

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



**Keap1-Nrf2-ARE: via de sinalização celular  
como potencial alvo terapêutico na Diabetes  
Mellitus tipo 2**

**Raquel Correia Bentes dos Santos Silva**

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria João Gama,  
Professora Auxiliar.

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2022**



**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



# **Keap1-Nrf2-ARE: via de sinalização celular como potencial alvo terapêutico na Diabetes Mellitus tipo 2**

**Raquel Correia Bentes dos Santos Silva**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria João Gama,  
Professora Auxiliar

**2022**



# Resumo

A Diabetes é um conjunto de patologias metabólicas de etiologia multifatorial onde a principal alteração fisiológica se pauta pela presença de um fenótipo comum – hiperglicemia. Os elevados níveis séricos de glicose, resultam de uma interação complexa de fatores genéticos e ambientais que provocam uma insuficiente produção de insulina e/ou resistência celular à ação da hormona, por parte das células que dela dependem para o transporte intracelular de glicose. O stress oxidativo contribui significativamente para o desenvolvimento fisiopatológico da Diabetes Mellitus tipo 2, ao exacerbar o estado disfuncional que as células beta pancreáticas apresentam sobre condições de hiperglicemia crónica. Este resulta principalmente da formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), resultando num desequilíbrio do estado *redox* celular.

A principal resposta fisiológica ao desequilíbrio *redox* é a ativação da via de sinalização celular Keap1-Nrf2-ARE (Kelch-like ECH associated protein 1 - nuclear factor (erythroid-derived 2) -like 2 – elemento de resposta antioxidante), na qual o fator de transcrição Nrf2 atua como um importante regulador da expressão de genes que codificam proteínas com ação antioxidante. Em resposta ao stress oxidativo, o Nrf2 tem ação sobre o processo de transcrição de diversas enzimas incluídas nos processos de biotransformação de fase I, II e III e mecanismos antioxidantes. A ativação desta via de sinalização permite contrariar os efeitos nefastos dos agentes oxidantes e outros eletrófilos, tendo-se tornado um alvo atrativo para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas com o stress oxidativo. Ao longo dos últimos anos têm sido estudados os diversos componentes integrantes desta via e que, em teoria, poderão ter um papel determinante no desenvolvimento da Diabetes Mellitus do tipo 2 e de complicações relacionadas com a doença, sendo por isso, possíveis alvos terapêuticos.

A presente monografia pretende analisar a forma como interagem os componentes da via de sinalização celular em estudo e apresentar uma revisão sobre as moléculas moduladoras do Nrf2 que se encontram atualmente em estudo por apresentar potencial terapêutico no tratamento da Diabetes Mellitus do tipo 2.

**Palavras-chave:** Stress Oxidativo; Via de Sinalização Celular *Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 - Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2) – Like 2 - Antioxidant Response Element*; Diabetes Mellitus Tipo 2; Alvos Terapêuticos

# Abstract

Diabetes is a group of complex metabolic disease of multifactorial etiology, which have, as a main physiopathological alteration, the presence of hyperglycaemia. The high levels of glucose in the blood result from an interaction of genetic and environmental factors, resulting in an impaired insulin production and/or an increase in cellular resistance to the hormone, specifically in cells which rely on it for intracellular glucose transportation. Oxidative stress is a significant contributor to the physiopathological development of Diabetes Mellitus type 2, worsening the dysfunctional status of beta pancreatic cells after being exposed to chronic hyperglycaemia. This oxidative status results from the formation of reactive oxygen species (ROS), which causes an oxidative-reductive imbalance in the cell.

The main physiological response to this oxidative-reductive imbalance is the activation of the Keap1-Nrf2-ARE (Kelch-like ECH associated protein 1 - nuclear factor (erythroid-derived 2) -like 2 – antioxidative response element) pathway, through which the Nrf2 transcription factor acts as an important regulator of genes that code proteins with an antioxidative role. In response to cellular stress, Nrf2 acts upon the process of protein transcription, stimulating the production of many enzymes involved in phases I, II and III of biotransformation reactions, as well as several antioxidative mechanisms. The activation of this signalling pathway allows the cell to combat the adverse effects of the oxidative agents, as well as other electrophiles. Because of that, this pathway has grown into an attractive target for treatment and prevention of several diseases related to oxidative stress. Through the years, there has been studies on the effects of the various components of this pathway which, in theory, might have a protective effect in the development of Diabetes Mellitus type 2 and the complications associated with it, causing them to have grown into potential therapeutic targets.

This dissertation will analyse the way by which the different cellular signalling pathway components in study interact and present a review of the modulating molecules of the Nrf2 pathway currently in development and study, presenting therapeutic potential in the treatment of Diabetes Mellitus type 2.

**Keywords:** Oxidative Stress; Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 - Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2) – Like 2 - Antioxidant Response Element signalling pathway; Type 2 Diabetes Mellitus; Therapeutic Targets

# Agradecimentos

À minha família,

Por estar sempre presente em todos os momentos.

Ao João,

Pelo apoio incondicional.

Aos meus amigos e à Rita,

Pela companhia em todas as aventuras.

À FFUL,

Por todas as experiências que me foram proporcionadas.

# Abreviaturas

ABC – ATP-binding cassetes

AGE – Produtos avançados de glicação

AKR1 – Aldo-ceto redutases família 1

ALDH3A – Aldeído desidrogenase família 3, membro A

AMPK – proteína cinase 5' AMP-ativada

ARE – Elemento de Resposta Antioxidante

Blvr – Biliverdina redutase

BTB – broad/tramtrack/bric-a-brac

$\beta$ -TrCP – Beta-transducin repeats-containing proteins

bZIP – Basic domain leucine zipper

CAT – Catalase

CBR – Carbonilo redutases

CDDO-Me – Bardoxolona Metil

CNC – Cap'n'collar

CRL3 – Complexo Cullin 3 e RING-box protein 1

CUL3 – Cullin 3

DMT2 – Diabetes Mellitus Tipo 2

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPP – Dipeptil peptidases

DRC – Doença Renal Crónica

EPHX – Epóxido hidrolases

ER – Recetor do estrogénio

FECH – Ferroquelatase

Ft – Ferritina

G6PD – Glucose-6-fosfato 1-desidrogenase

GCL – Glutamato-cisteína ligase  
γGT1 – Gama glutamiltransferase 1  
GLP-1 – Glucagon-Like Peptide 1  
GLRx – Glutarredoxina 1  
GLS – Glutaminase  
GLUT-4 – Transportadores de Glicose Insulinodependente  
GPx – Glutaciona peroxidase  
GR – Glutaciona reductase  
GSK3-β – Glycogen Kinase Synthase 3-beta  
GSH – Glutaciona  
GSSG – Glutaciona oxidada  
GST – Glutaciona-S-Transferase  
HAT – Histona acetiltransferase  
HbA1c – Hemoglobina glicada  
HO-1 – Heme oxigenase-1  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogénio  
IκB-α – Inibidor k-B alfa  
IKK-β – Cinase IκB beta  
Keap1 – Kelch-like ECH-Associated Protein 1  
sMaf – small Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Protein  
MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase  
MDR – *Multidrug-resistance pump*  
ME1 – Enzima málica 1 NADP<sup>+</sup>-dependente  
MGST – Glutaciona S-transferase microsomal  
MRP – *Multidrug-resistance-associated protein*  
Neh – Nrf2-ECH homology domains  
NF-κB – Nuclear Factor-κB

NQO1 – NAD(P)H:quinone oxireductase

NO – Óxido Nítrico

Nrf2 – Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2

$O_2^{\cdot-}$  - Anião superóxido

$O_2^{\cdot\cdot}$  - Oxigénio Birradical

$\cdot O_2$  - Oxigénio Singleto

$O_3$ – Ozono

OH· - Radical Hidroxilo

PALB2 – *Partner and localizer* do Brca2

PDE – Fosfodiesterases

PGAM – Fosfoglicerato mutase

PGD – 6-fosfogluconato desidrogenase

PI3K/AKT – Fosfatidilinositol 3-cinase/protein cinase B

PKC – Proteína cinase C

PON1 – Paraoxonase-1

PPAR $\gamma$  – Recetores ativados por proliferadores de peroxissoma gama

PPI – Inibidores proteína-proteína para a ativação do Nrf2

Prx – Peroxirredoxina

PTGR – Prostaglandina redutases

Rbx1 – RING-box Protein 1

RNA – Ácido ribonucleico

RNS – Espécies Reativas de Azoto

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

RXR $\alpha$  – retinoid X receptor alfa

SGLT2 – Co-transportadores sódio-glicose 2

SIRT1 – Histona desacetilase sirtuin 1 dependente do NAD<sup>+</sup>

SLC7A11 – Transportador glutamato/cistina

SNP – Polimorfismo de nucleótido único

SOD – Superóxido dismutases

Srx1 - Sulforredoxina-1

SULT – Família das sulfotransferases citosólicas

TALDO1 – Transaldolase

TCT – Transcetolase isoforma 1

Trx – Tiorredoxina

TrxR1 – Tiorredoxina redutase 1

TZD – Tiazolidinedionas

UCP – Proteínas de deacoplamento

UGD – UDP-glucose desidrogenase

UGT – UDP-glucuronosiltransferases

UV – Ultravioleta

Nota: Ao longo deste texto serão utilizados termos técnicos de língua inglesa que não foram traduzidos, uma vez que, fazendo parte de um glossário científico consagrado na literatura internacional, o seu sentido se desvirtuaria com uma tradução virtual.

## Índice

1	Secção Introdutória .....	9
1.1	Introdução .....	9
1.2	Objetivos .....	9
1.3	Métodos.....	10
2	Oxidação nos Sistemas Biológicos .....	11
2.1	Espécies Reativas de Oxigénio .....	11
2.2	Principais mecanismos de defesa contra o stress celular .....	12
3	Diabetes Mellitus Tipo 2.....	14
3.1	Introdução .....	14
3.2	Realidade terapêutica da Diabetes Mellitus Tipo 2 .....	15
3.3	Mecanismo fisiopatológico e Stress Oxidativo.....	17
4	Via Keap1-Nrf2-ARE .....	20
4.1	Introdução .....	20
4.2	Função de Keap1.....	20
4.3	Função de Nrf2 .....	21
4.4	Elemento de Resposta Antioxidante .....	23
4.5	Indutores da via.....	25
4.6	Mecanismo de regulação da via Keap1-Nrf2-ARE .....	26
5	A via Keap1-Nrf2-ARE como alvo terapêutico.....	29
5.1	Via Keap1-Nrf2-ARE e Diabetes Mellitus Tipo 2 .....	29
5.2	Perspetivas futuras no desenvolvimento de moléculas com atividade terapêutica .....	30
5.2.1	Resveratrol .....	31
5.2.2	Curcumina.....	33
5.2.3	Bardoxolona Metil .....	35
6	Conclusão.....	37
	Referências Bibliográficas .....	39

## Índice de Figuras:

Figura 1. Reações Enzimáticas de Eliminação de ROS catalisadas pelas principais enzimas antioxidantes. ....	13
Figura 2. Domínios funcionais da proteína Keap1. ....	20
Figura 3. Domínios funcionais da proteína Nrf2. ....	22
Figura 5. Estruturas químicas que atuam sobre a via de sinalização celular Keap1-Nrf2-ARE como potencial terapêutico no tratamento da DMT2. ....	31

## Índice de Tabelas:

Tabela 1. Características dos Antidiabéticos Autorizados e Comercializados em Portugal.....	16
Tabela 2. Proteínas cuja expressão é regulada pelo Nrf2. ....	23

# 1 Secção Introdutória

## 1.1 Introdução

A Diabetes é um conjunto de patologias metabólicas de etiologia multifatorial onde a principal alteração fisiológica se caracteriza pela presença de elevados níveis séricos de glicose que resultam de uma interação complexa de fatores genéticos e ambientais. No caso da Diabetes Mellitus Tipo 2 a hiperglicemia é resultante de uma insuficiente produção de insulina e/ou resistência celular à ação da hormona, por parte das células que dela dependem para o transporte intracelular de glicose.

O stress oxidativo é um fator que contribui significativamente para o desenvolvimento fisiopatológico da Diabetes Mellitus tipo 2, ao exacerbar o estado disfuncional que as células beta pancreáticas apresentam sob condições de hiperglicemia crónica. Este estado oxidativo é consequência de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua destoxificação por mecanismos antioxidantes, resultando numa incapacidade de neutralizar as Espécies Reativas de Oxigénio (ROS). Estes compostos têm efeitos nefastos a nível celular, no entanto as células eucarióticas estão munidas de mecanismos para dar resposta às condições de stress. Uma via importante nesta resposta celular é a via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE que, quando ativada conduz ao aumento de concentrações proteicas de enzimas envolvidas em reações de biotransformação de fase I, II e III e nos mecanismos antioxidantes. Assim, a ativação desta via de sinalização permite contrariar os efeitos nefastos dos agentes oxidantes e outros eletrófilos, tendo-se tornado um alvo atrativo para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas com o stress oxidativo.

## 1.2 Objetivos

A elaboração deste trabalho incide sobre o objetivo principal de compreender como é que a modulação dos elementos da via de sinalização celular Keap1-Nrf2-ARE poderá constituir uma possível abordagem terapêuticas na Diabetes Mellitus Tipo 2.

Para tal será feita uma descrição da fisiopatologia subjacente à Diabetes Mellitus Tipo 2, dos mecanismos de defesa celular contra o stress oxidativo, em especial, da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE. Esta análise crítica e a discussão dos resultados obtidos face à fundamentação teórica é integrada na avaliação de resultados

encontrados nos estudos que avaliam o potencial terapêutico de moléculas que influenciam o funcionamento da via de sinalização celular Keap1-Nrf2-ARE.

### **1.3 Métodos**

Esta dissertação compreende uma revisão bibliográfica, com base na evidência científica disponível. Como tal, foi realizada uma pesquisa bibliográfica recorrendo a bases de dados, nomeadamente, PubMed, PubChem, B-on, ScienceDirect, ClinicalTrials.gov e Scholar Google, tendo por base a utilização de termos como “Keap1-Nrf2-ARE Pathway”, “Type 2 Diabetes Mellitus”, “Nrf2”, “Oxidative Stress”, “Therapeutic Targets”, “Resveratrol”, “CDDO-Me” e “Curcumin”. Os resultados foram limitados a documentos na língua inglesa e portuguesa. Foram ainda consultadas outras fontes de informação, mais concretamente, a Organização Mundial de Saúde (OMS), guias orientadoras de terapêutica da Sociedade Europeia de Cardiologia (ESC) e a Agência Europeia do Medicamento (EMA).

## 2 Oxidação nos Sistemas Biológicos

### 2.1 Espécies Reativas de Oxigênio

O conceito de stress oxidativo baseia-se em alterações no equilíbrio *redox* que levam ao aumento de concentrações de compostos oxidantes, em detrimento de compostos e mecanismos ditos redutores. As condições de stress oxidativo são assim provocadas por desequilíbrios da homeostasia *redox* onde concentrações elevadas de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS) altamente reativas interagem com macromoléculas e provocam peroxidação lipídica, oxidação de DNA e RNA e podem contribuir para a formação de derivados carbonilo e nitrosilação de proteínas (1–6). Quando as condições de stress atingem patamares severos, a sobrevivência celular está dependente da sua capacidade de se adaptar ou resistir às condições do meio e estar apta a reparar e/ou substituir as moléculas que sofrem danos a nível intracelular (7). Em situações onde esta capacidade não seja suficiente para contornar os efeitos nocivos resultantes do stress celular, a célula ativa mecanismos que levam à morte. Diferentes tipos de células apresentam diferentes graus expressão dos sistemas de resistência às condições de stress, no entanto fatores como o tipo de espécies reativas produzidas, a duração e grau de exposição ao stress vão influenciar a sobrevivência celular.

Dentro das ROS incluem-se espécies como o anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e o oxigênio birradical ( $O_2^{\cdot\cdot}$ ). Estas moléculas podem ainda ser convertidas em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ozono ( $O_3$ ) ou oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) que, não sendo radicais, têm consequências potencialmente tóxicas para a célula (8). Estes compostos são pequenas moléculas, altamente reativas, contendo oxigênio e um ou mais elétrons desemparelhados. Em certos tipos celulares, a presença de ROS é essencial em alguns processos fisiológicos como na resposta proliferativa estimulada por fatores de crescimento e, nas células fagocíticas, desempenha um papel importante na resposta celular contra infeções (9).

Este fenómeno endógeno é contínuo e assinalado como uma consequência inevitável do normal funcionamento, diferenciação e proliferação celular, sendo a produção de ROS essencial na resposta de células como macrófagos e neutrófilos (10). A produção de espécies reativas resulta da utilização de oxigênio em diversos organelos celulares e nas vias metabólicas de organismos aeróbicos em reações enzimáticas como

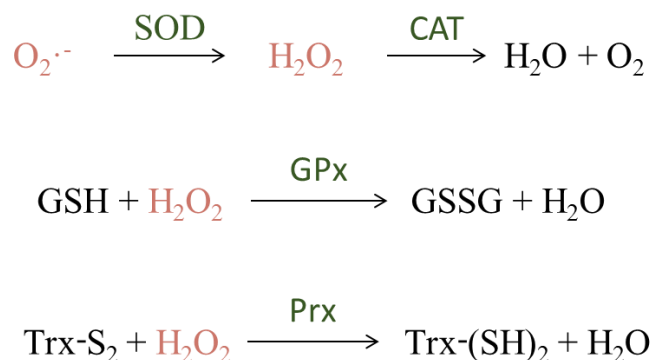
as catalisadas por enzimas da família das NADPH oxidases, citocromos P450 e lipoxigenases. Para além do peroxissoma, a mitocôndria é o principal organelo responsável pela produção de ROS que consome uma grande quantidade de oxigénio nos complexos I (NADH desidrogenase) e III (NADH: ubiquinona - citocromo c oxidorreductase) do processo da fosforilação oxidativa (11–13). No entanto em condições de stress oxidativo, o DNA mitocondrial sofre danos oxidativos que resultam na produção de mais ROS por parte deste organelo, estabelecendo-se um ciclo de produção de ROS (13).

Adicionalmente destacam-se ainda fontes de ROS exógenas na exposição celular a poluentes, toxinas, xenobióticos, radiações UV, ultrassom e gama, condições de hipertermia (14–19). Apesar do seu impacto não ser tão extensivo quando comparadas com as fontes endógenas, também contribuem para a manutenção das condições de stress oxidativo e exacerbação da produção de ROS por fontes endógenas.

## **2.2 Principais mecanismos de defesa contra o stress celular**

Para contornar os efeitos nefastos da produção natural de ROS, as células estão munidas de sistemas capazes de dar resposta às condições provocadas pelos desequilíbrios *redox*. Dentro desses mecanismos destacam-se as membranas celulares que atuam como barreiras físicas na proteção celular contra o stress oxidativo, dificultando que as fontes externas de ROS atuem no meio intracelular; os mecanismos que regulam as taxas metabólicas, onde se encaixam as proteínas de desacoplamento (UCP-1; UCP-2 e UCP-3) que têm efeito sobre a produção mitocondrial de ROS; a quelação de metais, com efeitos indiretos na proteção celular contra a formação de ROS; famílias enzimáticas atuam como catalisadores de reações de oxidação-redução com efeito antioxidante direto, sendo de destacar as superóxido dismutases (SOD), a catalase (CAT) e as peroxidases (Figura 1); agentes quelantes e *scavengers* de ROS onde se enquadram moléculas como a Glutathiona, o Piruvato, as vitaminas C e E, carotenoides e flavonoides capazes de neutralizar a reatividade destas moléculas;

mecanismos de reparação das moléculas afetadas pelas reações de oxidação, onde se incluem as enzimas de reparação do DNA (20–24).



**Figura 1. Reações Enzimáticas de Eliminação de ROS catalisadas pelas principais enzimas antioxidantes.**

A vermelho – ROS; A verde – enzimas antioxidantes; SOD – superóxido dismutase; CAT – catalase; GSH - glutationa; GSSG - glutationa oxidada; GPx – Glutaciona peroxidase; Trx – Tiorredoxina; Prx – peroxirredoxina.

Em condições de homeostasia, a célula apresenta vias de sinalização que permitem ativar os mecanismos que dispõem em resposta à produção de ROS, mantendo o equilíbrio entre subprodutos metabólicos tóxicos e ativação de sistemas antioxidantes capazes de reduzir as concentrações intracelulares de ROS e neutralizar os seus efeitos. A ativação destes sistemas enzimáticos é condicionada por vias de sinalização celular com proteínas que atuam como sensores da presença de ROS, onde se destaca a via Keap1-Nrf2-ARE, que está subjacente à regulação de vários elementos que integram mecanismos de resposta ao stress oxidativo.

A forte exigência que as elevadas concentrações de ROS e fatores inflamatórios exercem sobre os sistemas celulares de resposta ao stress oxidativo, leva à perda da sua eficácia, perpetuando as condições oxidativas do ambiente celular que constituem um marco fatorial importante para o desenvolvimento de inúmeras patologias, tal como a Diabetes Mellitus. As estratégias que têm por base a redução do stress oxidativo podem ser benéficas para retardar a progressão da Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) e aparecimento das complicações associadas.

## 3 Diabetes Mellitus Tipo 2

### 3.1 Introdução

A Diabetes é uma doença metabólica multifatorial que se caracteriza pela hiperglicemia crônica, consequência de uma insuficiente secreção de insulina e/ou resistência celular à hormona.

Em 2021, a prevalência global de Diabetes aponta para 10,5% dos adultos entre os 20 e os 79 anos e estima-se que, para o mesmo ano, um em cada dois adultos com diabetes não têm conhecimento da sua patologia. Estes valores tendem a aumentar, sendo a previsão da prevalência global de Diabetes em 2030 de 11,3% e em 2045 de 12,2%, para o mesmo intervalo de idades da população. É importante notar que esta patologia é mais incidente em países de rendimentos médio-elevados, com tendência a um maior aumento do número de casos diagnosticados, graças ao envelhecimento da população destes países (25).

Dentro das diferentes formas de apresentação desta patologia, a Diabetes Mellitus Tipo 2 representa cerca de 90% da população mundial com Diabetes. Fatores como sedentarismo, obesidade, envelhecimento e condições socioeconómicas da população contribuem para o desenvolvimento deste tipo de Diabetes e perpetuam as complicações associadas (25).

A disfunção adquirida pelas células  $\beta$  dos ilhéus de Langerhans no pâncreas está na origem fisiopatológica da DMT2, uma vez que estas células são responsáveis por armazenar e secretar insulina para a corrente sanguínea. Em condições normais, esta hormona atua como estímulo positivo de vias de transdução do sinal em células que dependem dos transportadores GLUT-4 para passagem intracelular de glicose (26).

Nas pessoas com DMT2, a hiperglicemia - resultado do efeito da resistência à insulina por parte das células periféricas - desencadeia mecanismos compensatórios que estimulam as células  $\beta$  a secretar insulina, numa tentativa ineficaz de normalizar os valores séricos de glicose. Associados aos mecanismos fisiopatológicos de DMT2, estão ainda outras alterações a nível do metabolismo de lípidos, proteínas e da própria glicose, que quando não são devidamente monitorizados e controlados podem dar origem a complicações vasculares com impacto em vários tecidos (26).

Estes dados permitem compreender o impacto da DMT2 na população global e a importância do diagnóstico precoce, tratamento não-farmacológico e

desenvolvimento de abordagens terapêuticas eficazes no controlo da DMT2 e prevenção do desenvolvimento de complicações.

### **3.2 Realidade terapêutica da Diabetes Mellitus Tipo 2**

No que diz respeito à gestão do doente com DMT2, as abordagens não farmacológicas são apresentadas como primeiro passo e assentam em alterações do estilo de vida ao nível da dieta, prática de exercício físico, controlo do peso, eliminação de hábitos como o tabagismo e monitorização adequada dos valores alvo - glicémia e hemoglobina glicada (HbA1c) (27). A abordagem terapêutica na DMT2 tende a ser cada vez mais centrada no doente e individualmente adequada às suas condições de saúde e socioeconómicas, tendo em consideração fatores como comorbidades, risco cardiovascular, histórico da doença, identificação de complicações, efeitos adversos associados à medicação, custos e sistemas de apoio a que o doente tenha acesso (28).

As moléculas com efeito farmacoterapêutico atualmente utilizadas na gestão do doente com DMT2 têm como objetivo a regulação dos valores séricos de glicose e dividem-se em cinco grupos principais, caracterizados na tabela 1.

De acordo com as diretrizes europeias de cardiologia “2019 Guidelines on Diabetes, Pre-Diabetes and Cardiovascular Diseases” o algoritmo que esquematiza a escalada terapêutica sugere a Metformina em monoterapia como primeira abordagem nos doentes com DMT2 em que este fármaco não seja contraindicado e a avaliação do risco cardiovascular não seja elevado a muito elevado, nem se verifique doenças cardiovasculares concomitantes. Caso os valores de HbA1c se mantenham acima do objetivo após 3 meses de monoterapia, deve ser adicionado um segundo antidiabético oral, tal como os inibidores da dipeptil peptidase-4 (DPP-4); os agonistas dos recetores *glucagon-like peptide 1* (GLP-1); os inibidores dos co-transportadores sódio-glicose 2 (SGLT2), sendo importante avaliar a taxa de filtração glomerular antes da instituição desta classe terapêutica; ou Tiazolidinedionas (TZDs), tendo em conta a avaliação risco-benefício do doente (27).

Nas situações em que a metformina seja contraindicada ou nos casos em que a avaliação do risco cardiovascular seja determinada como elevada ou muito elevada, a abordagem farmacológica pode passar por inibidores SGLT2 ou antagonistas do recetor GLP-1 em monoterapia. A associação com Metformina pode ser implementada caso o doente já tenha iniciado terapêutica com este fármaco. Se na reavaliação dos valores de

HbA1c após 3 meses de implementação desta linha terapêutica, os valores alvo não forem atingidos, deve ser considerada a introdução da classe terapêutica que ainda não tenha sido adotada (Metformina, antagonistas do recetor GLP-1 ou inibidores SGLT2). Estão comercializadas formas farmacêuticas com associações de fármacos compatíveis numa mesma apresentação, de forma a facilitar a terapêutica combinada (27,28).

**Tabela 1. Características dos Antidiabéticos Autorizados e Comercializados em Portugal.**

Classe Terapêutica		Substância Ativa	Mecanismo de Ação	Vantagens	Desvantagens
Secretagogos de insulina	Sulfonilureias	Glimepirida Glibenclamida Gliclazida	Aumento da secreção de insulina a nível das células beta pancreáticas.	Efeito anti-hiperglicemiante considerável Diminuição de HbA1c em 1-2% Pouco dispendioso	Perda de sensibilidade dos recetores Efeitos adversos cardiovasculares Risco de coma hipoglicémico
	Meglitinidas	Nateglinida		Redução de HbA1c em 1% Ação Hipoglicemiante pós-prandial	Hipoglicémia Contraindicado em casos de doença hepática e/ou renal
Incretinas	Inibidores da DPP-4	Alogliptina Linagliptina Saxagliptina Sitagliptina Vildagliptina	Inibição da degradação enzimática da GLP-1.	Sem efeito hipoglicemiante Redução de HbA1c em 0,4-1% Potencial de recuperação das células beta	Ajuste em caso de insuficiência renal Associados a risco de infeções Custos elevados
	Análogos do GLP-1	Dulaglutido Semaglutido Teduglutido Liraglutido	Aumentar a ação do GLP-1 que estimula a síntese a secreção de insulina e reduz a secreção de glucagon e esvaziamento gástrico.	Diminuição de fatores de risco cardiovascular Sem efeito hipoglicemiante	Medicação injetável Efeitos adversos transitórios gastrointestinais
	Agonistas dos recetores GLP-1	Exenatido			

Sensibilizadores de insulina	Biguanidas	Metformina	Redução da produção hepática de glicose (AMPK)	Abordagem independente de células beta Sem efeito hipoglicemiante	Contraindicada em doença renal, alcoolismo, doença hepática
	TZDs	Pioglitazona	Ação agonistas seletiva dos recetores PPAR- $\gamma$ e PPAR- $\alpha$ responsável pela diminuição da resistência à insulina	Sem risco de hipoglicémia Durabilidade Diminuição dos níveis de triglicérides e do risco cardiovascular	Dependentes da presença de insulina para exercer Aumento do peso Efeitos adversos relacionados com edema e fraturas ósseas
Inibidores do <i>reuptake</i> renal de glicose	Inibidores SGLT2	Canagliflozina Empagliflozina Dapagliflozina Ertugliflozina	Inibição do SGLT2 no tubo proximal do nefrónio, com aumento da glicosúria	Diminuição do peso corporal e da pressão arterial Sem risco de hipoglicemia	Risco de hipotensão, cetoacidose e infeções urinárias Custos elevados
Inibidores da absorção intestinal de glicose	Inibidores das $\alpha$ -glucosidases	Acarbose	Atenua o pico glicêmico pós-prandial ao reduzir a absorção gastrointestinal de glicose através da inibição das $\alpha$ -glucosidase intestinais	Sem efeito hipoglicemiante sem ação sistémica	Não indicado em caso de insuficiência renal ou patologia intestinal

De reiterar que a abordagem terapêutica na DMT2 deve ser corretamente ajustada à medida que a doença progride e a perda de função das células beta se intensifica.

### 3.3 Mecanismo fisiopatológico e Stress Oxidativo

Os valores crónicos de hiperglicémia que caracterizam a DMT2 produzem condições de stress oxidativo nas células  $\beta$  pancreáticas. Estas células apresentam deficit enzimático no que respeita aos sistemas de defesa contra o stress oxidativo.

Ainda que as enzimas SOD estejam presentes, as concentrações de glutathiona peroxidase e de catalase são extremamente reduzidas nos ilhéus pancreáticos, fazendo com que sejam particularmente vulneráveis aos efeitos nocivos de ROS, comparativamente a outros tecidos (29,30).

Acrescentando à suscetibilidade das células  $\beta$ , o stress oxidativo que é induzido pela hiperglicémia leva à diminuição da atividade dos sistemas de respostas ao stress oxidativo com diminuição da atividade de vários fatores - SOD, HO-1, PON1, GSH, GR e GPx e simultaneamente, a um aumento da produção de radicais livres. Os mecanismos bioquímicos que estão envolvidos na oxidação da glucose em condições de hiperglicémia incluem passos de auto-oxidação que contribuem para o aumento das concentrações de ROS (31). Estes compostos atuam na oxidação de lípidos, proteínas e DNA, sendo fator adicional no desencadeamento da disfunção das células  $\beta$ .

Adicionalmente, os desequilíbrios *redox* são responsáveis por ativar vias de sinalização celular que estão relacionadas com mecanismos de resistência à insulina e à diminuição da secreção desta hormona, contribuindo ativamente para a progressão da doença.

O stress oxidativo induzido pelas condições de hiperglicemia ativa quatro mecanismos moleculares distintos que são os principais contribuintes no desenvolvimento de complicações relacionadas com a DM2: a via dos polióis; a formação de Produtos Avançados de Glicação (AGE); a via das hexosaminas; via da Proteína Cinase C (PKC) (32,33). Estas vias são responsáveis por aumentar a produção de ROS e ativar vias celulares pró-inflamatórias onde se inclui o NF- $\kappa$ B. Consequentemente, a disfunção celular e as condições de stress oxidativo a par com os estímulos da resistência à insulina, são fatores que contribuem para a indução de apoptose e aumento de expressão de citocinas pró inflamatórias, moléculas de adesão, fatores de coagulação e diminuição das concentrações de óxido nítrico (NO), não só nas células  $\beta$  do pâncreas, como em células renais, endoteliais, cardiomiócitos e neurónios (34,35).

Assim, quando os valores séricos de glucose não são devidamente controlados, a longo prazo, provocam danos micro e macrovasculares que são das causas mais importantes das alterações progressivas que originam aumento do risco cardiovascular, retinopatias, nefropatias e neuropatias; favorecem o aparecimento de infeções; limitam

a cicatrização de feridas e podem conduzir a amputações das extremidades gangrenadas, nomeadamente dos membros inferiores.

## 4 Via Keap1-Nrf2-ARE

### 4.1 Introdução

A produção de ROS é inerente ao normal funcionamento da célula, mas por estar associada a consequências deletérias, levaram a célula eucariótica a desenvolver mecanismos de controlo das concentrações destes compostos, bem como toxinas e xenobióticos.

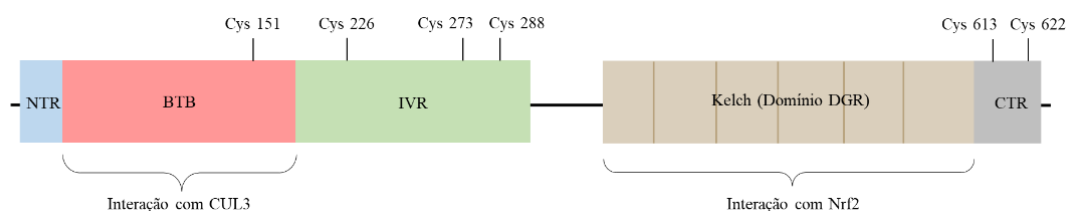
A via de sinalização celular Keap1-Nrf2-ARE constitui um dos sensores principais de alterações eletrofílicas e do estado de oxidação do meio celular, permitindo à célula eucariótica usufruir de mecanismos que contrariam os efeitos nocivos de compostos eletrófilos, Xenobióticos e ROS.

Enquanto fator de transcrição, o Nrf2 atua como sensor de desequilíbrios *redox* ao promover a expressão de genes relacionados com a defesa das células eucarióticas contra o stress oxidativo (Tabela 2), um dos fatores significativos na fisiopatologia de inúmeras doenças metabólicas, como a Diabetes Mellitus tipo 2.

A primeira identificação dos componentes desta via data a 1994, (36) com o isolamento da proteína Nrf2, atualmente considerada uma peça chave na modulação dos processos de defesa celular contra o stress oxidativo. Em 1999, (37) é identificada a Keap1, proteína responsável por regular a atividade do fator de transcrição Nrf2 e, mais tarde, (38) demonstrada a sua capacidade de atuar como sensor dos desequilíbrios *redox* pela interação entre os grupos tiol dos resíduos de cisteína a Keap1 e moléculas indutoras de stress oxidativo.

### 4.2 Função de Keap1

A ação da proteína Keap1, é atualmente reconhecida como a principal forma de regulação da ativação do fator de transcrição Nrf2. A Keap1 é constituída por oito domínios funcionais tal como se mostra na figura 2.



**Figura 2. Domínios funcionais da proteína Keap1.**

O domínio BTB apresenta-se como local de homodimerização e a ligação à Cullin 3 de modo a facilitar a degradação proteossomal do Nrf2. O IVR contém resíduos de cisteína necessários às alterações conformacionais em resposta ao stress oxidativo, no entanto estes resíduos sensores das alterações do equilíbrio redox não estão restritos no domínio IVR. Os domínios DGR 1-6 (domínio Kelch) ligam-se à F-actina e ao Nrf2, para sequestrar o Nrf2 no citosol em condições basais. A ligação entre as últimas proteínas é estabelecida na proporção estequiométrica de 2:1 onde duas moléculas de Keap1 interagem com os sítios de ligação ETGE e DLG do domínio Neh2 do Nrf2.

NTR – Porção Terminal NH3+; BTB - broad/tramtrack/bric-a-brac; CUL 3 – Cullin 3; IVR - intervening region; DGR – double glycine repeat; Cys151 – sensor de radicais de oxigénio; Cys273/Cys288 – sensores de stress celular; Cys 226/Cys613/Cys662 – sensores de H2O2; CTR – Porção terminal COO.

Em condições normais, verifica-se a ligação do complexo Keap1-Nrf2; a Keap1 atua como repressora da ação do Nrf2. A ligação entre estas duas proteínas permite a apresentação da Nrf2 para ubiquitinação, uma vez que Keap1 funciona como adaptador do complexo CRL3, o complexo enzimático E3 ligase, constituída por Cullin 3 (CUL3) e RING-box protein 1 (Rbx1). Este processo permite a contínua ubiquitinação dos resíduos de lisina do domínio Neh2 do Nrf2 e subsequente degradação proteossomal do fator de transcrição. Uma vez que o tempo de semivida do Nrf2 é de aproximadamente 10-30 minutos, a taxa de renovação do fator de transcrição mediada pela Keap1 é elevada e mantém os níveis basais de Nrf2 baixos (39).

Em condições de stress oxidativo, a proteína Keap1 atua como sensor das alterações do ambiente *redox* intracelular, através dos seus resíduos de cisteína e resíduos básicos dos aminoácidos que os rodeiam. A presença de espécies oxidativas e eletrofílicas exerce alterações conformacionais sobre a Keap1, através de reações de oxidação dos resíduos de cisteína desta proteína, capazes de induzir a disrupção do complexo Keap1-Nrf2 (38). Esta disrupção atua como ativador da via de sinalização, ao promover a ação nuclear do Nrf2 enquanto fator de transcrição dos genes citoprotetores.

### **4.3 Função de Nrf2**

Dentro da via de sinalização em que se insere, o Nrf2 atua como o elemento-chave para a modulação da expressão genética de um grande leque de proteínas envolvidas em diferentes processos de controlo do equilíbrio *redox* e homeostasia celular. Uma vez que a sua ativação está indiretamente condicionada pela presença de agentes oxidantes no citosol, este fator de transcrição torna-se um excelente candidato

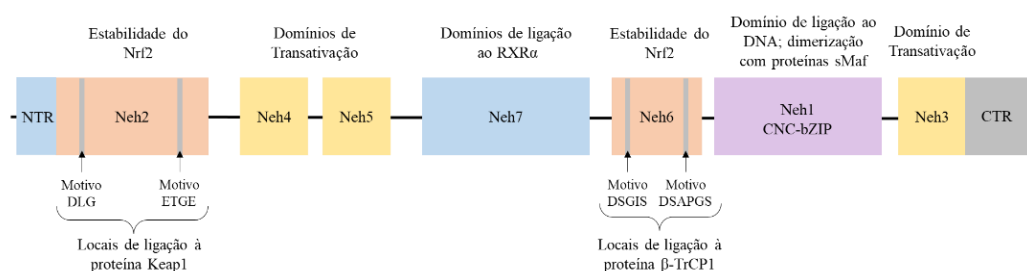
enquanto alvo de modulação terapêutica em patologias que detêm na sua base fatores como o stress oxidativo e a inflamação.

Do ponto de vista molecular, o Nrf2 (codificado pelo gene *NFE2L2*) é uma proteína de aproximadamente 95-110 kilodalton (kDa) (40) com 7 domínios funcionais denominados *Nrf2-ECH homology domains* (Neh) que pertence à subfamília Cap'n'collar (CNC) dos fatores de transcrição com um domínio básico *leucine zipper* (bZIP). Cada um dos sete domínios desempenha funções distintas (Figura 3) (41). No domínio Neh1 situa-se a região CNC bZIP que caracteriza a proteína e desempenha funções de ligação ao DNA. É também neste domínio que ocorre a heterodimerização do Nrf2 com proteínas sMaf, permitindo a transativação do fator de transcrição (41).

O domínio Neh2 age como o domínio de regulação negativa da atividade *redox*, por abranger dois motivos, ETGE e DLG, indispensáveis na ligação do complexo Keap1-Nrf2 (37).

Os domínios Neh3, Neh4 e Neh5 atuam em complemento entre si, atuando como domínios de transativação dos genes alvo do Nrf2. O domínio Neh6 aloja dois motivos, DSGIS e DSAPGS que reconhecem e estabelecem ligação com o adaptador da E3 ligase,  $\beta$ -TrCP, envolvido numa via de degradação proteossomal do Nrf2 alternativa e independente da Keap1.

O domínio Neh7 está envolvido na repressão da atividade transcripcional do Nrf2 através da ligação que estabelece com o recetor RXR $\alpha$ , proteína responsável pela supressão da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE (42).



**Figura 3. Domínios funcionais da proteína Nrf2.**

NTR – Porção Terminal NH<sub>3</sub><sup>+</sup>; Domínios Neh – domínios Nrf2 com homologia ECH; Neh2 – domínio de ligação a Keap1; Motivo DLG (peptido de quinze aminoácidos do Neh2) – motivo de reconhecimento da proteína Keap1 com baixa afinidade; Motivo ETGE (hairpin filogeneticamente conservado localizado no C-terminal do Neh2) – motivo de reconhecimento da proteína Keap1 com elevada afinidade; Neh3, Neh4, Neh5 – domínios de transativação, responsável por estabelecer ligações com outros da maquinaria de transcrição genética; Neh7 – domínio de ligação à proteína RxR $\alpha$ , que atua como inibidor da ação do Nrf2; Neh6 – domínio de ligação ao adaptador  $\beta$ -transducina da E3 ligase; Motivos DSGIS (dependente da fosforilação pelo GSK-3) e DSAPGS (independente da fosforilação pelo GSK-3) – motivos de

reconhecimento da proteína  $\beta$ -TrCP; Neh1 – motivo CNC (bZIP) básico leucine zipper da família cap'n'collar que participa na formação de heterodímeros Nrf2-Maf e onde é feita a ligação Nrf2-DNA pelo ARE; CTR – Porção terminal COO-.

Enquanto fator de transcrição, o Nrf2 encontra-se no centro de uma complexa rede de regulação de resposta ao stress celular, onde vários fatores determinam a atividade desta proteína.

#### 4.4 Elemento de Resposta Antioxidante

O Elemento de Resposta Antioxidante (ARE) consiste numa sequência reguladora *cis-acting* de DNA que se encontra na região promotora de mais de 250 genes que estão envolvidos na expressão de proteínas envolvidas nos processos de resposta antioxidante, destoxificação e biotransformação, regeneração de NADPH e regulação do metabolismo. Desta forma designam-se por genes ARE, aqueles que comportam uma sequência de regulação ARE na sua região promotora (41).

A afinidade entre fator de transcrição Nrf2 e o ARE está dependente da dimerização do Nrf2 com proteínas sMaf (43). A ligação do Nrf2-sMaf na região promotora dos genes ARE permite de forma direta, a regulação da expressão de várias enzimas envolvidas nos processos de biotransformação e transporte de xenobióticos, biossíntese de glutatona e regeneração de NADPH a partir de NADP<sup>+</sup> (Tabela 2).

Complementarmente, estão estudadas forma indireta de modulação dos genes ARE, através da ativação de fatores de transcrição regulados pelo Nrf2 como Notch1, MafG, C/EBP $\beta$ , RXR $\alpha$  ou por mecanismos de *cross-talk* com outras vias de sinalização como NF-kB, p53, PI3K/AKT e mTOR (44).

**Tabela 2. Proteínas cuja expressão é regulada pelo Nrf2.**

Função Bioquímica	Proteínas Associadas (abreviatura)	Referência
Biotransformação de Xenobióticos - Fase I	AKR1B1/8/10; AKR1C1/2/3; ALDH3A1/2; CBR1/3; EPHX1; PTGR1; NQO1.	(45–47)
Biotransformação de Xenobióticos - Fase II	MGST1/2; SULT1A1; UGT1A1; UGT1A6; UGT2B7/34.	(45,47,48)

Biotransformação de Xenobióticos - Fase III	ABCB6; ABCC2/3.	(49,50)
Sistema antioxidante baseado na GSH	GCL; $\gamma$ GT1; GLrx; GLS; GPx2; GR1; SLC7A11.	(47)
Sistema antioxidante baseado na TXN	Prx 1/6; Srx1; Trx1; TrxR1.	(51)
Regeneração de NADPH e metabolismo da glucose	G6PD; ME1; PGD; TALDO1; TCT; UGD.	(52,53)
Metabolismo do Ferro e Heme	BlvrA; BlvrB; FECH; Ft; HO-1.	(45,46)
Transcrição genética	MafG; PPAR $\gamma$ ; PPAR $\gamma$ C1 $\beta$ ; RXR $\alpha$ .	(53)

Na presença de eletrófilos e xenobióticos, são estabelecidas condições de stress oxidativo a nível celular. Nestas condições, os xenobióticos são transportados para o interior da célula e podem ser diretamente efluídos através de (bombas de efluxo MDR (*multidrug-resistance pump*) ou ser submetidos a processos de oxidação, redução e hidrólise, por ação das isoenzimas do citocromo P450. Alguns xenobióticos, como Quinonas e Hidroquinonas podem ser submetidos a processos *redox* resultando na produção de produtos secundários como espécies reativas de oxigénio. No entanto, a aldo-ceto redutase e a NAD(P)H:quinona oxidoreductase-1 (NQO1) atuam no ciclo de oxidação-redução das quinonas, através da redução destas moléculas, numa reação que faz uso de NADH/NADPH. Por sua vez, a produção de NADPH é consequência da ação enzimática de glucose-6-fosfato desidrogenases (G6PD), isocitrato desidrogenase e enzima málica (54–58).

A formação de epóxidos é resultante de processos metabólicos. Estes produtos posteriormente hidratados, com recurso à epóxido hidrólase (EPHX1), e conjugados com ácido glucorónico, catalisado pela UDP-glucuronosiltransferase (UGT), antes de serem exportadas do citosol através de proteínas de transporte MRP (*multidrug-resistance-associated protein*) (59,60). Alternativamente, os epóxidos podem também

ser conjugados com GSH, pela ação das isoenzimas GST, antes de serem enviados para fora da célula.

O GSH é formado através do processo de conjugação sequencial de glutamato e resíduos cisteína, catalisado pela Glutamato-cisteína ligase (GCL), e posteriormente conjugado. O GSH também é necessário para a redução de  $H_2O_2$  – processo catalisado pela GPx e Prx (Figura 1). Esta reação de redução resulta na produção de glutatona oxidada (GSSG), que pode ser utilizado pela célula para formação *de novo* de GSH através da ação da glutatona redutase (GR) através de reações dependentes do NADPH ou eliminado do citosol através das MRPs. O sistema de antiporte  $x_c^-$  permite o transporte do aminoácido cisteína na sua forma oxidada – cistina – para o interior da célula, e o transporte de glutamato para o meio extracelular. Já no citosol a cistina é reduzida a cisteína pela presença de NADPH e a enzima tiorredoxina redutase (TrxR) (61).

#### 4.5 Indutores da via

Para além dos estímulos que interrompem a sinalização ubiquitária da Nrf2 para proteólise por interação com a Keap1 descritos em 4.2., uma forma de promover a ativação da transcrição dos genes controlada pela Nrf2 é através da ativação da transcrição do mRNA que codifica para esta proteína reguladora.

O NF- $\kappa$ B atua como fator de transcrição, na medida em que a sua ligação ao promotor do gene *NFE2L2* permite induzir a expressão de Nrf2 nas células.

Em contextos de stress oxidativo no citosol, a presença de ROS, RNS e outros eletrófilos provocam alterações conformacionais na Keap1 que impedem a sua ligação ao IKK- $\beta$ , ativando-o. O IKK- $\beta$  agora ativado, fosforila o I $\kappa$ B- $\alpha$  que em condições normais se encontra ligado ao NF- $\kappa$ B impedindo a sua translocação nuclear. Este passo de fosforilação do I $\kappa$ B- $\alpha$  tem como consequência a quebra da sua ligação ao NF- $\kappa$ B e conduz, por um lado, à degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  e, por outro liberta o NF- $\kappa$ B que, na sua forma livre é ativo e translocado para o núcleo, onde atua como fator de transcrição, regulando a expressão de vários genes, nomeadamente *NFE2L2*. É através deste mecanismo que a presença de NF- $\kappa$ B regula a transcrição e síntese de Nrf2 (62,63).

É de notar que a transcrição controlada pela Nrf2 ocorre com base em várias condições celulares que permitem a ativação da via onde este fator de transcrição se insere. No entanto, estão também descritos mecanismos de regulação da via que

permitem controlar a resposta ao stress oxidativo associada à ativação da via Keap1-Nrf2-ARE.

Um dos mecanismos de regulação prende-se com a disponibilidade dos fatores de coativação da transcrição regulada pela Nrf2, nomeadamente através da ação da histona acetiltransferase (HAT) CBP/p300. Esta proteína acetila histonas H3 e H4, permitindo a modificação estrutural da cromatina, de heterocromatina para eucromatina e assim facilitar a ligação de fatores de transcrição a promotores e *enhancers* nas regiões menos condensadas da cromatina, regulando transcrição genética das células eucarióticas em diferentes situações. A atividade da CBP/p300 aumenta a atividade transcricional dos fatores de transcrição NF-kB e Nrf2. Como o NF-kB também depende desta coativação para atuar, em situações de sobrepressão de NF-kB na célula, verifica-se uma relação de competitiva entre NF-kB e Nrf2, com consequente diminuição da transcrição de Nrf2 (64).

Noutra perspetiva de regulação da ação desta via, é importante destacar que, ao estabelecer ligação com ARE, o fator de transcrição Nrf2 tem ainda de formar heterodímeros com as pequenas proteínas SMAF (K, G e F) para poder interagir com o *enhancer*. No entanto, NF-kB também é capaz de interagir com as proteínas SMAF, agindo de forma competitiva com o Nrf2, impedindo que estas se dimerizem com o Nrf2 (63).

É possível verificar que, apesar de depender da concentração de NF-kB no núcleo, para que possa agir como promotor da sua transcrição, o papel do Nrf2 é regulado pelo NF-kB. Estes mecanismos permitem o equilíbrio das concentrações de Nrf2 no citosol e no núcleo.

#### **4.6 Mecanismo de regulação da via Keap1-Nrf2-ARE**

A regulação da atividade do fator de transcrição Nrf2 é complexa e multifatorial, podendo ser executada a nível transcricional e pós-transcricional, através de regulação da estabilidade de proteínas, modificações pós-tradução, na disponibilidade de proteínas com as quais o Nrf2 dimeriza e, dependendo da sua localização sub-celular.

##### **1. Regulação do Nrf2 associada à Transcrição**

O fator de transcrição Nrf2 codificado pelo gene *NFE2L2*, é regulado por um conjunto de fatores distintos.

O promotor do gene *NFE2L2* contém um Elemento de Resposta Xenobiótica, pelo que xenobióticos são um gatilho para a ativação da transcrição do Nrf2, da mesma forma que o stress oxidativo é um gatilho para a ativação da transcrição de proteínas envolvidas em processos *redox*. Adicionalmente, o promotor deste gene também contém um local de ligação ao NF-kB, sendo esta ligação um estímulo de transativação genética. Outros estímulos que regulam a ativação da transcrição do gene *NFE2L2* são os mecanismos de *crosstalk* de vias de sinalização como os oncogenes Kras e B-Raf, Myc, a via da 3- fosfatidilinositol/proteína cinase B (PI3K/Akt) e a via Notch (57,65,66).

O promotor do gene *NFE2L2* contém também um elemento de resposta ARE, o que aponta para um mecanismo de *feedback* positivo de amplificação da resposta do Nrf2 por autorregulação da sua transcrição.

## **2. Regulação pós-transcrição**

Regulação do Nrf2 na fase de pós-transcrição ocorre com recurso a dois grandes fatores: os micro-RNAs e o processo de splicing.

Os micro-RNAs são RNA não-codificantes responsáveis por regular a expressão de genes. A ligação destas curtas sequências nucleotídicas de cadeia única ao RNA mensageiro (mRNA) impede a progressão da sua tradução ou sinalizam a degradação do mRNA. No caso do Nrf2, a expressão mais elevada de miR-144 foi associada a redução dos níveis de Nrf2 a nível celular, juntamente com uma menor tolerância celular a condições de stress oxidativo e disrupções no metabolismo do ferro e do grupo Heme que se conjectura estar relacionado com o aparecimento de anemias (67).

No processo de splicing alternativo durante a expressão do gene *NFE2L2*, pode ocorrer falhas na remoção de alguns exões (68), produzindo isoformas do fator de transcrição Nrf2 que apresentam alterações estruturais que condicionam a formação do complexo Keap1-Nrf2. Desta forma, é possível relacionar a efetividade deste passo do processamento do pré-RNA com uma variação na estabilidade e ativação da via de sinalização onde o Nrf2 se integra.

## **3. Regulação da estabilidade proteica do Nrf2**

A estabilidade da proteína Nrf2 está dependente da interação com Keap1 que a sinaliza para degradação proteossomal; mutações que afetem os domínios de ligação entre as duas proteínas resultam na acumulação de Nrf2. A indução de mutações e/ou

deleção do gene que codifica a síntese da Keap1 e, como consequência, concentrações reduzidas desta proteína no citosol levam uma maior acumulação de Nrf2 (44).

Existem ainda outras proteínas que afetam a interação Keap1-Nrf2, como o *partner and localizer* do Brca2 (PALB2), phosphoglycerate mutase 5 (PGAM5), dipeptidyl-peptidase 3 (DPP3) ou o sequestosoma p62 (proteína de ligação à ubiquitina na via de degradação proteossomal); esta proteína tem semelhanças estruturais com o motivo ETGE do Nrf2 por isso compete para a ligação ao Keap1; para além disso, o p62 é uma das proteínas cujas a transcrição está dependente do fator de transcrição Nrf2. A proteína p21 é induzida pelo p53, em resposta ao stress oxidativo e compete com o Keap1 pela ligação ao Nrf2, comprometendo a sinalização de ubiquitinação. O BRCA1 induz a estabilidade do Nrf2 (69–71).

A proteína cinase C participa na via de transdução de sinal do Nrf2 e é responsável por fosforilar o resíduo de serina40 do domínio Neh2 do Nrf2, resultando na quebra da ligação Keap1-Nrf2, sendo assim capaz de promover a ativação do fator de transcrição em condições de stress oxidativo (72).

Para além da ação de regulação negativa sobre o papel do Nrf2 que a Keap1 desempenha, também é importante destacar o papel do  $\beta$ -TrCP. Esta proteína liga-se ao Nrf2 através da interação com os motivos DSGIS e DSAPGS do domínio Neh6 do Nrf2 (73). Esta ligação promove a fosforilação do Nrf2 mediada pelo GSK-3 $\beta$ . À semelhança do Keap1, o  $\beta$ -TrCP desempenha função de adaptador na ligação do Nrf2 ao complexo Cullin1 (uma enzima E3 ligase) (74). Existe ainda outra E3 ligase, a E3 ubiquitina ligase Synoviolin/Hrd1 que interage com os domínios Neh4 e Neh5 do Nrf2 e sinaliza o fator de transcrição para o processo de ubiquitinação (75). Estas 3 vias de degradação proteossomal do Nrf2 são independentes umas das outras.

#### **4. Mecanismos de transativação dos genes ARE: Proteínas sMaf; co-ativadores; competidores e maquinaria genética**

A disponibilidade dos restantes elementos da maquinaria de transcrição genética, também afeta a ativação da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE, de forma indireta. As proteínas sMaf são proteínas da família dos fatores de transcrição bZIP. Estas proteínas precisam obrigatoriamente de dimerizar com o Nrf2 para poder atuar. A atividade transcripcional do Nrf2 está, desta forma, intimamente ligada às proteínas sMaf (44).

## 5 A via Keap1-Nrf2-ARE como alvo terapêutico

### 5.1 Via Keap1-Nrf2-ARE e Diabetes Mellitus Tipo 2

A expressão genética e a sua regulação afetam o funcionamento celular nas mais diversas vertentes. Desregulações estruturais e/ou de funcionamento da maquinaria de transcrição genética impactam uma vasta rede de vias e mecanismos responsáveis pela defesa celular como resposta ao stress, estando intimamente relacionadas com o desenvolvimento de muitas patologias, como na DMT2 onde a componente genética tem um grande peso na sua etiologia.

Na base dos princípios fisiopatológicos da DMT2 está a resistência periférica à ação da insulina e consequente atrofia e disfunção das células beta, que culminam no aumento da concentração de fatores inflamatórios e produção de ROS a nível mitocondrial nas células do pâncreas (76). Como referido anteriormente, as células beta apresentam uma expressão reduzida de enzimas envolvidas na manutenção da homeostasia *redox*. Efetivamente, estudos que utilizam modelos experimentais da doença, relatam uma diminuição dos danos oxidativos e recuperação de função das células beta quando estas células são submetidas a tratamento com agentes antioxidantes (77,78).

Ao reconhecer a importância do papel antioxidante na manutenção da secreção de insulina e utilização de glicose nos tecidos insulino-dependentes, poderá ser possível posicionar a via Keap1-Nrf2-ARE enquanto elo de ligação entre estes fatores. Desde 2007 que o papel do Nrf2 na DMT2 e nas complicações associadas a tal patologia tem sido estudado em modelos *in vitro* e *in vivo*.

O impacto da diminuição de Nrf2 em condições hiperglicémicas foi primeiro demonstrado num estudo com ratinhos *Nrf2-knockout* onde foi estabelecida uma correlação entre o aparecimento de lesão renal nestes animais e manutenção de condições de stress oxidativo perpetuadas pela falha na ativação da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE, apontando para um papel protetor do Nrf2 contra a disfunção celular e progressão de complicações associadas à DMT2 (79). Estudos *in vitro* com modelos celulares demonstram uma maior ativação da via de sinalização celular Keap1-Nrf2-ARE, quando expostas a elevadas concentrações de glicose de forma aguda, sendo que

o mesmo resultado não se verificou quando as condições de exposição foram prolongadas, indicando que a ativação do Nrf2 poderá estar dependente da regulação da homeostasia da glicose (80,81).

A indução de mutações que provocam a disrupção do gene que codifica para a proteína Keap1 (Keap1<sup>flox/-</sup>), desencadeiam a indução da disponibilidade e ativação do Nrf2, bem como diminuição dos valores de glicose no plasma de modelos db/db de murganhos obesos e diabéticos. Esta relação entre a disponibilidade do Nrf2 e dos valores de glicemia é estabelecida através do efeito de repressão direta e indireta de via de gliconeogénese (82,83). Adicionalmente, a potenciação da atividade do Nrf2 em ratinhos Keap1-*knockout* aumenta a fosforilação da proteína cinase 5' AMP-ativada (AMPK) presente nos hepatócitos e a via de transdução da insulina no tecido muscular esquelético, contribuindo para a regulação da homeostasia da glucose (84).

Por outro lado, o Nrf2 aparenta estar em menores concentrações em células mononucleares quando são estabelecidas condições de estados pré-diabéticos e em doentes diabéticos (85). Num estudo caso-controlo com voluntários, registou-se uma diferença significativa entre doentes DMT2 com e sem complicações, relacionada com a deteção de quatro polimorfismos de nucleótido único (SNP) distintos no gene *NFE2L2* e o desenvolvimento de neuropatia, nefropatia, retinopatia, úlceras nos pés e microangiopatias (86).

Estes resultados permitem reconhecer o papel do Nrf2 na regulação dos valores séricos e metabolismo da glucose; diminuição da resistência à insulina e acumulação de gorduras; aumento da proteção celular contra os fatores pro-inflamatórios e de stress oxidativo causados pela hiperglicemia crónica que caracteriza a DMT2.

## **5.2 Perspetivas futuras no desenvolvimento de moléculas com atividade terapêutica**

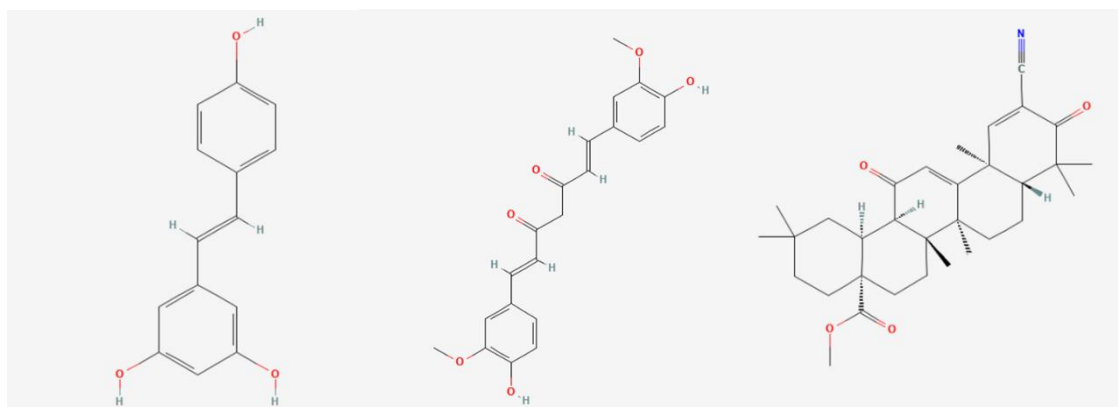
Atualmente, é possível posicionar a regulação da via de sinalização celular Keap1-Nrf2-ARE como um alvo farmacológico interessante na prevenção e tratamento da Diabetes, contribuindo para retardar o aparecimento de complicações e controlo do risco cardiovascular dos doentes.

Foram já descritos compostos capazes de interagir com os diferentes componentes da via de sinalização celular Keap1-Nrf2-ARE e ter uma regulação positiva sobre estes

alvos, sendo alguns destes compostos testados em ensaios clínicos, com diferentes níveis de sucesso, constituindo assim possíveis estratégias inovadoras na terapêutica farmacológica da DMT2.

Como já foi referido, na presença de espécies químicas eletrofílicas verifica-se a indução de condições de stress que desencadeiam mecanismos de defesa celular. É com este ponto em mente que começam a ser estudadas moléculas com características eletrofílicas, capazes de ativar a via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE e com afinidade para a disrupção da ligação Keap1-Nrf2, induzir a transdução do Nrf2. Desta forma, a maior parte das moléculas com a via Keap1-Nrf2-ARE como alvo terapêutico atualmente desenvolvidas são eletrofílicas ou podem ser transformadas em espécies com tais características.

Nas seguintes secções serão abordados o Resveratrol, a Curcumina e a Bardoxolona (Figura 3.) que contribuíram para o desenvolvimento de estratégias de regulação da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE e que têm demonstrado potencial terapêutico no tratamento da DMT2 e algumas complicações associadas.



**Figura 4. Estruturas químicas que atuam sobre a via de sinalização celular Keap1-Nrf2-ARE como potencial terapêutico no tratamento da DMT2.**

À esquerda - Resveratrol (C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>); No centro - Curcumina (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>); À direita - Bardoxolona Metil (C<sub>32</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>4</sub>). Adaptado de PubChem.

### 5.2.1 Resveratrol

O Resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxi-trans-estilbeno) é um composto polifenólico que se encontra presente em várias espécies vegetais sendo de destacar as uvas, morangos e amendoins. Esta molécula de baixo peso molecular apresenta propriedades antioxidantes, tendo demonstrado ação enquanto *scavenger* de radicais livres, devido aos seus grupos fenol (87) e através de mecanismos indiretos que passam pela regulação

genética dos sistemas de defesa celular contra o stress oxidativo. O tratamento de células com este polifenol leva à diminuição da produção de superóxidos a nível mitocondrial e aumento das concentrações enzimáticas das proteínas que participam nos sistemas antioxidantes. Estes efeitos baseiam-se num mecanismo de ação complexo que, apesar de não estar totalmente esclarecido, está relacionado com a ação do Resveratrol sobre a histona desacetilase sirtuin 1 dependente do NAD<sup>+</sup> (SIRT1) e sobre o Nrf2 (88,89).

O Resveratrol tem características moleculares que lhe permitem estabelecer afinidade específica com várias proteínas, como é o caso do Nrf2, SIRT1 e o recetor do estrogénio (ER). Devido à sua estrutura química planar (Figura 4), apresenta-se como uma molécula com afinidade para os *pockets* hidrofóbicos e sítios de ligação das proteínas. Os grupos OH conferem polaridade a molécula que atua como dador e aceitador de hidrogénio, permitindo o estabelecimento de ligações com resíduos de aminoácidos e com grupos amida da estrutura de proteínas (89).

Ao estimular a subpopulação do recetor ER-alfa presente na membrana plasmática das células endoteliais, o Resveratrol é capaz de induzir a via de transdução do sinal deste recetor e ativar a óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS), promovendo a produção de NO a nível do endotélio, envolvido na regulação das concentrações de proteínas antioxidantes como a HO-1. O Resveratrol atua sobre a regulação da SIRT1 e da AMPK num mecanismo dose-dependente. Em baixas concentrações de Resveratrol, esta substância atua como agonista da SIRT1 e a sua ação de desacetilação leva ao aumento da atividade de AMPK por intermédio da cinase hepática B1. É importante referir o papel inibitório da SIRT1 a dois níveis: sobre o NF-κB e sobre as fosfodiesterases (PDE) que leva ao aumento intracelular de AMP cíclico que é capaz de regular positivamente o Nrf2 e a via do AMPK. Quando as concentrações de Resveratrol são aumentadas, através de mecanismos complementares ao impacto deste composto sobre o Nrf2, verifica-se aumento do *uptake* celular de glicose, da atividade de enzimas glicolíticas e diminuição das concentrações de lípidos em circulação (90).

Ensaio com modelos animais destacam o Resveratrol como um dos estilbenos com capacidade de modular os níveis de insulina e reduzir os níveis séricos de glicose em roedores com hiperglicémia. Esta diminuição está associada à ativação do AMPK que, de forma indireta, contribui para a diminuição da gliconeogénese e consequente diminuição da percentagem de HbA1c (91–94).

Num outro estudo, quando administrado através por via oral durante 6 semanas tanto com concentrações baixas (0.005%) como elevadas (0,02%), o Resveratrol, mostrou ainda efeitos a nível de diminuição de concentrações dos triglicéridos, ácidos gordos livres e apolipoproteínas (95). Outros ensaios apontam para melhoria do index de sensibilidade à insulina, aquando da administração de Resveratrol em ratinhos que seguiam dietas hipercalóricas, quando comparados com o grupo controlo (96).

Uma meta-análise que incidiu sobre 11 estudos no contexto de ensaios clínicos, num total de 388 participantes, revelou os efeitos do Resveratrol sobre o metabolismo da glicose e diminuição da resistência celular à insulina em doentes diabéticos. Entre as duas semanas e os seis meses de tratamento, com variações de dose de Resveratrol entre os 8 e os 1500 mg/dia, foi possível detetar, de forma heterogénea nos participantes diabéticos, uma redução dos níveis séricos insulina (-4.55 microunidades/mL;  $p < 0.01$ ), glicose (-35.22 mg/dL;  $p < 0.01$ ) e HbA1c (-0.79%;  $p = 0.02$ ) em jejum, quando comparados com o grupo controlo de participantes saudáveis. Foram detetadas melhorias a nível da avaliação da resistência celular à insulina (homeostatic model assessment—insulin resistance; -2.25;  $p < 0.01$ ) (97).

Apesar do potencial terapêutico antidiabético que este composto mostra, é necessário ultrapassar algumas barreiras associadas à utilização do Resveratrol, nomeadamente a sua baixa biodisponibilidade oral (menos de 1%) devido à metabolização a glucoronidos a nível intestinal e ao efeito de primeira passagem, pela sua rápida metabolização hepática (98). Para além das problemáticas farmacocinéticas, o Resveratrol apresenta afinidade para múltiplos sítios de ligação de proteínas, sendo uma possível estratégia de melhoria da especificidade da molécula, a implementação de estudos Quantitative Structure-Activity Relationships - QSAR.

### 5.2.2 Curcumina

A Curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil) hepta-1,6-dieno-3,5-diona) (Figura 4) é o principal curuminóide da curcuma (*Curcuma longa* Linn). À semelhança do Resveratrol, a Curcumina é um *scavenger* de ROS que lhe atribuem propriedades antioxidantes diretas e, através da ligação covalente com os resíduos de cisteína do Keap1(99–103). Este composto produz um efeito citoprotetor contra o stress oxidativo e a inflamação. Ao possuir grupos carbonilo alfa-beta-insaturados, é capaz de participar em interações proteína-proteína com os resíduos de cisteína da Keap1 e ativar a translocação do Nrf2 (104).

A administração deste composto a animais de experiência está relacionada com atrasos no desenvolvimento da DMT2, verificando-se aumento da tolerância à glicose e diminuição das concentrações séricas deste parâmetro bioquímico e da hemoglobina glicada (HbA1c); aumento da sensibilidade celular à insulina; aumento da atividade catalítica das lipoproteína lipases; diminuição dos valores de ácidos gordos livres, triglicéridos e ácido úrico em circulação; aumento da atividade da leptina e da adiponectina e evidência de prevenção da morte celular das células beta (102,105–107). Em estudos com ratinhos submetidos a dietas hiperlipémicas, a Curcumina provocou diminuição da concentração de ROS a nível do tecido muscular. Este efeito está relacionado com o aumento das concentrações de Nrf2 livre (108) .

Para além da ação sobre os estados diabéticos, a Curcumina tem sido explorada quanto aos seus efeitos a nível das complicações micro e macrovasculares associadas à DMT2, principalmente em relação às complicações renais (109). Em ensaios conduzidos com células epiteliais do túbulo proximal do nefrónio de ratinhos saudáveis, incubadas em condições de hiperglicémia, verificou-se elevação das concentrações de Nrf2 e de HO-1 na presença de Curcumina (110). Este efeito tem consequências positivas no restauro dos níveis de glutathione, glucose-6-fosfato desidrogenase, lactato desidrogenase, aldose redutase, sorbitol desidrogenase e atividade das SOD, em ratinhos com nefropatia diabética induzida pela Estreptozotocina (111) .

Com o intuito de avaliar a segurança e a eficácia da Curcumina enquanto agente interventivo na redução do risco de complicações macro e microvasculares na DMT2, foi conduzido um ensaio clínico randomizado com dupla ocultação em participantes diabéticos onde foram avaliadas alterações a nível das concentrações séricas de HbA1c, Colesterol total, LDL e HDL e triglicéridos. Verificaram-se melhoria do índice de massa corporal, e do perfil lipídico - com redução das concentrações séricas de Colesterol total e LDL e aumento das concentrações de colesterol HDL - e da percentagem de HbA1c. Neste estudo não foram observadas complicações a nível da pressão arterial, função renal e hepática nem sintomas de hipoglicemia, associados à suplementação de Curcumina no espaço temporal de seis meses (106).

Embora estudos com diferentes espécies de roedores destaquem hepatotoxicidade e aumento de peso associadas a concentrações mais elevadas do composto, não existe informação sobre os efeitos da utilização da Curcumina a longo termo, ainda menos a nível humano. Apesar dos resultados positivos, a falta de dados

pode condicionar a utilização da molécula enquanto terapêutica de uma patologia crónica como a DMT2, ao tornar dificultada uma avaliação benefício-risco sustentada na evidência.

### 5.2.3 Bardoxolona Metil

A Bardoxolona Metil (CDDO-Me) é uma molécula com propriedades anti-inflamatórias que resulta de alterações estruturais ao ácido oleanólico. A esta molécula pentacíclica foram adicionados um grupo éster metílico e sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados  $\alpha$ -ciano-cetona que transformam a Bardoxolona Metil num potente aceitador de Michael, capaz de estabelecer interações proteína-proteína com os resíduos de cisteína da Keap1 e ativar a via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE. Cleasby et al. (112) analisaram a estrutura cristalizada e encontraram evidências bioquímicas de que a ligação covalente entre a CDDO-Me e a Keap1 é estabelecida através do resíduo de Cisteína 151. Esta interação com a Keap1 torna a Bardoxolona Metil uma abordagem terapêutica interessante na supressão da inflamação e de stress oxidativo (113,114). A CDDO-Me também mostra efeitos sobre a PPAR $\gamma$ , o IKK- $\beta$  e a via da 3- fosfatidilinositol/proteína cinase B (PI3K/Akt) (114).

Os estudos clínicos sobre o potencial terapêutico desta molécula incidem especialmente sobre as complicações renais associadas ou não à DMT2, como é o caso da Doença Crónica Renal (DCR). Apesar de não ser o foco deste trabalho, o estudo da CDDO contribuiu para o desenvolvimento do farmacóforo de moléculas capazes de estabelecer interações proteína-proteína com os resíduos Cys da Keap1 pelo que trás relevância ao tema.

Os resultados obtidos por Shelton et al. (115) em 2015 vieram confirmar os efeitos benéficos in vivo do tratamento com CDDO-Me, um indutor da transativação de Nrf2. Neste estudo foram executadas análises integradas dos perfis transcritómicos e proteómicos em células de tecido renal de ratinhos *wild-type* e Nrf2 *knockout*. O tratamento com CDDO-Me foi relacionado com síntese e conjugação da glutationa e manutenção do equilíbrio redox através do controlo metabólico de xenobióticos regulado pelo NADPH. Num ensaio clínico de fase 2 a utilização de CDDO-Me foi correlacionada com uma melhoria da taxa de filtração glomerular em doentes com DRC avançada e DMT2 após 24 semanas de tratamento; esta melhoria persistiu até à 53<sup>a</sup> semana de tratamento (116). Por outro lado, um outro ensaio clínico de fase 3 que fazia

uso do tratamento com CDDO-Me para avaliar a eficácia desta molécula em doentes DMT2 com DRC de estadio 4 foi interrompido em outubro de 2012. O cancelamento do estudo está relacionado com a deteção de efeitos hepatotóxicos, gastrointestinais, de hipomagnesemia e perda de peso detetados ao comparar o grupo placebo com o grupo submetido ao tratamento (116–118). Os efeitos adversos relacionados com a utilização de CDDO-Me podem ser atribuídos à natureza eletrofílica do composto.

## 6 Conclusão

A Diabetes Mellitus tipo 2 é uma patologia metabólica complexa e multifatorial que afeta cerca de 10% da população mundial. Esta prevalência é elevada e apresenta uma tendência para aumentar nos próximos anos. Para além das complicações associadas à progressão da doença, a Diabetes está aliada a outras comorbilidades e constitui um fator de risco cardiovascular.

Analisando as várias classes terapêuticas onde se enquadram os fármacos atualmente aprovados para o tratamento da DMT2, não existe nenhuma abordagem que tenha um efeito direto e significativo no controlo do stress celular que as condições de hiperglicemia crónica impõem no organismo. Com o aumento da investigação nesta área é possível estabelecer uma relação entre a hiperglicémia, a resistência celular à insulina e o stress oxidativo, já que estes fatores induzem disfunção das células beta pancreáticas. Adicionalmente, as concentrações de glutathiona peroxidase e de catalase são extremamente reduzidas nos ilhéus pancreáticos, tornando-os alvos suscetíveis aos efeitos nocivos de ROS.

As células eucarióticas têm no seu arsenal uma vasta rede de processos focados no combate ao stress ambiental a que estão expostas. A ativação desta rede é regulada através de vias de sinalização celular que, para ser desencadeadas, contam com proteínas que detetam alterações da homeostasia *redox* que é desencadeada na presença intracelular de ROS, xenobióticos e outro tipo de espécies eletrofílicas. No entanto, nem sempre estas vias são eficazes na manutenção da homeostasia celular, culminando na disfunção celular e aparecimento de patologias. Desta forma, estas vias tornam-se um potencial alvo terapêutico inovador em patologias onde se verifica uma componente inflamatória relacionada com o stress oxidativo na sua etiologia.

Uma das principais vias de sinalização celular no combate contra o stress oxidativo é a via Keap1-Nrf2-ARE. Em condições normais, verifica-se a ligação do complexo Keap1-Nrf2 e a repressão da ação do Nrf2; a ligação entre estas duas proteínas permite a apresentação da Nrf2 para ubiquitinação e posterior degradação proteossomal. As condições de stress oxidativo são sentidas pelos resíduos de cisteína da proteína Keap1 e esta proteína sofre alterações conformacionais na Keap1 que provocam a disrupção da ligação do complexo Keap1-Nrf2 e translocação do fator de transcrição para o núcleo. Neste compartimento celular, o Nrf2 vai integrar a

maquinaria celular de promoção da transcrição de genes que possuem uma região promotora com ARE. A promoção da transcrição dos genes ARE vai desencadear a ativação de processos de regulação do metabolismo, destoxificação, biotransformação e resposta antioxidante.

Tendo sido estabelecida uma relação entre a modulação da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE em condições de stress oxidativo e o impacto da desregulação da homeostasia *redox* na progressão da disfunção das células beta na Diabetes Mellitus tipo 2 é possível postular o papel protetor do Nrf2 contra a disfunção celular e progressão de complicações associadas à DMT2. Complementarmente, verifica-se uma relação entre a disponibilidade do Nrf2 e a repressão direta e indireta de via de gliconeogénese; a potenciação da atividade do Nrf2 aumenta a fosforilação do AMPK nos hepatócitos e a via de transdução da insulina no tecido muscular esquelético, contribuindo para a regulação da homeostasia da glucose; verifica-se uma diferença significativa entre doentes DMT2 com e sem complicações, relacionada com a deteção de quatro polimorfismos de nucleótido único (SNP) distintos no gene *NFE2L2* que codifica para o fator de transcrição Nrf2.

Desta forma, e de acordo com a evidência científica disponível, a modulação de vias de sinalização que participam no combate ao stress oxidativo apresentam-se de forma inovadora no tratamento e controlo da DMT2, bem como das complicações micro e macrovasculares associadas. Nutracêuticos como o Resveratrol e a Curcumina atuam num mecanismo direta ou indiretamente dependente da presença de Nrf2 e mostram resultados promissores na redução de parâmetros bioquímicos como a HbA1c, glucose sérica, colesterol e ainda melhoria na resistência à insulina. Outras moléculas que têm mostrado mais resultados a nível da proteção renal contra o stress oxidativo, como a Bardoxolona-Metil, também produzem efeito na regulação da glicémia.

Em última análise, numa perspetiva futura que permita a incorporação destes alvos terapêuticos na prática clínica é importante avaliar o perfil de segurança das moléculas em estudo para a DMT2. Considera-se que existe margem para expansão da biblioteca de moléculas em estudo nesta vertente e uma abordagem importante nesse sentido será o desenvolvimento de esforços no *repurposing* de moléculas cuja ação reguladora da inflamação e stress oxidativo através da modulação da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE já é conhecida e apresenta potencial terapêutico noutras patologias de foro inflamatório.

## Referências Bibliográficas

1. Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, Taddei F, Radman M, Nyström T. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(11):5746–9.
2. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radical Research. Science* (80-). 1992;40257(5074):1220–4.
3. Goto S, Nakamura A, Radak Z, Nakamoto H, Takahashi R, Yasuda K, et al. Carbonylated proteins in aging and exercise: Immunoblot approaches. *Mech Ageing Dev*. 1999;107(3):245–53.
4. Meral A, Ozbek R, Ozt E. Meral, A., Tuncel, P., Sürmen-Gür, E., Özbek, R., Öztürk, E., & Günay, Ü. (2000). LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT STATUS IN  $\beta$ -THALASSEMIA. *Pediatric hematology and oncology*, 17(8), 687-693.2000. ;(November 1999):687–93.
5. Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely. *Univ California, Berkeley*,. 2001;475:7–20.
6. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*. 1997;272(32):19633–6.
7. BORTZ EA. Biology of ageing. *Del Med J*. 1951;23(5):112–6.
8. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47–95.
9. Tchounwou PB, Centeno JA. Toxicologic Pathology. *Preclin Dev Handb Toxicol*. 2007;551–80.
10. Branch C. Oxygen radicals and signaling Toren Finkel. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 1998;10:248–53. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9561849](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9561849)
11. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi SI, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404(6779):787–90.

12. Nemoto S, Takeda K, Yu Z-X, Ferrans VJ, Finkel T. Role for Mitochondrial Oxidants as Regulators of Cellular Metabolism. *Mol Cell Biol.* 2000;20(19):7311–8.
13. Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep.* 1997;17(1):3–8.
14. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(4):625–35.
15. Obata T, Yamanaka Y, Kinemuchi H, Oreland L. Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Res.* 2001;906(1–2):170–5.
16. Elsayed NM, Omaye ST, Klain GJ, Korte DW. Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology.* 1992;72(2):153–65.
17. Wormser U, Sintov A, Brodsky B, Nyska A. Topical iodine preparation as therapy against sulfur mustard-induced skin lesions. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;169(1):33–9.
18. Ray RS, Mehrotra S, Shankar U, Suresh Babu G, Joshi PC, Hans RK. Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug Chem Toxicol.* 2001;24(2):191–200.
19. Koren HS. Associations between criteria air pollutants and asthma. *Environ Health Perspect.* 1995;103(SUPPL. 6):235–42.
20. Skulachev VP. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys.* 1996;29(2):169–202.
21. Atamna H, Cheung I, Ames BN. A method for detecting abasic sites in living cells: Age-dependent changes in base excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(2):686–91.
22. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Serial Review : Oxidative DNA Damage and Repair. *Science (80- ).* 2002;32(7):1102–15.

23. Kohen R. Skin antioxidants: Their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. *Biomed Pharmacother.* 1999;53(4):181–92.
24. Kohen R, Gati I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology.* 2000;148(2–3):149–57.
25. Federation ID. No IDF Diabetes Atlas. 2021.
26. Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J. Diabetes Mellitus. In: *Harrison's Manual of Medicine, 20e* [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2020. Available from: <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1167068671>
27. Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V, Bailey CJ, Ceriello A, Delgado V, et al. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J.* 2020;41(2):255–323.
28. Tsoutsouki J, Wunna W, Chowdhury A, Chowdhury TA. Advances in the management of diabetes: Therapies for type 2 diabetes. *Postgrad Med J.* 2020;96(1140):610–8.
29. Pi J, Zhang Q, Fu J, Woods CG, Hou Y, Corkey BE, et al. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2010;244(1):77–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.05.025>
30. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(3):463–6.
31. Bigagli E, Lodovici M. Circulating oxidative stress biomarkers in clinical studies on type 2 diabetes and its complications. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019.
32. HENRY WL. Perspectives in diabetes. *J Natl Med Assoc.* 1962;54:476–8.
33. Ahmed AJ, Majeed SR, Obaid HM. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Syst Rev Pharm.* 2020;11(11):850–60.
34. Teodoro JS, Nunes S, Rolo AP, Reis F, Palmeira CM. Therapeutic options targeting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and inflammation to hinder the progression of vascular complications of diabetes. *Front Physiol.*

- 2019;10(JAN).
35. Kaur R, Kaur M, Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: Molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2018;17(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0763-3>
  36. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. 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*. 1994;91(21):9926–30.
  37. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*. 1999;13(1):76–86.
  38. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. 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 Sci U S A*. 2002;99(18):11908–13.
  39. Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem*. 2003;278(4):2396–402.
  40. Lau A, Tian W, Whitman SA, Zhang DD. The predicted molecular weight of Nrf2: It is what it is not. *Antioxidants Redox Signal*. 2013;18(1):91–3.
  41. Clark J, Simon DK. Transcribe to survive: Transcriptional control of antioxidant defense programs for neuroprotection in parkinson's disease. *Antioxidants Redox Signal*. 2009;11(3):509–28.
  42. Wang H, Liu K, Geng M, Gao P, Wu X, Hai Y, et al. RXR $\alpha$  inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res*. 2013;73(10):3097–108.
  43. Igarashi K, Kataokata K, Itoh K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature*. 1994;367(6463):568–72.
  44. Cuadrado A, Manda G, Hassan A, Alcaraz MJ, Barbas C, Daiber A, et al.

- Transcription factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: A systems medicine approach. *Pharmacol Rev.* 2018;70(2):348–83.
45. Jung KA, Choi B hyun, Nam CW, Song M, Kim ST, Lee JY, et al. Identification of aldo-keto reductases as NRF2-target marker genes in human cells. *Toxicol Lett* [Internet]. 2013;218(1):39–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.12.026>
  46. Macleod AK, McMahan M, Plummer SM, Higgins LG, Penning TM, Igarashi K, et al. Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: Demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis.* 2009;30(9):1571–80.
  47. Agyeman AS, Chaerkady R, Shaw PG, Davidson NE, Visvanathan K, Pandey A, et al. Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast epithelial cells reveals common expression profiles. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(1):175–87.
  48. Hirotsu Y, Katsuoka F, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Nakayama K, et al. Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(20):10228–39.
  49. Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Srivastava S, Arenillas D, Happel C, et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through chip-seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(17):5718–34.
  50. Maher JM, Dieter MZ, Aleksunes LM, Slitt AL, Guo G, Tanaka Y, et al. Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway. *Hepatology.* 2007;46(5):1597–610.
  51. Hawkes HJK, Karlenius TC, Tonissen KF. Regulation of the human thioredoxin gene promoter and its key substrates: A study of functional and putative regulatory elements. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2014;1840(1):303–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.013>

52. Wu KC, Cui JY, Klaassen CD. Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicol Sci.* 2011;123(2):590–600.
53. Chorley BN, Campbell MR, Wang X, Karaca M, Sambandan D, Bangura F, et al. Identification of novel NRF2-regulated genes by ChiP-Seq: Influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):7416–29.
54. Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* 2002 Sep;62(18):5196–203.
55. Lee J-M, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem.* 2003 Apr;278(14):12029–38.
56. Wu KC, Cui JY, Klaassen CD. Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicol Sci.* 2011 Oct;123(2):590–600.
57. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell.* 2012 Jul;22(1):66–79.
58. Singh A, Happel C, Manna SK, Acquah-Mensah G, Carrerero J, Kumar S, et al. Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2013 Jul;123(7):2921–34.
59. Maher JM, Dieter MZ, Aleksunes LM, Slitt AL, Guo G, Tanaka Y, et al. Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway. *Hepatology.* 2007 Nov;46(5):1597–610.
60. Yates MS, Tran QT, Dolan PM, Osburn WO, Shin S, McCulloch CC, et al. Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis.* 2009 Jun;30(6):1024–31.
61. Lewerenz J, Hewett SJ, Huang Y, Lambros M, Gout PW, Kalivas PW, et al. The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from

- molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Feb;18(5):522–55.
62. Lee D-F, Kuo H-P, Liu M, Chou C-K, Xia W, Du Y, et al. KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta. *Mol Cell*. 2009 Oct;36(1):131–40.
  63. Cuadrado A, Martín-Moldes Z, Ye J, Lastres-Becker I. Transcription factors NRF2 and NF-κB are coordinated effectors of the Rho family, GTP-binding protein RAC1 during inflammation. *J Biol Chem*. 2014 May;289(22):15244–58.
  64. Liu G-H, Qu J, Shen X. NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim Biophys Acta*. 2008 May;1783(5):713–27.
  65. Wakabayashi N, Skoko JJ, Chartoumpakis D V, Kimura S, Slocum SL, Noda K, et al. Notch-Nrf2 axis: regulation of Nrf2 gene expression and cytoprotection by notch signaling. *Mol Cell Biol*. 2014 Feb;34(4):653–63.
  66. Miao W, Hu L, Scrivens PJ, Batist G. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J Biol Chem*. 2005 May;280(21):20340–8.
  67. Sangokoya C, Telen MJ, Chi J-T. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood*. 2010 Nov;116(20):4338–48.
  68. Goldstein LD, Lee J, Gnad F, Klijn C, Schaub A, Reeder J, et al. Recurrent Loss of NFE2L2 Exon 2 Is a Mechanism for Nrf2 Pathway Activation in Human Cancers. *Cell Rep*. 2016 Sep;16(10):2605–17.
  69. Lo S-C, Hannink M. PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp Cell Res*. 2008 May;314(8):1789–803.
  70. Hast BE, Goldfarb D, Mulvaney KM, Hast MA, Siesser PF, Yan F, et al. Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination. *Cancer Res*. 2013 Apr;73(7):2199–210.
  71. Camp ND, James RG, Dawson DW, Yan F, Davison JM, Houck SA, et al. Wilms tumor gene on X chromosome (WTX) inhibits degradation of NRF2 protein

- through competitive binding to KEAP1 protein. *J Biol Chem.* 2012 Feb;287(9):6539–50.
72. Huang H-C, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem.* 2002 Nov;277(45):42769–74.
  73. McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. 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.* 2004 Jul;279(30):31556–67.
  74. Rada P, Rojo AI, Chowdhry S, McMahon M, Hayes JD, Cuadrado A. SCF/ $\beta$ -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol Cell Biol.* 2011 Mar;31(6):1121–33.
  75. Wu T, Zhao F, Gao B, Tan C, Yagishita N, Nakajima T, et al. Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis. *Genes Dev.* 2014 Apr;28(7):708–22.
  76. Uruno A, Yagishita Y, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system and diabetes mellitus. *Arch Biochem Biophys.* 2015;566(December):76–84.
  77. Grankvist K, Marklund S, Sehlin J, Taljedal IB. Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells in vitro. *Biochem J.* 1979;182(1):17–25.
  78. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J ichiro, Matsuoka T aki, Fujitani Y, Umayahara Y, et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: Possible protection of pancreatic  $\beta$ -cells against glucose toxicity. *Diabetes.* 1999;48(12):2398–406.
  79. Yoh K, Hirayama A, Ishizaki K, Yamada A, Takeuchi M, Yamagishi SI, et al. Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. *Genes to Cells.* 2008;13(11):1159–70.
  80. Ungvari Z, Bailey-Downs L, Gautam T, Jimenez R, Losonczy G, Zhang C, et al. Adaptive induction of NF-E2-related factor-2-driven antioxidant genes in

- endothelial cells in response to hyperglycemia. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2011;300(4):1133–40.
81. Liu TS, Pei YH, Peng YP, Chen J, Jiang S, Sen, Gong J Bin. Oscillating high glucose enhances oxidative stress and apoptosis in human coronary artery endothelial cells. *J Endocrinol Invest*. 2014;37(7):645–51.
  82. Uruno A, Furusawa Y, Yagishita Y, Fukutomi T, Muramatsu H, Negishi T, et al. The Keap1-Nrf2 System Prevents Onset of Diabetes Mellitus. *Mol Cell Biol*. 2013;33(15):2996–3010.
  83. Wang Y, Zhang T, Zhao H, Qi C, Ji X, Yan H, et al. Pentoxifylline Enhances Antioxidative Capability and Promotes Mitochondrial Biogenesis in D-Galactose-Induced Aging Mice by Increasing Nrf2 and PGC-1  $\alpha$  through the cAMP-CREB Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021.
  84. Xu J, Donepudi AC, Moscovitz JE, Slitt AL. Keap1-knockdown decreases fasting-induced fatty liver via altered lipid metabolism and decreased fatty acid mobilization from adipose tissue. *PLoS One*. 2013;8(11):1–16.
  85. Jiménez-Osorio AS, Picazo A, González-Reyes S, Barrera-Oviedo D, Rodríguez-Arellano ME, Pedraza-Chaverri J. Nrf2 and redox status in prediabetic and diabetic patients. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):20290–305.
  86. Xu X, Sun J, Chang X, Wang J, Luo M, Wintergerst KA, et al. Genetic variants of nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 associated with the complications in Han descents with type 2 diabetes mellitus of Northeast China. *J Cell Mol Med*. 2016;20(11):2078–88.
  87. Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;309(4):1017–26.
  88. Xia N, Daiber A, Förstermann U, Li H. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. 2017;174(12):1633–46.
  89. Britton RG, Kover C, Brown K. Direct molecular targets of resveratrol: identifying key interactions to unlock complex mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1348(1):124–33.
  90. Sin TK, Yung BY, Siu PM. Modulation of SIRT1-foxo1 signaling axis by

- resveratrol: Implications in skeletal muscle aging and insulin resistance. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(2):541–52.
91. Tomé-Carneiro J, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, Dávalos A, Gil-Zamorano J, González M, et al. One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. *Pharmacol Res*. 2013;72:69–82.
  92. Movahed A, Nabipour I, Lieben Louis X, Thandapilly SJ, Yu L, Kalantarhormozi M, et al. Antihyperglycemic effects of short term resveratrol supplementation in type 2 diabetic patients. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2013;2013.
  93. Goh KP, Lee HY, Lau DP, Supaat W, Chan YH, Koh AFY. Effects of resveratrol in patients with type 2 diabetes mellitus on skeletal muscle SIRT1 expression and energy expenditure. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2014;24(1):2–13.
  94. Bhatt JK, Thomas S, Nanjan MJ. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res [Internet]*. 2012;32(7):537–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2012.06.003>
  95. Do GM, Jung UJ, Park HJ, Kwon EY, Jeon SM, Mcgregor RA, et al. Resveratrol ameliorates diabetes-related metabolic changes via activation of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in db/db mice. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(8):1282–91.
  96. Scrocchi LA, Drucker DJ. Effects of aging and a high fat diet on body weight and glucose tolerance in glucagon-like peptide-1 receptor(-/-) mice. *Endocrinology*. 1998;139(7):3127–32.
  97. Liu K, Zhou R, Wang B, Mi MT. Effect of resveratrol on glucose control and insulin sensitivity: A meta-analysis of 11 randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2014;99(6):1510–9.
  98. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*.

- 2004;32(12):1377–82.
99. Jeong SO, Oh GS, Ha HY, Koo BS, Kim HS, Kim YC, et al. Dimethoxycurcumin, a synthetic curcumin analogue, induces heme oxygenase-1 expression through Nrf2 activation in RAW264.7 macrophages. *J Clin Biochem Nutr.* 2009;44(1):79–84.
  100. Rivera-Mancía S, Lozada-García MC, Pedraza-Chaverri J. Experimental evidence for curcumin and its analogs for management of diabetes mellitus and its associated complications. *Eur J Pharmacol [Internet].* 2015;756:30–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.02.045>
  101. Trujillo J, Granados-Castro LF, Zazueta C, Andérica-Romero AC, Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Mitochondria as a target in the therapeutic properties of curcumin. *Arch Pharm (Weinheim).* 2014;347(12):873–84.
  102. Weisberg SP, Leibel R, Tortoriello D V. Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabetes. *Endocrinology.* 2008;149(7):3549–58.
  103. Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IMA, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin-from molecule to biological function. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(22):5308–32.
  104. Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J.* 2003;371(3):887–95.
  105. Pugazhenti S, Akhoy L, Selvaraj G, Wang M, Alam J. Regulation of heme oxygenase-1 expression by demethoxy curcuminoids through Nrf2 by a PI3-kinase/Akt-mediated pathway in mouse  $\beta$ -cells. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2007;293(3).
  106. Chuengsamarn S, Rattanamongkolgul S, Phonrat B, Tungtrongchitr R, Jirawatnotai S. Reduction of atherogenic risk in patients with type 2 diabetes by curcuminoid extract: A randomized controlled trial. *J Nutr Biochem [Internet].* 2014;25(2):144–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.013>
  107. Na LX, Li Y, Pan HZ, Zhou XL, Sun DJ, Meng M, et al. Curcuminoids exert

- glucose-lowering effect in type 2 diabetes by decreasing serum free fatty acids: A double-blind, placebo-controlled trial. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(9):1569–77.
108. He H-J. Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. *World J Diabetes*. 2012;3(5):94.
  109. Zhang D, Fu M, Gao S-H, Liu J-L. Curcumin and diabetes: a systematic review.: Full Text Finder Results. Hindawi Publ Corp [Internet]. 2013;2013(1):1–16. Available from: <http://resolver.ebscohost.com.libproxy.txstate.edu/openurl/?sid=Entrez%3APubMed&id=pmid%3A24348712&linksourcecustid=3402>
  110. Zhang X, Liang D, Guo L, Liang W, Jiang Y, Li H, et al. Curcumin protects renal tubular epithelial cells from high glucose-induced epithelial-to-mesenchymal transition through Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1. *Mol Med Rep*. 2015;12(1):1347–55.
  111. Suresh Babu P, Srinivasan K. Amelioration of renal lesions associated with diabetes by dietary curcumin in streptozotocin diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 1998;181(1–2):87–96.
  112. Cleasby A, Yon J, Day PJ, Richardson C, Tickle IJ, Williams PA, et al. Structure of the BTB domain of Keap1 and its interaction with the triterpenoid antagonist CDDO. *PLoS One*. 2014;9(6):15–21.
  113. Sporn MB, Liby KT, Yore MM, Fu L, Lopchuk JM, Gribble GW. New synthetic triterpenoids: Potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. *J Nat Prod*. 2011;74(3):537–45.
  114. Liby KT, Sporn MB. Synthetic oleanane triterpenoids: Multifunctional drugs with a broad range of applications for prevention and treatment of chronic disease. *Pharmacol Rev*. 2012;64(4):972–1003.
  115. Shelton LM, Lister A, Walsh J, Jenkins RE, Wong MHL, Rowe C, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analyses uncover regulatory roles of Nrf2 in the kidney. *Kidney Int*. 2015;88(6):1261–73.
  116. Pergola PE, Raskin P, Toto RD, Meyer CJ, Huff JW, Grossman EB, et al.

- Bardoxolone Methyl and Kidney Function in CKD with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2011;365(4):327–36.
117. Tayek JA, Kalantar-Zadeh K. The extinguished BEACON of bardoxolone: Not a monday morning quarterback story. *Am J Nephrol.* 2013;37(3):208–11.
118. de Zeeuw D, Akizawa T, Audhya P, Bakris GL, Chin M, Christ-Schmidt H, et al. Bardoxolone Methyl in Type 2 Diabetes and Stage 4 Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med.* 2013;369(26):2492–503.