



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ROL DE NRF2 EN LA PROTECCIÓN CELULAR BETA PANCREÁTICA Y SU  
POTENCIAL TERAPÉUTICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO  
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORA: MARÍA JAVIERA PAROT CABRERA  
PROFESOR GUÍA: TM. DR. SERGIO ANTONIO WEHINGER WEHINGER**

**TALCA-CHILE  
2020**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

## 1. ÍNDICE DE CONTENIDOS

3. Resumen.....	1
4. Introducción.....	2
5. Objetivos.....	4
6. Metodología.....	5
7. Marco teórico.....	6
7.1 Diabetes.....	6
7.2 Fisiología de la célula beta pancreática.....	7
7.3 Fisiopatología de la DM2.....	10
7.3.1 Pérdida de masa celular beta pancreática en DM2.....	11
7.3.2 Pérdida de funcionalidad de las células beta pancreáticas en DM2.....	12
7.3.3 Rol del estrés oxidativo en el daño a la célula beta pancreática en DM2.....	14
7.4 Nrf2.....	16
7.4.1 Regulación de Nrf2 por Keap1.....	17
7.4.2 Otras vías de regulación de Nrf2.....	19
7.4.3 Genes <i>target</i> de Nrf2.....	20
7.5 Moduladores exógenos de Nrf2.....	21
7.6 Nrf2 en diabetes mellitus tipo 2.....	24
7.7 Efectos de la activación de Nrf2 en la célula beta pancreática.....	25
7.7.1 Efectos de la activación de Nrf2 sobre la masa celular beta pancreática.....	26
7.7.2 Efectos de la activación de Nrf2 sobre la funcionalidad celular beta pancreática.....	29
7.8 Efectos adversos de la activación de Nrf2.....	30
7.9 Modulación de Nrf2 a nivel genético.....	31
8. Conclusión.....	34
9. Referencias.....	35

## 2. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1: Modelo consenso de secreción insulínica.....	9
Figura 2: Mecanismo molecular del sistema Nrf2-Keap1.....	18
Tabla 1: Activadores conocidos de Nrf2.....	22
Tabla 2: Efectos de activación de Nrf2 sobre la masa celular beta pancreática.....	28
Tabla 3: Efectos de activación de Nrf2 sobre la funcionalidad celular beta pancreática.....	30
Tabla 4: Modulación de Nrf2 a nivel genético.....	33

### 3. RESUMEN

La diabetes es una de las enfermedades de mayor impacto a nivel mundial, por su alta prevalencia y la gravedad de sus consecuencias. El tipo más común es la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cuyo factor de riesgo más importante es la obesidad. Los dos componentes centrales de la diabetes mellitus tipo 2 son la resistencia a la insulina y la falla beta pancreática. Los tratamientos actuales tienden a centrarse en controlar la insulinoresistencia y la hiperglicemia más que en proteger o rescatar la función beta pancreática. Por ello, es importante evaluar nuevas metodologías que apunten a disminuir el daño y favorecer la función beta en condiciones diabetogénicas. Ello podría complementar y potenciar el efecto de las terapias actuales.

Nrf2 es un factor de transcripción que permite la expresión de proteínas involucradas en vías de protección contra el estrés oxidativo. Existen diversas moléculas en estudio, tanto de origen natural como sintético, que son capaces de activar la vía de Nrf2. En este trabajo se revisa la literatura existente acerca de los distintos mecanismos de daño de la célula beta pancreática en el contexto de DM2, y los posibles efectos terapéuticos que podría tener Nrf2 para minimizar este daño. Los resultados indicarían que la activación de Nrf2 tiene potencial como posible complemento a los tratamientos actuales para la DM2.

**Palabras clave:** diabetes, células beta pancreática, secreción insulínica, Nrf2, lipotoxicidad, potencial terapéutico.

## 4. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por elevados niveles de glucosa en sangre. La más común es la tipo 2, que se caracteriza por resistencia de los tejidos periféricos a la hormona insulina y falla celular beta pancreática. A largo plazo, la diabetes puede causar serios daños al corazón, riñones, vasos sanguíneos, nervios y retina. Si bien es una enfermedad poligénica, con un fuerte componente familiar, se acepta hoy que los principales factores de riesgo son el sobrepeso y la obesidad derivados de una dieta hipercalórica y sedentarismo para la gran mayoría de los casos.

Esta enfermedad es una de las principales causas de morbimortalidad en el mundo. En 2012, el número total de muertes que causó se calcularon en 3,7 millones, de las cuales 1,5 millones se debieron directamente a hiperglicemia, mientras que 2,2 millones se debieron a enfermedades relacionadas. En 2014, 422 millones de personas sufrían de esta enfermedad. La prevalencia ha aumentado rápidamente en las últimas tres décadas, especialmente en países de ingreso bajo a medio (1).

Además, la diabetes tiene un importante costo en la economía global. Se ha estimado que su costo anual directo es de unos 827 mil millones de dólares. Esto solo toma en cuenta los costos por tratamiento médico y deja de lado aquellos asociados a pérdida de productividad y mortalidad prematura (1).

Los tratamientos actuales involucran cambios en el estilo de vida, principalmente en alimentación y actividad física, y medicación. Entre los medicamentos utilizados está la metformina como el principal sensibilizador a la insulina, la insulina exógena y otros fármacos hipoglicemiantes. Exceptuando a las sulfanilureas y glinidas (secretagogos de

insulina), las estrategias usuales no suelen enfocarse en proteger la funcionalidad de las células beta pancreáticas del daño inducido por el ambiente pro-diabetogénico.

Nrf2 es un factor de transcripción que estimula la síntesis de proteínas que protegen contra el estrés oxidativo. Es muy importante en la respuesta antioxidante celular en tejido hepático, pero ha sido menos explorado en la célula beta pancreática. Este trabajo pretende recopilar la información existente sobre el posible rol terapéutico de Nrf2 en células beta. Se espera que con este conocimiento eventualmente se puedan desarrollar nuevas terapias a utilizar en pacientes diabéticos.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo General

Estudiar el rol de Nrf2 en la protección al daño celular beta pancreático y su potencial como *target* terapéutico.

### Objetivos Específicos

1. Identificar los mecanismos de daño oxidativo en la célula beta.
2. Describir la vía de Nrf2 y su rol en la respuesta celular al estrés oxidativo.
3. Analizar el rol y el potencial como *target* terapéutico de la vía de Nrf2 en la respuesta al daño oxidativo en la célula beta.

## 6. METODOLOGÍA

Se realizó una revisión bibliográfica relacionada con la información disponible acerca de los mecanismos de daño de la célula beta pancreática en DM2, la vía de Nrf2 y el potencial terapéutico de Nrf2 en el contexto de DM2. Para esta búsqueda, se consultó en revistas indexadas con comité editorial y revisión de pares, de tal forma de asegurar que estos artículos han cumplido con criterios de calidad, los cuales les han permitido ingresar a bases de datos internacionales y/o nacionales. Los conceptos buscados fueron asociaciones entre los siguientes términos: *Nrf2*, *beta cell*, *diabetes*, *therapeutic*, *Keap1*, *ARE*, *oxidative stress*, *antioxidant*, *autophagy*, *ultrastructure*, *reticulum stress*, *mitochondrial stress*, *beta cell function*, *insulin secretion*, *lipotoxicity* y *glucotoxicity*. Las bases de datos consultadas fueron: PubMed, Scopus y Web of Science, con el propósito de revisar trabajos publicados relacionados con el tema investigado, de preferencia durante los últimos 5 años.

## 7. MARCO TEÓRICO

### 7.1 Diabetes

El término diabetes se refiere a un grupo de desórdenes metabólicos caracterizados por la presentación de hiperglicemia causada por defectos en la acción o secreción de insulina (2). Actualmente, la diabetes se clasifica en diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), diabetes gestacional y otros tipos específicos de diabetes debidos a otras causas. En este último grupo se encuentran las diabetes monogénicas (por ejemplo, la tipo MODY) y las causada por pancreatitis, fibrosis quística o consumo de glucocorticoides (3).

La diabetes mellitus tipo 1 afecta principalmente a niños y es causada por la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas. Comprende entre el 5 y el 10% de los casos de diabetes mellitus. Por su parte, la DM2 se da más comúnmente en adultos y está relacionada con resistencia a la insulina por parte de tejidos periféricos al páncreas (músculo esquelético, tejido adiposo e hígado). Es mucho más común que la tipo 1, representando entre el 90 y el 95% de los casos de diabetes (3). En este trabajo el foco principal está en la DM2.

La diabetes puede traer graves complicaciones a largo plazo. La hiperglicemia crónica conlleva daño micro y macrovascular, lo que a su vez puede provocar retinopatía, nefropatía, neuropatía, enfermedad coronaria, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades vasculares periféricas (4).

Las estrategias de tratamiento actuales para la DM2 se basan principalmente en modificaciones del estilo de vida y medicación hipoglicemiante. Entre los medicamentos utilizados están la metformina, que reduce la gluconeogénesis en el hígado; las sulfonilureas, que aumentan la secreción de insulina; y las tiazolidinedionas, que aumentan la sensibilidad

periférica a insulina (5). Las estrategias de tratamiento no suelen poner énfasis en la protección directa de las células beta pancreáticas contra los efectos tóxicos de altos niveles de glucosa y ácidos grasos, denominado glucolipototoxicidad.

## 7.2 Fisiología de la célula beta pancreática

El órgano central en la fisiopatología de la diabetes es el páncreas. Este tiene funciones tanto endocrinas como exocrinas. El páncreas exocrino comprende el 98% de todo el órgano y tiene por función producir las enzimas pancreáticas, que ayudan en el proceso de la digestión. La parte endocrina comprende el 2% de su masa y está dispuesta en estructuras llamadas islotes de Langerhans, los cuales contienen cinco tipos celulares distintos: células alfa, beta, delta, épsilon y úpsilon, encargadas de secretar glucagón, insulina, somatostatina, grelina y polipéptido pancreático, respectivamente (6).

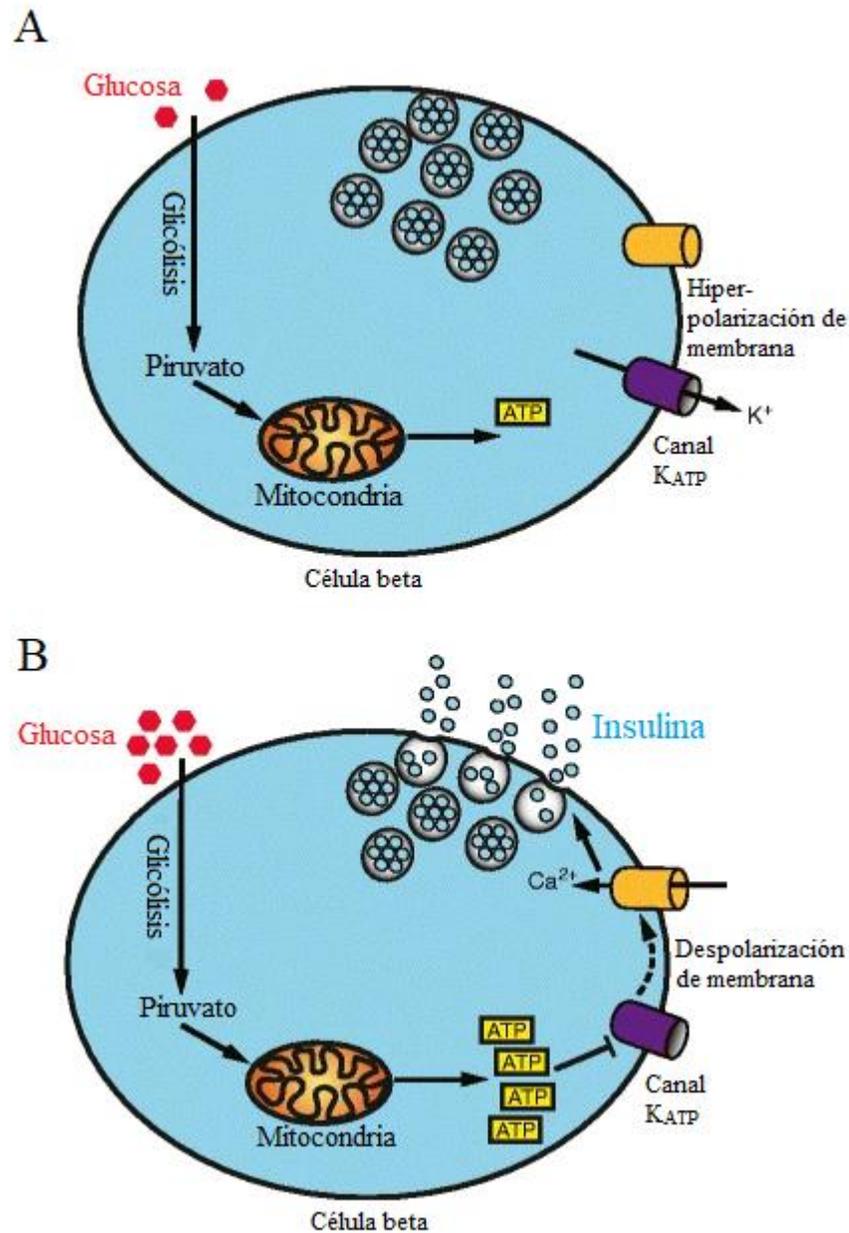
La insulina actúa en el estado posprandial. Entre sus funciones están: facilitar el influjo de glucosa en el músculo esquelético y el tejido adiposo, estimular la síntesis de proteínas y de glucógeno en el hígado, inducir la síntesis de lípidos y su almacenamiento en tejido adiposo, inhibir la betaoxidación de ácidos grasos, y finalmente, reducir la glucogenólisis y gluconeogénesis hepáticas. Durante el ayuno, la insulina se encuentra baja, mientras que aumenta la concentración de otras hormonas, principalmente glucagón, que tienen funciones opuestas (7).

La producción de insulina puede ser regulada tanto a nivel de síntesis como de secreción. Se trata de una hormona peptídica codificada por el gen *INS*. La transcripción de este gen está controlada por varios factores de transcripción, entre los que se encuentran PDX-1 y MafA (8). Este gen codifica para proinsulina, la que contiene un péptido-sígnal para translocación al retículo endoplásmico (RE). En el RE se corta el péptido señal, dejándola en su forma de proinsulina, la que llega al aparato de Golgi y es encapsulada en gránulos de

secreción inmaduros, donde es escindida a su forma madura y de esta manera está lista para ser liberada (9).

En cuanto a la regulación a nivel de secreción, existe un modelo consenso de la secreción de insulina estimulada por glucosa, que propone lo siguiente: primero: la glucosa entra a la célula mediante los transportadores GLUT1 y GLUT3 (GLUT2 en células murinas) (10); segundo: la glucosa es metabolizada, lo que aumenta la concentración de ATP intracelular; tercero: el aumento de la razón ATP/ADP citosólica produce el cierre de canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ); cuarto: se produce una despolarización de la membrana, lo que abre canales de calcio dependientes de voltaje; y quinto: el aumento del calcio intracelular induce a la secreción de insulina desde los gránulos de secreción (11, 12). Este mecanismo se encuentra esquematizado en la **Figura 1**.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que este modelo está altamente simplificado e incompleto. La secreción insulínica *in vivo* es bifásica (13) e involucra varias vías de señalización además de la consenso (14, 15). Existe evidencia de que la glucosa puede ejercer efectos sobre la secreción de insulina por mecanismos independientes del  $K_{ATP}$ , del potencial de membrana o del influjo de calcio (16). Además, las células beta pancreáticas no solo pueden ser estimuladas por glucosa, sino también por otros nutrientes, como ácidos grasos libres o aminoácidos, por hormonas o incluso por neurotransmisores (17). Los ácidos grasos libres no son capaces de estimular por sí solos la liberación de insulina, pero son necesarios para que su secreción inducida por glucosa ocurra normalmente (18).



**Figura 1. Modelo consenso de secreción insulínica.** (A) A niveles basales de glucosa, los canales de potasio dependientes de ATP (canales K<sub>ATP</sub>) se encuentran abiertos, manteniendo la membrana celular en un estado de hiperpolarización, por lo que los canales de calcio dependientes de voltaje se mantienen cerrados y se inhibe la secreción de insulina. (B) A niveles elevados de glucosa, aumenta la glicólisis y por tanto la producción de ATP, lo que resulta en el cierre de los canales K<sub>ATP</sub>, se induce la despolarización de la membrana, la entrada de calcio al citosol y la exocitosis la insulina. Tomada y adaptada de (Cantley, James y Ashcroft, Frances M.). 2015. (12).

### 7.3 Fisiopatología de la DM2

La fisiopatología de la DM2 tiene dos componentes principales: la resistencia a la insulina y la falla beta pancreática. Existen factores de riesgo genéticos, pero también está muy relacionada al estilo de vida (19).

La obesidad destaca como un factor de riesgo importante, ya que puede producir resistencia a la insulina en tejidos periféricos. Existen diversas hipótesis sobre por qué ocurre esto, pero algunos de los mecanismos que parecen estar involucrados son la producción de metabolitos tóxicos debido al exceso de ácidos grasos libres (20), la reducción de la expresión del receptor de insulina o alteraciones en las vías que este activa (21), y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (22).

En algunos pacientes con insulinoresistencia, eventualmente los islotes pancreáticos pierden la capacidad de secretar insulina suficiente para mantener los niveles de glicemia en rangos normales. En este punto se acepta generalmente que es cuando empieza la diabetes como tal (23). A día de hoy aún es discutido si lo primero en aparecer es la falla beta pancreática o la hiperglicemia, y cuál es la relación causal entre ambos. Es probable que esto dependa de múltiples factores y que no en todos los individuos se dé de la misma forma. En cualquier caso lo que se genera es un círculo vicioso en el que la hipoinsulinemia producida por la falla beta pancreática hace que disminuya la captación de glucosa por el tejido adiposo y el músculo esquelético, lo que genera hiperglicemia, que a su vez daña las células beta y múltiples otros tejidos (24).

La falla beta pancreática de por sí también parece ser multifactorial, y tiene dos componentes: disminución en el número de células beta en los islotes pancreáticos y gradual pérdida de la funcionalidad de las células beta aún activas (23). Entre los mecanismos que parecen estar involucrados en estos procesos están el estrés inflamatorio, estrés de retículo,

estrés metabólico y oxidativo (glucotoxicidad, lipotoxicidad y glucolipotoxicidad), estrés amiloide y pérdida de la integridad de los islotes pancreáticos (24).

### **7.3.1 Pérdida de masa celular beta pancreática en DM2**

Los pacientes con DM2 sufren una reducción en la masa de células beta en sus islotes pancreáticos que puede ir desde el 24 al 65%, siendo mayor la pérdida a medida que progresa la enfermedad (25). Por mucho tiempo se pensó que esta disminución se debía a un aumento en la tasa de apoptosis de las células beta, pero un creciente número de estudios indican que el escenario es más complejo, donde juegan un rol tanto la apoptosis como la des-diferenciación o trans-diferenciación celular. Esto tendría la implicación de que la función de las células beta pancreáticas podría recuperarse con los tratamientos adecuados (26).

A pesar de que fue dado por hecho durante muchos años, el mecanismo de la apoptosis es cada vez más discutido como la razón principal de la disminución de la masa celular beta pancreática en diabetes, aunque aún se cree que puede ser responsable de al menos una parte de la pérdida de células betas. La apoptosis de células beta se ha relacionado especialmente a lipotoxicidad por aumento de ácidos grasos libres (27).

La posible des-diferenciación o trans-diferenciación de las células beta se ha estudiado principalmente mediante la detección de marcadores particulares a cada tipo celular. Por ejemplo: FoxO1, Pdx1, MafA, Pax6 y Nkx6.1 para las células beta pancreáticas; MafB y Arx1 para células alfa; y Ngn3, Oct4, Nanog, y L-myc para células endocrinas progenitoras (23). Se ha observado, principalmente en modelos animales, que las células beta expuestas a hiperglicemia expresan marcadores correspondientes a células progenitoras endocrinas (28). Algunas también pueden expresar glucagón además de insulina, o solo glucagón, tanto en humanos (29, 30) como en modelos animales (28). Sin embargo, en general estas células también mantienen algunos marcadores específicos de células beta, como el GLUT2 (en

células de ratón), por lo que no está bien definido cómo clasificarlas. Tampoco está bien estudiado a qué clase de célula corresponde su funcionamiento, es decir, si secretan el contenido de sus gránulos a una glicemia alta, como las células beta, o baja, como las células alfa (23).

### **7.3.2 Pérdida de funcionalidad de las células beta pancreáticas en DM2**

Es poco probable que la falla beta pancreática se deba solo a una disminución del número de células beta. Existen pistas que indicarían que tienen que haber otros factores involucrados, por ejemplo: la disrupción del patrón normal de liberación bifásica de insulina, con pérdida de la primera fase, lo que indicaría un problema de funcionalidad; el hecho de que pacientes hemipancreatectomizados, no obesos o insulinoresistentes, mantienen niveles de glicemia normales a pesar de perder la misma proporción de células beta que los diabéticos; y la rápida recuperación que se observa en la función celular cuando se logra volver a euglicemia, que no podría ser atribuible a proliferación celular por la velocidad con la que ocurre (25). Existe mucha interacción entre los procesos de pérdida de masa celular y pérdida de función, y probablemente en muchos casos tengan una etiología común.

En diabetes, las células beta se ven alteradas en su contenido de insulina, expresión génica, metabolismo oxidativo, ultraestructura, mecanismo de autofagia, función mitocondrial y función del retículo endoplasmático.

Las células beta expuestas a hiperglicemia muestran un contenido reducido de insulina (28). Esto podría deberse a una disminución de la expresión del gen de la insulina o a la degradación interna de los gránulos. Es probable que en algunos de los estudios en los que se habla de la pérdida de masa celular beta pancreática se haya subestimado la cantidad real de células beta, debido a que la detección de insulina se suele usar como una manera de identificarlas (23).

En cuanto a la expresión génica, en un experimento en cultivos de islotes de ratones  $\beta$ V59M se vio que la exposición a hiperglicemia aumentó la transcripción de más de 780 genes, mientras que disminuyó la transcripción de otros 300. El patrón general observado implicaría un aumento en la gluconeogénesis y una disminución de la fosforilación oxidativa y de la actividad del ciclo de Krebs. Relacionado a lo anterior, también se observó una reducción en los niveles celulares de ATP y NAD(P)H, posiblemente como un intento de protegerse del estrés oxidativo, pero también tendría la implicancia de que se pierde la respuesta ante el estímulo por glucosa (31).

Otro de los genes que ve disminuida su expresión es el gen *G6pc2*, que codifica la proteína encargada de la desfosforilación de glucosa-6-fosfato a glucosa. Esto implicaría que se acumula glucosa-6-fosfato en el citoplasma, la que probablemente pasaría a formar glucógeno. En efecto, las células beta expuestas a hiperglicemia desarrollan depósitos de glucógeno, en algunos casos tan excesivos que alteran la ultraestructura celular, tanto en humanos como en cultivos de islotes de ratón. El almacenamiento de glucógeno no es una función normal de las células beta pancreáticas, y los investigadores no encontraron depósitos similares en los islotes control. Es posible que la acumulación de glucógeno sea uno de los factores que estimulan la apoptosis en las células beta (31).

La alteración del mecanismo de autofagia en células beta se ha detectado por el aumento de agregados de ubiquitina y p62, una proteína que marca a otras para su transporte a autofagosomas. Estos agregados además se encontraron colocalizados con los cúmulos de glucógeno. La autofagia es una de las maneras por las que el glucógeno es metabolizado, por lo que una falla en este mecanismo podría ser otra explicación para su acumulación (31).

En relación a la disfunción mitocondrial, este es un organelo que está constantemente expuesto a estrés oxidativo debido a que es allí donde ocurre la fosforilación oxidativa, un paso esencial para la secreción insulínica. El estrés oxidativo puede provocar daño en el genoma, lípidos de membrana o proteínas de la membrana interna de la mitocondria. La

disfunción mitocondrial también se ha propuesto como un gatillante de des-diferenciación celular (32).

Otro efecto de la diabetes en la funcionalidad de las células beta es la inducción de estrés de retículo, lo que quiere decir que este acumula proteínas no procesadas o mal dobladas, posiblemente por efecto de la glucolipototoxicidad o del aumento en la demanda de producción de insulina. En células beta esto se ha medido por el aumento en la expresión de p58IPK, CHOP, ATF3 y proteínas BiP, que son parte del sistema UPR (unfolded protein response), el sistema de respuesta de la célula frente al estrés de retículo (33). Otro estudio asoció una UPR defectuosa a la disfunción beta pancreática (34).

Cabe destacar que en la mayoría de estos experimentos los cambios que se observaron fueron al menos parcialmente reversibles cuando las células se expusieron a un ambiente de glicemia normal, sobre todo si la exposición a hiperglicemia fue de corta duración. Este fue el caso con la acumulación de glucógeno, los cambios en la expresión de genes metabólicos, la disminución del contenido de insulina y el estrés de retículo. Sin embargo esto ha sido difícil de replicar en pacientes humanos.

### **7.3.3 Rol del estrés oxidativo en el daño a la célula beta pancreática en DM2**

El estrés oxidativo puede alterar ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, causando alteración en la actividad enzimática, transporte de membrana, recepción y transducción de señales, expresión génica, apoptosis, entre otros (35). Aunque es difícil decir hasta qué punto el estrés oxidativo por sí solo es responsable de la falla beta pancreática, se cree que probablemente es uno de los factores más influyentes.

Las células beta pancreáticas son metabólicamente muy activas pero a la vez expresan pobremente genes de enzimas antioxidantes, lo que las vuelve altamente susceptible al estrés oxidativo. En estas células casi el 100% de la glucosa es llevada a oxidación mediante el ciclo de Krebs, cosa que no ocurre en otros tejidos donde se tiene, por ejemplo, mayor actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) (35). De hecho, la resistencia a la insulina ha sido propuesta como un posible mecanismo protector de los tejidos sensibles a la insulina, como el músculo esquelético, contra la glucolipototoxicidad inducida por el exceso de glucosa y lípidos desde la dieta (36). Por su rol como “sensor” de glucosa, la célula beta no puede utilizar este mecanismo, sino por el contrario: responde ante este aumentando la producción y secreción de insulina. Esta condición en un principio compensa la mayor exigencia, pero con el tiempo agota y daña a la célula beta.

Además del rol que podría tener la glucotoxicidad, los ácidos grasos libres también han sido relacionados con la generación de estrés oxidativo en las células beta. La hiperlipidemia también es una de las características de la DM2, y provoca estrés oxidativo, estrés de RE, disfunción mitocondrial, aumento en la apoptosis y autofagia no solo de las células beta, sino también otros tipos celulares (38-40). Los diversos tipos de ácidos grasos pueden tener efectos distintos sobre las células, debido a sus propiedades particulares. Por ejemplo, las dietas altas en palmitato conllevan un mayor riesgo de desarrollar DM2 comparadas con dietas ricas en oleato (37). Se cree que las diferencias en los efectos de estos dos ácidos grasos están dadas por las distintas vías metabólicas que activan. El palmitato estimula la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-8, se incorpora pobremente a triglicéridos y no estimula la secreción insulínica. El oleato, por el contrario, estimula la formación de triglicéridos e induce a la secreción de insulina (38). Se piensa que la formación de triglicéridos es un mecanismo de defensa de las células contra la lipotoxicidad, ya que son menos reactivos que los ácidos grasos libres (39).

## 7.4 Nrf2

El Nrf2 (nuclear factor erythroid-derived 2-like 2) es un factor de transcripción que ha llamado la atención por tener un rol en la resistencia celular al estrés oxidativo. Regula aproximadamente 250 genes involucrados en diversas funciones celulares, incluyendo tanto genes de respuesta al estrés como genes del metabolismo intermediario (40). Entre los mecanismos de acción que se han descubierto de este factor de transcripción están: inducción de la expresión de enzimas detoxificadoras como la catalasa y la superóxido dismutasa, aumento de los niveles de glutatión reducido y NADPH + H<sup>+</sup>, reducción de la producción de superóxido mitocondrial e inducción de la expresión de enzimas de la vía de las pentosas fosfato (2). Debido a que es un factor de transcripción en lugar de un antioxidante en sí mismo, el Nrf2 es capaz de desencadenar una respuesta celular amplificada, lo que lo vuelve de especial interés en la búsqueda de tratamientos para enfermedades relacionadas al estrés oxidativo.

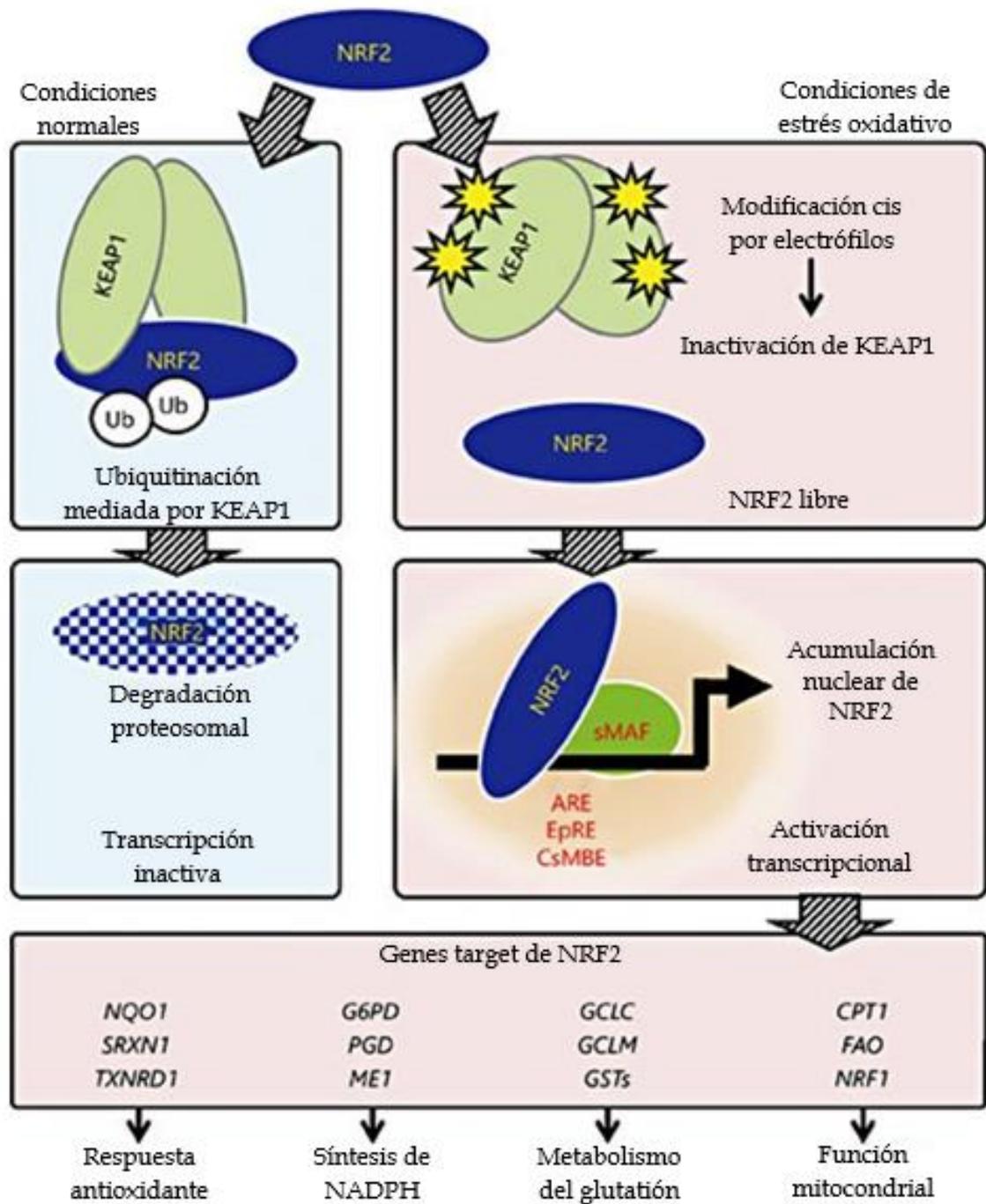
Estructuralmente, Nrf2 es una proteína de 605 aminoácidos con 7 dominios funcionales conocidos, los cuales han sido nombrados Neh1 a Neh7 (Neh es acrónimo para Nrf2-ECH homology domains). El dominio Neh1 contiene el motivo bZIP (Basic Leucine Zipper) que se une a las secuencias ARE (Antioxidant Response Element), regiones reguladoras dentro de los promotores génicos de algunas proteínas citoprotectoras y detoxificantes. El dominio Neh2 contiene dos motivos que se unen a Keap1, ETGE de unión fuerte y DLG de unión débil (41). Entre estos dos motivos se encuentran siete residuos lisina susceptibles a ubiquitinación. Los dominios Neh3, Neh6 y Neh7 se unen a la helicasa CHD6, a β-TrCP y a RXR, respectivamente. Los dominios Neh4 y Neh5 median transactivación o transrepresión por coactivadores o correpresores (42).

### 7.4.1 Regulación de Nrf2 por Keap1

El mecanismo más conocido de regulación de Nrf2 es por su inhibidor Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). En condiciones normales, Keap1 se encuentra asociado en forma de homodímero al dominio Neh2 (41), y sirve como un puente entre Nrf2 y la ligasa de ubiquitina Cul-3, que provoca la ubiquitinación de las lisinas del dominio Neh2 y la subsecuente degradación proteosomal de Nrf2 (43).

Keap1 es una proteína con un alto contenido en residuos cisteína, lo que la vuelve un excelente sensor del estrés oxidativo. En humanos posee 27 residuos cisteína, de los cuales todos o la mayoría parecen estar disponibles para interactuar con moléculas electrofílicas (44). En condiciones de estrés oxidativo, las modificaciones a los residuos cisteína de Keap1 alteran el complejo Nrf2-Keap1 pero no lo disocian directamente; solo se rompe la interacción débil de Keap1 con el motivo DLG del dominio Neh2 de Nrf2, pero no la interacción con el motivo ETGE. Este cambio conformacional es suficiente para detener la ubiquitinación y degradación de Nrf2 (43).

Al ser rescatado de la degradación, Nrf2 se acumula en el núcleo celular donde se heterodimeriza con proteínas Maf pequeñas (sMaf). Este heterodímero tiene la capacidad de unirse al ADN, con lo que Nrf2 puede interactuar con las secuencias ARE para inducir la expresión de sus genes *target* (43). Esta vía se encuentra esquematizada en la **Figura 2**.



**Figura 2. Mecanismo molecular del sistema Nrf2-Keap1.** En condiciones normales, Nrf2 es capturado por Keap1, ubiquitinado y posteriormente degradado. En condiciones de estrés oxidativo, moléculas electrófilas producen cambios conformacionales en Keap1, lo que hace que este libere a Nrf2, que luego puede translocarse al núcleo e inducir la expresión de sus genes *target*. Tomado y adaptado de (Nezu, Masahiro; Suzuki, Norio; y Yamamoto, Masayuki). 2017. (45).

#### 7.4.2 Otras vías de regulación de Nrf2

Además de la vía clásica, se han descubierto varios mecanismos adicionales de regulación de Nrf2. Estos pueden actuar a nivel postraducciona, traduccional, transcripcional o epigenético.

Uno de los mecanismos postraduccionales es la fosforilación. Entre las enzimas que se ha identificado que pueden fosforilar a Nrf2 están: PKC (protein kinase C) en el residuo Ser40; AMPK (AMP-activated protein kinase) en el residuo Ser550; MAPKs (mitogen-activated protein kinases) en los residuos Ser215, 408 y 577; Cdk5 (cyclin dependent kinase 5) en los residuos Thr395, Ser433 y Thr439; y GDK-3 (glycogen synthase kinase-3) en el dominio Neh6 (2, 43). Sin embargo, la relación real entre cada una de estas kinasas y Nrf2 aún no ha sido descrita completamente, y algunos experimentos parecen contradecir la hipótesis de que estas enzimas realmente tienen un efecto en Nrf2. Por ejemplo, se ha estudiado si mutaciones en los residuos que supuestamente son fosforilados por MAPKs producen alguna alteración en la actividad transcripcional de Nrf2, y los resultados han indicado que esta solo se afecta mínimamente, lo que implica que posiblemente el mecanismo de regulación de Nrf2 por MAPKs no es por fosforilación directa (46).

Otro mecanismo de regulación postraducciona es la acetilación. La enzima p300 acetila a Nrf2 en varios residuos de lisina dentro del dominio Neh1, lo que aumenta la actividad de Nrf2. Otra enzima, Sirt2, deacetila las lisinas 506 y 598 de Nrf2, teniendo el efecto contrario (2).

También existen proteínas que regulan a Nrf2 interactuando con Keap1. Un ejemplo es p62, que es capaz de secuestrar a Keap1, inhibiendo competitivamente su unión con Nrf2 y además marcándolo para degradación mediante autofagia. Cabe destacar que p62 también

está dentro de los genes *target* de Nrf2, por lo que su activación genera un ciclo de *feedback* positivo. Otras proteínas con funciones similares son p61 e IQGAP1 (2).

A nivel traduccional, el mRNA de Nrf2 contiene en la región 5' una secuencia IRES, necesaria para su internalización en el ribosoma, y un elemento inhibitorio en una posición *upstream* con respecto a IRES, que bloquea su entrada. El sulforafano y el peróxido de hidrógeno aparentemente aumentan la entrada del mRNA de Nrf2 en el ribosoma en un mecanismo dependiente de IRES. La traducción de NRf2 es probablemente escasa en condiciones normales (47).

La modulación a nivel transcripcional de Nrf2 está menos estudiada que las otras formas de regulación. Al parecer la transcripción de Nrf2 puede ser alterada a través de la vía de AhR, la vía de Notch o de la unión de Myc y Jun al promotor de Nrf2 (2).

La modulación a nivel epigenético se puede producir por metilación de DNA, modificación de histonas y por microRNAs. En un experimento en tumores de próstata de ratón, se vio que la expresión de Nrf2 puede verse disminuida ante la hipermetilación de ciertas regiones de su promotor (48). Algunos nutrientes bioactivos han mostrado ser capaces de revertir las modificaciones epigenéticas de Nrf2 para restaurar su expresión, entre los cuales se encuentran la curcumina, los tocoferoles, el sulforafano y el DIM (43). Se han identificado varios microRNAs que son capaces de controlar la transcripción de Nrf2 o Keap1, entre los cuales están miR144, miR34a, miR28 y miR200a (2).

### **7.4.3 Genes *target* de Nrf2**

Los principales genes *target* conocidos de Nrf2 corresponden a enzimas antioxidantes, entre las cuales están: superóxido dismutasa (*SOD*), catalasa (*CAT*), hemoxygenasa-1

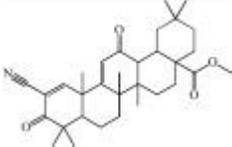
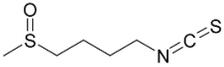
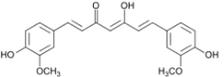
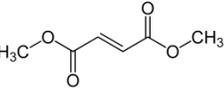
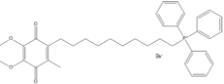
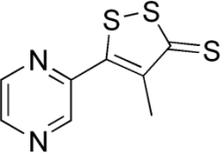
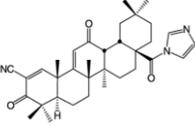
(*HMOX-1* o *HO-1*),  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa ( $\gamma$ *GCS*), peroxirredoxina (*PRDX*), glutatión reductasa (*GR*), tiorredoxina reductasa (*TXNRD*) 1 y sulfirredoxina (*SRXN*). Otros *targets* están involucrados en el metabolismo de drogas y la detoxificación, como NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1 (*NQO1*), glutatión-S-transferasa (*GST*) y UDP-glucoronosil transferasa (*UGT*) (2, 49).

Las funciones citoprotectoras no son el único rol que cumple Nrf2 en la célula. También se ha propuesto que estaría involucrado en procesos de transporte de proteínas, ubiquitinación, fosforilación, ciclo celular, crecimiento y apoptosis. Por ejemplo, se le han identificado *targets* en el metabolismo intermediario tales como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, transcetolasa, enzima málica, RXR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ -coactivador 1  $\beta$  (*PGC1- $\beta$* ) (2). Cabe destacar que Nrf2 no siempre produce el aumento en la expresión de sus genes *target*; también tiene rol de represor en algunos casos. Aparentemente es capaz de inhibir la biosíntesis de ácidos grasos, posiblemente al modular negativamente la transcripción de enzimas clave en la biosíntesis de estos como la ácido graso sintasa, la acetil-CoA carboxilasa o la ATP-citrato liasa, aunque no se ha comprobado que el mecanismo de inhibición en este caso sea directo (50).

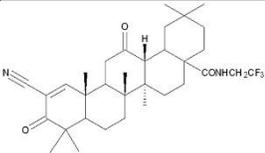
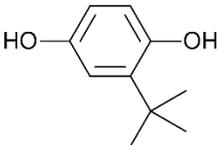
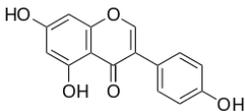
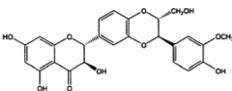
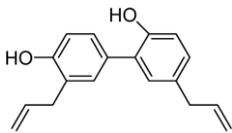
## 7.5 Moduladores exógenos de Nrf2

Muchos activadores de Nrf2 han sido estudiados. La mayoría en realidad operan inhibiendo a la proteína Keap1 en lugar de activar directamente Nrf2. Tienen en común que en general son compuestos electrofílicos capaces de reaccionar con grupos sulfhidrilos como los de los residuos cisteína (43). Los residuos cisteínas de Keap1 tienen distinta afinidad por cada activador. Cys-151, cys-273 y cys-288 parecen ser las que más comúnmente reaccionan con moduladores exógenos. Otras cisteínas sensibles son cys-226, cys-434 y cys-613 (51). Los activadores más comunes y sus mecanismos de interacción con el sistema Keap1/Nrf2 están resumidos en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Activadores conocidos de Nrf2**

Activador	Estructura química	Clasificación	Fuente	Mecanismo de acción	Ref
CDDO-Me		Triterpenoide	Sintético	Posiblemente se une a C151 de Keap1	(52, 53)
Sulforafano		Isotiocianato	Especies de plantas de la familia <i>Brassicaceae</i>	Se une a C38, C151, C368 y C489 de Keap1	(54)
Curcumina		Fenol	<i>Curcuma longa</i> L.	Se une a C151 de Keap1	(55)
Dimetil fumarato		Éster de ácido fumárico	Sintético	Se une a C151, C257 y C273 de Keap1	(56)
Mitoquinona		Quinona	Sintético	Induce autofagia de Keap1 por mecanismo dependiente de Atg7	(57, 58)
Oltipraz		Ditioletones	Sintético	Se une a C273 y C288 de Keap1	(43, 59)
CDDO-Im		Triterpenoide	Sintético	Se une a C151 de Keap1	(52)

**Tabla 1. Activadores conocidos de Nrf2 (continuación)**

Activador	Estructura química	Clasificación	Fuente	Mecanismo de acción	Ref
dh404		Triterpenoide	Sintético	Se une a C151 de Keap1	(60)
tBHQ		Quinona	Sintético	Se une a C151 de Keap1, induce ubiquitinación de Keap1	(43)
Genisteína		Isoflavona	Lupino, habas, soya kudzu, café	Aumenta la S-nitrosilación de Keap1 y aumenta la capacidad de Nrf2 de unirse al ADN	(61)
Silibinina		Polifenol	<i>Silibum marianum</i>	Indirecto, activa la vía de ER $\alpha$	(62)
Honokiol		Polifenol	<i>Magnolia officinalis</i>	Se une a cisteínas de Keap1	(63)

De los activadores estudiados, el que ha tenido más éxito desde el punto de vista terapéutico es el dimetil fumarato (DMF), que ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de psoriasis y esclerosis múltiple remitente-recurrente. En modelos en ratones de estas enfermedades, DMF demostró efectos antiinflamatorios y disminuyó la población de linfocitos T y B, lo que no se replicó en ratones *Nrf2*<sup>-/-</sup>, lo que indicaría que efectivamente actúa a través de la vía de Nrf2 (51). Otro activador que obtuvo un relativo éxito fue la metil bardoxilona (CDDO-Me), que llegó a ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de enfermedad renal crónica, sin embargo no llegó a la fase III debido a aparentes efectos adversos sobre el sistema cardiovascular. En este caso los mecanismos de acción incluyen la activación de vía de Nrf2 pero también la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción de rol proinflamatorio (51, 65).

Algunos de los activadores de Nrf2 son de origen natural y otros sintéticos. Los de origen natural han llamado la atención debido al auge de la medicina naturista en el último tiempo, siendo el más importante el sulforafano (66). Los activadores de Nrf2 más potentes conocidos son el triterpenoide CDDO y sus derivados, que corresponden a compuestos sintéticos (43).

La modulación negativa de Nrf2 está menos estudiada, pero puede tener relevancia en tratamientos contra el cáncer. Un ejemplo de un inhibidor que se está estudiando es el brusatol, un quasinoide (grupo triterpenoide) que se espera ayude a tratar la resistencia a la quimioterapia (67).

## **7.6 Nrf2 en diabetes mellitus tipo 2**

El tratamiento antioxidante en diabetes se ha estudiado ampliamente. Los primeros intentos involucraron antioxidantes propiamente tales, como las vitaminas C y E y el ácido  $\alpha$ -lipoico, pero no se obtuvieron resultados satisfactorios (68). Por esto se empezaron a probar

factores de transcripción que pudieran generar una respuesta antioxidante generalizada, siendo Nrf2 el más importante de estos.

A nivel sistémico, Nrf2 puede contribuir a prevenir el comienzo de la diabetes mediante la supresión de la ganancia de peso y la disminución de la resistencia a la insulina. Nrf2 puede regular el metabolismo de lípidos y glucosa, por lo que podría ayudar a tratar la obesidad en pacientes con DM, mientras que otros antihiperlipémicos como las glibenclamidas la aumentan (69). También se ha reportado que puede prevenir algunas de las complicaciones de la enfermedad, como el daño renal, la retinopatía y la cardiomiopatía. Además de sus funciones como regulador de la respuesta antioxidante, hay evidencia de que protege de la inflamación, regula los sistemas de degradación de proteínas y puede evitar la desdiferenciación celular (70).

Los niveles de Nrf2 parecen estar disminuidos en individuos diabéticos. Un estudio en pacientes con DM2 provenientes de la India, encontró que sus niveles de Nrf2 se encuentran disminuidos en plasma y en células polimorfonucleares, al igual que los niveles de algunas de las proteínas que regula, como SOD, HO-1, GPx (Glutación Peroxidasa) y CAT (71). También se encontraron concentraciones más bajas de lo normal en islotes pancreáticos de ratas diabéticas (62). Sin embargo, Nrf2 está aparentemente aumentado en modelos de DM2 en etapas más tempranas, en las que todavía existe hiperinsulinemia. La explicación no es completamente clara, pero se cree que puede ser un mecanismo compensatorio o porque la hiperinsulinemia directamente estimula la expresión de Nrf2 (2, 72).

### **7.7 Efectos de la activación de Nrf2 en la célula beta pancreática**

La activación de Nrf2 es capaz de alterar el balance redox de la célula beta pancreática. Una manera de medir el estrés oxidativo en células beta es utilizando como indicador el compuesto DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluorescina diacetato), el cual en un ambiente oxidativo

lleva a la producción del compuesto fluorescente diclorofluorosceína (DCF). Este método se ha utilizado, por ejemplo, en células INS-1 cultivadas en un ambiente glucolipotóxico, donde se vio que los niveles de ROS fueron significativamente menores en células tratadas con honokiol (73) o silibinina (62). *In vivo*, se ha encontrado que la activación de Nrf2 con silibinina disminuye la expresión de 8-OHdG, un marcador de daño oxidativo en el DNA, en ratas diabéticas (62). Se llegaron a resultados similares *ex vivo* en islotes aislados de ratón, utilizando oltipraz como activador (74). Esta protección se asocia tanto al aumento de la expresión de Nrf2 como de algunas de las proteínas que regula, como SOD (73) o HO-1 (62).

Otra forma de evaluar el estrés oxidativo en célula beta es midiendo la peroxidación lipídica, por ejemplo por ensayo TBARS. Esto se ha hecho en células MIN6, donde se vio que la activación de Nrf2 por sulforafano logró prevenir el aumento en la peroxidación de lípidos producida por la exposición a colesterol (75).

Cabe mencionar que también se ha visto un efecto protector de Nrf2 sobre el estrés nitrosativo en célula beta, disminuyendo no solo los niveles de radical hidroxilo, sino también de peroxinitrito (76).

### **7.7.1 Efectos de la activación de Nrf2 sobre la masa celular beta pancreática**

En diversos experimentos se ha visto que Nrf2 ayuda a proteger a la masa celular beta pancreática. Esto se ha comprobado *in vitro* en cultivos de células murinas MIN6 (77) e INS-1 (62, 73); *ex vivo* en islotes aislados de ratón (74), de rata (72) o de donantes humanos (78); e *in vivo* en ratas diabéticas (62, 79). En todos los casos se vio una disminución de la viabilidad celular al exponerlas al estímulo de estrés oxidativo, lo que se evitó cuando las células fueron pretratadas con algún activador de Nrf2. Cabe tener en cuenta que en estos experimentos se buscó principalmente indicios de apoptosis, sin hacer distinción con la posible des-diferenciación y/o disfunción de las células beta.

En la mayoría de los casos se utiliza peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para generar la condición de estrés oxidativo *in vitro* (72, 77, 78), lo que tiene la desventaja de que no representa totalmente la condición fisiopatológica oxidativa de un paciente con diabetes. Sin embargo, en otros experimentos que utilizaron estresores más cercanos a la realidad *in vivo*, tales como niveles elevados de palmitato (ácido graso saturado abundante en el organismo) o glucosa (62, 73, 74), también se obtuvieron resultados positivos. Esto sugiere que la activación de Nrf2 en células beta las protegería de estímulos citotóxicos pro-oxidativos más asociados a la realidad como las dietas hipercalóricas.

Los activadores de Nrf2 más utilizados para estos estudios son los derivados del triterpenoide sintético ya mencionado, el CDDO, tales como CDDO-Im (77) o dh404 (72, 78). Entre los activadores de origen natural que se han estudiado en célula beta están la silibinina (62), el honokiol (73) y la curcumina (79). Los resultados fueron positivos sin importar el origen del activador. En la **Tabla 2** se resumen los principales estudios en los que se evidencia el rol de Nrf2 sobre la masa celular beta pancreática.

**Tabla 2. Efectos de activación de Nrf2 sobre la masa celular beta pancreática**

<b>Activador</b>	<b>Estresor</b>	<b>Modelo</b>	<b>Resultados</b>	<b>Ref</b>
dh404	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Islotes pancreáticos de donantes humanos	Protección de viabilidad celular y aumento del porcentaje de células positivas para péptido-C	(78)
dh404	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Islotes aislados de rata	Protección de viabilidad celular y aumento del porcentaje de células positivas para proinsulina e insulina	(72)
CDDO-Im	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Células MIN6	Protección de viabilidad celular	(77)
DMF	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Células MIN6	Protección de viabilidad celular	(77)
tBHQ	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Células MIN6	Disminución de expresión de marcadores apoptóticos: caspasa-3 cortada (C-Casp-3) y PARP cortado(C-PARP)	(77)
Silibinina	Ninguno	Ratas Sprague-Dawley (SD) con DM2 inducida por estreptozocina	Aumento de porcentaje de células positivas para insulina	(62)
Silibinina	Palmitato y glucosa	Células INS-1	Protección de viabilidad celular	(62)
Oltipraz	Glucosa	Islotes de Langerhans de ratones C57Bl/6N	Disminución de porcentaje de células beta apoptóticas	(74)
Honokiol	Glucosa	Células INS-1	Protección de viabilidad celular, aumento de la proliferación celular, disminución de porcentaje de células apoptóticas	(73)
Curcumina	Ninguno	Ratas Winstar con diabetes inducida por estreptozocina	Protección frente a la apoptosis tanto por vía de retículo endoplásmico como mitocondrial	(79)

### 7.7.2 Efectos de la activación de Nrf2 sobre la funcionalidad celular beta pancreática

Son menos los estudios que se han centrado en ver el rol de Nrf2 concretamente sobre la funcionalidad celular beta pancreática, es decir, que hayan medido el efecto de la activación de Nrf2 sobre la capacidad de secreción insulínica de la célula beta ante un estímulo por glucosa.

Los estudios han mostrado que Nrf2 tiene un efecto protector sobre la funcionalidad celular beta. Los mecanismos parecen ser principalmente la protección de la función mitocondrial (74, 75) y de la autofagia (72). Los resultados vienen principalmente de estudios en islotes de roedores (72, 74) o *in vitro* en líneas celulares provenientes de roedores, como la línea MIN6 (75). Estos estudios están resumidos en la **Tabla 3**.

El proceso de autofagia consiste en la formación de autofagosomas que degradan contenido y estructuras celulares frente a un estímulo. Esto puede ser parte de un proceso fisiológico normal así como también una respuesta patológica al estrés celular, como por ejemplo frente a daño por estrés oxidativo. El efecto de Nrf2 sobre la autofagia se ha estudiado en células beta de ratas, donde la inducción de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocó la acumulación de proteínas ubiquitinadas y de LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), un marcador del autofagosoma. Cuando las células fueron tratadas con dh404 previo a la generación de estrés oxidativo, se suprimió la acumulación tanto de proteínas ubiquitinadas como de LC3 (72).

En la mitocondria, lo que se ha encontrado es que la activación de Nrf2 aumenta la tasa de consumo de oxígeno y la producción de ATP y NAD(P)H ante un estímulo por glucosa, en células MIN6 (75) o en islotes de ratón (74). Además se encontró que Nrf2 puede modular la expresión de algunos genes reguladores de la función mitocondrial, tales como *Sirt1* o *Pgc-1 $\alpha$* , pudiendo aumentar su expresión en alrededor de un 40% (75). En otras palabras, esto

sugiere que la activación de Nrf2 protege la reactividad de la mitocondria a los niveles elevados de glucosa.

**Tabla 3. Efectos de activación de Nrf2 sobre la funcionalidad celular beta pancreática**

<b>Activador</b>	<b>Estresor</b>	<b>Modelo</b>	<b>Resultados</b>	<b>Ref</b>
dh404	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Islotes aislados de rata	Mantenición de la funcionalidad celular mediante protección frente a la autofagia inducida por estrés oxidativo	(72)
Sulforafano	Colesterol	Células MIN6	Mantenición de la funcionalidad celular mediante la protección de la función mitocondrial	(75)
Oltipraz	Palmitato y glucosa	Islotes de ratones C57Bl/6N adultos	Mantenición de la funcionalidad celular mediante la protección de la función mitocondrial	(74)
DMF	Palmitato y glucosa	Islotes de ratones C57Bl/6N adultos	Mantenición de la funcionalidad celular mediante la protección de la función mitocondrial	(74)

### 7.8 Efectos adversos de la activación de Nrf2

A pesar de todo lo anteriormente expuesto, el paradigma actual sobre las especies oxidativas establece que estas también cumplen un rol trasductor de señales intracelulares en las células, incluida la célula beta, siendo la producción de radicales libres mitocondriales una parte importante del proceso de secreción insulínica (35). Se ha planteado la posibilidad de que el tratamiento antioxidante, incluida la activación de Nrf2, además de proteger a la célula beta del estrés oxidativo, también le quite capacidad de respuesta al estímulo por

glucosa (80). La activación de Nrf2 en células en condiciones no estresadas no muestra efectos beneficiosos sobre la secreción insulínica, por el contrario, ha mostrado afectar negativamente el funcionamiento de las células en ensayos de secreción de insulina estimulada por glucosa *in vitro* o GSIS (74).

Más allá de la célula beta, Nrf2 se encuentra usualmente aumentado en células tumorales. Se han reportado mutaciones somáticas de *KEAP1* o *NFE2L2* (gen de Nrf2) que producen activación constitutiva de Nrf2 en cáncer de pulmón, mama, vesícula biliar, riñón, vejiga, esófago y piel (40). El rol de *NFE2L2* en la fisiopatología del cáncer parece ser tanto de supresor tumoral como de oncogén. Su proteína, Nrf2, protege a las células normales de la carcinogénesis al remover radicales libres y otras moléculas que pudieran dañar el ADN. En células cancerosas, Nrf2 activa genes metabólicos que estimulan la proliferación celular y dota a las células de resistencia a agentes quimioterapéuticos (81). Esto es algo a tomar en cuenta como una posible fuente de complicaciones en cualquier tratamiento antioxidante que se quisiera utilizar para la diabetes o cualquier otra enfermedad donde la actividad de Nrf2 sea considerada un *target* terapéutico.

## 7.9 Modulación de Nrf2 a nivel genético

Por último, se buscaron estudios en los que la activación o inhibición de Nrf2 no fuera por moléculas exógenas sino por alteración genética. En la **Tabla 4** se encuentra resumido lo que se encontró al respecto.

Existe un estudio en células MIN6 en las que se silenció Nrf2 con shRNA (short hairpin RNA), produciendo una reducción del 70% en la producción de su mRNA. Estas células mostraron una reducción significativa en los niveles de GSH, un aumento en los niveles de ROS y una reducción en genes dependientes de ARE como *Gclc*, *Srxn1*, *Sod1* y *Prdx1*. Además, mostraron una mayor susceptibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, medida por la disminución de la

viabilidad celular y el aumento de marcadores apoptóticos como caspasa-3 cortada (C-Casp-3) y PARP cortado (C-PARP) (77).

Otros experimentos se han realizado en islotes pancreáticos de ratones  $Nrf2^{-/-}$ . En este caso se encontró que los islotes  $Nrf2^{-/-}$  expresan de manera reducida los genes *Nqo1* y *Gclc*, dependientes de ARE. Al compararlos con islotes  $Nrf2^{+/+}$  mostraron ser más susceptibles a la exposición a  $H_2O_2$ , sufriendo mayores cambios morfológicos (77). En otro experimento similar se vio que la supresión a nivel genético de *Nrf2* disminuye dramáticamente el tamaño de los islotes pancreáticos y empeora la tolerancia a la glucosa (76).

Por otro lado, para estudiar los efectos de la inducción a nivel genético de *Nrf2*, una estrategia que se ha utilizado es la de suprimir la expresión de *Keap1*. Esto se ha hecho en un modelo de ratones que además cuentan con una mutación para la sobreexpresión de sintasa de óxido nítrico 2 (iNOS), por lo que producen niveles excesivos de radicales libres. Los resultados mostraron niveles de insulina normales y una distribución normal de los islotes pancreáticos, lo que implicaría que la inducción constitutiva de *Nrf2* logró contrarrestar los efectos del estrés oxidativo en estos ratones (76).

**Tabla 4. Modulación de Nrf2 a nivel genético**

<b>Modelo</b>	<b>Modulación de Nrf2</b>	<b>Resultados</b>	<b>Ref</b>
Células MIN6	Inhibición de Nrf2 mediante shRNA	Reducción en un 70% en la transcripción de Nrf2, reducción en los niveles de GSH, aumento en los niveles de ROS, reducción en la transcripción de genes dependientes de ARE, mayor susceptibilidad a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(77)
Islotes de ratón Nrf2 <sup>-/-</sup>	Supresión del gen de Nrf2	Expresión reducida de genes dependientes de ARE, mayores cambios morfológicos ante la exposición a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(77)
Ratones <i>iNOS-Tg::Nrf2</i> <sup>+/-</sup>	Sobreexpresión de iNOS, supresión del gen de Nrf2	Tamaño disminuido de los islotes pancreáticos, peor tolerancia a la glucosa	(76)
Ratones <i>iNOS-Tg::Keap1-βCKO</i>	Sobreexpresión de iNOS, supresión del gen de Keap1 en célula beta	Niveles de insulina normales, distribución normal de los islotes pancreáticos, protección contra la producción excesiva de radicales libres	(76)

## 8. CONCLUSIÓN

La DM2 es una enfermedad con alta morbimortalidad a nivel mundial y local. Los tratamientos actuales no son del todo satisfactorios, por lo que se hace necesario buscar nuevas alternativas. Es una enfermedad compleja que involucra muchos factores, de los cuales los dos principales son la resistencia a la insulina y la falla beta pancreática. Se ha encontrado que ambos componentes están relacionados al estrés oxidativo.

Nrf2 es un factor de transcripción que regula la expresión de proteínas antioxidantes. Su principal regulador es su inhibidor Keap1, que al atraparlo provoca su ubiquitinación y posterior degradación. Se ha descubierto una gran cantidad de moléculas, tanto de origen natural como sintético, que son capaces de interrumpir esta interacción y por lo tanto aumentar la vida media de Nrf2 dentro de la célula. Estos compuestos se han convertido en un objeto de estudio por el potencial que tienen para ayudar en el tratamiento contra la diabetes y otras enfermedades crónicas.

Los estudios *in vitro* y en modelos animales han mostrado buenos resultados en cuanto a la capacidad de Nrf2 de proteger a la célula beta del estrés oxidativo. Sin embargo esto no se ha comprobado en humanos y de hecho, la mayoría de los estudios anteriores mostraron que el tratamiento antioxidante no da resultados lo suficientemente satisfactorios en diabetes. Es probable que existan otros factores, más allá del estrés oxidativo, que evitan que el tratamiento antioxidante por sí solo sea efectivo. Quizá el futuro terapéutico de Nrf2 en la diabetes sea más como complemento a las terapias farmacológicas actualmente disponibles. Por otra parte, los avances en la edición génica podrían permitir el desarrollo de terapias génicas que modifiquen la respuesta de la vía Keap1/Nrf2 en las células beta de manera tal que las haga más resistentes al daño oxidativo, pero sin que ello comprometa su función secretora de insulina.

## 9. REFERENCIAS

1. Organization WH. Global report on diabetes. 2016.
2. Matzinger M, Fischhuber K, Heiss EH. Activation of Nrf2 signaling by natural products-can it alleviate diabetes? *Biotechnology Advances*. 2018;36(6):1738-67.
3. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care*. 2019;42(Supplement 1):S13-S28.
4. Papatheodorou K, Banach M, Bekiari E, Rizzo M, Edmonds M. Complications of Diabetes 2017. *Journal of Diabetes Research*. 2018;2018:1-4.
5. Marín-Peñalver JJ, Martín-Timón I, Sevillano-Collantes C, Del Cañizo-Gómez FJ. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World journal of diabetes*. 2016;7(17):354-95.
6. Collombat P, Hecksher-Sørensen J, Serup P, Mansouri A. Specifying pancreatic endocrine cell fates. *Mechanisms of Development*. 2006;123(7):501-12.
7. Guo S. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *Journal of Endocrinology*. 2014;220(2):T1-T23.
8. Zhu Y, Liu Q, Zhou Z, Ikeda Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017;8(1).
9. Vakilian M, Tahamtani Y, Ghaedi K. A review on insulin trafficking and exocytosis. *Gene*. 2019;706:52-61.
10. McCulloch LJ, Van De Bunt M, Braun M, Frayn KN, Clark A, Gloyn AL. GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: Implications for understanding genetic association signals at this locus. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2011;104(4):648-53.
11. Henquin JC, Nenquin M, Ravier MA, Szollosi A. Shortcomings of current models of glucose-induced insulin secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2009;11:168-79.
12. Cantley J, Ashcroft FM. Q&A: insulin secretion and type 2 diabetes: why do  $\beta$ -cells fail? *BMC Biology*. 2015;13(1).
13. Huang M, Joseph JW. Assessment of the Metabolic Pathways Associated With Glucose-Stimulated Biphasic Insulin Secretion. *Endocrinology*. 2014;155(5):1653-66.
14. Kang T, Jensen P, Huang H, Lund Christensen G, Billestrup N, Larsen MR. Characterization of the Molecular Mechanisms Underlying Glucose Stimulated Insulin Secretion from Isolated Pancreatic  $\beta$ -cells Using Post-translational Modification Specific Proteomics (PTMomics). *Molecular & Cellular Proteomics*. 2018;17(1):95-110.
15. Prentki M, Matschinsky Franz M, Madiraju SRM. Metabolic Signaling in Fuel-Induced Insulin Secretion. *Cell Metabolism*. 2013;18(2):162-85.
16. Gembal M, Gilon P, Henquin JC. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;89(4):1288-95.
17. Molina J, Rodriguez-Diaz R, Fachado A, Jacques-Silva MC, Berggren PO, Caicedo A. Control of Insulin Secretion by Cholinergic Signaling in the Human Pancreatic Islet. 2014;63(8):2714-26.
18. Yaney GC, Corkey BE. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2003;46(10):1297-312.

19. Alejandro EU, Gregg B, Blandino-Rosano M, Cras-Méneur C, Bernal-Mizrachi E. Natural history of  $\beta$ -cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Molecular Aspects of Medicine*. 2015;42:19-41.
20. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of Medicine*. 2013;7(1):14-24.
21. Gutiérrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. Molecular mechanisms of insulin resistance: An update. *Gaceta Medica de Mexico*. 2017;153(2):214-28.
22. Hardy OT, Czech MP, Corvera S. What causes the insulin resistance underlying obesity? *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*. 2012;19(2):81-7.
23. Brereton MF, Rohm M, Ashcroft FM.  $\beta$ -Cell dysfunction in diabetes: a crisis of identity? *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2016;18:102-9.
24. Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, et al.  $\beta$ -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(6):1983-92.
25. Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, Bozsak R, Speier S. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Molecular Metabolism*. 2017;6(9):943-57.
26. Accili D, Talchai SC, Kim-Muller JY, Cinti F, Ishida E, Ordelheide AM, et al. When  $\beta$ -cells fail: lessons from dedifferentiation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2016;18:117-22.
27. Lee J-H, Mellado-Gil JM, Bahn YJ, Pathy SM, Zhang YE, Rane SG. Protection from  $\beta$ -cell apoptosis by inhibition of TGF- $\beta$ /Smad3 signaling. *Cell Death & Disease*. 2020;11(3).
28. Brereton MF, Iberl M, Shimomura K, Zhang Q, Adriaenssens AE, Proks P, et al. Reversible changes in pancreatic islet structure and function produced by elevated blood glucose. *Nature Communications*. 2014;5(1):4639.
29. Spijker HS, Song H, Ellenbroek JH, Roefs MM, Engelse MA, Bos E, et al. Loss of  $\beta$ -Cell Identity Occurs in Type 2 Diabetes and Is Associated With Islet Amyloid Deposits. *Diabetes*. 2015;64(8):2928-38.
30. White MG, Marshall HL, Rigby R, Huang GC, Amer A, Booth T, et al. Expression of Mesenchymal and  $\beta$ -Cell Phenotypic Markers in Islet  $\beta$ -Cells in Recently Diagnosed Diabetes. 2013;36(11):3818-20.
31. Brereton MF, Rohm M, Shimomura K, Holland C, Tornovsky-Babeay S, Dadon D, et al. Hyperglycaemia induces metabolic dysfunction and glycogen accumulation in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature Communications*. 2016;7(1):13496.
32. Fan J, Du W, Kim-Muller JY, Son J, Kuo T, Larrea D, et al. *Cyb5r3* links FoxO1-dependent mitochondrial dysfunction with  $\beta$ -cell failure. *Molecular Metabolism*. 2020;34:97-111.
33. Cnop M, Toivonen S, Igoillo-Esteve M, Salpea P. Endoplasmic reticulum stress and eIF2 $\alpha$  phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic  $\beta$  cells. *Molecular Metabolism*. 2017;6(9):1024-39.
34. Engin F, Nguyen T, Yermalovich A, Hotamisligil GS. Aberrant islet unfolded protein response in type 2 diabetes. *Scientific Reports*. 2015;4(1).
35. Gerber PA, Rutter GA. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxidants & redox signaling*. 2017;26(10):501-18.
36. Mugabo Y, Zhao S, Lamontagne J, Al-Mass A, Peyot M-L, Corkey BE, et al. Metabolic fate of glucose and candidate signaling and excess-fuel detoxification pathways in pancreatic  $\beta$ -cells. 2017;jbc.M116.763060.

37. Kien CL, Bunn JY, Poynter ME, Stevens R, Bain J, Ikayeva O, et al. A Lipidomics Analysis of the Relationship Between Dietary Fatty Acid Composition and Insulin Sensitivity in Young Adults. 2013;62(4):1054-63.
38. Nemezc M, Constantin A, Dumitrescu M, Alexandru N, Filippi A, Tanko G, et al. The Distinct Effects of Palmitic and Oleic Acid on Pancreatic Beta Cell Function: The Elucidation of Associated Mechanisms and Effector Molecules. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;9.
39. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(6):3077-82.
40. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT, et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. 2015;88:108-46.
41. Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H, Itoh K, Tanaka T, Yamamoto M. Keap1 Recruits Neh2 through Binding to ETGE and DLG Motifs: Characterization of the Two-Site Molecular Recognition Model. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26(8):2887-900.
42. Nam LB, Keum Y-S. Binding partners of NRF2: Functions and regulatory mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2019;678:108184.
43. Huang Y, Li W, Su Z-Y, Kong A-NT. The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015;26(12):1401-13.
44. Hong F, Freeman ML, Liebler DC. Identification of Sensor Cysteines in Human Keap1 Modified by the Cancer Chemopreventive Agent Sulforaphane. *Chemical Research in Toxicology*. 2005;18(12):1917-26.
45. Nezu M, Suzuki N, Yamamoto M. Targeting the KEAP1-NRF2 System to Prevent Kidney Disease Progression. *American Journal of Nephrology*. 2017;45(6):473-83.
46. Sun Z, Huang Z, Zhang DD. Phosphorylation of Nrf2 at Multiple Sites by MAP Kinases Has a Limited Contribution in Modulating the Nrf2-Dependent Antioxidant Response. *PLoS ONE*. 2009;4(8):e6588.
47. Li W, Thakor N, Xu EY, Huang Y, Chen C, Yu R, et al. An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2. 2010;38(3):778-88.
48. Yu S, Khor TO, Cheung K-L, Li W, Wu T-Y, Huang Y, et al. Nrf2 Expression Is Regulated by Epigenetic Mechanisms in Prostate Cancer of TRAMP Mice. *PLoS ONE*. 2010;5(1):e8579.
49. Habtemariam S. The Nrf2/HO-1 Axis as Targets for Flavanones: Neuroprotection by Pinocembrin, Naringenin, and Eriodictyol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:4724920.
50. Tanaka Y, Aleksunes LM, Yeager RL, Gyamfi MA, Esterly N, Guo GL, et al. NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008;325(2):655-64.
51. Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, Cuadrado A. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:1-20.
52. Dayalan Naidu S, Muramatsu A, Saito R, Asami S, Honda T, Hosoya T, et al. C151 in KEAP1 is the main cysteine sensor for the cyanoenone class of NRF2 activators, irrespective of molecular size or shape. *Scientific Reports*. 2018;8(1).

53. Camer D, Yu Y, Szabo A, Dinh CHL, Wang H, Cheng L, et al. Bardoxolone methyl prevents insulin resistance and the development of hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2015;412:36-43.
54. Hu C, Egger AL, Mesecar AD, Van Breemen RB. Modification of Keap1 Cysteine Residues by Sulforaphane. *Chemical Research in Toxicology*. 2011;24(4):515-21.
55. Shin JW, Chun K-S, Kim D-H, Kim S-J, Kim SH, Cho N-C, et al. Curcumin induces stabilization of Nrf2 protein through Keap1 cysteine modification. *Biochemical Pharmacology*. 2020;173:113820.
56. Brennan MS, Matos MF, Li B, Hronowski X, Gao B, Juhasz P, et al. Dimethyl Fumarate and Monoethyl Fumarate Exhibit Differential Effects on KEAP1, NRF2 Activation, and Glutathione Depletion In Vitro. *PLOS ONE*. 2015;10(3):e0120254.
57. Zhang T, Xu S, Wu P, Zhou K, Wu L, Xie Z, et al. Mitoquinone attenuates blood-brain barrier disruption through Nrf2/PHB2/OPA1 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. *Experimental Neurology*. 2019;317:1-9.
58. Gonzalez Y, Aryal B, Chehab L, Rao VA. Atg7- and Keap1-dependent autophagy protects breast cancer cell lines against mitoquinone-induced oxidative stress. 2014;5(6):1526-37.
59. Ali M, Bonay M, Vanhee V, Vinit S, Deramaudt TB. Comparative effectiveness of 4 natural and chemical activators of Nrf2 on inflammation, oxidative stress, macrophage polarization, and bactericidal activity in an in vitro macrophage infection model. *PLOS ONE*. 2020;15(6):e0234484.
60. Ichikawa T, Li J, Meyer CJ, Janicki JS, Hannink M, Cui T. Dihydro-CDDO-Trifluoroethyl Amide (dh404), a Novel Nrf2 Activator, Suppresses Oxidative Stress in Cardiomyocytes. 2009;4(12):e8391.
61. Wang R, Tu J, Zhang Q, Zhang X, Zhu Y, Ma W, et al. Genistein attenuates ischemic oxidative damage and behavioral deficits via eNOS/Nrf2/HO-1 signaling. *Hippocampus*. 2013;23(7):634-47.
62. Chu C, Gao X, Li X, Zhang X, Ma R, Jia Y, et al. Involvement of Estrogen Receptor- $\alpha$  in the Activation of Nrf2-Antioxidative Signaling Pathways by Silibinin in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Biomolecules & Therapeutics*. 2020;28(2):163-71.
63. Hou Y, Peng S, Li X, Yao J, Xu J, Fang J. Honokiol Alleviates Oxidative Stress-Induced Neurotoxicity via Activation of Nrf2. *ACS Chemical Neuroscience*. 2018;9(12):3108-16.
64. Lee S, Hur E-g, Ryoo I-g, Jung K-A, Kwak J, Kwak M-K. Involvement of the Nrf2-proteasome pathway in the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic  $\beta$ -cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012;264(3):431-8.
65. Wang YY, Yang YX, Zhe H, He ZX, Zhou SF. Bardoxolone methyl (CDDO-Me) as a therapeutic agent: an update on its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Drug Design Development and Therapy*. 2014;8:2075-88.
66. Vasileva LV, Savova MS, Amirova KM, Dinkova-Kostova AT, Georgiev MI. Obesity and NRF2-mediated cytoprotection: Where is the missing link? *Pharmacological Research*. 2020;156:104760.
67. Olayanju A, Copple IM, Bryan HK, Edge GT, Sison RL, Wong MW, et al. Brusatol provokes a rapid and transient inhibition of Nrf2 signaling and sensitizes mammalian cells to chemical toxicity—implications for therapeutic targeting of Nrf2. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015;78:202-12.
68. Thakur P, Kumar A. Targeting oxidative stress through antioxidants in diabetes mellitus. *Journal of Drug Targeting*. 2018;26(9):766-76.

69. Hendrawati A. Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) as A Therapeutical Target in Type-2 Diabetes Mellitus: A Review. *The Indonesian Biomedical Journal*. 2017;9(2):73.
70. Uruno A, Yagishita Y, Yamamoto M. The Keap1–Nrf2 system and diabetes mellitus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2015;566:76-84.
71. Sireesh D, Dhamodharan U, Ezhilarasi K, Vijay V, Ramkumar KM. Association of NF-E2 Related Factor 2 (Nrf2) and inflammatory cytokines in recent onset Type 2 Diabetes Mellitus. *Scientific Reports*. 2018;8(1).
72. Li W, Wu W, Song H, Wang F, Li H, Chen L, et al. Targeting Nrf2 by dihydro-CDDO-trifluoroethyl amide enhances autophagic clearance and viability of  $\beta$ -cells in a setting of oxidative stress. *FEBS Letters*. 2014;588(12):2115-24.
73. Li C-g, Ni C-l, Yang M, Tang Y-z, Li Z, Zhu Y-j, et al. Honokiol protects pancreatic  $\beta$  cell against high glucose and intermittent hypoxia-induced injury by activating Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;97:1229-37.
74. Schultheis J, Beckmann D, Mulac D, Müller L, Esselen M, Düfer M. Nrf2 Activation Protects Mouse Beta Cells from Glucolipototoxicity by Restoring Mitochondrial Function and Physiological Redox Balance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:1-17.
75. Carrasco-Pozo C, Tan KN, Gotteland M, Borges K. Sulforaphane Protects against High Cholesterol-Induced Mitochondrial Bioenergetics Impairments, Inflammation, and Oxidative Stress and Preserves Pancreatic  $\beta$ -Cells Function. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:3839756.
76. Yagishita Y, Fukutomi T, Sugawara A, Kawamura H, Takahashi T, Pi J, et al. Nrf2 Protects Pancreatic  $\beta$ -Cells From Oxidative and Nitrosative Stress in Diabetic Model Mice. *Diabetes*. 2014;63(2):605.
77. Fu J, Zheng H, Wang H, Yang B, Zhao R, Lu C, et al. Protective Role of Nuclear Factor E2-Related Factor 2 against Acute Oxidative Stress-Induced Pancreatic $\beta$ -Cell Damage. 2015;2015:1-12.
78. Masuda Y, Vaziri ND, Li S, Le A, Hajjghasemi-Ossareh M, Robles L, et al. The Effect of Nrf2 Pathway Activation on Human Pancreatic Islet Cells. *PLOS ONE*. 2015;10(6):e0131012.
79. Rashid K, Sil PC. Curcumin enhances recovery of pancreatic islets from cellular stress induced inflammation and apoptosis in diabetic rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2015;282(3):297-310.
80. Fu J, Hou Y, Xue P, Wang H, Xu Y, Qu W, et al. Nrf2 in Type 2 diabetes and diabetic complications: Yin and Yang. *Current Opinion in Toxicology*. 2016;1:9-19.
81. Mizumura K, Maruoka S, Shimizu T, Gon Y. Role of Nrf2 in the pathogenesis of respiratory diseases. *Respiratory Investigation*. 2020;58(1):28-35.