equipo de trabajo, sino también recibirme como un amigo. Me han enseñado que el corazón rinde todo al momento, y que la mente juzga y frena. Finalmente, al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS-BUAP), por las facilidades que nos han brindado.



Secretaría
de Educación
Gobierno de Puebla

CONCYTEP
Consejo de Ciencia
y Tecnología del Estado
de Puebla

CONTENIDO

Introducción

Capítulo 1. Antecedentes

1.1 Antecedentes Computacionales

- 1.1.1 Química computacional
- 1.1.2 Docking molecular
- 1.1.3 Simulaciones de Dinámica molecular
- 1.1.4 Áreas de aplicación y sus límites

1.2 Antecedentes Biológicos

- 1.2.1 Estrés Oxidativo
- 1.2.2 Clasificación del estrés oxidativo
- 1.2.3 Radicales libres y fuentes de oxidación
- 1.2.4 Elemento de respuesta antioxidante (ARE)
- 1.2.5 Activación de ARE por Nrf2
- 1.2.6 Estructura de Nrf2
- 1.2.7 Papel y estructura de Keap1
- 1.2.8 Mecanismo y regulación de la vía Keap1-Nrf2-ARE
- 1.2.9 La vía Keap1-Nrf2ARE como blanco terapéutico
- 1.2.10 Inhibidores de la interacción proteína-proteína Keap1-Nrf2

Capítulo 2. Planteamiento del Problema

Capítulo 3. Justificación

Capítulo 4. Hipótesis

Capítulo 5. Objetivos

- 4.1 Objetivo General
- 4.2 Objetivos Específicos

Capítulo 6. Metodología

Capítulo 7. Resultados y Discusión

8. Conclusión

9. Referencias Bibliográficas

Introducción

El estudio de estructuras macromoleculares se ha convertido en un punto crítico para la comprensión de la biología. Los procesos biológicos están basados en las interacciones moleculares, y estos son consecuencia de las estructuras macromoleculares. Para entender mejor las bases de la actividad de alguna molécula en un organismo vivo, es importante conocer cómo interactúa la molécula con el sitio de acción, específicamente las propiedades conformacionales y su orientación. En los sistemas biológicos, el reconocimiento molecular depende de interacciones de atracción/repulsión entre dos moléculas, y básicamente define las reglas para la comprensión de fenómenos biológicos como los mecanismos de una enzima y su regulación, transporte a través de la membrana, construcción de complejos macromoleculares, la regulación génica, entre otros. Por lo tanto, el estudio y la predicción de las interacciones proteína-proteína es uno de los campos crecientes en la biología moderna.

El estudio del reconocimiento molecular no es una tarea sencilla. En este sentido, para identificar las interacciones entre ligandos con su molécula diana se requieren de estructuras tridimensionales (3D). Los análisis de las estructuras 3D, obtenidas en experimentos, ha conducido a un gran número de estudios exitosos en el campo de la bioquímica, además de que son la base para el diseño de nuevos fármacos. A pesar de que esta herramienta es muy útil, un simple análisis de la estructura 3D solo proporciona una comprensión parcial de la molécula, puesto que se requiere obtener información de las geometrías de interacción y de las contribuciones de afinidad aproximadas para las interacciones de atracción. Al mismo tiempo, la interacción puede contribuir a cambios de energía y a cambios en la estructura molecular debido al dinamismo y flexibilidad implícitas de las moléculas. Adicionalmente,

solo ciertas características de las funciones de una proteína solo pueden ser entendidas cuando se estudian sus propiedades dinámicas.

El acercamiento tradicional para estudiar la influencia conformacional en la función de una macromolécula ha sido acumular muchas estructuras experimentales que puedan cubrir un espacio conformacional, generando diferentes estructuras cristalográficas de macromoléculas en diferentes ambientes, o bien, macromoléculas en complejo con otras moléculas. Todo lo anterior ha contribuido a la vasta redundancia que existe al obtener estructuras en PDB. Como respuesta a este problema, las técnicas teóricas han sido consideradas como el camino más conveniente para obtener un panorama más certero en cuanto a las propiedades dinámicas. El desarrollo de las simulaciones de dinámica molecular ha sido gradual, convirtiéndose en una ciencia cada vez más madura y consistente. Para muchas áreas de investigación, las simulaciones de dinámica molecular son un método estándar para el estudio de macromoléculas. Los grandes avances en el campo de la informática han permitido mejorar el rendimiento de los algoritmos de simulación que emplean los softwares de dinámica molecular, disminuyendo el costo computacional y logrando que las simulaciones puedan realizarse en escalas de tiempo considerables [1].

Este trabajo se estructura de la siguiente manera:

En el capítulo 1. *Antecedentes*, se presentan los antecedentes que han dado pie a esta investigación. Se dividen en dos apartados: Antecedentes Computacionales y Antecedentes Biológicos. En los primeros, se da un breve resumen de los avances computacionales y técnicos que han permitido el desarrollo y establecimiento de la dinámica molecular como una herramienta fiable y útil para el estudio de macromoléculas. En los segundos, se cuenta acerca de la historia del estrés oxidativo, abarcando desde su origen en 1936 hasta el establecimiento de la vía de interés Nrf2-Keap1-ARE y su relevancia como un blanco terapéutico para distintas enfermedades.

En los capítulos 2. *Planteamiento del Problema* y 3. *Justificación*, se propone la problemática que motiva el desarrollo de esta tesis, así como también se explica por qué el estudio del Nrf2 y por qué la elección de estos péptidos catiónicos.

En el capítulo 4. *Hipótesis*, se plantea la especulación que existe con base a la información recabada.

En el capítulo 5. *Objetivos*, se presentan el objetivo general y los objetivos particulares que se lograron en este trabajo.

En el capítulo 6. *Metodología*, se exponen los métodos y técnicas empleadas. Se especifican los softwares que se utilizaron, así como también la secuencia aminoacídica del péptido y los detalles técnicos de la simulación.

En el capítulo 7. *Resultados y Discusión*, se muestran los resultados obtenidos y su interpretación. Se describen los resultados del acoplamiento molecular y los modelos seleccionados para la simulación de dinámica molecular. Posteriormente, se detallan los resultados de la simulación para los modelos 1 y 2. También, se presenta un análisis de las interacciones de interés, así como los análisis de distancia y el RMSD obtenidos. Para finalizar, se presenta un breve resumen de las interacciones observadas en ambos modelos.

Posteriormente, se presentan las *Conclusiones* a las que los resultados discutidos han conducido. Y finalmente, se presenta la *Bibliografía* empleada en este trabajo.

CAPÍTULO UNO

Antecedentes

1.1 Antecedentes computacionales

1.1.1 Química computacional

Basados en los descubrimientos y las teorías en el campo de la física cuántica, los primeros cálculos teóricos en química fueron desarrollados por Walter Heitler y Fritz London en 1927, empleando la ecuación de Schrödinger para mostrar que a través de su solución se puede obtener las funciones de onda y la interacción de intercambio magnético de dos átomos de hidrógeno para formar un enlace covalente ^[2].

A partir de entonces y con el continuo desarrollo de la tecnología computacional en 1940, la solución a la ecuación de Schrödinger (o ecuación de onda) para sistemas más complejos con un mayor número de átomos empezaron a ser un objetivo alcanzable. A principios de 1950, se llevaron a cabo los primeros cálculos semi-empíricos de orbitales atómicos. En 1956 se llevó a cabo el primer cálculo *ab initio* con el método Hartree-Fock en moléculas diatómicas, realizado por primera vez en el Massachusetts Institute of Technology (MIT) ^[3]. Para ciertas moléculas diatómicas, un estudio sistemático empleando conjuntos de bases pequeñas y grandes fue publicado por Ransil y Nesbet en 1960 ^[4]. En 1971 Richards *et al.*, desarrollaron la metodología para los cálculos *ab initio* de moléculas más grandes, tales como el naftaleno y el azuleno ^[5].

A principios de 1970, los programas que empleaban eficientemente los cálculos *ab initio* como: ATMOL, GAUSSIAN, IBMOL y POLYAYTOM, comenzaron a ser usados para acelerar los cálculos de los orbitales moleculares. De los programas antes mencionados solo

GAUSSIAN, que actualmente es más extenso, sigue siendo empleado por muchos centros de investigación, aunque existen otros programas que se han desarrollado y también son empleados ^[3]. En la misma década, los métodos que ocupa la mecánica molecular, como es el método de algoritmo de minería-mínimo de segunda generación (MM2), fue desarrollado y empleado por primera vez por Norman Allinger en 1977 ^[6].

Una de las primeras menciones del término "química computacional" se puede encontrar en el libro de 1970 *Computadoras y su rol en las ciencias físicas* de Sidney Frenbach y Abraham Haskell ^[7]. Por ello durante 1970, diversos métodos comenzaron a verse como parte de una disciplina emergente de la química computacional ^[8].

1.1.2 Docking molecular

En el campo del modelado molecular, el método de docking molecular sirve para predecir la orientación preferida de una primera molécula (Ligando) respecto a una segunda molécula (Receptor) cuando se unen para formar un compuesto estable ^[9]. El docking molecular está basado en realizar tres metas principales: a) Predecir la posición, b) La proyección virtual y c) La estimación de la afinidad de unión Ligando-Receptor ^[10]. La información acerca de la orientación preferida Ligando-Receptor es usada para predecir la fuerza de disociación o la afinidad de unión entre dos moléculas usando los conceptos de las funciones de puntuación. Bajo este concepto, las asociaciones entre moléculas biológicas como: Proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos son relevantes en la señalización celular, además la orientación entre las moléculas que interactúan puede afectar el tipo de señal que se produce ^[11].

El docking molecular es usado frecuentemente para predecir la orientación de unión entre posibles fármacos y su proteína diana (Ligandos-Receptor), de tal manera que se predice la afinidad y la actividad de esta primera molécula pequeña (Ligando). Además, el docking molecular juega un papel esencial en el diseño racional de nuevos fármacos. El

enfoque que tiene el docking molecular es encontrar la conformación optimizada y la orientación relativa del ligante y la proteína, en donde la energía libre de todo el sistema es minimizada ^[12]. Sin embargo, se debe escoger una metodología adecuada para poder predecir la posición del ligando sin el sitio de unión y la interacción molecular físicoquímica. El método seleccionado debe ser capaz de distinguir exitosamente las moléculas de unión y las de no unión, además de que debe puntuar correctamente a estos ligandos en la base de datos ^[13].

Existen tres tipos de docking molecular: Docking Rígido (DR), Docking con Ligando Flexible (DLF) y Docking Flexible (DF). En el DR ambas moléculas, receptor y ligando, son tratadas de manera rígida evitando cambios en su conformación. En el (DLF) solamente el ligando permanece flexible, mientras que en el (DF) todo el sistema permanece flexible para poder así explorar diferentes conformaciones en el espacio multi-conformacional ^[14].

1.1.3 Simulaciones de Dinámica molecular

El estudio de todas las estructuras macromoleculares juega un papel clave para el entendimiento de sistemas biológicos. Las funciones biológicas están basadas en interacciones moleculares, por lo tanto, estas son consecuencia de las estructuras macromoleculares. A partir de 1950, hubo un incremento acerca del conocimiento de las estructuras químicas de proteínas y de ácidos nucleicos ^[15]. Sin embargo, las estructuras obtenidas a partir de cristalografía de rayos-X y otras técnicas son estáticas, surgiendo el problema de que las moléculas son dinámicas y sus movimientos están relacionados a su función. Como alternativa nacen los modelos computacionales de movimiento a nivel atómico, basados en las primeras leyes de la física. Sin embargo, estas simulaciones estuvieron sujetas a desarrollo por décadas, debido a que son computacionalmente costosas y al desafío de desarrollar los modelos apropiados que puedan explicar el comportamiento para una gran variedad de diferentes moléculas ^[1].

En sus inicios, la dinámica molecular era parte de la física teórica, sin embargo, a partir de 1960 este método ganó popularidad en la ciencia de materiales y, tiempo después, en la bioquímica y la biofísica. Con el desarrollo de las simulaciones de dinámica molecular en los años 1970's, se tuvieron avances desde hacer simulaciones con cientos de átomos hasta llegar a simular sistemas biológicos de relevancia ^[16], incluyendo proteínas completas en solución con modelos explícitos de solventes, proteínas embebidas en la membrana y complejos macromoleculares como nucleosomas ^[17] o ribosomas ^[18].

En la actualidad, es común modelar sistemas que tengan entre 50,000-100,000 átomos, así como también es posible modelar sistemas de más de 500,000 átomos con la infraestructura computacional adecuada. Esta mejora remarcable es consecuencia, en parte, del uso de computadoras de alto rendimiento o Supercomputadoras, así como también de la simplicidad de los algoritmos que se han desarrollado para la dinámica molecular ^[15].

Las simulaciones de dinámica molecular se están desarrollando gradualmente desde una nueva ciencia a una cada vez más madura y consistente. Las técnicas clásicas de dinámica molecular se han usado por más de 40 años ^[19] y aquellos modelos que emplean esferas actualmente tienen más de 50 años de antigüedad ^[20]. Para muchas áreas, las simulaciones con dinámica molecular se han convertido en un método estándar acompañado de otras técnicas, tales como el docking molecular. A pesar de su gran desarrollo, la dinámica molecular atraviesa desafíos en cuanto a su entendimiento debido a las bases sólidas de programación que tienen los algoritmos complejos y las bases de códigos ^[21].

Mejoras en las escalas de tiempo

Las simulaciones de dinámica molecular son demandantes por dos razones. En primer lugar, los cálculos en cada paso requieren de una gran cantidad de recursos computacionales, aproximadamente de 1 billón de operaciones aritméticas para un sistema

de cientos de átomos. En segundo lugar, el cálculo del campo de fuerzas se debe repetir muchas veces y cada paso individual está limitado a pocos femtosegundos, por lo que realizar una simulación de 1 milisegundo requiere de aproximadamente 1 trillón de pasos ^[1].

Hace dos décadas, Duan y Kollman realizaron la primera simulación de dinámica molecular de una proteína pequeña a una escala de tiempo de 1 microsegundo ^[22]. Este trabajo presento un esfuerzo muy grande, se ocuparon supercomputadoras (o Clústeres) durante cuatro meses, a pesar de que se tratara de una proteína pequeña (menor a 10,000 átomos), además de usar una aproximación que se limitara a interacciones electrostáticas menores a 8 Å. Sin embargo, en los últimos años las simulaciones con sistemas con miles de átomos se han vuelto más prácticas, donde los estudios con trayectorias individuales mayores a 1 microsegundo han sido reportados ^[20-25] e incluso simulaciones de moléculas pequeñas a escalas de 1 milisegundo han sido reportadas ^[26].

Todos estos avances reflejan, en parte, el esfuerzo significativo para mejorar la escalabilidad de los softwares de dinámica molecular mediante una paralelización más eficiente en grandes números de nodos de procesamiento multinúcleo ^[27]. Actualmente, el desarrollo de arquitecturas paralelas de súpercomputo especializadas, que emplean chips como son los CPU's han permitido disminuir el tiempo de maquina en el trabajo computacional. En particular, una maquina desarrollada especialmente para correr simulaciones de dinámica molecular, llamada "Anton", puede realizar simulaciones de dinámica molecular de todos los átomos a un ritmo de 20 μ s por día, aproximadamente dos órdenes de magnitud más rápido que las simulaciones que generalmente son realizadas con otros hardwares y softwares ^[28].

Otros esfuerzos que se han llevado a cabo para aumentar la escala de tiempo se han enfocado en el uso del hardware de la computadora más allá de los chips de la unidad central de procesamiento (CPU). Las unidades de procesamiento gráfico (GPUs) diseñadas

para acelerar los gráficos, proveen un paralelismo interno significativo con el potencial de una computadora de alto rendimiento a un costo relativamente bajo [27]. Muchos grupos que han desarrollado estos chips para las simulaciones de dinámica molecular, han mejorado varios órdenes de rendimiento en un solo chip de CPU [29-31].

Campos de fuerza

Un campo de fuerza es una expresión matemática que se encarga de describir la energía de un sistema respecto a las coordenadas de sus partículas. Consiste de una forma analítica de la energía potencial interatómica, $U(r_1, r_2, \dots, r_n)$, y un conjunto de parámetros. Estos parámetros se obtienen de cálculos de mecánica cuántica *ab initio* o semi-empíricos, o bien ajustándolos a datos experimentales como difracción de neutrones, rayos X o electrones, resonancia magnética nuclear (NMR), espectroscopia infrarroja, entre otros. Las moléculas son definidas como un conjunto de átomos que están sujetos entre ellos por fuerzas elásticas (armónicas) donde el campo de fuerza reemplaza el potencial verdadero con un modelo simplificado en la región donde se lleva a cabo la simulación [32].

Existen diversos campos de fuerza reportados en la literatura [33], cada uno con diversos grados de complejidad y orientados al tratamiento de diferentes tipos de sistemas. Sin embargo, una expresión general de un campo de fuerza tiene la siguiente forma:

$$U = \sum_{\text{enlaces}} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torsiones}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \delta)] + \sum_{\text{impropio}} V_{\text{imp}} + \sum_{IJ} 4\epsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{IJ}^{12}}{r_{IJ}^{12}} - \frac{\sigma_{IJ}^6}{r_{IJ}^6} \right) + \sum_{\text{elec}} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

Donde los primeros cuatro términos se refieren a contribuciones intramoleculares o locales de energía total (estiramiento de enlace, doblamiento del ángulo y torsiones del

diedro e impropio). Finalmente, los dos últimos términos sirven para describir las interacciones repulsivas y de Van der Waals, así como las interacciones Coulombianas.

La calidad de las simulaciones de dinámica molecular depende, en gran parte, de la precisión del modelo físico (campo de fuerza) que se emplea. En los últimos años, se ha hecho un progreso significativo para que los campos de fuerza de dinámica molecular puedan describir con gran precisión proteínas plegadas ^[34].

1.1.4 Áreas de aplicación y sus límites

Aplicaciones para entender la alostería.

La mayoría de fenómenos en las proteínas se puede explicar mediante las transiciones conformacionales. El cambio de conformación que está involucrado en la alostería se extiende desde pequeños a grandes arreglos que sufren cambios cuaternarios. En cualquier caso, existe un acuerdo general sobre los cambios conformacionales envueltos en las transiciones alostéricas donde se tratan en términos de simples movimientos colectivos ^[35]. Por esta razón la dinámica molecular puede ser empleada como una herramienta para entender la alostería. Sin embargo, la habilidad para los algoritmos de simulación atomística libre de seguir la transición completa permanece limitada, La mayoría de los reportes de simulaciones emplean sistemas simplificados, como dinámica molecular discreta ^[36] o Go-Models ^[37], incluso equivalentes como modelos de redes elásticas ^[38].

Aplicaciones empleando el docking molecular para diseño de fármacos.

Para poder entender cómo es que un ligando se une a una macromolécula es imprescindible entender la función que el mismo desempeña, siendo la base del diseño de fármacos. Este proceso de reconocimiento es de naturaleza dinámica. Las moléculas son entidades flexibles, y su proceso de reconocimiento implica ciertos rearreglos estructurales,

donde el ajuste de su forma es parte del proceso de unión y no solo desde el punto de vista estructural, sino también energético ^[15].

A pesar de ser una idea válida y generalmente aceptada, los algoritmos del docking carecen de efectos dinámicos y la mayoría operan con estructuras rígidas que se obtienen de PDB. Este problema es relevante en los dockings de proteína-proteína donde las diferencias considerables se encuentran entre las estructuras de unión y de no unión. Para métodos de proteína ligando, la flexibilidad del ligando debe ser ampliamente recuperada usando familias de confórmeros ^[39-40]. Para el caso de la flexibilidad en las proteínas, las soluciones no son tan extensas. La mayoría ocupan algoritmos que seleccionan un set alternativo y limitado de conformaciones de proteínas ^[41]. También, es posible introducir la flexibilidad como un proceso de refinamiento *a posteriori* ^[42]. Todavía no está claro si el ajuste estructural proviene de la selección disponible de conformaciones o es inducido por el proceso mismo de unión ^[43], pero en cualquier caso el uso de ensamblajes estructurales en lugar de estructuras individuales mejora la predicción de unión ^[44].

Aplicaciones para refinar la predicción de estructuras.

La predicción de la estructura es uno de los principales problemas que le compete a la bioinformática estructural. La dinámica molecular, incluyendo las simulaciones más largas realizadas, ha sido empleada para predicciones *ab initio* de estructuras en proteínas ^[45-46], con el objetivo de estimular el plegamiento de proteínas desde cero, aunque no es la mejor estrategia para obtener un modelo teórico de la estructura de la proteína. En lugar se emplea el modelaje basado en plantilla, que es una técnica más eficiente ^[47-48]. En este tipo de modelaje, una o varias estructuras 3D de proteínas con una similitud razonable respecto a la proteína de interés. El resultado final es un modelo nuevo con una secuencia de aminoácidos y estructura promedio respecto a las plantillas usadas. En la mayoría de los casos, el último paso del proceso de predicción implica la relajación de la estructura

mediante mecánica molecular. En los demás pasos se ocupa una simulación restringida ^[49]. Emplear las simulaciones de dinámica molecular en este proceso puede refinar los modelos obtenidos ^[50]. Las simulaciones permiten que la estructura se adapte a la nueva secuencia, dando un modelo teórico mucho más realista.

1.2 Antecedentes biológicos

1.2.1 Estrés oxidativo

El origen del principio del estrés oxidativo, y las respuestas que lo acompañan, fueron propuestas por Selye en 1936 ^[51]. Realizó experimentos en ratas mostrando que el organismo era dañado por agentes no específicos ante la exposición de frío, algún tipo de lesión, ejercicio excesivo o ante dosis no-letales de diversas drogas. Selye observó que un conjunto de síntomas típicos se hacía presentes ante estos agentes nocivos, los cuales eran independientes de su naturaleza o del agente que empleado.

Sin embargo, no fue hasta 1985 en el libro titulado "Estrés oxidativo" ^[52] que se acuñó el término al que Selye hacía referencia en sus experimentos. La definición original fue "una perturbación en el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor del primero". Gracias al surgimiento de este término, numerosas investigaciones acerca de las reacciones óxido-reducción dieron pie al desarrollo de la Biología Redox y a la medicina ^[53-54], y el concepto de estrés oxidativo fue actualizado y mejorado con base en las investigaciones posteriores. Actualmente, la definición del concepto es "Un desequilibrio entre los oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, que conduce a una interrupción de la señalización y control redox y/o daño molecular" ^[55].

1.2.2 Clasificación del estrés oxidativo

La diversidad de los oxidantes con su enorme rango, en términos de su reactividad química y biológica, conduce a un número de subtipos de estrés oxidativo, denotado por sus diferentes vías de generación ^[54]. Dada la enorme variedad de enzimas y compuestos pro-oxidantes y antioxidantes, actualmente no existe un consenso que haya permitido clasificar los subtipos de estrés oxidativo. Sin embargo, se han realizado esfuerzos para poder clasificar los subtipos de estrés oxidativo ^[55] y para introducir escalas que van desde estrés oxidativo fisiológico hasta la carga oxidativa excesiva y tóxica basada en cuatro rangos: estrés oxidativo basal, bajo, intermedio y alto ^[56] (Tabla 1).

Tabla 1. Tipo de estrés oxidativo

Estrés fisiológico oxidativo (eustrés oxidativo)
Estrés oxidativo fisiopatológico (diestrés oxidativo)
Estrés oxidativo nutricional, dietético, postprandial
Estrés foto-oxidativo (UV-A, UV-B, visible, infrarrojo-A)
Estrés oxidativo inducido por radiación
Estrés reductivo
Estrés nitro-oxidativo, nitrosativo, nitrativo
Estrés hiperóxico
Estrés hipóxico
Estrés del retículo endoplásmico
Estrés proteóxico, disulfuro
Estrés glico-oxidativo
Estrés carbonilo
Estrés oxidativo inducido por nanopartículas
Estrés redox, electrofílico
Estrés por tensión [SHEAR STRESS]
Estrés energético, metabólico
Estrés oxidante, pro-oxidante

Sies y Jones, 2007 ^[55]

1.2.3 Radicales libres y fuentes de oxidación

Los radicales libres son producto de un metabolismo celular normal. Las células y los órganos en condiciones normales de su metabolismo aeróbico son sujetas a una continua exposición de oxidantes. Los radicales libres pueden ser definidos como un átomo o una molécula que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia y que es capaz de existir de forma independiente ^[57]. La presencia de electrones desapareados resulta en propiedades comunes que comparten la mayoría de radicales, como su inestabilidad, vida corta y su alta reactividad. Debido a su alta reactividad, pueden donar o aceptar electrones de otras moléculas, comportándose como oxidantes o reductores según sea el caso ^[58]. Cuando una molécula reacciona con un radical libre, y pierde electrones, se convierte en un radical libre, comenzando una cascada de reacciones que finalmente conlleva al daño celular ^[59]. Las principales especies de radicales libres que contienen oxígeno en enfermedades son el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete, hipoclorito, radical óxido nítrico ($^{\bullet}\text{NO}$) y radical peroxinitrito (ONOO^{\bullet}). Estas son especies altamente reactivas, capaces de dañar moléculas biológicas importantes como el ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos ^[60]. A niveles moderados y bajos, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) pueden ejercer efectos benéficos involucrados en funciones fisiológicas, como la función inmune (Ej. defensa ante microorganismos patogénicos), en varias vías de señalización, en la respuesta mitogénica y en la regulación redox. Pero en concentraciones altas, ambos ROS y RNS provocan estrés oxidativo y nitrosidativo, respectivamente, causando daño potencial a biomoléculas. El estrés oxidativo y nitrosidativo desarrolla un exceso en la producción de ROS/RNS y una deficiencia de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, además de que la generación de ROS puede provocar el surgimiento de reacciones espontáneas y enzimáticas ^[61]. Los factores del estilo de vida de un individuo

afectan el tipo de oxidantes a los que se expone, y como consecuencia pueden existir oxidantes de fuentes exógenas o endógenas.

Fuentes oxidantes endógenas (celulares).

Las ROS pueden ser producidas de manera endógena de diferentes organelos celulares, como las mitocondrias, peroxisomas y el retículo endoplasmático rugoso, donde la producción de oxígeno es alta. Cuando las mitocondrias fueron aisladas, se identificaron como los mayores productores de H_2O_2 , principalmente mediante la reducción de un electrón hasta radicales aniónicos superóxidos ^[62]. Los radicales superóxidos son producidos en dos sitios principales dentro de la cadena transportadora de electrones, el complejo I (NADH deshidrogenasa) y el complejo III (Ubiquinol-citocromo-c reductasa) ^[63]. La transferencia de electrones desde el complejo I o II a la Ubiquinona (Q) resulta en la formación de ubiquinona reducida (QH_2). Esta forma de QH_2 regenera a ubiquinona mediante un intermediario inestable llamado anión semiquinona ($Q^{\cdot-}$). Este intermediario transfiere electrones al oxígeno molecular, conduciendo a la formación de radical superóxido. Esta generación de superóxido es no enzimática por lo que su producción depende del metabolismo ^[64]. La sintetasa de NO y las enzimas citocromo P-450, cuando se encuentran separadas, pueden contribuir a la producción de oxidantes endógenos ^[65] (Figura 1).

En los peroxisomas, el proceso es similar al de las mitocondrias, pues la cadena respiratoria involucra la transferencia de electrones desde varios metabolitos a oxígeno, lo que provoca la formación de H_2O_2 . Las principales enzimas antioxidantes en el peroxisoma son: Acyl Co-A-oxidasa, D-aminoácido oxidasa, L- α -hidroxi oxidasa, Urato oxidasa, D-aspartato oxidasa y Xantina oxidasa. Los principales ROS producidos durante en metabolismo se enlistan en la tabla 2.

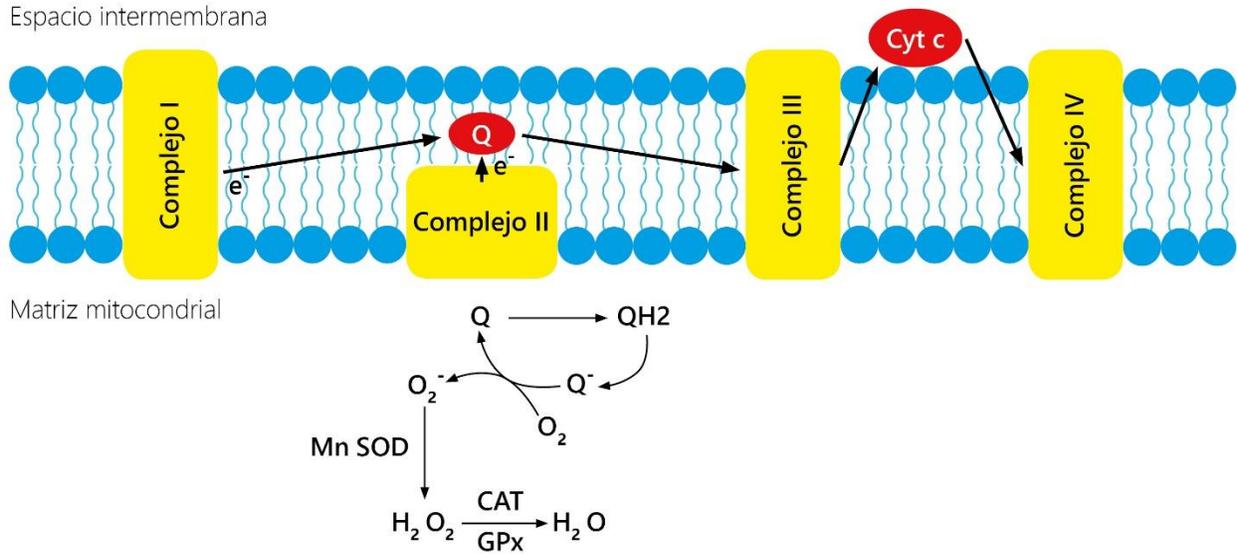


Figura 1. Producción mitocondrial de ROS. El anión superóxido es convertido a peróxido de hidrógeno por acción de la enzima mitocondrial superóxido dismutasa dependiente de magnesio (Mn-SOD). El peróxido de hidrógeno puede ser detoxificado por la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx).

1.2.4 Elemento de respuesta antioxidante (ARE)

La inducción de muchas enzimas citoprotectoras, que responden al estrés químico, son reguladas primeramente a nivel transcripcional. Esta respuesta transcripcional esta mediada por el Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE) ^[66], encontrado en principio en los promotores de los genes que codifican a dos grandes enzimas detoxificantes: La glutatión-S-transferasa A2 (GSTA2) y la NADPH quinona oxidoreductasa (NQO1). ARE es un elemento regulador en cis que posee características biológicas únicas ante el estrés oxidativo ^[67], el cual es activado no solo ante la respuesta de H_2O_2 sino que puede activarse con una variedad de compuestos químicos que tengan la capacidad de entrar en el ciclo redox o que puedan ser metabólicamente transformados en especies reactivas o intermediarios electrofílicos ^[68]. Además, los compuestos que son propensos a reaccionar con grupos sulfhídricos, como el malonato de dietilo, los isotiocianatos y las ditioltionas, son potentes inductores de la actividad de ARE ^[69]. Los genes que presentan sitios ARE codifican para diferentes proteínas,

como las enzimas de la fase I, II y III, que ayudan a mantener el control redox en la célula y la protege ante el daño oxidativo [70].

Por consiguiente, la alteración del estado redox en la célula, debido a elevados niveles de ROS y especies electrofílicas o bien por una capacidad antioxidante reducida, es una importante señal para disparar la respuesta transcripcional mediada por este potenciador.

Tabla 2. ROS producidos durante el metabolismo

Radical	
Superóxido	$O_2^{\bullet -}$
Hidroxilo	OH^{\bullet}
Alcoxilo	RO^{\bullet}
Peróxilo	ROO^{\bullet}
No Radical	
Peróxido de Hidrógeno	H_2O_2
Oxígeno Singlete	1O_2
Ozono	O_3
Peróxido Orgánico	$ROOH$
Ácido Hipocloroso	$HOCl$
Ácido Hipobromoso	$HOBr$

Phaniendra y cols., 2015 [63]

Fuentes oxidantes exógenas (externas).

Las ROS también pueden ser producidas en los sistemas biológicos por varias fuentes exógenas (Tabla 3).

Tabla 3. Tipo de estrés oxidativo

Contaminación del Aire y Agua
Alcohol
Humo de tabaco
Metales de transición (Cd, Hg, Pb, As)
Metales pesados (Fe, Cu, Co, Cr)
Solventes industriales
Pesticidas
Altas temperaturas
Luz Ultravioleta
Cocinar alimentos
Fármacos

Phaniendra y cols., 2015 ^[63]

La detoxificación de xenobióticos o compuestos químicos tóxicos está regulada en tres fases: la fase I, II y III ^[71]. En la fase I, una variedad de enzimas actúan para introducir los grupos reactivos y polares en sus sustratos. Las enzimas principales pertenecen a la superfamilia de enzimas del citocromo P450 responsable de metabolizar los xenobióticos ^[72]. Las reacciones en la fase I pueden ocurrir por oxidación, reducción, hidrólisis, ciclación, deciclización y adición de oxígeno y remoción de hidrógeno, a menudo en el hígado ^[73]. Subsecuentemente, las reacciones de la fase II son activadas por metabolitos xenobióticos conjugadas con especies cargadas como el glutatión (GSH), sulfatos, glicina o ácido glucurónico. Las reacciones de la fase II son catalizadas por un gran grupo de transferasas, que en combinación pueden metabolizar casi cualquier compuesto hidrofóbico que contenga grupos nucleofílicos o electrofílicos ^[74]. Una de las clases más importantes de este grupo de enzimas es la glutatión-S-transferasa, que cataliza la conjugación de especies electrófilas que reaccionan con GSH ^[75]. Los productos de las reacciones de conjugación tienen peso alto molecular y tienden a ser menos activas que sus sustratos, además de que la adición de grupos aniónicos grandes, como la GSH, produce metabolitos más polares que

no pueden ser difundidos a través de la membrana ^[76]. Después de las reacciones de la fase II, los conjugados metabólicos deben ser metabolizados. En la fase III, los transportadores de la familia de las proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos (MRP) ^[77], se encargan de eliminar a los conjugados de GSH y algunas veces ofrecen protección contra químicos perjudiciales ^[78]. La regulación de estas tres fases enzimáticas juega un papel clave para contrarrestar las sustancias tóxicas del ambiente.

1.2.5 Activación de ARE mediada por Nrf2

La iniciación de la respuesta de estrés comprende los interruptores redox moleculares que inician la activación de la expresión génica para contrarrestar la respuesta. El resultado es mantener la homeostasis redox. Uno de estos reguladores maestros son los sistemas Nrf2/Keap1 ^[79] y NF- κ B/I κ B ^[80]. Los niveles del factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2) y su activación están controlados principalmente por la proteína asociada a proteína derivada de célula eritroide (ECH) tipo Kelch-1 (Keap1). En condiciones normales, Nrf2 se expresa en bajas cantidades. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo o ante la presencia de compuestos electrofílicos, Nrf2 se activa, induciendo la expresión de aproximadamente 1055 genes ^[81], entre los cuales se encuentran genes que tienen en su estructura al elemento de respuesta antioxidante de acción cis (ARE, 5'-GTGACNNGC-3') ^[67]. La secuencia ARE está presente en la región promotora de los genes involucrados en la respuesta antioxidante y detoxificante, proliferación celular, metabolismo, respuesta inmune, señalización, supervivencia y ciclo celular ^[82].

La activación de la transcripción génica a través de ARE es mediada primeramente por Nrf2, aislado por primera vez en experimentos de clonación ^[83]. En experimentos de transfección transitoria Nrf2 fue identificado como uno de los factores de transcripción que activan ARE en el gen NQO1 de humano ^[84]. Posteriormente, el papel que juega Nrf2 fue corroborada en experimentos *in vivo*, pues se observó que la activación de los genes

dependientes de ARE fue notablemente diferente en ratones deficientes de Nrf2 [79, 85]. Todos estos estudios aportaron evidencia de que Nrf2 controla la expresión de genes, tanto constitutivos como inducibles, mediados por ARE.

1.2.6 Estructura de Nrf2

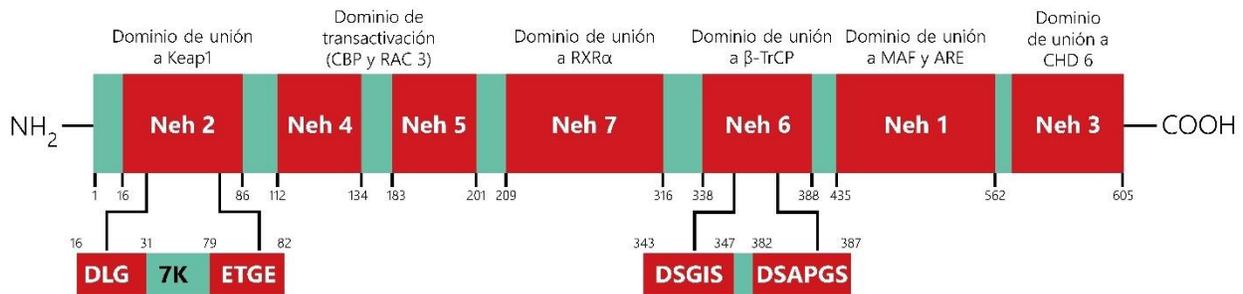


Figura 2. Estructura del Factor de transcripción Nrf2. Se muestran los 7 dominios Neh (Neh1-Neh7) que conforman la estructura de Nrf2.

Nrf2 es un factor de transcripción codificado en humanos por el gen NFE2L2. Pertenece a la familia de factores de transcripción Cap'n'Collar (CNC), que cuenta con una región básica de cremallera de leucina (bZip). Cuenta con 605 residuos de aminoácidos, y su movilidad electroforética indica que cuenta con un peso de 96-118 KDa, provocado principalmente por la abundancia de residuos ácidos [83]. Este factor de transcripción cuenta con 7 dominios Neh (Neh1-Neh7) que son importantes para su actividad y represión. El dominio Neh1 está implicado en la unión a ADN y la heterodimerización con las proteínas pequeñas Maf (sMaf) [86]. Los dominios Neh2 y Neh6 son regiones de degradación (secuencias de aminoácidos o estructuras en una proteína que participan en su degradación), que son blancos de Keap1 a través de los motivos DLG y ETGE de Neh2 y Neh6 que contiene los motivos DSGIS y DSAPGS donde sufren la ubiquitinación tras unirse a Keap1 [87]. Los dominios Neh3, Neh4 y Neh5 son dominios de transactivación a través de asociaciones con la helicasa con cromodominio de unión a ADN proteína 6 (CHD6), la proteína de unión a CREB (CBP) y la proteína C3 botulínica sustrato de toxina relacionadas con Ras 3 (RAC3) [88-90]. El dominio Neh7 está implicado en la represión de Nrf2 por el receptor X para retinoides alfa (RXRα) [91].

1.2.7 Papel y estructura de Keap1

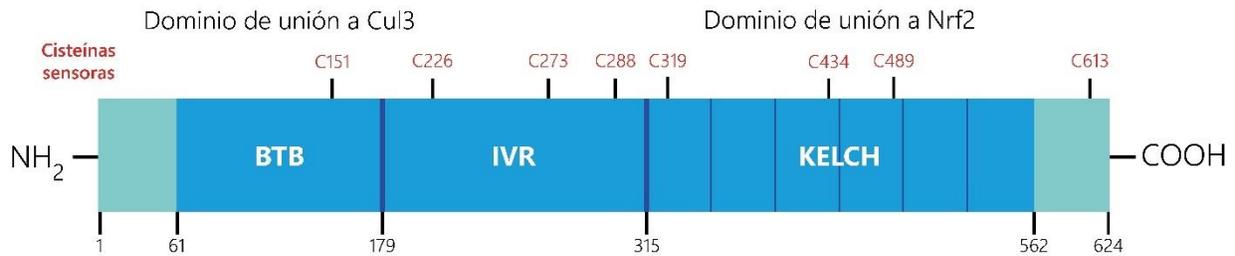


Figura 3. Estructura de la proteína Keap1. Se muestran los dominios BTB, IVR y el dominio Kelch con 6 motivos Kelch repetidos.

La proteína 1 Asociada A ECH tipo Kelch (Keap1) fue identificada por primera vez como un compañero de unión a Nrf2 basado en similitudes estructurales con la proteína Kelch en *Drosophila* [92]. Keap1 es un miembro de la familia de proteínas adaptadoras de sustrato BTB-Kelch. Las proteínas BTB-Kelch se dividen en proteínas KLHL y proteínas KBTB. Las proteínas KLHL consisten en un dominio N-terminal Broad-Complex, un dominio Tramtrack, un dominio BTB, un dominio BACK, y un dominio Kelch C-terminal de 5-6 motivos Kelch repetidos. Las proteínas KBTB consisten de un dominio BTB N-terminal y un dominio Kelch C-terminal de 2-4 motivos Kelch repetidos [93].

Como un miembro de la familia KLHL, Keap1 está compuesto de una región N-terminal (residuos 1-49), un dominio BTB (residuos 50-179) y un dominio Kelch C-terminal (residuos 327-611) con un dominio BACK denominado como región interviniente (IVR, residuos 180-314). Los dominios más importantes son los dominios BTB e IVR, que contienen residuos de cisteína importantes para la detección del estrés en el medio, y los motivos DGR y CTR que forman el dominio KELCH y que colaboran para formar un propulsor β donde interactúan con Nrf2 [94]. Se ha determinado que la estructura del dominio Kelch de Keap1 se une a un péptido de 16 aminoácidos de Nrf2 que contiene un motivo DxETGE altamente conservado [95].

El sistema Keap1-Nrf2 juega un papel importante en la respuesta antioxidante, contribuyendo a la citoprotección de perturbaciones en el balance redox. Bajo condiciones normales, el factor de transcripción Nrf2 es regulado de manera negativa por Keap1 mediante la poliubiquitinación y su subsecuente degradación en el proteosoma. Cuando las células se exponen al estrés oxidativo, un dominio Kelch de Keap1 se une a P62, permitiendo que Nrf2 quede libre y pueda ser degradado. Posteriormente, el motivo DLG se une a P21 que ayuda en su translocación al núcleo, permitiendo la expresión de varios genes que codifican para enzimas detoxificantes y proteínas antioxidantes ^[96] (Figura 4a y b). La expresión de estos genes ayuda a mitigar los efectos que ejercen ciertos agentes citotóxicos, además de reducir el número de proteínas pro-inflamatorias y aumentar las proteínas anti-inflamatorias y las enzimas de detoxificación ^[97].

1.2.8 Mecanismo y regulación de la vía Keap1-Nrf2-ARE

El sistema de defensa antioxidante es el mecanismo principal de defensa, de manera que las células emplean los antioxidantes para neutralizar los peligrosos efectos de los oxidantes y los electrófilos ^[98]. Los antioxidantes se pueden clasificar de acuerdo en la fuente, naturaleza y el mecanismo de acción en endógenos (antioxidantes metabólicos y enzimáticos) y exógenos (antioxidantes de nutrientes), o en antioxidantes directos, indirectos y bifuncionales ^[99]. Los antioxidantes directos son redox activos y de corta vida, que pueden ser consumidos durante procesos y se necesitan regenerar para seguir ofreciendo citoprotección, mientras que los indirectos pueden o no ser redox activos y con vidas relativamente largas, además de que exhiben sus efectos antioxidantes mediante la regulación de varios compuestos citoprotectores y de proteínas como NAD(P)H, NQO1, SOD, GST, GPx, la hemo-oxigenasa 1 (HO-1), la ligasa glutamato-cisteína (GCL), la catalasa y la tiorredoxina ^[100, 101]. Los principales componentes involucrados en la regulación de la respuesta antioxidante son: Keap1, Nrf2 y ARE ^[102].

La vía Keap1-Nrf2-ARE es la principal reguladora de la respuesta citoprotectora ante agentes endógenos y exógenos que provocan estrés oxidativo ^[103]. Las proteínas clave en esta vía de señalización son: Nrf2, que se une junto con las proteínas sMaf a ARE en las regiones reguladoras de los genes diana, y Keap1; una proteína represora que se une a Nrf2 y promueve su ubiquitinación y degradación en los proteosomas. Keap1 es una proteína rica en cisteínas, en ratón Keap1 tiene un total de 25 residuos de cisteínas y en humano 27, donde la mayoría pueden ser modificados *in vitro* por diferentes oxidantes y electrófilos ^[104]. De los residuos de cisteína, se ha observado que los residuos C273, C288 y C297, del dominio BTB ^[105], y C151, del dominio IVR ^[106], juegan un papel funcional debido a que alteran la conformación de Keap1 que conduce a la translocación nuclear de Nrf2 y la posterior expresión de los genes diana ^[96] (Figura 4).

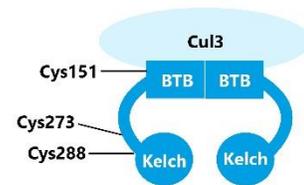
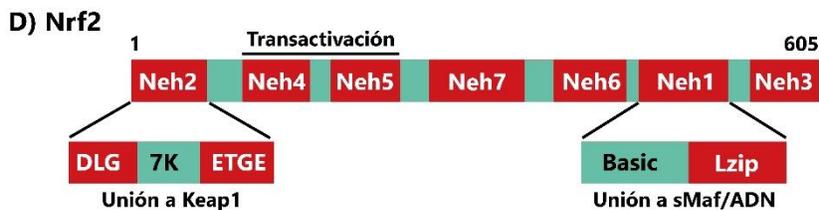
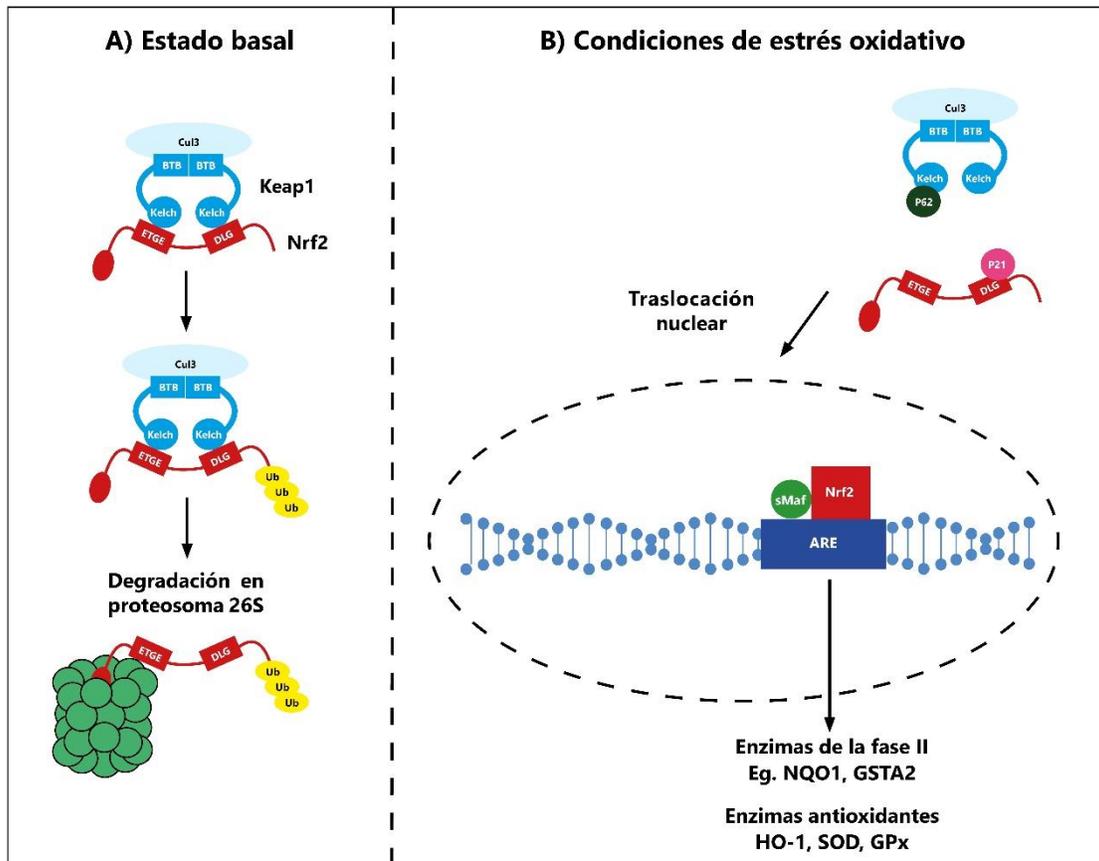


Figura 4. Función del factor de transcripción Nrf2. A) En condiciones basales, Nrf2 se une a la proteína Keap1, donde posteriormente es ubiquitinada y degradada en el proteosoma 26S. B) Bajo condiciones de estrés oxidativo, proteínas como p62 se unen a los dominios Kelch de Keap1, impidiendo que Nrf2 se una y sea degradado. De esta manera, y con ayuda de proteínas como p21, Nrf2 puede ser traslocado al núcleo donde se unirá a varias proteínas para poder regular los genes dependientes de Nrf2 y expresar enzimas de la fase II y antioxidantes. Como figuras complementarias, se muestra la C) estructura de Keap1 y D) la estructura de Nrf2.

Vía canónica de activación de Nrf2

En condiciones de homeostasis, la conformación de horquilla β de cuatro residuos en el motivo ETGE, en específico los aminoácidos E78, E79, T80, E82 y F83, interactúan con la superficie inferior de la estructura del propulsor β de seis láminas del dominio Kelch de un protómero del homodímero de Keap1 (Y334, S363, R380, D382, R415, R482, S508, Q530, S555 y S602), dando lugar a la conformación abierta, mientras que la conformación de la horquilla β de cuatro residuos que conforman el motivo DLG en Nrf2, específicamente los aminoácidos Q26, D27 y D29, interactúan de manera similar con la superficie inferior del propulsor β de seis laminas del dominio Kelch del segundo protómero del homodímero de Keap1 (D382, R415, R483, S508, S555, S602 y G603), dando lugar a la conformación cerrada [95, 107-109].

La conformación cerrada del complejo Keap1-Nrf2 permite la orientación adecuada de una hélice α en el dominio Neh2 para la ubiquitinación dependiente de Keap1 [110]. Este proceso requiere la presencia del Cul3 nedilado [111], y la proteína Rbx1 [112].

Por otra parte, los inductores de Nrf2 oxidan los residuos Cys en Keap1, conduciendo a un cambio conformacional en su estructura. Estos cambios estructurales en Keap1 inducen una conformación muy cercana entre Keap1-Nrf2, provocando una interacción. Sin embargo, en esta interacción, los residuos de Lys de Nrf2 no se encuentran orientados de manera correcta para que ocurra su ubiquitinación, disminuyendo la degradación de Nrf2. Subsecuentemente, ocurre un decremento en los niveles de Keap1, impidiendo que Nrf2 sea secuestrado y pueda ser traslocado al Núcleo. Para poder ingresar al núcleo, se necesita la fosforilación de los residuos S40 por la proteína quinasa C (PKC δ), S558 por la quinasa AMPK, y otros residuos sin identificar fosforilados por otras quinasas [113].

Dentro del núcleo, Nrf2 se heterodimeriza con las proteínas sMaf (MafF, MafG y MafK) a través de los dominios Bzip que se unen a la secuencia ARE, induciendo la activación de la

transcripción [86]. La heterodimerización de Nrf2 con otros factores de transcripción, como c-Jun, Sp-1 y JDP2, también incrementa la actividad de la transcripción [114, 115]. Además, la actividad nuclear de Nrf2 es regulada negativamente por la dimerización con c-Myc [116]. P65 compite con Nrf2 por la unión a CBP, disminuyendo la activación transcripcional de Nrf2 [117] mientras que los homodímeros de MafG también disminuyen la activación transcripcional de Nrf2 compitiendo por la unión a ARE [86].

Vía no-canónica de activación de Nrf2

Además de la vía canónica, recientemente se ha propuesto un nuevo mecanismo de activación de Nrf2. Este mecanismo de activación, denominado vía no-canónica de activación de Nrf2, involucra a varias proteínas (Tabla 4), como p62 [118], DPP3 [119], WTX [120], Protimosina α [121], PALB2 [122], P21 [123] y BRCA1 [124], las cuales tienen la habilidad de poder interrumpir al complejo Keap1-Nrf2 mediante la interacción directa con Keap1 o Nrf2.

La activación por la proteína p62 es el mecanismo no-canónico más estudiado. Esta proteína es capaz de interactuar con Keap1 de una manera similar a la interacción Keap1-Nrf2. El dominio KIR en p62 (³⁴⁵SKEVDPSTGELQSLQ³⁵⁹) interactúa con la superficie inferior del propulsor β de seis láminas del dominio Kelch de Keap1. Esta interacción involucra a los residuos D349, P350, S351, T352, E354 y L355 de p62, y a los residuos Y334, S363, R380, D382, R415, Q530, S555 y S602 de Keap1, con una afinidad muy similar a la observada entre Keap1 y el motivo DLG de Nrf2 [118]. Sin embargo, la fosforilación de S351 con p62 por mTORC1 [125] o TAK1 [126], incrementa la afinidad entre Keap1-p62 debido a la interacción adicional entre p-S351 de p62 y R483 y S508 de Keap1, sugiriendo que p62 compite contra el motivo ETGE de Nrf2 por unirse a Keap1 [125]. Además, se ha observado que en células MEF y HEK293 esta interacción induce la degradación de Keap1 y la subsecuente estabilización y activación de Nrf2 [127].

Tabla 4. Proteínas con la capacidad de interactuar con Keap1 o Nrf2

Proteínas de unión a Keap1	Motivo que interactúa
SQSTM1/p62	³⁴⁵ SKEVDPSTGELQSLQ ³⁵⁹
DPP3	⁴⁸⁰ ETGE ⁴⁸³
WTX	²⁸⁶ SPETGE ²⁹¹
Protimosina α	⁴¹ NEENGE ⁴⁶
PALB2	⁹¹ ETGE ⁹⁴
Proteínas de unión a Nrf2	Región N-Terminal
BRCA1	
p21	¹⁵⁴ KRR ¹⁵⁶

Silva-Islas y Maldonado, 2018 ^[113]

La dipeptidil peptidasa III (DPPT3) es una aminopeptidasa capaz de hidrolizar péptidos de con longitudes de 3 a 10 residuos aminoácidos. Participa en la regulación del estrés oxidativo a través de la modulación de Nrf2 mediante la interacción directa con Keap1 y su motivo ⁴⁸⁰ETGE⁴⁸³ y el dominio Kelch, disminuyendo la interacción de Keap1-Nrf2 en un proceso independiente de estrés oxidativo e independiente también de la actividad catalítica de DPP3. En células HEK293T, la sobreexpresión de DPP3 disminuyó la ubiquitinación e incrementó la translocación nuclear de Nrf2, con su consecuente activación y expresión de los genes diana ^[119]. Aunque este mecanismo usualmente protege a las células ante el estrés oxidativo y disminuye los niveles de las ROS, en células de cáncer de mama se observó que un incremento de DPP3 está asociado con la metástasis y la quimio resistencia ^[128].

La proteína supresora de tumores ligado al cromosoma X (WTX) está implicada en la regulación del estrés oxidativo a través de la activación de Nrf2. WTX tiene una secuencia similar al motivo ETGE en Nrf2, la secuencia ²⁸⁶SPETGE²⁹¹, mediante la cual puede interactuar con el dominio Kelch de Keap1 de una manera parecida a la interacción Keap1-Nrf2 ^[120]. La Protimosina alfa (ProT α) es una proteína nuclear involucrada en la proliferación celular y la protección ante la apoptosis, y actúa de manera similar a Nrf2, uniéndose al dominio Kelch de Keap1 ^[121]. La proteína compañero y localizador de BRCA2 (PALB2), es una proteína

nuclear que interactúa con BRCA1 y BRCA2, controlando su localización y estabilización. PALB2 interactúa con el dominio KELCH de Keap1 a través de la secuencia ⁹¹ETGE⁹⁴ en su estructura, muy similar al motivo ETGE que posee Nrf2, por lo tanto, PALB2 es capaz de competir con Nrf2 por la unión a Keap1 ^[122]. Niveles altos de WTX, ProTα o PALB2 disminuyen la ubiquitinación de Nrf2 mediante la unión a Keap1, incrementando la translocación nuclear de Nrf2 y permitiendo la expresión de los genes diana ^[113].

La proteína de cáncer de mama 1 funciona como un supresor de tumores y regula el ciclo celular. La sobreexpresión de BRCA1 protege a las células ante el estrés oxidativo activando la expresión de enzimas antioxidantes, además de que incrementa la actividad transcripcional de Nrf2. A diferencia de p62, DPP3, WTX, ProTα o BRCA1, BRCA1 interactúa con el motivo ETGE de Nrf2 a través de la región N-terminal, evitando que Keap1 pueda ubiquitinar a Nrf2 ^[124]. BRCA1 también regula a Nrf2 a nivel transcripcional mediante la interacción directa con la secuencia del elemento de respuesta a xenobióticos (XRE), localizado en el promotor de Nrf2 ^[129]. Además, Nrf2 regula BRCA1 por la presencia de la secuencia ARE en el promotor de BRCA1, creando una retroalimentación positiva, donde un incremento de Nrf2 incrementa los niveles de BRCA1 y viceversa ^[130].

1.2.9 La vía Keap1-Nrf2-ARE como blanco terapéutico

La vía Keap1-Nrf2-ARE induce una respuesta adaptativa para combatir al estrés oxidativo que de no evitarse podría conducir a enfermedades inflamatorias, incluyendo al cáncer, la diabetes, Alzheimer y Parkinson ^[96, 131-133]. Por lo tanto, la vía de señalización Keap1-Nrf2-ARE como blanco terapéutico se ha considerado como una estrategia racional para descubrir agentes preventivos y terapéuticos para condiciones que involucren inflamación.

Cáncer.

La activación de Nrf2 regula positivamente muchas enzimas conjugantes para la detoxificación de químicos carcinógenos, además de conferir protección ante la carcinogenicidad, mutagenicidad y otras formas de toxicidad ^[134, 135]. Se han demostrado las propiedades quimiopreventivas de los activadores de Nrf2, además de que varios activadores de la vía Nrf2 se han probado en ensayos clínicos para la prevención de varios tipos de cáncer ^[136-139].

Por otra parte, existe evidencia de que una alta expresión constitutiva de Nrf2 está presente en muchos tipos de cáncer, donde contribuye a generar resistencia ante los fármacos anticancerígenos, además de crear un ambiente propicio para el desarrollo de células cancerosas y mejorar su supervivencia ^[140]. Se han propuesto inhibidores del mecanismo de defensa antioxidante Nrf2. El brusatol, que es un quasinoide aislado de la planta *Brucea Javanica*, mostró ser un inhibidor de la vía Nrf2 que selectivamente reduce los niveles de Nrf2 mediante un aumento de ubiquitinación y degradación de Nrf2. Consecuentemente, la expresión de los genes dependientes de Nrf2 fue reducida, disminuyendo la capacidad protectora de la respuesta, además de inducir la apoptosis, la proliferación celular e inhibir el crecimiento de tumores ^[141]. Otro inhibidor de la vía Nrf2 es la luteolina, un flavonoide común que se encuentra en diversas plantas. La luteolina ha mostrado mejorar la respuesta de los fármacos empleados en la quimioterapia, sensibilizando a las células cancerosas mediante la inhibición de las enzimas antioxidantes y de la GST ^[142, 143]. Por lo tanto, la activación de Nrf2 puede ser un blanco para el tratamiento de cáncer, así como un blanco de quimiopreención en diferentes poblaciones de pacientes.

Enfermedades Neurodegenerativas.

Las enfermedades neurodegenerativas comparten varias características patológicas, como la acumulación de agregados de proteínas aberrantes, activación microglial y la

disfunción mitocondrial. Todos estos procesos patológicos son asociados con la generación de ROS, que causan estrés oxidativo y daño a moléculas esenciales, como lo son lípidos, proteínas y ADN ^[144]. Las modificaciones oxidativas afectan las funciones fisiológicas de los componentes celulares en el cerebro, causando depósitos anormales en las neuronas y en la glía en enfermedad de Parkinson, Alzheimer, Esclerosis Amiotrófica Lateral (ELA) y en la enfermedad de Huntington ^[145]. Sin embargo, es difícil distinguir si el estrés oxidativo es la causa o el efecto de la enfermedad es causada por la naturaleza multifactorial en la muerte celular y los efectos progresivos del estrés oxidativo en la célula. La clara asociación entre el daño oxidativo y las enfermedades han hecho que los sistemas antioxidantes sean un blanco atractivo ^[146].

Enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson es la segunda causa más común de enfermedades neurodegenerativas, con una alta prevalencia en Occidente ^[147]. Los principales signos del Parkinson incluyen temblor en reposo y pérdida de reflejos posturales. Otras condiciones clínicas incluyen síntomas motores y no motores ^[148]. A nivel celular, el Parkinson es caracterizado por la pérdida preferencial de las neuronas dopaminérgicas en la substantia nigra (SN) en el cerebro y la presencia de cuerpos de inclusión (Cuerpos de Levy) que contienen α -sinucleína (α -Syn) en varias regiones cerebrales, incluyendo a SN, el bulbo olfatorio y la neocorteza ^[149].

La activación de la vía Nrf2-ARE se ha propuesto como un blanco terapéutico en Parkinson ^[150, 151]. En células SK-N-SH de neuroblastoma, el hierro ferroso promueve la agregación de α -Syn mediante la inhibición de la vía Nrf2 ^[152]. Estas agregaciones agravan el daño oxidativo inducido por el hierro ferroso, la disfunción mitocondrial y la apoptosis. La sobreexpresión de los genes dependientes de Nrf2 hacen reversible la toxicidad, donde se puede retrasar la pérdida de las neuronas dopaminérgicas y la disfunción motora ^[153]. Por

otra parte, la delección genética de Nrf2 incrementa la toxicidad de α -Syn y exagera su acumulación en las neuritas dopaminérgicas y gliosis *in vivo* ^[154].

Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa más común, que conduce a la demencia y eventualmente a la muerte ^[155]. Es caracterizada por la pérdida de la integridad neuronal y la discapacidad de la memoria y deterioro cognitivo como resultado de la pérdida de neuronas y sinapsis ^[156]. Las características neuropatológicas de la enfermedad son las placas seniles extracelulares (SPs) y los ovillos neurofibrilares intracelulares (NFTs). Los NFTs están compuestos de microtúbulos asociados a la proteína tau, la cual es hiperfosforilada, así como también oxidada. Las SPs se componen principalmente del péptido A β , derivado del precursor de proteína beta amiloide (APP) ^[157].

Numerosos estudios han mostrado que la activación de Nrf2 puede atenuar la toxicidad causada por A β . Sin embargo, la mayoría de estudios están enfocados en la neuroprotección que otorga la activación de la vía Nrf2-ARE ante la generación de ROS y la muerte celular inducida por A β *in vitro* ^[158-161]. Sin embargo, en estudios *in vivo* la claridad de los efectos de la vía Nrf2 en A β es controversial. Un activador prototípico de Nrf2, la terbutilhidroquinona (tBHQ), se ha mostrado capaz de reducir la toxicidad inducida por la secreción de A β 1-42 en la línea celular derivada de teratocarcinoma embrionario humano NT2N ^[162]. Otro activador de Nrf2, el sulforafano, es capaz de mejorar la función cognitiva en modelos de ratón sin cambiar la solubilidad de A β ^[163]. También, la sobreexpresión de la catalasa mitocondrial, en ratones que sobreexpresan una forma mutante del precursor de proteína amiloide (APP) (Tg2576), redujo la longitud total de APP y su extremo c-terminal, bajando los niveles de A β soluble e insoluble y mejorando la memoria de trabajo ^[164].

Diabetes.

La Diabetes Mellitus (DM) se refiere a muchos desordenes metabólicos de distinta etiología, pero el más común y característico es la hiperglucemia debido a defectos en la secreción y/o acción de la insulina. Se clasifica en diabetes tipo 1 (T1DM) donde no se produce insulina, o diabetes tipo 2 (T2DM) causada por una escasa producción o acción de la insulina, además de conducir a la inflamación crónica ^[165]. Con más de 425 millones de personas afectadas a nivel mundial en 2015 y un estimado de 590 millones en 2030, la enfermedad se ha clasificado como una de las principales cuatro enfermedades no transmisibles por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ^[166].

El estrés oxidativo y la inflamación crónica están interconectados, donde teóricamente inhibir el estrés oxidativo parece una estrategia eficaz para tratar la diabetes y otras enfermedades derivadas, como complicaciones macrovasculares o renales. Las investigaciones han revelado que la expresión de enzimas antioxidantes, incluyendo HO-1, NQO1 y GPx son aumentadas significativamente en los riñones de pacientes diabéticos cuando son tratados con ácido salvianólico (SSA) solo o en combinación con metformina ^[167]. Por otra parte, en pacientes diabéticos y prediabéticos los niveles de Nrf2 se han mostrado bajos, así como la actividad antioxidante de GSH y GSL ^[168]. Estudios similares han encontrado que el agotamiento de Nrf2, así como la expresión de los genes dependientes de Nrf2, comprometen la capacidad antioxidante, resultando en una disfunción microvascular y a una desregulación en la respuesta miogénica, la cual es reversible al administrar sulforafano ^[169].

En ratones AKI, tanto isquémicos como nefrotóxicos, la deficiencia de Nrf2 está asociada con incremento en la mortalidad, acompañada de un aumento en la disfunción de los riñones y permeabilidad vascular ^[170]. Liu y colaboradores en 2009 ^[171] demostraron que la deficiencia de Nrf2 aumenta la susceptibilidad a lesiones agudas isquémicas y nefrotóxicas

en riñón. En 2013, Uruno y colaboradores ^[172] encontraron que la administración oral del inductor de Nrf2 CDDO-Im en ratones diabéticos (*db/db*), altero la expresión de genes antioxidantes, de consumo de energía y de gluconeogénesis en tejidos metabólicos. Además, la activación de la vía Nrf2 en ratones Keap1^{flox/-} y en cruce de ratones Keap1^{flox/-} con ratones *db/db*, atenuó los síntomas de la diabetes, mejorando de la secreción de insulina y a la disminución de la resistencia a insulina.

Enfermedades Cardiovasculares y Aterosclerosis.

En el sistema cardiovascular, Nrf2 se expresa de manera ubicua. La vía Keap1-Nrf2-ARE está íntimamente involucrada en la regulación de la homeostasis vascular, así como también en la protección ante la hipertrofia cardíaca y la falla cardíaca mediante la supresión del estrés oxidativo ^[173]. Por lo tanto, esta vía se ha convertido en un blanco para tratar enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis, una de las principales enfermedades cardíacas ^[174]. Durante el proceso de aterosclerosis, se reclutan y se retienen células inflamatorias que conducen a una persistente producción de citocinas y ROS que contribuyen al progreso de las lesiones ^[175]. Bajo este contexto, Nrf2 se considera una molécula protectora debido a la cantidad de genes antioxidantes que pueden atenuar la progresión de la aterosclerosis. Se ha observado que deficiencia de genes activados por Nrf2, como GPx-1 y HO-1, conduce a una proliferación acelerada de macrófagos, así como también formación de ROS y de citocinas pro-inflamatorias ^[176-178].

Enfermedades Respiratorias.

El sistema respiratorio es especialmente susceptible ante el estrés oxidativo. Este sistema es el primero en tener contacto con los oxidantes inhalados, cambiando el balance redox constantemente y de manera repetida. Debido a que se encuentra en constante exposición ante agentes externos, incluyendo oxidantes y contaminantes, el balance redox que mantiene Nrf2 es importante para las vías respiratorias ^[179]. La expresión pulmonar de

Nrf2 ocurre principalmente en el epitelio y en los macrófagos alveolares. La ausencia o delección de su expresión agrava la toxicidad pulmonar por múltiples fuentes oxidantes, como humo de cigarrillo, infecciones virales, endotoxinas bacterianas, hiperoxia y contaminantes del ambiente ^[180]. Varios estudios muestran que la deficiencia de Nrf2 está asociada a gran susceptibilidad para desarrollar Enfermedad Pulmonar Crónica Obstructiva (EPOC) ^[181], enfisema ^[182], asma ^[183], fibrosis pulmonar ^[184], síndrome de dificultad respiratoria aguda ^[185] y sepsis ^[186]. Por lo tanto, la activación de Nrf2 en los macrófagos alveolares parece un blanco prometedor para tratar numerosas enfermedades respiratorias.

Otras enfermedades y condiciones asociadas a la vía Keap1-Nrf2-Are.

Además de las enfermedades descritas anteriormente, el papel que juega Nrf2 y su potencial terapéutico ha sido investigado en numerosas enfermedades y tejidos. Investigaciones de enfermedades gastrointestinales, como la gastritis crónica y la colitis ulcerosa, sugieren que inhiben la señalización proinflamatoria, conduciendo al estrés oxidativo. Al activar la vía Nrf2, la célula refuerza su habilidad para neutralizar varios tipos de radicales libres ^[187], así como también preservar las estructuras de las uniones estrechas manteniendo la polaridad epitelial, la cual es esencial para la protección del tracto superior gastrointestinal ante el ácido gástrico ^[188, 189]. En hepatotoxicidad y en lesiones al hígado, Nrf2 se ha mostrado crucial para combatir dichas enfermedades. Múltiples estudios muestran que la activación o supresión de este factor de transcripción conduce a la progresión de enfermedades del riñón ^[190-195]. La vía Nrf2 también se involucra en respuestas inmunes e inflamatorias asociadas con infecciones ^[196], enfermedades autoinmunes ^[198, 199], y otras respuestas inmunes ^[200-202]. La gran cantidad de enfermedades y mecanismos biológicos donde se involucra la vía Keap-1-Nrf2-ARE muestra su clara importancia y su potencial farmacéutico para el desarrollo de nuevos fármacos.

1.2.10 Péptidos inhibidores de la interacción proteína-proteína Keap1-Nrf2

Búsqueda de la secuencia peptídica mínima.

El descubrimiento de la estructura de la interacción Nrf2-Keap1 trajo consigo el desarrollo de péptidos capaces de inhibir dicha interacción. La búsqueda de secuencias peptídicas mínimas a partir de la secuencia primaria es el acercamiento general para encontrar péptidos inhibidores. Identificar la secuencia mínima ayuda a entender los puntos principales de los péptidos inhibidores de la interacción proteína-proteína (PPI). Gracias a las estructuras de los co-cristales de Keap1-Nrf2 se pudieron encontrar las secuencias mínimas. En la región Nrf2 ETGE las secuencias mínimas correspondieron a 9-mer y 16-mer. En un inicio, el péptido 9-mer (LDEETGEFL) fue un buen punto de partida para investigaciones posteriores para otros péptidos ^[203].

En 2006, Lo y colaboradores ^[95] aíslan el complejo Keap1-Nrf2 y trabajan con los péptidos 10-mer, 14-mer y 16-mer para determinar la afinidad de dichos péptidos con la Keap1. En su investigación, encuentran que el péptido 10-mer es capaz de desplazar a Nrf2 de Keap1, pero no es tan efectivo como los péptidos 14-mer y 16-mer. El péptido 10-mer carece de una o más interacciones del esqueleto, por lo que péptidos más largos pueden estabilizar mejor la interacción. Posteriormente, en 2011 Chen y colaboradores ^[204] trabajan con los mismos péptidos y añaden 7-mer, 8-mer, 9-mer, 11-mer y 12-mer. Los resultados que obtienen son similares, donde los péptidos 7-mer y 8-mer presentan muy poca afinidad de unión ($K_d \gg 1000$ nM), mientras que 9-mer una afinidad moderada ($K_d = 352$ nM). Los péptidos con más de 9 residuos aminoacídicos tuvieron afinidades muy similares ($K_d = 31.3$ - 22.5 nM), encontrando que la secuencia mínima de un péptido para inhibir la interacción Nrf2-Keap1 es de al menos 9 aminoácidos. Resultados similares fueron obtenidos por Inoyama ^[205] y Marcotte ^[206] donde los péptidos mayores a 10-mer tienen una afinidad moderada a buena.

Por otro lado, Hancock y colaboradores en 2012 ^[207] encuentran otros péptidos 7-mer. El péptido FITC-7-mer contiene una β -Alanina en el extremo N-terminal que actúa como un enlazador entre FITC y el N-terminal. Esta β -Alanina tiene un efecto similar a la Leucina en el péptido 8-mer, por lo que se considera como un péptido 8-mer. Sin embargo, la diferencia principal del péptido 8-mer recae en que el último residuo es una Leucina en el extremo C-terminal, y este residuo no forma una interacción con la proteína Keap1. Además, el grupo de investigación de Hancock encuentra que el péptido Ac-7-mer (Ac-DEETGEF-OH) presenta una inhibición moderada (5.39 μ M), concluyendo que este tipo de péptidos 7-mer corresponden a la secuencia peptídica mínima para unirse con Keap1. De igual forma, Lu y colaboradores en 2015 ^[208] trabajan con el péptido Ac-7-mer (Ac-DEETGEF-OH) y Ac-9-mer (Ac-LDEETGEFL-OH), concluyendo que el reemplazo de un Glutamato por una Prolina, además de la Leucina en el extremo terminal, ayudan a imitar la conformación secundaria de horquilla β durante un tiempo prolongado, la cual es importante para la unión del péptido a Keap1.

Péptidos inhibidores con actividad celular.

Los dos residuos de Glutamato en los péptidos Nrf2 ETGE son importantes para la inhibición de Keap1-Nrf2. Sin embargo, a pesar de que estos residuos son importantes tanto para la estabilización como la unión a Keap1, desfavorecen en gran medida la permeabilidad en la célula. Por lo tanto, reducir los residuos ácidos y mejorando la lipofilicidad es el principal objetivo para desarrollar un péptido que pueda penetrar en la célula.

La forma más directa para investigar los efectos inhibitorios de los PPI es mediante la conjugación directa de péptidos de penetración celular (PPI). Steel y colaboradores ^[209] emplearon un activador transcripcional trans-activador (TAT) derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como péptido penetrante celular (CPP) para la construcción de péptidos Nrf2 ETGE capaces de penetrar la célula. El péptido Tat-14-mer logró elevar los

niveles de Nrf2 en la célula, además de regular positivamente el gen HO-1 tanto en niveles de mRNA como de proteína de manera dosis-dependiente en monocitos THP-1 de humano. También, este estudio mostró que este péptido inhibidor de Keap1-Nrf2 pudo también inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, demostrando su capacidad como potencial anti-inflamatorio.

Con la misma estrategia, el grupo de investigación de Zhao en 2011 ^[210] construyen un péptido similar, denominado Tat-CAL-DEETGE, que prueban en ratones con daño cerebral. Este péptido contiene una secuencia de calpaína (PLFAER) entre la secuencia Tat y el motivo Nrf2 ETGE, haciendo que el péptido sea sensible al incremento de calcio permitiendo la activación de Nrf2 ante lesiones específicas. Encuentran que este péptido incrementa significativamente los niveles de mRNA de los genes que regula Nrf2, además de encontrar que atenúa eficazmente el compromiso de la barrera hematoencefálica asociado a la lesión cerebral. En otro estudio realizado con el mismo péptido en ratones con daño cerebral e isquemia global cerebral, confirma que este péptido es capaz de inducir los genes citoprotectores que regula Nrf2, reduciendo el estrés oxidativo e induciendo una fuerte neuroprotección y una marcada preservación de las funciones cognitivas dependientes del hipocampo ^[211] (Tabla 5).

Tabla 5. Péptidos inhibidores de la interacción Keap1-Nrf2

Péptido	Secuencia	Referencia
H-7-mer	H-EETGEFL-OH	Chen <i>et al</i> , 2011
H-8-mer	H-DEETGEFL-OH	Chen <i>et al</i> , 2011
H-9-mer	H-LDEETGEFL-OH	Chen <i>et al</i> , 2011; Marcotte <i>et al</i> , 2013
H-10-mer	H-QLDEETGEFL-OH	Lo <i>et al</i> , 2006; Chen <i>et al</i> , 2011; Inoyama <i>et al</i> , 2012
H-11-mer	H-LQLDEETGEFL-OH	Chen <i>et al</i> , 2011
H-12-mer	H-QLQLDEETGEFL-OH	Chen <i>et al</i> , 2011
H-14-mer	H-FAQLQLDEETGEFL-OH	Lo <i>et al</i> , 2006; Chen <i>et al</i> , 2011
H-16-mer	H-AFFAQLQLDEETGEFL-OH	Lo <i>et al</i> , 2006; Chen <i>et al</i> , 2011; Inoyama <i>et al</i> , 2012
Ac-7-mer	Ac-DEETGEF-OH	Hancock <i>et al</i> , 2012
Ac-7-mer	Ac-DPETGEL-OH	Hancock <i>et al</i> , 2012; Lu <i>et al</i> , 2015
FITC-7-mer	FITC-β-Ala-DEETGEF-OH	Hancock <i>et al</i> , 2012
Ac-9-mer	Ac-LDEETGEFL-OH	Lu <i>et al</i> , 2015
Tat-14-mer	YGRKKRRQRRRLQLDEETGEFLPIQ	Steel <i>et al</i> , 2012
DEETGE-CAL-Tat	NH ₂ -RKKRRQRRRPLFAERLDEETGEFLP-NH ₂	Zhao <i>et al</i> , 2011; Tu <i>et al</i> , 2015

CAPÍTULO DOS

Planteamiento del problema

En condiciones normales, el factor de transcripción Nrf2 interacciona con la proteína Keap1 a través de dos motivos, ETGE y DLG, causando su degradación en la célula. Por otro lado, en condiciones de estrés oxidativo, donde algunas de las cisteínas en Keap1 sufren oxidación, esta interacción es inhibida, lo que permite que Nrf2 se libere y pueda translocarse al núcleo para expresar genes de protección a estrés oxidativo. Por lo tanto, una interrupción selectiva del sistema Keap1–Nrf2 sugiere la posibilidad de desarrollar fármacos con capacidad antioxidante y antiinflamatoria. Por otro lado, datos preliminares sugieren que el péptido IDR-1002 es capaz de translocar a Nrf2 al núcleo y dadas sus características fisicoquímicas, este fenómeno podrían surgir debido a su capacidad de inhibir la interacción Keap1–Nrf2^[212]. Dada la complejidad de estudiar este fenómeno a nivel atómico utilizando técnicas experimentales, un estudio computacional de la posible interacción de Nrf2 y el péptido IDR-1002 puede esclarecer los detalles del mecanismo por el cual IDR-1002 es capaz de translocar Nrf2 al núcleo y así activar la transactivación de genes citoprotectores.

Específicamente, un tipo de péptidos reguladores de la defensa innata (IDR) catiónicos, han mostrado la capacidad de translocar a Nrf2 al núcleo, donde éste es capaz de regular la expresión de varios genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, por medio del reconocimiento de una secuencia específica de ADN conocida como ARE^[212]. En este trabajo de investigación, se pretende identificar los modos de interacción de al menos un péptido catiónico IDR y el factor de transcripción Nrf2 utilizando métodos computacionales. Un entendimiento de las interacciones más relevantes, es fundamental para el subsecuente desarrollo y diseño de péptidos capaces de inhibir la unión Nrf2–Keap1, lo que conduciría, sin duda alguna, a un tratamiento para diversas enfermedades, en donde la expresión de los

genes ayudaría a combatir el estrés oxidativo en las células, evitando así el daño celular y previniendo el desarrollo de otras enfermedades.

CAPÍTULO TRES

Justificación

Dada la gran cantidad de evidencia sobre la relevancia del factor Nrf2 en varias enfermedades, el desarrollo de compuestos capaces de inhibir directamente la interacción entre Keap1 y Nrf2 se ha vuelto un tema de suma importancia en el ámbito de la salud humana. Existen numerosas investigaciones acerca de las propiedades médicas y terapéuticas de moléculas pequeñas, tanto sintéticas como naturales, que inducen la expresión de los genes dependientes de ARE. La mayoría de los activadores de Nrf2 son inhibidores indirectos de la interacción Keap1–Nrf2. Estos inhibidores son especies electrofílicas o metabólicamente transformadas *in vivo* para ser electrofílicas, que tienen la función de reaccionar con los grupos tiol de los residuos de cisteína de Keap1 mediante oxidación o alquilación. Sin embargo, estos inhibidores electrofílicos representan un problema debido a que su falta de especificidad y selectividad supone un riesgo al interactuar con otros blancos celulares causando posibles efectos tóxicos.

Recientemente, la inhibición directa de la interacción Keap1–Nrf2 se ha vuelto una estrategia atractiva para la activación de Nrf2. El descubrimiento de sistemas moleculares pequeños que actúen selectivamente como inhibidores de la vía Keap1–Nrf2 vislumbra un camino muy prometedor debido a la posibilidad de disminuir los efectos tóxicos, incrementar

su estabilidad y biodisponibilidad, en comparación con inhibidores indirectos. Por esta razón, el estudio de inhibidores directos de Nrf2 se ha vuelto una tarea importante que requiere una caracterización desde un punto de vista experimental y computacionales para lograr una comprensión integral de los mecanismos de interacción de las entidades biomoleculares en el ambiente celular.

Particularmente, la caracterización de los mecanismos de interacción de péptidos catiónicos capaces de translocar a Nrf2 al núcleo es indispensable para sentar las bases de un posible inhibidor con propiedades terapéuticas, es fundamental (Maldonado, 2018).

CAPÍTULO CUATRO

Hipótesis

Los péptidos catiónicos IDR, particularmente IDR-1002, son capaces de inhibir la interacción de Nrf2 y Keap1 a través de su interacción directa con el primero, permitiendo la translocación al núcleo de Nrf2 y con ello, la activación de genes citoprotectores. En este contexto, utilizando métodos computacionales, será posible identificar los modos de interacción directa entre IDR-1002 y Nrf2 lo que será fundamental para soportar la posible actividad terapéutica de este tipo de péptidos para combatir el estrés oxidativo celular.

CAPÍTULO CINCO

Objetivos

5.1 Objetivo General

Investigar los mecanismos de interacción entre el factor de transcripción Nrf2 (dominio de baja afinidad, DLG) y péptidos catiónicos, particularmente, el péptido IDR-1002 empleando métodos computacionales. Asimismo, determinar a las interacciones más relevantes en la formación del complejo Nrf2-IDR-1002.

5.2 Objetivos Específicos

- 1) Realizar cálculos de docking molecular entre el dominio DLG de Nrf2 y el péptido IDR-1002 (VQRWLIVWRIRK-NH₂).
- 2) Evaluar las diferentes poses moleculares del péptido y seleccionar a los mejores candidatos.
- 3) Realizar simulaciones de dinámica molecular de los complejos para verificar la validez de las interacciones identificadas previamente.
- 4) Analizar los resultados de las simulaciones para poder proponer un mecanismo de interacción entre dichos sistemas biomoleculares.

CAPÍTULO SEIS

Metodología

Para la realización de esta tesis se utilizarán diversas técnicas computacionales incluyendo acoplamiento (*docking*) molecular, así como simulaciones atomísticas de dinámica molecular para identificar los mecanismos de interacción del complejo Nrf2 y IDR-1002.

Acoplamiento molecular de Nrf2 y IDR-1002.

Para el acoplamiento molecular entre Nrf2 y el péptido IDR-1002, se utilizará el programa *PIPER-flexPepDock*. Esta herramienta computacional utiliza la estructura tridimensional de la proteína, en este caso el motivo de baja afinidad (DLG) de Nrf2 y la secuencia de aminoácidos del péptido, IDR-1002 (VQRWLIVWRIRK-NH₂). La fortaleza de esta herramienta computacional no solamente reside en la concepción original de su algoritmo que se centra en sistemas proteína-péptido, sino en su capacidad de identificar posibles poses moleculares cuando no existe información alguna del sitio de interacción de las dos especies. Como sabemos, en la mayoría de las ocasiones, en su estado no enlazado, los péptidos no presentan una estructura definida y, por lo tanto, no existe información experimental estructural de ellos. Es por esta razón, que se eligió utilizar esta herramienta, la cual consideramos la mejor para identificar posibles poses entre Nrf2 y IDR-1002.

Simulaciones de dinámica molecular del péptido IDR-1002 con Nrf2.

Las interacciones entre el péptido IDR-1002 y Nrf2 serán determinadas utilizando métodos computacionales, específicamente, se realizarán simulaciones atomísticas de dinámica molecular. Dichas simulaciones están basadas en conceptos de fisicoquímica y termodinámica estadística que nos ofrecerán información a nivel atómico-molecular sobre

las posibles interacciones entre las dos biomoléculas. La información obtenida será analizada y contrastada con los resultados experimentales disponibles y nuevas hipótesis serán examinadas y evaluadas. El sistema molecular consistirá en el motivo de baja afinidad (DLG) de Nrf2 localizado en el centro de una caja de moléculas de agua donde además estará presente el péptido IDR-1002. Los grupos ionizables de las cadenas laterales tanto de la proteína como del péptido, corresponderán a su estado de protonación más probable a un pH de 7.0. Todo el sistema (compuesto por alrededor de 21,000 átomos) será neutralizado con iones de sodio y cloro. Con la finalidad de emular el ambiente fisiológico nativo, el sistema será simulado a una presión de 1 atmósfera y a una temperatura de 37 °C. El campo de fuerza, el cual indica la manera en que las diferentes entidades moleculares interactúan, corresponderá a CHARMM36. Los sistemas se prepararán con el programa Visual Molecular Dynamics (VMD) y las simulaciones de dinámica molecular con el programa NAMD. Las simulaciones se realizarán utilizando infraestructura local (laboratorio de Química Teórica, BUAP) y utilizando parte del tiempo de cómputo otorgado en el *Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México, LNS*.

CAPÍTULO SIETE

Resultados y Discusión

Acoplamiento molecular

Los desafíos que presentan los acoplamientos globales de péptidos flexibles se han tratado de diversas maneras, como reducir el espacio conformacional que será muestreado tanto para los grados de libertad internos del péptido como para las orientaciones de cuerpo rígido de la molécula a tratar. Sin embargo, la mayoría de acoplamientos moleculares de este tipo siguen ofreciendo acercamientos limitados en la calidad del modelamiento y su aplicación en general. El protocolo *PIPER-FlexPepDock*, representa una herramienta robusta y con alta precisión para los acoplamientos péptido-proteína ^[213]. Como se menciona en la metodología, se empleó el programa previamente mencionado, y se realizó un acoplamiento molecular del péptido IDR-1002 con el dominio Neh2 de Nrf2 que contiene el motivo DLG, también denominado dominio de baja afinidad (3WN7.pdb).

Nuestros resultados de acoplamiento molecular arrojaron un total de 10 posibles conformaciones entre Nrf2-IDR-1002. Basados en características importantes, como la presencia de interacción con el motivo DLG y que la conformación estuviera del mismo lado donde se une Keap1, se tomaron dos modelos. La unión del péptido con el motivo DLG es importante debido a que se necesita que al menos se una a este motivo para inhibir la interacción. La idea principal de considerar dichos criterios fue tratar de competir por las mismas interacciones observadas en el complejo Nrf2-Keap1, además de que la unión al motivo DLG es particularmente importante debido a que alinea correctamente las lisinas en el dominio Neh2 de Nrf2 para una correcta y eficiente ubiquitinación en Nrf2 ^[109].

El resultado del acoplamiento molecular para el modelo 1 muestra que existe una interacción por puente salino entre R9 y D27^{Nrf2}, además que R9 interactúa con Q26^{Nrf2}. Existe una interacción entre K12 y D29^{Nrf2} del motivo DLG. Los residuos básicos R11 y K12 no interactúan directamente con Nrf2, pero están localizados en una región cercana al residuo D29^{Nrf2} del motivo DLG. Finalmente, ocurren interacciones aromáticas entre F39^{Nrf2} y W4, así como otro puente de sal entre R3 y E35^{Nrf2} (Figura 5).

Nrf2 (Motivo DLG en dominio Neh2)

MDLIDILWRQDIDLGVSRVFD

Péptido IDR-1002

VQRWLIVWRIRKG

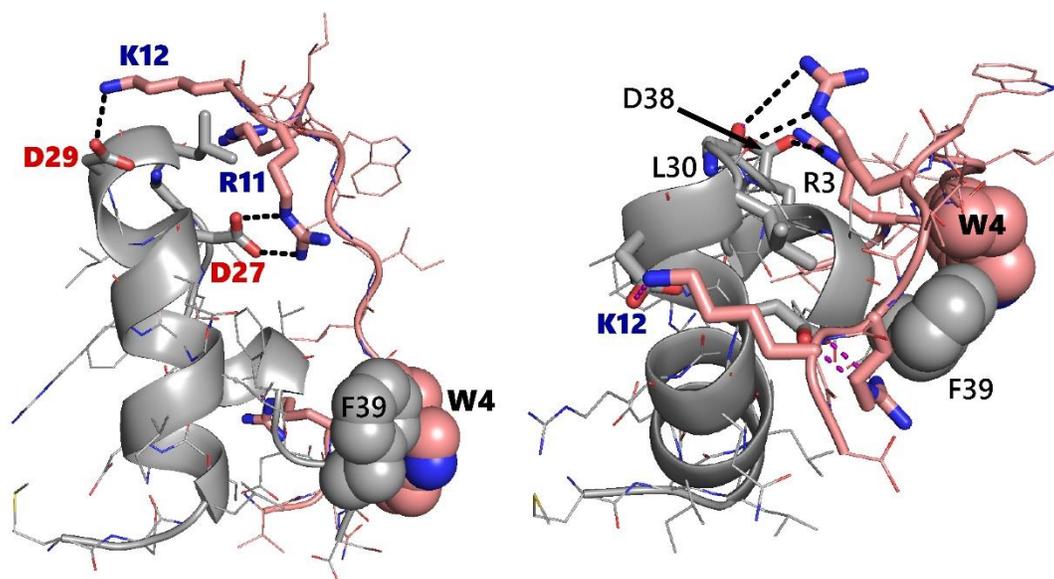


Figura 5. Interacciones entre Nrf2-IDR-1002 del modelo 1. En este modelo existe una interacción carga-carga entre R11 y D27^{Nrf2}. Además, existe una interacción del mismo tipo entre K12 y D29^{Nrf2} (parte del motivo DLG). En este modelo, el residuo R9 parece formar interacciones con los grupos CO de la cadena principal de los residuos L30^{Nrf2} y G31^{Nrf2}, ambos partes del motivo DLG. Existen interacciones aromáticas entre F39 y W8^{Nrf2}.

El resultado del acoplamiento molecular para el modelo 2 muestra que existe una interacción por puente salino entre R11 y D27^{Nrf2}. Existe una interacción directa entre K12 y D29^{Nrf2} del motivo DLG. El residuo básico R9 forma una interacción con el grupo carbonilo del esqueleto de L30^{Nrf2}, y posiblemente con G31^{Nrf2} (Ambos pertenecen al motivo DLG).

Además, el anillo aromático de F39^{Nrf2} presenta una interacción π - π con W4, así como otro puente salino entre R3 y E35^{Nrf2} (Figura 6).

Nrf2 (Motivo DLG en dominio Neh2)

MDLIDILWR**QDI****DLG**VSREVFDFS

Péptido IDR-1002

VQRWLIVW**RIR**KG

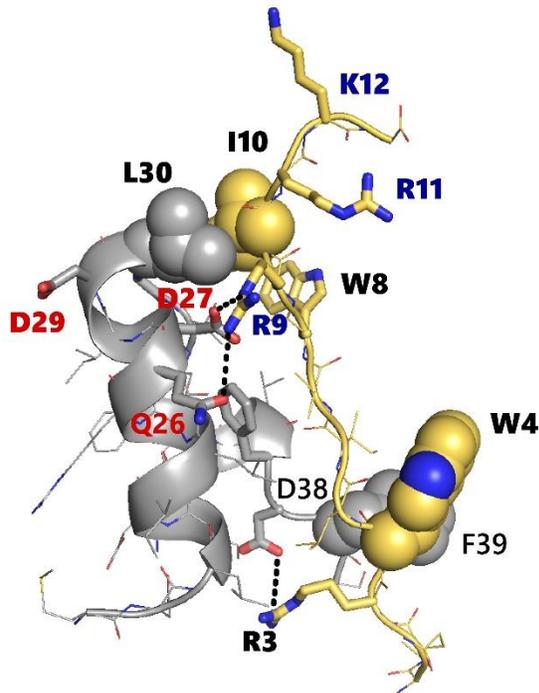


Figura 6. Interacciones entre Nrf2-IDR-1002 del modelo 2. En este modelo, existe una interacción carga-carga entre R11 y D27^{Nrf2} mientras que R9 interactúa con Q26^{Nrf2}. Además, interacciones aromáticas entre F39 y W4^{Nrf2} también están presentes.

Simulaciones de dinámica molecular

Con la idea de validar las interacciones de los complejos de la figura 5, se utilizó la técnica computacional de simulaciones atómicas de dinámica molecular. Ambos modelos fueron hidratados con moléculas de agua, además se incorporaron iones de sodio y cloro para poder obtener una solución salina de 0.15 M. Cada sistema estuvo compuesto por ~20,000 átomos, y se simuló durante 1000ns (500 millones de pasos), utilizando la infraestructura computacional proporcionada por el *Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México* (LNS). En la figura 7 y 9 se muestran los resultados de la simulación

para ambos modelos. En la figura 11, se presenta el análisis temporal detallado de las interacciones, la cual se basa en calcular la distancia entre dos diferentes residuos a lo largo de la simulación. También, se proporciona una tabla que resume las interacciones para ambos modelos (Tabla 6).

Modelo 1

Los resultados de la simulación para el modelo 1 muestran que las interacciones entre los residuos R3 con E35^{Nrf2}, V1 (+NH₃) con D38^{Nrf2}, R9 con D27^{Nrf2} y W8 con D27^{Nrf2} se forman a los pocos nanosegundos de haber iniciado la simulación, manteniéndose así hasta que la simulación concluye. Sin embargo, la interacción entre R11 con D27^{Nrf2}, que en un principio estaba formada, se pierde a los pocos nanosegundos de simulación.

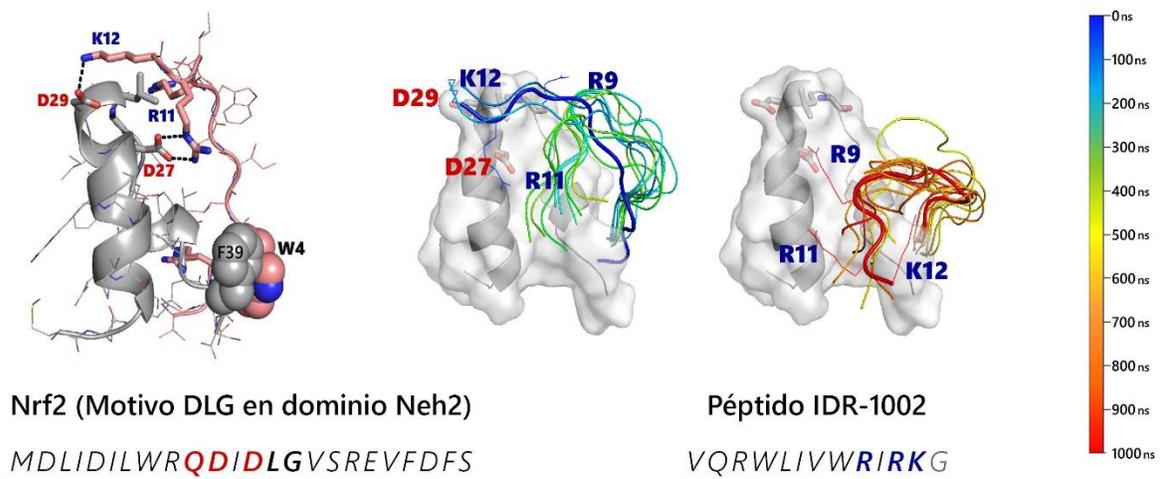


Figura 7. Modelo 1 del complejo Nrf2/IDR-1002 considerado a partir de los resultados del acoplamiento molecular. A) En este modelo existe una interacción carga-carga entre R11 y D27^{Nrf2}. Además, existe una interacción del mismo tipo entre K12 y D29^{Nrf2} (parte del motivo DLG). En este modelo, el residuo R9 parece formar interacciones con los grupos CO de la cadena principal de los residuos L30^{Nrf2} y G31^{Nrf2}, ambos partes del motivo DLG. Finalmente, interacciones aromáticas entre F39 y W4^{Nrf2} están presentes. B) y C) La evolución temporal de las diferentes poses moleculares obtenidas a partir de los cálculos de acoplamiento molecular fue investigada mediante simulaciones de dinámica molecular para el modelo 1. Los colores en las conformaciones del péptido IDR-1002 indican diferentes estructuras representativas tomadas cada 50ns a lo largo de toda la

simulación (1000ns). Por claridad, en B) se muestran las conformaciones de los primeros 500ns, mientras que en C) las conformaciones representativas de 500 a 1000ns. A la derecha se encuentra una barra de colores auxiliar mientras que las respectivas secuencias de cada una de las entidades se encuentran en la parte de debajo de la figura. En azul está la posición original del péptido mientras se desplaza hacia el color rojo (ver barra de colores), vamos observando la evolución del péptido a lo largo de la trayectoria. Inicialmente, existen cambios importantes en las conformaciones adoptadas por el péptido, sin embargo, a partir de aproximadamente 600ns, el péptido parece haber encontrado conformaciones estables (formando una conformación de "U" alrededor del dominio DLG de Nrf2), las cuales son mantenidas por el resto de la simulación.

Para este modelo, se mencionan cinco interacciones, cuatro carga-carga y una de naturaleza polar, detallando su comportamiento:

Interacción 1A R11 y D27^{Nrf2}. La distancia de interacción entre ambos residuos es baja desde el comienzo de la simulación (4 Å aproximadamente). En una trayectoria que va desde 0 a 550ns, ocurren pequeñas fluctuaciones en las distancias, pero la interacción se mantiene. Sin embargo, pasando los 550ns la distancia aumenta considerablemente y se mantiene fluctuando hasta concluir los 1000ns, indicando que la interacción se ha perdido y que la orientación de ambos residuos ha cambiado.

Interacción 1B R3 y E35^{Nrf2}. Esta interacción se forma a los pocos nanosegundos de simulación (50ns) y se mantiene durante toda la simulación.

Interacción 1C V1+(NH₃) y D38^{Nrf2}. En esta interacción, la parte N-terminal del péptido está cargada positivamente, y rápidamente establece una interacción carga-carga con el residuo D38^{Nrf2}. Esta interacción presenta un comportamiento similar a la interacción 1B, y se mantiene a lo largo de la simulación.

Interacción 1D R9 y D27^{Nrf2}. Al inicio de la simulación, esta interacción no está formada. Se mantiene oscilando en valores altos de distancia hasta que alcanza los 550ns aproximadamente. Posteriormente, la interacción toma lugar y se mantiene hasta que

finaliza. Cabe señalar que, esta interacción se relaciona con la interacción 1A, debido a que el residuo D27^{Nrf2} participa en ambas interacciones y en un comienzo está interactuando con R3, pero posteriormente se pierde su interacción y pasa a formar una nueva con el residuo R9.

Interacción 1E W8 y D27^{Nrf2}. Esta interacción presenta un comportamiento similar al observado en la interacción 1D y parece ser consecuencia de ella. La interacción no está formada en un inicio, y la distancia entre ambos residuos se mantiene oscilando en valores altos hasta que alcanza los 600ns de simulación, donde finalmente la interacción es formada y mantenida.

Análisis de RMSD

Para evaluar la estabilidad de cada complejo de proteína-péptido, el análisis del RMSD de los carbonos alfa fue calculado durante los 1000ns de simulación (Figura 8). El análisis RMSD obtenido para el modelo 1 revela que en los primeros 100ns de la simulación el movimiento que presenta el péptido es muy bajo, sin embargo, el movimiento aumenta rápidamente debido a que el péptido busca una posición más estable. Durante el intervalo de tiempo de simulación de 600-1000ns el movimiento del péptido se mantiene más o menos constante, indicando que ha alcanzado una posición estable donde varios residuos del péptido pueden estar interactuando con Nrf2.

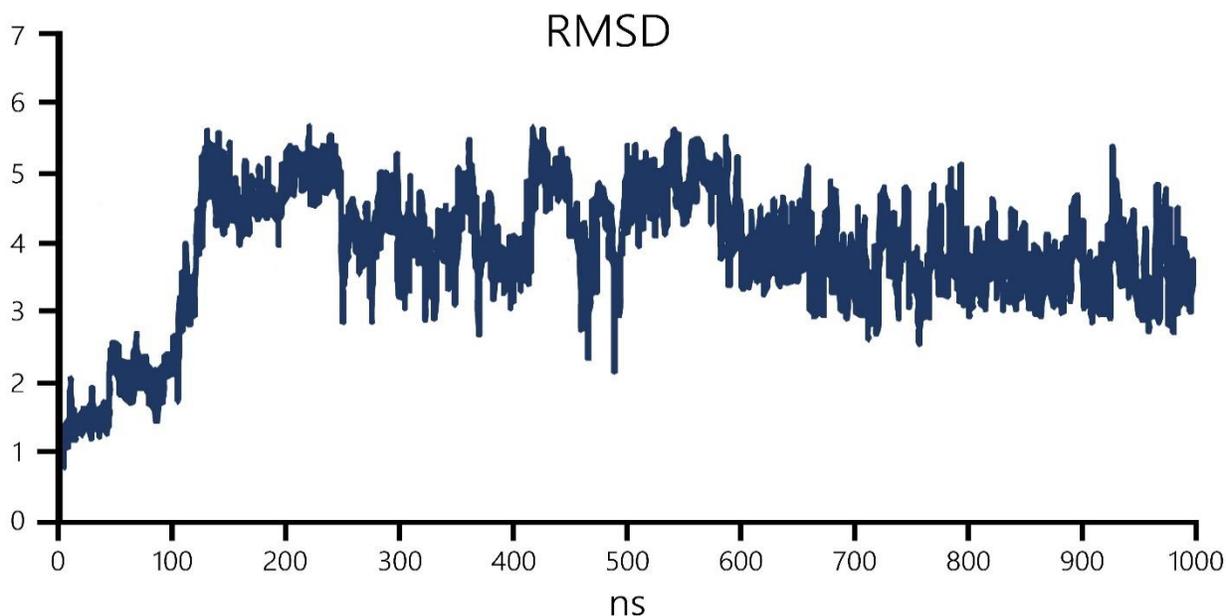


Figura 8. Análisis de RMSD del modelo 1. En el eje X de las gráficas se muestran los nanosegundos de simulación, y en el eje de las Y el RMSD en Å. Se observa que en el intervalo que va de 0-550ns el péptido explora diferentes orientaciones. Sin embargo, posteriormente encuentra una orientación estable y se mantiene así hasta que finaliza.

Modelo 2

Los resultados de la simulación para el modelo 2 muestran que las interacciones entre los residuos R11 y D27^{Nrf2} se forman eventualmente, además de que, una vez al formarse, se mantienen hasta concluir la simulación. La interacción entre R9 y D27^{Nrf2} está formada desde el inicio y se mantiene en toda la simulación. Además, las interacciones de los residuos R9 con D29^{Nrf2}, K12 con D29^{Nrf2} y R3 con D18^{Nrf2} se forman, pero se pierden conforme el tiempo de simulación progresa.

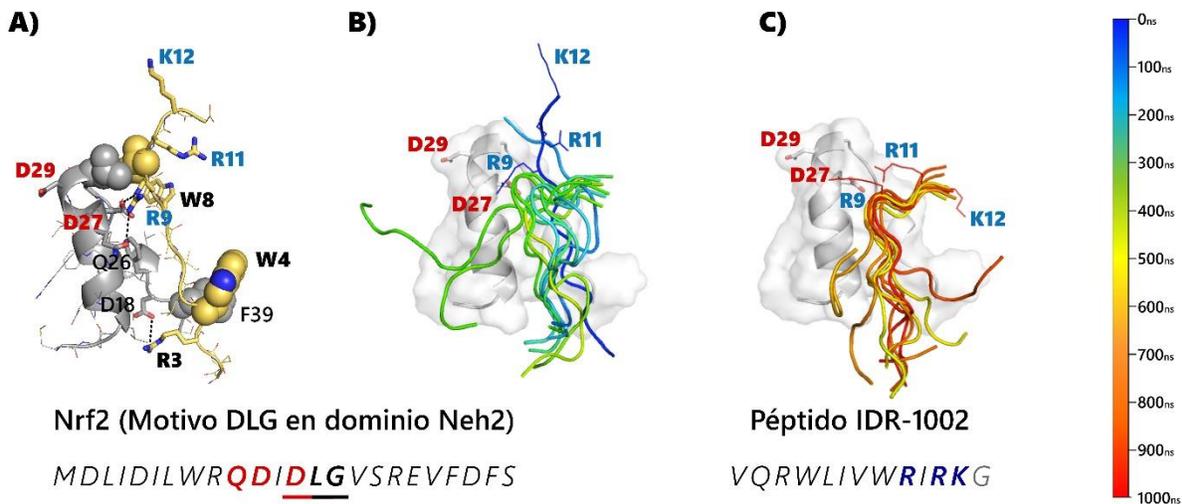


Figura 9. Modelo 2 del complejo Nrf2/IDR-1002 considerado a partir de los resultados del acoplamiento molecular. A) En este modelo, existe una interacción carga-carga entre R11 y D27^{Nrf2} mientras que R9 interactúa con Q26^{Nrf2}. Además, existen interacciones aromáticas entre F39 y W4^{Nrf2}. B) y C) Resultados de las simulaciones de dinámica molecular del modelo 2 del complejo de Nrf2 con IDR-1002. De manera similar a la figura 8, la evolución temporal de las diferentes poses moleculares, obtenidas a partir de los cálculos de acoplamiento molecular, fue investigada. Los colores en las conformaciones del péptido IDR-1002 indican diferentes estructuras representativas tomadas cada 50ns a lo largo de toda la simulación (1000ns). Por claridad, en B) se muestran las conformaciones de los primeros 500ns mientras que en C) las conformaciones representativas de 500 a 1000ns. A la derecha se encuentra una barra de colores auxiliar mientras que las respectivas secuencias de cada una de las entidades se encuentran en la parte de debajo de la figura. En azul está la posición original del péptido mientras que como nos desplazamos hacia el color rojo (ver barra de colores), vamos observando la evolución del péptido en la trayectoria. Al igual que en el caso del modelo 1, durante aproximadamente la primera mitad de la simulación, el péptido explora distintas conformaciones hasta que alrededor de 650ns, el segmento C-terminal parece haber encontrado conformaciones estables. Es de notar, que el extremo N-terminal del péptido, muestra mayor flexibilidad en este modelo.

De manera detallada y específica, las interacciones a las que se harán referencia corresponden a cinco interacciones carga-carga:

Interacción 2A R11 y D27^{Nrf2}. El residuo R11 es un residuo básico localizado en la mitad del péptido, mientras que D27^{Nrf2} está implicado en la interacción directa con el complejo Nrf2-Keap1. Al comienzo de la simulación, ambos residuos están separados por una distancia >10 Å. Sin embargo, a los pocos nanosegundos de iniciar la simulación, la interacción toma lugar y se mantiene por el resto de la trayectoria.

Interacción 2B R9 y D27^{Nrf2}. Esta interacción, formada desde el comienzo de la simulación, se pierde a los pocos nanosegundos de comenzar la simulación, donde R9 y D27^{Nrf2} alcanzan una distancia de hasta 12 Å aproximadamente. No obstante, esta interacción vuelve a formarse y se mantiene hasta que la simulación concluye.

Interacción 2C R9^{IDR-1002} y D29^{Nrf2}. Ocurre una formación de la interacción, pero esta se pierde conforme la simulación transcurre. En un inicio, el residuo R9^{IDR-1002} está a una distancia considerable del residuo D29^{Nrf2} (≈ 14 Å), pero esta interacción presenta una fluctuación alta a los 100ns de simulación, indicando un cambio en su orientación. Sin embargo, esta interacción se estabiliza. Al alcanzar los 250ns de simulación, la distancia entre los dos residuos se vuelve muy pequeña < 4 Å, pero al alcanzar 450ns de simulación nuevamente ocurre una fluctuación, y la interacción se pierde.

Interacción 2D K12 y D29^{Nrf2}. Esta interacción no está formada al comienzo de la simulación, pero se forma a los pocos nanosegundos. Así mismo, la interacción se pierde al poco tiempo de simulación, y se mantiene fluctuando durante toda la simulación en intervalos de distancia considerables (15-23 Å aproximadamente). El comportamiento de ambos residuos indica que, a pesar de no formarse una interacción, se mantiene la orientación de ambos residuos.

Interacción 2E R3 y D18^{Nrf2}. La distancia de esta interacción se vuelve muy pequeña a los pocos nanosegundos de simulación, alcanzando aproximadamente 4 Å, indicando la formación de la interacción. Al alcanzar los 300ns de simulación, ocurre una fluctuación y la distancia aumenta rápidamente hasta alcanzar los 25 Å aproximadamente. Posteriormente, la distancia entre ambos residuos se mantiene fluctuando en intervalos bastante amplios, indicando que no logra mantener su orientación conforme avanza la simulación.

Análisis de RMSD

Este análisis para el modelo 2 mostró que, inicialmente, el péptido presenta cierta estabilidad hasta alcanzar los 400ns aproximadamente, donde muestra un elevado movimiento del reflejado en intervalos de distancia altos (2-8 Å). En el análisis se pueden observar que ocurren diversos cambios respecto a la orientación inicial del péptido. En los 300ns de simulación aproximadamente, el péptido experimenta un cambio en su orientación, marcado por una variación en la distancia (3 -7 Å). Otro cambio de orientación ocurre entre los 400-500ns, donde intenta mantenerse en la misma posición hasta los 900ns, donde nuevamente vuelve a cambiar su orientación. Lo anterior indica que el péptido no encuentra una posición estable, además de que el péptido parece encontrar múltiples orientaciones para unirse (Figura 11).

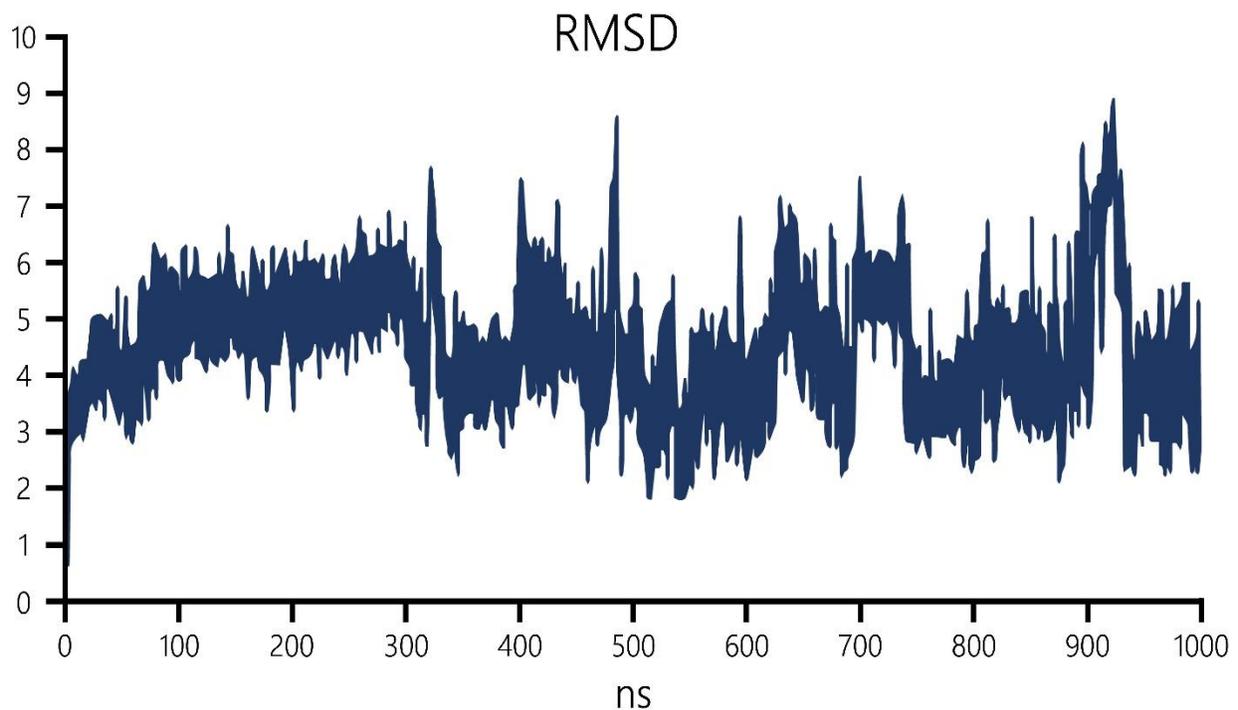


Figura 11. Análisis de RMSD del modelo 2. En el eje X de las gráficas se muestran los nanosegundos de simulación, y en el eje de las Y el RMSD en Å. Se observa que el comportamiento del péptido durante toda la simulación explora distintas conformaciones, donde el mayor movimiento fue registrado en un intervalo de 300-1000ns.

Distancias de las interacciones

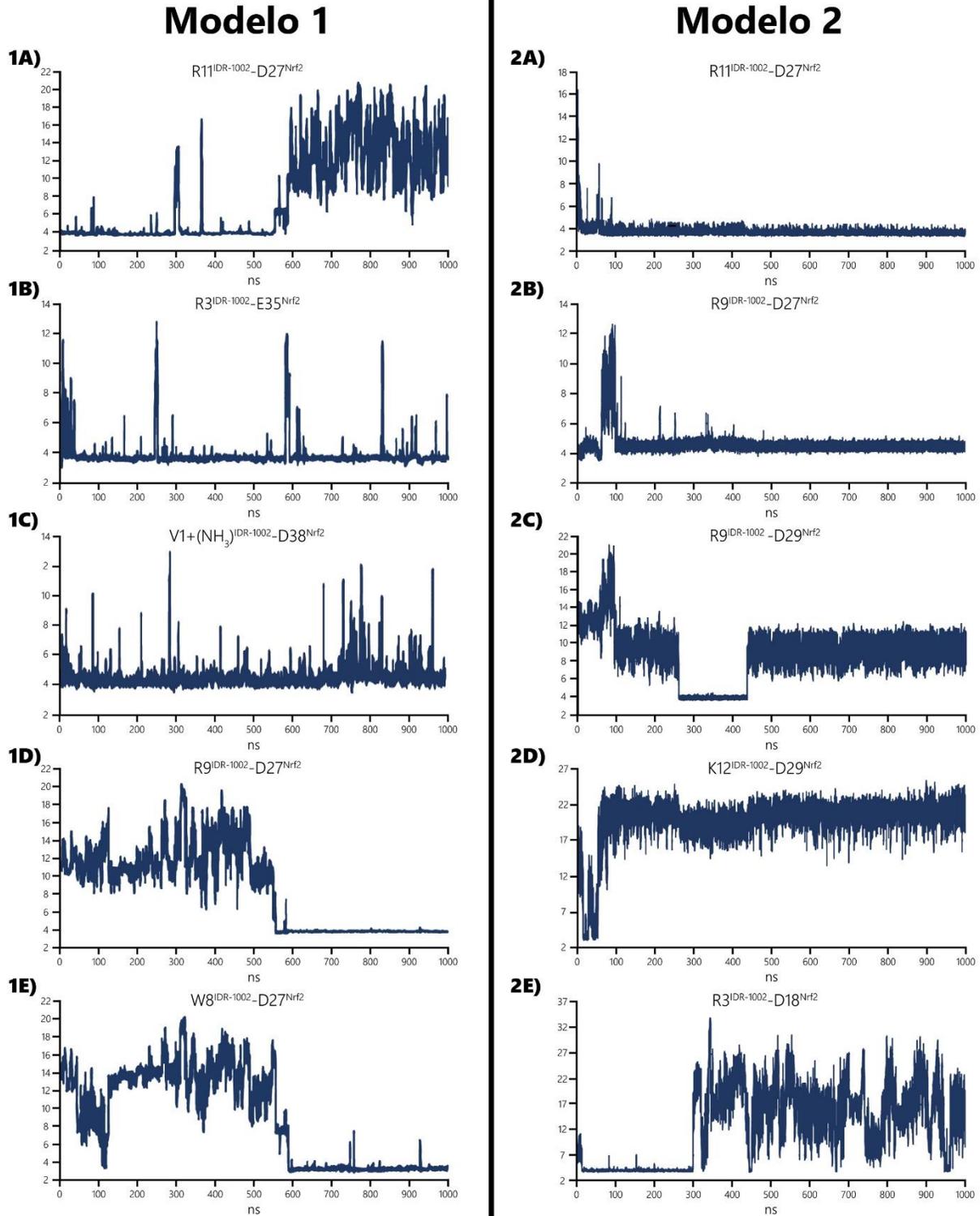


Figura 11. Análisis de distancias de las interacciones del modelo 1 y 2. En el eje X de las gráficas se muestran los nanosegundos de simulación, y en el eje de las Y las distancias entre los residuos de la interacción en Å. En

el modelo 1 se muestra que la interacción 1A) se mantiene durante el inicio de simulación, pero pasando los 550ns de simulación se pierde. Las interacciones 1B) y 1C) se mantienen durante todo el tiempo de simulación, mientras que las interacciones 1D) y 1E) se forman a los 550ns de simulación y se mantienen hasta que concluyen. En el modelo 2 se muestra que la interacción 2A) está formada y se mantiene durante toda la simulación. La interacción 2B) se pierde a los pocos nanosegundos de simulación, pero se vuelve a formar rápidamente. No obstante, las interacciones 2C), 2D) y 2E) se pierden durante la simulación.

Tabla 6. Resumen de las diversas interacciones y su resultado a lo largo de 1000ns de simulación de dinámica molecular para ambos modelos.

Modelo 1	
Interacción	Resultado
Interacción 1A, R11 y D27 ^{Nrf2}	Interacción perdida
Interacción 1B, R3 y E35 ^{Nrf2}	Interacción formada y mantenida
Interacción 1C, V1(+NH3) y D38 ^{Nrf2} .	Interacción formada y mantenida
Interacción 1D, R9 y D27 ^{Nrf2}	Interacción formada y mantenida
Interacción 1E, W8 y D27 ^{Nrf2}	Interacción formada y mantenida
Modelo 2	
Interacción	Resultado
Interacción 2A, R11 y D27 ^{Nrf2}	Interacción formada y mantenida
Interacción 2B, R9 y D27 ^{Nrf2}	Interacción perdida, formada nuevamente y mantenida
Interacción 2C, R9 y D29 ^{Nrf2}	Interacción formada y perdida
Interacción 2D, K12 y D27 ^{Nrf2}	Interacción formada y perdida
Interacción 2E, R3 y D18 ^{Nrf2}	Interacción formada y perdida

Conclusiones

Empleando diversos métodos computacionales, se propone un mecanismo detallado acerca de la interacción entre el factor de transcripción Nrf2 y el péptido catiónico IDR-1002. Esta interacción se presume que sea capaz de inhibir la interacción del complejo Nrf2-Keap1, el cual ha sido considerado como un blanco terapéutico de suma importancia. En nuestro análisis, se identificó la interacción entre los residuos R9 y D27^{Nrf2}, crucial puesto que, aunque los complejos de nuestro modelo 1 y 2 son diferentes, la interacción entre dichos residuos (Interacción 1D y 2C respectivamente) se mantuvo en ambos modelos. En el modelo 1 parece ser aún más importante debido a que esta interacción es consecuencia de la pérdida de la interacción 1A, además de que hace posible la interacción 1E dada la cercanía de los residuos en el péptido y la orientación que este presenta. Las interacciones que involucran a los residuos en el extremo N-terminal, como las interacciones 1B y 2E, son solamente importantes para el modelo 1. Las interacciones que involucran al residuo básico R11, solo es importante en el modelo 2 (interacción 2A). La interacción 2D parece no tener ninguna relevancia debido a que no se forma durante la simulación. Con este estudio, se sientan las bases para una nueva manera de inducir la liberación de Nrf2, mediante ligantes que interactúen con Nrf2 y no con Keap1.

10. Referencias Bibliográficas

1. Dror, R. O; Dirks, R. M; Grossman, J. P; Xu, H; Shaw, D. E. (2012). Biomolecular Simulation: A Computational Microscope for Molecular Biology. *Annu Re. Biophys*, Vol. 41, pp: 421-452.
2. Heitler, W. y London, F. (1927). Wechselwirkung neutraler Atome und homöopolare Bindung nach der Quantenmechanik. *Z Phys*, Vol. 44, pp: 455-472.
3. PediaPress. (2011). Computational Science. En: Computer Science: An Overview (12da Edición). *PediaPress*, Mainz, Alemania.
4. Schaefer, H. F. (1972). The electronic structure of atoms and molecules. *Addison-Wesley Publishing Co.* Massachusetts, EE.UU. pp: 146.
5. Richards, W. G; Walter T. E. H; Hinkley, R. K. (1971). A bibliography of *ab initio* molecular wave function. *Clarendon Press*, Oxford, Reino Unido.
6. Allinger, N. (1977). Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 99, No. 25, pp: 8127-8134.
7. Fernbach, S; y Haskell, A. (1970). Computers and Their Role in the Physical Sciences. *Routledge*.
8. Lipkowitz, K. B. y Boyd, D. B. (2007). Reviews in Computational Chemistry (Vol. 1). *John Wiley & Sons. Inc.*
9. Lengauer, T. y Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Curr Opin Struct Biol*, Vol. 6, No. 3, pp: 402-406.
10. Jain, A. N. y Nicholls, A. (2008). Recommendations for evaluation of computational methods. *J Comput Aided Mol Des*, Vol. 22, pp: 133-139.
11. Monika, G; Punam, G; Sarbjot, S; Gupta, G. D. (2010). An overview on molecular docking. *Int J Drug Dev Res*, Vol. 2, No. 2, pp: 219-231.
12. Kitchen, D. B; Decornez, H; Furr, J. R; Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Rev Drug Discov*, Vol. 3, No. 11, pp: 935-949.
13. Kolb, P. e Irwin, J. J. (2009). Docking screens: right for the right reasons? *Curr Top Med Chem*, Vol. 9, pp: 755-770.
14. Sheng-You, H. (2017). Comprehensive assessment of flexible-ligand docking algorithms: current effectiveness and challenges. *Brief. Bioinformatics*, Vol. 19, No. 5, pp: 982-994.
15. Hospital, A; Goñil, J. R; Orozco, M; Gelpí, J. L. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Adv Appl Bioinform Chem*, Vol. 8, pp: 37-47.
16. McCammon, J. A; Gelin, B. R; Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, Vol. 267, No. 5612, pp: 585-590.
17. Roccatano, D; Barthel, A; Zacharias, M. (2007). Structural flexibility of the nucleosome core particle at atomic resolution studied by molecular dynamis simulation. *Biopolymers*, Vol. 85, No. 5-6, pp: 407-421.

18. Brandman, R; Brandman, Y; Pande, V. S. (2012). A-site residues move independently from P-site residues in all-atom molecular dynamics simulations of the 70S bacterial ribosome. *PLoS One*, Vol. 7, No. 1, e:29377.
19. Rahman, A. Correlations in the motion of atoms in liquid argon. *Phys Rev*, Vol. 136, No. 2A, pp: A405-A411.
20. Alder, B. J. y Wainwright, T. E. (1957). Phase transition for a hard sphere system. *J Chem Phys*, Vol. 27, No. 5, pp: 1208-1209.
21. Larsson, P; Hess, B; Lindahl, E. (2011). Algorithm improvements for molecular dynamics simulations. *Wires Comput Mol Sci*, Vol. 1, pp: 93-108.
22. Duan, Y. y Kollman, P. A. (1998). Pathways to protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution. *Science*, Vol. 282, pp: 740-744.
23. Martinez-Mayorga, K; Pitman, M. C; Grossfield, A; Feller, S. E; Brown, M. F. (2006). Retinal counterion switch mechanism in vision evaluated by molecular simulations. *J Am Chem Soc*, Vol. 128, pp: 16502-16503.
24. Pérez, A; Luque, F. J; Orozco, M. (2007). Dynamics of B-DNA on the microsecond time scale. *J Am Chem Soc*, Vol. 129, pp: 14739-14745.
25. Freddolino, P. L; Liu, F; Gruebele, M; Schulten, K. (2008). Ten-microsecond molecular dynamics simulation of a fast-folding WW domain. *Biophys J*, Vol. 94, pp: L75-L77.
26. Lindorff-Larsen, K; Maragakis, P; Piana, S; Shaw, D. E. (2016). Picosecond to Millisecond Structural Dynamics in Human Ubiquitin. *J Phys Chem B*, Vol. 120, pp: 8313-8320.
27. Klepeis, J. L; Lindorff-Larsen, K; Dror, R. O; Shaw, D. E. (2009). Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function. *Curr Opin Struct Biol*, Vol. 19, pp: 120-127.
28. Shaw, D. E; Dror, R. O; Salmon, J. K; Grossman, J. P; Mackenzie, K. M; et al. (2009). Millisecond-scale molecular dynamics simulations on Anton. *Proc Conf High Performance Computing, Networking, Storage and Analysis (SC09)*, Nueva York: ACM.
29. Phillips, J. C; Stone, J. E; Schulten, K. (2008). Adapting a message-driven parallel application to GPU-accelerated cluster. *Proceedings of the 2008 ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC08)*, ACM Press.
30. Luttmann, E; Ensign, D. L; Vaidyanathan, V; Houston, M; Rimon, N; Oland, J; Jayachandran, G; Friedrichs, M; Pande V. S. (2009). Accelerating molecular dynamic simulations on the cell processor and PlayStation 3. *J Comput Chem*, Vol. 30, pp: 268-274.
31. Friedrichs, M. S; Eastman, P; Vaidyanathan, V; Houston, M; Legrand, S; Beberg, A. L; Ensign, D. L; Bruns, C. M; Pande, V. S. (2009). Accelerating molecular dynamic simulation on graphics processing units. *J Comput Chem*, Vol. 30, pp: 864-872.
32. González, M. A. (2011). Force fields and molecular dynamics simulations. *JDN*, Vol. 12, pp: 169-200.
33. Ponder, J. W. y Case, D. A. (2003). Force Fields for Protein Simulations. *Adv Protein Chem*, Vol. 66, pp: 27-85.

34. Robustelli, P; Piana, S; Shaw, D. E. (2018). Developing a molecular dynamics force field for folded and disordered protein states.
35. Henzler-Wildman, K. A; Thai, V; Lei, M; Ott, M; Wolf-Watz, M; Fenn, T; Pozharski, E; Wilson, M. A; Petsko, G. A; Karplus, M; Hübner, C. G; Kern, D. (2007). Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. *Nature*, Vol. 450, pp: 838-844.
36. Sfriso, P; Emperador, A; Orellana, L; Hospital, A; Gelpi, J. L; Orozco, M. (2012). Finding conformational transition pathways from discrete molecular dynamics simulations. *J Chem Theory Comput*, Vol. 8, No. 11, pp: 4707-4718.
37. Sfriso, P; Hospital, A; Emperador, A; Orozco, M. (2013). Exploration of conformational transition pathways from coarse-grained simulations. *Bioinformatics*, Vol. 29, No. 16, pp: 1980-1986.
38. Orellana, J; Rueda, M; Ferrer-Costa, C; López-Blanco, J. R; Chacón, P; Orozco, M. A. (2010). Approaching elastic network models to molecular dynamics flexibility. *J Chem Theory Comput*, Vol. 6, No. 9; pp: 2910-2923.
39. Hawkins, P. C. D. y Nicholls, A. (2012). Conformer generation with OMEGA: learning from the data set and the analysis of failures. *J Chem Inf Model*, Vol. 52, No. 11, pp: 2919-2936.
40. Klett, J; Cortés-Cabrera, A; Gil-Redondo, R; Cago, F; Morreale, A. (2014). ALFA: Automatic ligand flexibility assignment. *J Chem Inf Model*, Vol. 54, No. 1, pp: 314-323.
41. Nabuurs, S.B; Wagener, M; De Vlieg, J. A. (2007). A flexible approach to induced fit docking. *J Med Chem*, Vol. 50, No. 26, pp: 6507-6518.
42. Emperador, A; Solernou, A; Sfriso, P; Pons, C; Gelpi, J. L; Fernández-Recio, J; Orozco, M. (2013). Efficient relaxation of protein-protein interfaces by discrete molecular dynamics simulation. *J Chem Theory Comput*, Vol. 9, No. 2, pp: 1222-1229
43. Csermely, P; Palotai, R; Nussinov, R. (2010). Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments: an extended view of binding events. *Trends Biochem Sci*, Vol. 35, No. 10, pp: 539-546.
44. Ivetac, A. y McCammon, J. A. (2011). A molecular dynamics ensemble-based approach for the mapping of druggable binding sites. *Methods Mol Biol*, Vol. 819, pp: 3-12.
45. Lindorff-Larsen, K; Piana, S; Dror, R. O; Shaw, D. E. (2011). How fast-folding proteins fold. *Science*, Vol. 334, No. 6055, pp: 517-520.
46. Dorn, M; Silva, M. B; Buriol, L. S; Lamb, L. C. (2014). Three-dimensional protein structure prediction: methods and computational strategies. *Comput Biol Chem*, Vol. 53, pp: 251-276.
47. Lance, B. K; Deane, C. M; Wood, G. R. (2010). Exploring the potential of template-based modelling. *Bioinformatics*, Vol. 26, No. 15, pp: 1849-1856.
48. Roy, A; Kucukural, A; Zhang. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, Vol 5, No. 4, pp: 725-738.
49. Sali, A. y Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, Vol. 234, No. 3, pp: 779-815.

50. Raval, A; Piana, S; Eastwood, M. P; Dror, R. O; Shaw, D. E. (2012). Refinement of protein structure homology models via long, all-atom molecular dynamics simulations. *Proteins*, Vol. 80, No. 8, pp: 2071-2079.
51. Selye, H. (1936). A síndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, Vol. 138, p: 32.
52. Sies, H. (1985). 1 – Oxidative Stress: Introductory Remarks. En: *Oxidative Stress* (1° Ed.). *Academic Press*, Lóndres, pp: 1-8.
53. Herrmann, J. M. y Dick, T. P. (2012). Redox Biology on the rise. *Biol Chem*, Vol. 393, No. 9, pp: 999-1004.
54. Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr Opin Toxicol*, Vol. 7, pp: 122-126.
55. Sies, H. y Jones, D. (2007). Oxidative stress. En: Fink G. (2da Ed.). *Elsevier*, Amsterdam, pp: 45-48.
56. Luschkak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem-Biol Interact*, Vol. 224, pp: 164-175.
57. Lobo, V; Patil, A; Phatak, A; Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.*, Vol. 4, No. 8, pp: 118-26.
58. Cheeseman, K.H. y Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, Vol. 49, No. 3, pp: 481-93.
59. Mukherji, S.M. y Singh, S.P. (1986). *Reaction mechanism in organic chemistry*. Madras: Macmillan Indian Press.
60. Young, I.S. y Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.*, Vol. 54, No. 3, pp: 176-86.
61. Valko, M; Leibfritz, D; Moncol, J; Cronin, M.T; Mazur, M; Telser, J. (2007). *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, Vol. 39, No. 1, pp: 44-84.
62. Loschen, G; Flohé, L; Chance, B. (1971). Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett.*, Vol. 18, pp: 261-4.
63. Phaniendra, A; Jestdi, D.B; Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.*, Vol. 30, No. 1, pp: 11-26.
64. Finkel, T. y Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, Vol. 408, pp: 239-47.
65. Hrycay, E.G. y Bandiera, S.M. (2015). Involvement of cytochrome P450 in reactive oxygen species formation and cancer. *Adv. Pharmacol.*, Vol. 74, pp: 35-84.
66. Friling, R.S; Bensimon, A; Tichauer, Y; Daniel, V. (1990). Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophilie-responsive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 87, pp: 6258-62.
67. Rushmore, T.H; Morton, M.R; Pickett, C.B. (1991). The antioxidante responsive element. Activation by oxidative stress and identification of DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.*, Vol. 226, No. 18, pp: 11632-9.

68. Rushmore, T.H; King, R.G; Paulson, K.E; Pickett, C.B. (1990). Regulation o glutathione S-transferase Ya subunit gene expresión: identification of a unique xenobiotic responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 87, pp: 3826-30.
69. Nguyen, T; Nioi, P; Pickett, C.B. (2009). The Nrf2-Antioxiddant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.*, Vol. 284, No. 20, pp: 13291-5.
70. Raghunath, A; Sundarraj, K; Nagarajan, R; Arfuso, F; Bian, J; Kumar, A.P; Sethi, G; Perumal, E. (2018). Antioxidant Response Elements: Discovery, Classes, Regulation and Potential Applications. *Redox Biol.*, Vol. 17, pp: 297-314.
71. Xu, C; Li, C.Y; Kong, A.N. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.*, Vol. 28, pp: 249-68.
72. Lewis, D.F. (2003). Human cytochromes P450 ssociated with the phase 1 metabolism of drugs and other xenobiotics: a compilation of substrates and inhibitors of the CYP1, CYP2 and CYP3 families. *Curr. Med. Chem.*, Vol. 10, pp: 1955-72
73. Baranczewski, P; Stańczyk, A; Sundberg, K; Svensson, R; Wallin, A; Jansson, J; Garberg, P; Postlind, H. (2006). Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol. Rep.*, Vol. 58, No. 4, pp: 453-72.
74. Jakoby, W.B; Ziegler, D.M. (1990). The enzymes of detoxication. *J. Biol. Chem.*, Vol. 265, No. 34, pp: 20715-8.
75. Strange, R.C; Jones, P.W; Fryer, A.A. (2000). Glutathione S-ransferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett.*, Vol 112-113, pp: 357-63.
76. Akagah, B; Lornier, A.T; Fournet, A; Figadère, B. (2008). Oxidation of antiparasitic 2-substituted quinolines using metalloporphyrin catalysts: scale-up of a biomimetic reaction for metabolite production of drug candidates. *Org. Biomol. Chem.*, Vol. 6, No. 24, pp: 4494-7.
77. Homolya, L; Váradi, A; Sarkadi, B. (2003). Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucoronate or sulfate. *BioFactors*, Vol. 17, No. 1-4, pp: 103-14.
78. Mizuno, N; Niwa, T; Yotsumoto, Y; Sugiyama, Y. (2003). Impacto f drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol. Rev.*, Vol. 55, pp: 425-61.
79. Itoh, K; Chiba, T; Takahashi, S; Ishii, T; Igarashi, K, Katoh, Y; Oyake, T; Hayashi, N; Satoh, K; Hatayama, I; Yamamoto, M; Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 236, pp: 313-322.
80. Schreck, R; Albermann, K; Baeuerle, P. A. (1992). Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic Res Commun*, Vol. 17, pp: 221-237.

81. Malhotra, D; Portales-Casamar, E; Singh, A; Srivastava, S; Arenillas, A; Happel, C; Shyr, C; Wakabayashi, N; Kensler, T.W; Wasserman, W.W; Biswal, S. (2010). Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.*, Vol. 38, No. 17, pp: 5718-34.
82. Suzuki, T. y Yamamoto, M. (2017). Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress. *J Biol Chem*, Vol. 292, pp: 16817-16824.
83. Moi, P; Chan, K; Asunis, I; Cao, A, Kan, Y.W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 91, pp: 9926-30.
84. Venugopal, R. y Jaiswal, A.K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase₁ gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 93, pp: 14960-5.
85. McMahon, M; Itoh, K; Yamamoto, M; Chanas, S.A; Henderson, C.J; McLellan, L.I; Wolf, C.R; Cavin, C; Hayes, J.D. (2001). The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res.*, Vol. 61, pp: 3299-307.
86. Li, W; Yu, S; Liu, T; Kim, J.H; Blank, V; Li, H; Kong, A.N. (2008). Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1783, pp: 1847-56.
87. McMahon, M; Thomas, N; Itoh, K; Yamamoto, M; Hayes, J.D. (2004). Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, No. 30, pp: 31556-67.
88. Katoh, Y; Itoh, K; Yoshida, E; Miyagishi, M; Fukamizu, A; Yamamoto, M. (2001). Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and a synergistically activate transcription. *Genes to Cells*, Vol. 6, No. 10, pp: 857-68.
89. Kim, J.H; Yu, S; Chen, J.D; Kong, A.N. (2013). The nuclear cofactor RAC3/AIB1/SRC-3 enhances Nrf2 signaling by interacting with transactivation domains. *Oncogene*, Vol. 32, pp: 514-27.
90. Nio, P; Nguyen, T; Sherratt, P.J; Pickett, C.B. (2005). The carboxy-Terminal Neh3 Domain of Nrf2 Is Required for Transcriptional Activation. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 25, No. 24, pp: 10895-906.
91. Wang, H; Liu, K; Geng, M; Gao, P; Wu, X; Hai, Y; Li, Y; Li, Y; Luo, L; Hayes, J.D; Wang, X.J; Tang, X. (2013). RXR α inhibits the NRF2-ARE Signaling Pathway through a Direct Interaction with the Neh7 Domain of NRF2. *J. Cancer Res.*, Vol. 73, No. 10, pp: 3097-108.

92. Itoh, K; Wakabayashi, N; Katoh, Y; Ishii, T; Igarashi, K; Engel, J.D; Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.*, Vol. 13, No. 1, pp: 76-86.
93. Dinkova-Kostova, A.T; Kostov, R.V; Canning, P. (2017). Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants. *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 617, pp: 84-93.
94. Canning, P; Sorrel, JF; Bullock, A.N. (2015). Structural basis of Keap 1 interactions with Nrf2. *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 88, p: 101-7.
95. Lo, S.C; Li, X; Henzl, M.T; Beamer, L.J; Hannik, M. (2006). Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J.*, Vol. 25, No. 15, pp: 360517.
96. Taguchi, K; Motohaashi, H; Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*, Vol. 16, pp: 123-40.
97. Tu, W; Wang, H; Li, S; Liu, Q; Sha, H. (2019). The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in Chronic Diseases. *Aging Dis.*, Vol. 10, No. 3, pp: 637-651.
98. Lyakhovich, V.V; Vavilin, V.A; Zenkov, N.K; Menshchikova, E.B. (2006). *Biochemistry (Mosc)*. Vol. 71, No. 9, pp: 962-74
99. Dinkova-Kostova, A.T. y Talalay, P. (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food. Res.*, Vol. 52, No. 1, pp: S128-38.
100. Talalay, P. (2000). Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactos*, Vol. 12, No. 1-4, pp: 5-11.
101. Holtzclaw, W.D; Dinkova-Kostova, A.T; Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Vol. Adv. Enzyme Regul.*, Vol. 44, pp: 335-67.
102. Christensen, L.P. y Christensen, K.B. (2014). Chapter 23 – The Role of Direct and Indirect Polyphenolic Antioxidants in Protection Against Oxidative Stress. En: *Polyphenols in Human Health and Disease*. (pp: 289-309). Elsevier Academic Press
103. Kansanen, E; Jyrkkänen, H.K; Levonen, A.L. (2012). Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 52, pp: 973-82.
104. Kansanen, E; Jivelä, A.M; Levonen, A.L. (2009). Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂. *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 47, pp: 1310-7.
105. Dinkova-Kostova, A.T; Holtzclaw, W.D; Cole, R.N; Itoh, K; Wakabayashi, N; Katoh, Y; Yamamoto, M; Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, Vol. 99, pp. 11908-13.

106. Zhang, D.D. y Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 23, pp: 8137-51.
107. Padmanabhan, B; Tong, K.I; Ohta, T; Nakamura, Y; Scharlock, M; Ohtsuji, M; Knag, M.I; Kobayashi, A; Yokoyama, S; Yamamoto, M. (2006). Structural basis for defects of keap1 activity provoked by its point mutation in lung cancer. *Mol. Cell*, Vol. 21, pp: 689-700.
108. Padmanabhan, B; Tong, K.I; Kobayashi, A; Yamamoto, M; Yokoyama, S. (2007). Structural insights into the similar modes of Nrf2 transcription factor recognition by the cytoplasmic repressor Keap1. *J. Synchrotron. Rad.*, Vol. 15, pp: 273-6.
109. Tong, K.I; Padmnabhan, B; Kobayashi, A; Shang, C; Hirotsu, Y; Yokoyama, S; Yamamoto, M. (2007). Different electrostatic potentila define ETGE and DLG motif as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 27, pp: 7511-21.
110. Baird, L; Lleres, D; Swift, S; Dinkova-Kostova, A.T. (2013). Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response in conferred by conformational cycling o eap1-Nrf2 protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 110, pp: 15259-64.
111. Lo, S.C. y Hannink, M. (2006). CAND1-mediated substrate adaptor recycling is required for efficient repression of Nrf2 by Keap1. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 26, pp: 1235-44.
112. Zhang, D.D; Lo, S.C; Cross, J.V; Templeton, D.J; Hannink, M. (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Biol. Cell.*, Vol. 24, pp: 10941-53.
113. Silva-Islas, C.A. y Maldonado, P.D. (2018). Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol. Res.*, Vol. 134, pp: 92-9.
114. Chi, P.L; Lin, C.C; Chen, Y.W; Hsiao, L.D; Yang, C.M. (2015). CO induces Nrf2-dependent heme oxygenase-1 transcription by cooperating with Sp1 and c-Jun in rat brain astrocytes. *Mol. Neurobiol.*, Vol. 52, pp: 277-92.
115. Tanigawa, S; Lee, C.H; Lin, C.S; Ku, C.C; Hasegawa, H; Qin, S; Kawahara, A; Korenori, Y; Miyamori, K; Noguchi, M; Lee, L.H; Lin, Y.C; Steve-Lin, C.L; Nakamura, Y; Jin, C; Yamaguchi, N; Eckner, R; Hou, D.X; Yokoyama, KK. (2013) Jun dimerization protein 2 is a critical component of the Nrf2/MaafK complex regulating the response to ROS homeostasis. *Cell Death Dis.*, Vol. 4, pp: e921.
116. Levy, S. y Forman, H.J. (2010). c-Myc is a Nrf2 interacting protein that negatively regulates phase II genes through their electrophile responsive elements. *IUBMB Life*, Vol. 62, pp: 237-46.
117. Liu, G.H; Qu, K; Shen, X. (2008). NF- κ B antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Bioch. Biophys. Acta*, Vol. 1783, pp: 713-27.
118. Komatsu, M; Hurokawa, H; Waguri, S; Taguchi, K; Kobayashi, A; Ichimura, Y; Sou, Y.S; Ueno, I; Sakamoto, A; Tong, K.I; Kim, M; Nishito, Y; Iemuraa, S; Natsume, T; Ueno, T; Kominami, E; Motohashi, H; Tanaka, K; Yamamoto, M. (2010). The selective autophagy

- substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.*, Vol. 12, pp: 213-23.
119. Hast, B.E; Goldfarb, D; Mulvaney, K.M; Hast, M.A; Siesser, P.F; Yan, F; Hayes, D.; Major, M.B. (2013). Proteomic analysis of ubiquitin ligase Keap1 reveals associated proteins that inhibit Nrf2 ubiquitination. *Cancer Res.*, Vol. 73, pp: 2199-210.
120. Camp, N.D; James, R.G; Dawson, D.W; Yan, F; Davidson, J.M; Houck, S.A; Tang, X; Zheng, N; Major, M.B; Moon, R.T. (2012). Wilms tumor gene on X chromosome (WTX) inhibits degradation of Nrf2 protein through competitive binding to KEAP1 protein. *J. Biol. Chem.*, Vol. 287, pp: 6539-50.
121. Karapetian, R.N; Evstafieva, A.G; Abaeva, I.S; Chichkova, N.V; Filonov, G.S; Rubtsov, Y.P; Sukhacheva, E.A; Melnikov, S.V; Schneider, U; Wanker, E.E; Vartapetian, A.B. (2005). Nuclear oncoprotein prothymosin α is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 25, pp: 1089-99.
122. Ma, J; Cai, H; Wu, T; Sobhian, B; Huo, Y; Alcivar, A; Mehta, M; Cheung, K.L; Ganesan, S; Kong, A.N; Zhang, D.D; Xia, B. (2012). PALB2 interacts with Keap1 to promote Nrf2 nuclear accumulation and function. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 32, pp: 1506-17.
123. Chen, W; Sun, Z; Wang, X.J; Jiang, T; Huang, Z; Fang, D; Zhang, D.D. (2009). Direct interaction between Nrf2 and p21 (Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol. Cell.*, Vol. 32, pp: 663-73.
124. Gorrini, C; Baniasadi, P.S; Harris, I.S; Silvester, J; Inoue, S; Snow, B; Joshi, P.a; Wakeham, A; Molyneux, S.D; Martin, B; Bouwman, P; Cescon, D.W; Elia, A.J; Winterton-Perks, Z; Cruickshank, J; Brenner, D; Tseng, A; Musgrave, M; Berman, H.K; Khokha, R; Jonkers, J; Mak, T.W; Gauthier, M.L. (2013). BRCA1 interacts with Nrf2 to regulate antioxidant signaling and cell survival. *J. Exp. Med.*, Vol. 210, pp: 1529-44.
125. Ichimura, Y; Waguri, S; Sou, Y.S; Kageyama, S; Hasegawa, J; Ishimura, R; Saito, T; Yang, Y; Kouno, T; Fukutomi, T; Hoshii, T; Hirao, A; Takagi, K; Mizushima, T; Motohashi, H; Lee, M.S; Yoshimori, T; Tanaka, K; Yamamoto, M; Komatsu, M. (2013). Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol. Cell.*, Vol. 51, pp: 618-31.
126. Hashimoto, K; Simmons, A.N; Kajino-Sakamoto, R; Tsuji, Y; Ninomiya-Tsuji, J. (2016). TAK1 regulates the Nrf2 antioxidant system through modulating p62/SQSTM1. *Antio. Redox. Signal.*, Vol. 25, pp: 953-64.
127. Jain, A; Lamark, T; Sjøttem, Larsen, K.B; Awuh, J.A; Øvervatn, A; McMahon, M; Hayes, J.D; Tohansen, T. (2010). 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.*, Vol. 285, pp: 22576-91.
128. Lu, K; Alcivar, A.L; Ma, J; Foo, T.K; Zywea, S; Mahdi, A; Hou, Y; Kensler, T.W; Gatza, M.L; Xia, B. (2017). Nrf2 induction supporting breast cancer cell survival is enabled by oxidative stress-induced DPP3-Keap1 interaction. *Cancer Res.*, Vol. 77; pp: 2881-92.

129. Kang, H.J; Hong, Y.B; Kim, H.J; Rodríguez, O.C; Nath, R.G; Tilli, E.M; Albanese, C; Chung, F.L; Kwon, S.H; Bae, I. (2011). Detoxification: a novel function of BRCA1 in tumor suppression? *Toxicol. Sci.*, Vol. 122, pp: 26-37.
130. Wang, Q; Li, J; Yang, X; Sun, H; Gao, S; Zhu, H; Wu, J; Jin, W. (2013). Nrf2 is associated with the regulation of basal transcription activity of the BRCA1 gene. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, Vol. 45, pp: 179-87.
131. Hayes, J.D. y McMahon, M. (2009). NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends. Biochem. Sci.*, Vol. 34, No. 4, pp: 176-88.
132. Kensler, T.W; Wakabayashi, N; Biswal, s. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, Vol. 47, PP. 89-116.
133. Lee, J.M. y Johnson, D.A. (2004). An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 37, No.2, pp: 139-43.
134. Yu, X. y Kensler, T. (2005). Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutat. Res.*, Vol. 591, No. 1-2, pp: 93-102.
135. Kwak, M.K. y Kensler, T.W. (2010). Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 244, No. 1, pp: 66-76.
136. Shapiro, T.A; Fahey, J.W; Dinkova-Kostova, A.T; Holtzclaw, W.D; Stephenson, K.K; Wade, K.L, Ye, L; Talalay, P. (2006). Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study. *Nutr. Cancer.*, Vol. 55, No. 1, pp: 53-62.
137. Cornblatt, B.S; Ye, L; Dinkova-Kostova, A.T; Erb, M; Fahey, J.W, Singh, N.K; Chen, M.S; Stierer, T; Garret-Mayer, E; Argani, P; Davidson, N.E; Talay, P; Kensler, T.W; Visvanathan, K. (2007). Preclinical and clinical evaluation of sulforaphane for chemoprevention in the breast. *Carcinogenesis*, Vol. 28, No. 7 pp: 1486-90.
138. Hatcher, H; Plnlp, R; Cho, K; Torti, F.M; Torti, S.V. (2008). Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell. Mol. Life. Sci.*, Vol. 65, No. 11, pp. 1631-52.
139. Zhang, Y. y Munday, R. (2008). Dithiolethiones for cancer chemoprevention: where do we stand? *Mol. Cancer. Ther.*, Vol. 7, No. 11, pp: 3470-9.
140. Kensler, T.W. y Wakabayashi, N. (2010). Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis*, Vol. 31, No. 1, pp: 90-9.
141. Ren, D; Villeneuve, N.F; Jiang, T; Wu, T; Lau, A; Toppin, H.A; Zhang, D.D. (2011). Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *PNAS.*, Vol. 108, No. 4, pp: 1433-8.
142. Tang, X; Wang, H; Fan, L; Wu, X; Xin, A; Ren, H; Wang, X.J. (2011). Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. *Free Rad. Biol. Med.*, Vol. 50, pp: 1599-609.

143. Chian, S; Thapa, R; Chi, Z; Wang, X.J; Tang, X. (2014). Luteolin inhibits the Nrf2 signaling pathway and tumor growth *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 447, pp: 602-8.
144. De Vries, H.E; Witte, M; Hondius, D; Rozemuller, A.J.M; Drukarch, B; Hoozemans, J; van Horsen, J. (2008). Nrf2-induced antioxidant protection: A promising target to counteract ROS damage in neurodegenerative disease? *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 45, pp: 1375-83.
145. Gan, L. y Johnson, J.A. (2014). Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1842, pp: 1208-18.
146. Magesh, S; Chen, Y; Hu, L. (2012). Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med. Res. Rev.*, Vol. 32, No. 4, pp: 687-726.
147. McKinley, J.E. y Perkins, A. (2019). Neurologic Conditions: Parkinson Disease. *FP Essent.*, Vol. 477, pp: 16-21.
148. Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, Vol. 79, pp: 368-76.
149. Mosley, R.L; Benner, E.J; Kadiu, I; Thomas, M; Boska, M.D; Hasan, K, Laurie, C; Gendelman, H.E. (2006). Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clin. Neurosci. Res.*, Vol. 6, pp: 261-81.
150. Jazwa, A; Rojo, A.I; Innamorato, N.G; Hesse, M; Fernández-Ruiz, J; Cuadrado, A. (2011). Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism. *Antioxid. Redox. Signal.*, Vol. 14, No. 12, pp: 2347-60.
151. Tufekci, K.U; Civi-Bayin, E; Genc, S; Genc, K. (2011). The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.*, Vol. 2011, pp: 314082.
152. He, Q; Song, N; Jia, F; Xu, H; Yu, X; Xie, J; Jiang, H. (2013). Role of alpha-synuclein aggregation and the nuclear factor E2-related factor 2/heme oxygenase-1 pathway in iron-induced neurotoxicity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Vol, 45, pp: 1019-30.
153. Barone, M.C; Sykiotis, G.P; Bohmann, D. (2011). Genetic activation of Nrf2 signaling is sufficient to ameliorate neurodegenerative phenotypes in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Dis. Model. Mech.*, Vol. 4, pp: 701-7.
154. Lastres-Becker, I; Ulusoy, A; Innamorato, N.G; Sahin, G; Rabano, A; Kirik, D; Cuadrado, A. (2012). Alpha-synuclein expression and Nrf2 deficiency cooperate to aggravate protein aggregation, neuronal death and inflammation in early-stage Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.*, Vol. 21, pp: 3173-92.
155. Sadegh, M; Izadi, Z; Azadi, A; Kurd, M; Derakhshankhah, H; Sharifzadeh, M; Javar, A; Hamidi, M. (2019). Neuroprotective Potential of Curcumin-Loaded Nanostructured Lipid Carrier in an Animal Model of Alzheimer's Disease: Behavioral and Biochemical Evidence. *J. Alzheimers Dis.*, Vol. 69, No. 3, pp: 671-86.

156. Cummings, J.L. (2004). Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, Vol. 351, pp: 56-67.
157. De Stropper, B. (2010). Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol. Rev.* Vol. 90, pp: 465-94.
158. Kanninen, K; Malm, T.M; Jyrkkanen, H.K; Goldsteins, G; Keksa-Godsteine, V; Tanila, H; Yamamoto, M; Yla-Herttuala, S; Levonen, A.L; Kostinaho, J. (2008). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid. *Mol. Cell. Neurosci.*, Vol. 39, pp: 302-13.
159. Lee, C; Park, G.H; Lee, S.R; Jang, J.H. (2013). Attenuation of beta-amyloid-induced oxidative cell death by sulforaphane via activation of NF-E2-related factor 2, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, Vol. 213, pp: 313510.
160. Li, X.H; Li, C.Y; Lu, J.M; Tian, R.B; WWei, J. (2012). Allicin ameliorates cognitive deficits ageing-induced learning and memory deficits through enhancing of Nrf2 antioxidant signaling pathways. *Neurosci. Lett.*, Vol. 514, pp: 46-50.
161. Wruck, C.J; Gotz, M.E; Herdege, T; Varoga, D; Brandenburg, L.O; Pufe, T. (2008). Kavalactones protect neural cells against amyloid beta peptide-induced neurotoxicity via extracellular signal-regulated kinase 1/2 -dependent nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation. *Mol. Pharmacol.*, Vol. 73, pp: 1785-95.
162. Eftekharzadeh, B; Maghsoudi, N; Khodagholi, F. (2010). Stabilization of transcription factor Nrf2 by tBHQ prevents oxidative stress-induced amyloid beta formation in NT2N neurons, *Biochimie*, Vol. 92, pp: 245-53.
163. Kim, H.V; Kim, H.Y; Ehrlich, H.Y; Choi, S.Y; Kim, D.J; Kim, Y. (2013). Amelioration of Alzheimer's disease by neuroprotective effect of sulforaphane in animal model. *Amyloid*, Vol. 20, pp: 7-12.
164. Mao, P; Manczak, M, Calkins, M.J; Truong, Q; Reddy, T.P; Reddy, A.P; Shirendeb, U; Lo, H.H; Rabinovitch, P.S. (2012). Mitochondria-targeted catalase reduces abnormal APP processing, amyloid beta production and BACE1 in a mouse model of Alzheimer's disease: implications for neuroprotection and lifespan extension. *Hum. Mol. Genet.*, Vol. 21, pp: 2973-90.
165. Matzinger, M; Fischhuber, K; Heiss, E.H. (2018). Activation of Nrf2 signaling by natural products-can it alleviate diabetes? *Biotechnol. Adv.*, Vol. 36, pp: 1738-67.
166. WHO. (2016). Global report on diabetes. Geneva, Suiza: WHO Press. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf
167. Wu, P; Yan, Y; Ma, L.L; Hou, B.Y; He, Y.Y; Zhang, L; Niu, Z.R; Song, J.K; Pang, X.C; Yang, X.Y; Du, G.H. (2016). Effects of the Nrf2 modulator salvianolic acid alone or combined with metformin on diabetes-associated macrovascular and renal injury. *J. Biol. Chem.*, Vol. 291, pp: 22288-301.
168. Jiménez-Osorio, A.S; Picazo, A; González-Reyes, S; Barrera-Oviedo, D; Rodríguez-Arellano, M.E; Pedraza-Chaverri, J. (2014). Nrf2 and Redox Status in Prediabetic and Diabetic Patients. *Int. J. Mol.*, Vol. 15, pp: 20290-305.

169. Velmurugan, G.V; Sundaresan, N.R; Gupta, M; White, C. (2013). Defective Nrf2-dependent redox signaling contributes to microvascular dysfunction in type 2 diabetes. *Cardiovasc. Res.*, Vol. 100, pp: 143-50.
170. Silva-Reis, A.A; Santos, R.S; Silva-Cruz, A.H; Silva, E.G; Cruz, A.D; Pedrino, G.R. (2016). The Effect of Nrf2 on Diabetic Complications. En Morales-Gonzales, J.A. (Ed.), *The Transcription Factor Nrf2*. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/a-master-regulator-of-oxidative-stress-the-transcription-factor-nrf2/the-effect-of-nrf2-on-diabetic-complications>
171. Liu, M; Grigoryev, D.N; Crow, M.T; Haas, M; Yamamoto, M; Reddy, S.O; Rabb, H. (2009). Transcription factor Nrf2 is protective during ischemic and nephrotoxic acute kidney injury in mice. *Kidney Int.*, Vol. 76, No. 3, pp: 277-85.
172. Uruno, A; Furusawa, Y; Yagishita, Y; Fukutomi, T; Muramatsu, H; Negishi, T; Sugawara, A; Kensler, T.W; Yamamoto, M. (2013). The Keap1-Nrf2 System Prevents Onset of Diabetes Mellitus. *Mol. Cell Biol.*, Vol. 33, No. 15, pp: 2996-3010.
173. Koenitzer, J.R. y Freeman, B.A. (2010). RedOx signaling in inflammation: interactions of endogenous electrophiles and mitochondria in cardiovascular disease. *Ann. N. Y Acad. Sci.*, Vol. 1203, pp: 45-52.
174. Yahagi, K; Kolodgie, F.D; Otsuka, F; Finn, A.V; Davis, H.R; Joner, M; Virmani, R. (2016). Pathophysiology of native coronary, vein graf, and in-stent atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.*, Vol. 13, pp: 79-99.
175. Koelwyn, G.J; Corr, E.M; Erbay, E; Moore, K.J. (2018). Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Nat. Immunol.*, Vol. 19, pp: 526-37.
176. Cheng, F; Torzewski, M; Degreif, A; Rossmann, H; Canisius, A; Lackner, K.J. (2013). Impact of glutathione peroxidase-1 deficiency on macrophage foam cell formation and proliferation: implications for atherogenesis. *PLoS One*, Vol. 8, pp: e72063.
177. Yet, S.F; Laune, M.D; Liu, X; Chen, Y.H; Ith, B; Sibinga, N.E; Perrella, M.A. (2003). Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling. *FASEB J.*, Vol. 17, No. 12, pp: 1759-61.
178. Orozco, L.D; Kapturczak, M.H; Barajas, B; Wang, X; Weinstein, M.M; Wong, J; Deshane, J; Bolisetty, S; Shaposhnik, Z; Shih, D.M; Agarwal, A; Luscis, A.J; Araujo, J.A. (2007). Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis. *Circ. Res.*, Vol. 100, No. 12, pp: 1703-11.
179. Liu, Q; Gao, Y; Ci, X. (2019). Role of Nrf2 and Its Activators in Respiratory Diseases. *Oxid. Med. Cell Longev.*, Vol. 8, pp: 7090534.
180. Mata, M; Morcillo, E; Gimeno, C; Cortijjo, J. (2011). N-Acetyl-1-cysteine (NAC) inhibit mucin synthesis and pro-inflammatory mediators in alveolar type ii epithelial cells infected with influenza virus a and b and with respiratory syncytial virus (RSV). *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 82, No. 5, pp: 548-55.

181. Boutten, A; Goven, D; Artaud-Macari, E; BOCzkowski, J; Bonay, M. (2011). NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Mol. Med.*, Vol. 17, No. 7, pp: 363-71.
182. Cui, W; Zhang, Z; Zhang, P; Qu, J; Zheng, C; Mo, X; Zhou, W; Xu, L; Yao, H; Gao, J. (2018). Nrf2 attenuates inflammatory response in COPD/emphysema: Crosstalk with Wnt3a/ β -catenin and AMPK pathways. *J. Cell. Mol. Med.*, Vol. 22, No. 7, pp: 3514-25.
183. Sussan, T.E; Gajghate, S; Chatterjee, S; Mandke, P; McCormick, S; Sudini, K; Kumar, S; Breysse, P.N; Diette, G.B; Sidhaye, V; Biswal, S. (2015). Nrf2 reduces allergic asthma in mice through enhance airway epithelial cytoprotective function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, Vol. 309, No. 1, pp: L27-L36.
184. Swamy, S.M; Rajasekaran, N.S; Thannickal, V.J. (2016). Nuclear Factor-Erythroid-2-Related Factor 2 in ging and Lung Fibrosis. *Am. J. Pathol.*, Vol. 186, No. 7, pp: 1712-23.
185. Vega, M.R; Dodson, B; Gross, C; Mansour, H.M; Lantz, C.R; Chapman, E; Wang, T; Black, S.M; Garcia, J.G.N; Zhang, D.D. (2016). Role of Nrf2 and Autophagy in Acute Lung Injury. *Vol. 2, No. 2*, pp: 91-101.
186. Thimmulappa, R.K; Rangasamy, L.H; Reddy, S.P; Yamamoto, M; Kensler, T.W; Biswal, S. (2006). Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J. Clin. Invest.*, Vol. 116, No. 4, pp: 984-95.
187. Pérez, S; Taléns-Visconti, R; Rius-Pérez, S; Finamor, I; Sastre, J. (2017). Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 104, pp: 75-103
188. Chen, H; Fang, Y; Li, W; Orlando, R.C; Shaheen, N; Chen, X.L. (2013). NF κ B and Nrf2 in esophageal epithelial barrier function. *Tissue Barriers*, Vol. 1, No. 5, pp: e27463.
189. Chen, H; Hu, Y; Fang, Y; Diukic, Z; Yamamoto, M; Shaheen, N.J; Orlando, R.C; Chen, X. (2014). Nrf2 deficiency impairs the barrier function of mouse oesophageal epithelium. *Gut*, Vol. 63, No. 5, pp: 711-9.
190. Okawa, H; Motohashi, H; Kobayashi, A; Aburatani, H; Kensler, T.W; Yamamoto, M. (2006). Hepatocyte-specific deletion of the Keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 339, pp: 79-88.
191. Qu, Q; Liu, J; Zhou, H.H; Klaassen, C.D. (2014). Nrf2 protects against furosemide-induced hepatotoxicity. *Toxicology*, Vol. 324, pp: 35-42.
192. García-Niño, W.R. y Pedraza-Chaverrí, J. (2014). Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food Chem. Toxicol.*, Vol 69, pp: 182-201.
193. Klaassen, C.D. y Reisman, S.A. (2010). Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 244, pp: 57-65.
194. Kurzawski, M; Dzieziejko, V; Urasinska, E Post, M; Wójciki, M; Mietkiewski, J; Drozdziak, M. (2012). Nuclear factor erythroid 2-like 2 (Nrf2) expression in end-stage liver disease. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, Vol 34, No. 1, pp: 87-95.

195. Xu, D; Xu, M; Jeong, S; Qian, Y; Wu, H; Xia, Q; Kong, X. (2019). The Role of Nrf2 in Liver Disease: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front. Pharmacol.*, Vol. 9, pp: 1428.
196. Battino, M; Giampieri, F; Pistollato, F; Sureda, A; de Oliveira, M.R; Pittala, V; Fallarino, F; Nabavi, S.F; Atanasov, A.G; Nabavi, S.M. (2018). Nrf2 as regulator of innate immunity: A molecular Swiss army knife! *Biotechnol. Adv.*, Vol. 36, No. 2, pp: 358-70.
197. Helou, D.G; Martin, S.F; Pallardy, M; Chollet-Martin, S; Kerdine-Rómer, S. (2019). Nrf2 Involvement in Chemical-Induced Skin Innate Immunity. *Front. Immunol.*, Vol. 10, pp: 1004.
198. Suzuki, T; Murakami, S; Biswal, S.S; Skaguchi, S; Harigae, H; Yamamoto, M; Motohasi, M. (2017). Systemic Activation of NRF2 Alleviates Lethal Autoimmune Inflammation in Scurfy Mice. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 37, No. 15, pp: e00063-17.
199. Kavian, N; Mehlal S; Jeljeli, M; Saidu, N.E.B; Nicco, C; Cerles, O; Chouzenoux, S; Cauvet, A; Camus, C; Ait-Dhoubi, M; Chéreau, C; Kerdine-Römer, S; Allanore, Y; Batteux, F. (2018). The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway Controls Fibrosis and Autoimmunity in Scleroderma. *Front. Immunol.*, Vol. 9, pp: 1896.
200. Braun, S; Hanselmann, C; Gassmann, M.G; Auf Dem Keller, U; Born-Berclaz, C; Chan, K.M; Kan, YW; Werner, S. (2002). Nrf2 transcription factor, a novel target for keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 22, pp: 5492-505.
201. Beyer, T.A; Auf Dem Keller, U; Braun, S; Schäfer, M; Werner, S. (2007) Roles and mechanisms of action of the Nrf2 transcription factor in skin morphogenesis, wound repair and skin cancer. *Cell Death Differ.*, Vol. 14, pp: 1250-4.
202. Nagai, N; Thimmulappa, R.K; Cano, M; Fujihara, M; Izumi-Nagai, K; Kong, X.N; Sporn, M.B; Kensler, T.W; Biswal, S; Handa, J.T. (2009). Nrf2 is a critical modulator of the innate immune response in a model of uveitis. *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 47, pp: 300-6.
203. Sheng, C. y Georg, G. (2018). 10.3 Discovery and Optimization of Keap1-Nrf2 PPI Inhibitors. En: *Targeting Protein-Protein Interactions by Small Molecules*. (pp: 264-269). Shanghai, China. Springer.
204. Chen, Y; Inoyama, D; Kong, A.T; Beamer, L.J; Hu, L. (2011). Kinetic analyses of Keap1-Nrf2 interaction and determination of the minimal Nrf2 peptide sequence required for Keap1 binding using Surface Plasmon Resonance. *Chem. Biol. Drug. Des.*, Vol. 78, No. 6, pp: 1014-21.
205. Inoyama, D; Chen, Y; Huang, X; Beamer, L.J; Kong, A.T; Hu, L. (2012). Optimization of fluorescently labeled Nrf2 peptide probes and the development of a fluorescence polarization assay for the discovery of inhibitors of Keap1-Nrf2 interaction. *J. Biomol. Screen.*, Vol. 17, No. 4, pp: 435-47.
206. Marcotte, D; Zeng, W; Hus, J.C; McKenzie, A; Hession, C; Jin, P; Bergeron, C; Lugvskoy, A; Enyedy, I; Cuervo, H; Wang, D; Atmane, C; Roecklin, D; Vecchi, M; Vivat,

- V; Kraemer, J; Winkler, D; Hong, V; Chao, J; Lukashev, M; Silvian, L. (2013). Small molecules inhibit the interaction of Nrf2 and the Keap1 Kelch domain through a non-covalent mechanism. *Bioorg. Med. Chem.*, Vol. 21, pp: 4011-19.
207. Hancock, R; Bertrand, H.C; Tsujita, T; Naz, S; El-Bakry, A; Laoruchupong, J; Hayes, J.D; Wells, G. (2012). Peptide inhibitors of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction. *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 52, pp: 444-451.
208. Lu, M.C; Chen, Z.Y; Wang, Y.L; Jiang, Y.L; Yuan, Z.W; You, Q.D; Jiang, Z.Y. (2015). Binding thermodynamics and kinetics guided optimization of potent Keap1-Nrf2 peptide inhibitors. *RSC Adv.*, Vol. 5, pp: 85983.
209. Steel, R; Cowan, J; Payerne, E; O'Connell, M.A; Searcey, M. (2012). Anti-inflammatory Effect of a Cell-Penetrating Peptide Targeting the Nrf2/Keap1 Interaction. *ACS Med. Chem. Lett.*, Vol. 3, pp: 407-10.
210. Zhao, K; Redell, J.B; Moore, A.N; Dash, P.K. (2011). A novel strategy to activate cytoprotective genes in the injured brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 407, No. 3, pp: 501-6.
211. Tu, J; Zhang, X; Zhu, Y; Dai, Y; Li, N; Yang, F; Zhang, Q; Brann, D.W; Wang, R. (2015). Cell-Permeable Peptide Targeting the Nrf2-Keap1 Interaction: A Potential Novel Therapy or Global Cerebral Ischemia. *J. Neurosci.*, Vol. 35, No. 44, pp: 14727-39
212. Maldonado, M.C. (2018). Análisis de la actividad del factor de transcripción Nrf2 en células HEK293. (Tesis de Maestría). Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Morelia.
213. Alam, N; Goldstein, O; Xia, B; Porter, K.A; Kozakov, D; Schueler-Furman, O. (2017). High-resolution global peptide-protein docking using fragments-based PIPER-FlexPepDock. *PLoS Comput. Biol.*, Vol. 13, No. 12, pp: e1005905.