

Índice

Lista de Acrónimos.....	2
Resumo	3
Abstract	3
1. Introdução	4
2. Nutrigenómica.....	5
3. Ativação genética via Nrf2	7
4. Efeitos benéficos da ativação do Nrf2	9
4.1 Efeitos Antioxidantes dependentes do Nrf2.....	9
4.1.1 NQO1	9
4.1.2 HO-1.....	10
4.1.3 SOD.....	10
4.1.4 GSH.....	10
4.2 Genes desintoxicantes ativados pelo Nrf2.....	11
4.3 Efeitos Anti-inflamatórios do Nrf2	12
4.4 Biogénese e Autofagia Mitocondrial.....	12
4.5 Doenças prevenidas e/ou tratadas pelo aumento de Nrf2, pele menos em modelos animais.....	13
5. Aumento de Nrf2 por nutrientes e outros fatores	14
6. Sulforafano e outros ativadores Nrf2 usados como suplementos	15
6.1. Quinona Redutase (NQO1) Avaliador de Capacidade de Indução	17
6.2. Biodisponibilidade.....	18
6.2.1. Curcumina.....	19
6.2.2. Resveratrol	20
6.2.3. Silimarina.....	20
6.2.4. Sulforafano	21
7. Regulação Negativa da via Nrf2/ARE	22
8. Conclusão	23
9. Referências Bibliográficas	24

Lista de Acrónimos

ALS – Amyotrophic Lateral Sclerosis

AMP – Adenosina Monofosfato

AMPK – Adenosina Monofosfato Cinase

ARE – Elemento de Resposta Antioxidante (Antioxidant Response Element)

bZIP – Basic Leucine Zipper

COX-2 – Ciclo-oxigenase-2

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

GRN – Glucorafina

GSH – Glutationa reduzida

GSSG – Glutationa Reduzida

HO – Heme Oxigenase

IL-10 – Interleucina-10

ITCs - Isotiocianatos

Keap1 - Kelch-like ECH-associated protein 1

MYR – Mirosinase

NAPQI – N-acetil-p-benzoquinona-imina

NCDs – Non-communicable diseases

NF-κB - Factor Nuclear kappa B (Nuclear Factor κB)

NQO1 – Quinona oxidoreductase

Nrf2 - Nuclear factor erythroid-2-related factor 2

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species)

SOD – Superóxido Dismutase

TGF-β – Fator de crescimento tumoral β (Tumor Growth Factor β)

Resumo:

A alimentação, como é científica e empiricamente sabido, constitui um pilar da saúde. Na sociedade, ao longo das épocas, também em função de culturas diversas, os hábitos alimentares vão mudando, contribuindo para a saúde ou para o aumento da incidência de algumas condições patológicas. A nutrigenômica ajuda-nos a traduzir em pormenor, numa base científica, a influência de compostos da dieta na regulação da expressão dos nossos genes, abrindo possibilidades para novas terapias, mas também contribuindo com informações que fomentam hábitos alimentares mais saudáveis.

O Nrf2, *nuclear factor erythroid-2-related factor 2*, é um alvo interessante uma vez que desempenha um papel central na regulação de resposta celular ao stress, que podem ser úteis nas mais diversas patologias, assim como na manutenção da homeostasia num indivíduo saudável.

Vários estudos têm identificado um leque alargado de compostos da dieta com papel relevante na ativação deste fator de transcrição. Neste trabalho, será comparada a capacidade de indução da ativação do Nrf2 em suplementos da dieta, bem como a sua biodisponibilidade, contribuindo assim para um conhecimento mais profundo sobre o papel da dieta na regulação dos genes e na saúde humana.

Abstract:

Food, as scientific and empirically known, is a pillar of health. In society, over the ages, also according to different cultures, diet habits are changing, contributing to health or increasing the incidence of certain pathological conditions. Nutrigenomics help us translate in detail, on a scientific basis, the influence of dietary compounds in the regulation of gene expression, opening up possibilities for new therapies, while also contributing with information that encourage healthier diet habits.

The Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 is an attractive target because it plays a central role in regulating cellular response to stress and can be useful in various diseases, as well as in the maintenance of homeostasis in a healthy individual.

Various studies have identified a wide range of dietary compounds that have a role in the activation of this transcription factor. In this paper, we compared the ability of these compounds, that are presente in diet supplements, to induce Nrf2 activation as well as its bioavailability, thus contributing to a better understanding about the role of diet in gene regulation and human health.

I. | Introdução

Ao longo do século XX a ciência nutricional tem-se focado na descoberta de vitaminas¹ e minerais², na definição do seu uso e no impacto que a deficiência destas tem na saúde³. No entanto, os problemas de saúde relacionados com a alimentação do mundo desenvolvido desviaram-se do conceito de subnutrição e tomaram o rumo da sobrenutrição, obesidade e diabetes mellitus tipo 2.⁴

Assim, com o objetivo de prevenir estas doenças, a medicina moderna mudou a direção da sua investigação para perceber como a dieta pode otimizar e manter a homeostasia das nossas células, tecidos, órgãos e organismo. Isto requer a compreensão dos mecanismos e processos através dos quais os nutrientes atuam e interagem com os genes, proteínas e metabolismo. Como tal, a pesquisa nutricional deixou o foco da epidemiologia e fisiologia para seguir a bioquímica biologia molecular e genética, nascendo a nutrigenómica.

A nutrigenómica traz-nos uma nova terminologia e técnicas experimentais que se traduzem, essencialmente, numa abordagem inovadora à investigação nutricional, que nos permite o estudo global da expressão genética numa célula ou organismo na vertente em que é influenciada por compostos ingeridos na dieta.

O entusiasmo em redor desta área vem do aumento da perceção de que existe potencial nas alterações alimentares, bem como que estas permitem promover a saúde e prevenir ou tratar doenças que estão relacionadas com a dieta.

Neste momento, com o aumento da incidência de pandemias que se relacionam com a alimentação (obesidade, hipertensão, diabetes ...), a nutrigenómica revela-se uma ferramenta fundamental na abordagem molecular de diversas patologias, podendo ser considerada um caminho do futuro na prevenção e, até, tratamento das condições citadas.

A descoberta de que moléculas derivadas da dieta estão em constante conversação com complexos sistemas de controlo intracelular demonstrou que a alimentação é muito mais que uma fonte de micro e macronutrientes. Assim sendo, seguindo este modelo, nenhum suplemento multivitamínico irá substituir a enorme diversidade de fitoquímicos presentes numa dieta equilibrada.

Do ponto de vista social, é muito fácil confeccionar comida saborosa combinando alguns ingredientes. O verdadeiro desafio está em fazer uma alimentação, realmente saudável e equilibrada, que seja agradável ao paladar. Deste modo, é preciso um trabalho conjunto dos profissionais de genética, indústrias de saúde pública, ciência nutricional e culinária.⁵

Ao longo deste trabalho vou focar-me, fundamentalmente, no Nrf2 dado o seu papel central na regulação da expressão génica e resposta celular a estímulos externos, nomeadamente, compostos exógenos consumidos na dieta.

O Nrf2 é um fator de transcrição conhecido há mais de 10 anos por ser um importante ativador de genes antioxidantes, responsáveis por importantes respostas protetoras. Mais recentemente, tem-se mostrado que os seus efeitos citoprotetores vão muito para além dos seus efeitos antioxidantes. Estes incluem a ativação de dezenas de genes envolvidos na desintoxicação de vários xenobióticos; diminuição de respostas inflamatórias; melhoria no funcionamento mitocondrial; e estimulação da autofagia, processo pelo qual agregados de proteínas tóxicas e organelos disfuncionais podem ser degradados.⁶

2. | Nutrigenómica

De um ponto de vista da apresentação a um público leigo, a nutrigenómica tem sido divulgada como “a nova ciência de nutrigenómica ensina-nos o que alimentos específicos dizem aos nossos genes. O que comemos determina diretamente as mensagens genéticas que o nosso corpo recebe. Estas mensagens, por outro lado, controlam todas as moléculas que constituem o nosso metabolismo: as moléculas que dizem ao nosso corpo para queimar ou armazenar calorias. Se conseguirmos aprender a linguagem dos nossos genes e controlar as mensagens e instruções que eles dão ao nosso corpo e metabolismo, podemos alterar radicalmente a forma como a alimentação interage com o nosso corpo, perder peso e otimizar a nossa saúde.”⁷

De um ponto de vista científico, a nutrigenómica envolve o estudo e caracterização dos efeitos de compostos ingeridos na dieta na expressão de genes, na modificação da atividade de proteínas e do metabolismo. Em suma, foca-se no efeito dos nutrientes no genoma, proteoma e metaboloma. Logo, elucida em termos mecanísticos e moleculares o impacto que estes nutrientes específicos e regimes nutricionais têm na saúde (Fig.1).⁵

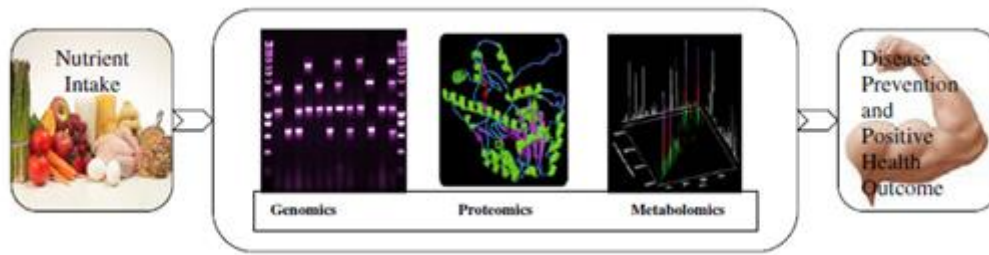


Fig. 1 Abordagem nutrigenômica na prevenção de doenças. Os componentes presentes na dieta têm impacto na regulação gênica influenciando, conseqüentemente, a expressão proteica e perfil metabólico, podendo originar um resultado benéfico para o organismo. (Retirado de Neeha et al., 2013)⁵

Fundamentalmente, uma abordagem nutrigenômica providencia:

- Uma amostra instantânea dos genes que estão On/Off (potencial genético) a qualquer momento;
- Uma imagem de como um gene ou proteína colabora para produzir a resposta observada;
- O método para determinar a influência dos nutrientes na expressão genética/proteica.⁵

Espera-se que o aumento do conhecimento nesta área permita uma compreensão integrada do modo como a dieta afeta o metabolismo e o controle homeostático, que será então usado para prevenir o desenvolvimento de doenças crônicas relacionadas com a dieta como, por exemplo, a Obesidade e a Diabetes Mellitus Tipo-2.⁸

Non-communicable diseases (NCDs) – especialmente doenças cardiovasculares, câncros, doenças respiratórias crônicas e diabetes – causaram 60% das mortes a nível global em 2005 (aproximadamente 35 milhões de mortes). O número total de mortes devido a NCDs estão previstos aumentar ainda mais 17% ao longo dos próximos 10 anos. Em 2020, estima-se que as NCDs serão a causa de 80% das doenças a nível mundial, causando a morte de 7 em cada 10 pessoas apenas em países em desenvolvimento. Isto coloca um peso considerável em orçamentos de saúde limitados, particularmente em economias emergentes. Assim, a promissora área da nutrigenômica deve ser levada seriamente em relação a esta epidemia crescente, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento.⁹

Posto isto, para desmistificar estas doenças crónicas, o trabalho em nutrigenómica está a expandir-se rapidamente em várias partes do mundo sendo que, segundo a base de dados da Scopus, os Estados Unidos da América e Reino Unido apresentam as maiores contribuições (Fig. 2).⁵

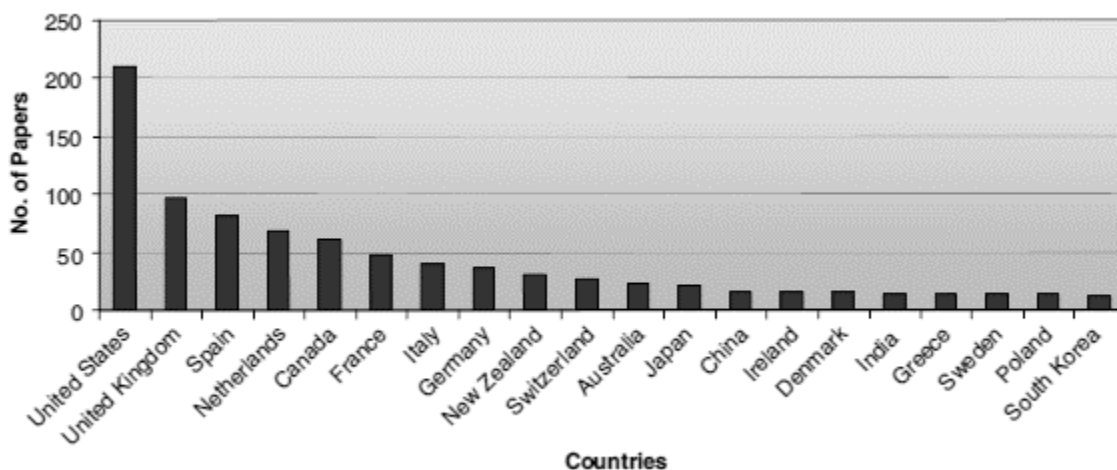


Fig. 2 Contribuição para a investigação nutrigenómica. Os Estados Unidos da América e o Reino Unido exibem um maior número de publicações, seguindo-se a Espanha, Holanda, Canadá, França, Itália e Alemanha. (Tirado de Neeha et al., 2013)⁵

3. | Ativação genética via Nrf2

O Nrf2, no estado não induzido, encontra-se maioritariamente no citoplasma num complexo inativo com outra proteína conhecida como Keap1. Em situações basais ausentes de stress, o Nrf2 cuja semivida é aproximadamente 20 minutos¹⁰, é continuamente degradado por via proteossomal pela via ubiquitina-proteossoma, para que os seus níveis sejam mantidos baixos¹¹. Quando um sinal apropriado é detetado pelos resíduos de cisteína da Keap1, há a inibição da atividade da ubiquitina-E3-ligase no complexo Keap1-Cul3. A disrupção da associação Nrf2-Keap1 leva à diminuição da taxa de proteólise, aumentando, consequentemente, a acumulação de Nrf2 no núcleo onde se alinha com uma curta sequência de nucleótidos na região promotora dos seus genes alvo, induzindo genes citoprotetores e enzimas antioxidantes, resultando numa resposta adaptativa. Esta sequência é conhecida como Elemento de Resposta Antioxidante (ARE) ou Elemento de Resposta Eletrofílica (EpRE). Para se ligar, o Nrf2 dimeriza com outra *basic leucine zipper* (bZIP), uma das pequenas proteínas Maf, para formar um complexo que se liga aos AREs.¹² Estes AREs não se encontram apenas nas regiões promotoras de genes antioxidantes, mas também em genes envolvidos em outras funções, particularmente outras funções citoprotetoras.⁶

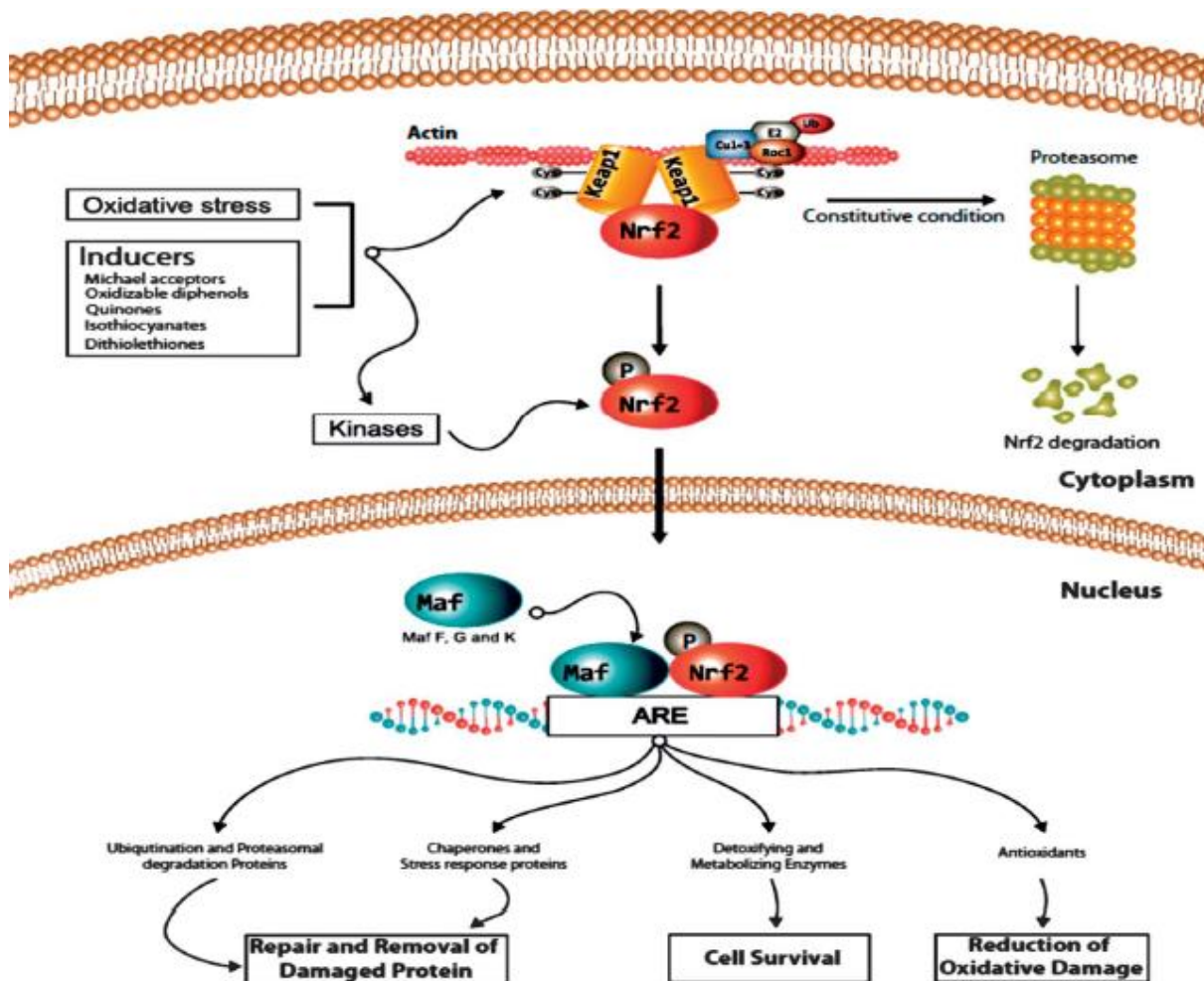


Fig. 3 Ilustração esquemática da regulação do Nrf2 em condições basais e de stress. No estado basal, o Nrf2 encontra-se no citoplasma num complexo multiproteico em que se destaca a Keap1. Este complexo é continuamente degradado no proteossoma. A oxidação de resíduos de cisteína na Keap1 leva à dissociação do complexo, permitindo a libertação do Nrf2 que, após fosforilação, transloca para o núcleo onde se liga ao ARE, induzindo a expressão de genes de defesa. (Tirado de Kumar et al., 2014)¹²

É ainda considerado que a fosforilação do Nrf2 por cinases nos resíduos de serina e tionina facilita a dissociação do Nrf2-Keap1 e subsequente translocação para o núcleo.¹²

Os agentes que reagem com os grupos tiol das cisteínas da Keap1 são eletrofílicos e/ou oxidantes, sendo que a reação com estes grupos é tida em conta como o mecanismo mais importante de regulação de Nrf2. No entanto, há muitos outros mecanismos de regulação, fazendo o sistema de controlo de Nrf2 muito complexo.⁶

Em caso de agressão, como por exemplo intoxicação com paracetamol, há uma depleção rápida das reservas de GSH. Contudo, a célula ativa uma resposta adaptativa onde a Keap1 sente a presença do metabolito N-acetil-p-benzoquinona-imina (NAPQI), ativando

subsequentemente o Nrf2 que, por sua vez, vai promover a síntese de GSH. No entanto, este mecanismo não é muito eficiente em situações agudas, uma vez que os tempos de tradução para a síntese de proteínas dos genes alvo do Nrf2 podem demorar quatro horas.¹³

4. | Efeitos benéficos da ativação do Nrf2

4.1 | Efeitos Antioxidantes dependentes do Nrf2

A variedade de enzimas produzidas dos genes alvo do Nrf2 são eficientes e versáteis. Várias razões podem explicar a sua eficiência e diversidade: (1) não são consumidos estequiometricamente como os antioxidantes que atuam diretamente como o ascorbato e tocoferóis; (2) têm uma duração de ação longa, com semividas compreendidas entre dias e, por isso, a sua indução não precisa de ser contínua; (3) restauram os antioxidantes diretamente produzidos endogenamente, como a coenzima Q10 e tocoferóis, ao revertê-los ao estado reduzido (em particular pela via NQO1 pois, tanto a coenzima Q10 como os tocoferóis, são quinonas).

4.1.1 | NQO1

Um dos genes antioxidantes mais estudados que são ativado pelo Nrf2 é o gene da quinona oxidoreductase (NQO1).

A NQO1 tem sido descrita como a enzima citoprotetora protagonista, e codificada pelo que é considerado um dos genes induzíveis mais consistentes e robustos na sua classe.¹⁴ Para além disto, é ainda sabido que a sua atividade diminuiu com a idade, sendo que a regulação da sua atividade, induzida pelo Nrf2, é descrita como uma forma de manter as defesas celulares com o avançar de idade. A NQO1 exibe uma especificidade ampla para substratos, sendo que os seus efeitos benéficos se estendem muito para além do seu famoso papel enquanto enzima de fase II.¹⁵

As suas outras funções, descritas de seguida, podem contribuir para a sua capacidade citoprotetora e incluem: (1) proteção contra quinonas derivadas do benzeno, como o benzo(a)pireno, um carcinogénico usualmente encontrado nos gases de exaustão, fumo de cigarro e carnes grelhadas na brasa¹⁶; (2) redução de quinonas estrogénicas aos respetivos grupos fenóis, um processo associado com a diminuição do risco de cancro da mama devido aos elevados níveis de metabolitos do estrogénio¹⁷; (3) ação sobre o radical superóxido, embora numa ordem de magnitude mais baixa do que a superóxido dismutase¹⁸; (4) estabilização do p53, o gene anticancerígeno mais comumente alterado¹⁴; (5) reparação da coenzima Q10 (ubiquinona) oxidada e os tocoferóis à sua forma reduzida.¹⁴

Há vários polimorfismos do gene NQO1, sendo que são associados a um maior risco carcinogénico. A variante C609T do gene é um dos poucos polimorfismos de nucleótido único (SNP) comuns, conhecido por eliminar quase por completo a atividade enzimática. Deste modo, o NQO1 atrai muita investigação devido aos seus múltiplos efeitos na defesa celular.¹⁹

No seguimento do trabalho, será também abordada enquanto avaliador de capacidade de indução.

4.1.2 | HO-1

Um segundo gene antioxidante vulgarmente estudado ativado pelo Nrf2 é o gene da heme oxigenase I (HO-1). Esta enzima converte o heme livre, que tem efeitos pro-oxidantes, em ferro, monóxido de carbono e biliverdina, sendo esta última convertida no antioxidante bilirrubina (por uma reação também estimulada pelo Nrf2, codificado pelos dois genes biliverdina redutase). O ferro libertado pela heme oxigenase é sequestrado pela ferritina e, como o Nrf2 induz cada um dos 4 genes da ferritina, previne o *stress* oxidativo derivado do ferro.²⁰

Este controlo coordenado de múltiplos genes, produzindo proteínas com funções interligadas para produzir uma importante resposta biológica tem sido associado, de forma recorrente, com a regulação genética mediada pelo Nrf2.⁶

4.1.3 | SOD

Dois genes de superóxido dismutase (SOD) são estimulados pelo Nrf2, com cada SOD - SOD1 e SOD2 - a diminuir o *stress* oxidativo ao diminuir a concentração de superóxido.⁶

4.1.4 | GSH

A glutationa reduzida (GSH) tem sido descrita como o mais importante antioxidante de baixo peso molecular produzido no corpo humano. Cada um dos 3 genes que codificam enzimas necessárias à síntese da GSH são ativados pelo Nrf2, tal como o gene que codifica a glutationa redutase – enzima que converte a glutationa oxidada (GSSG) a glutationa reduzida (GSH).¹²

Em suma, como se pode ver acima, há muitos genes estimulados pelo Nrf2 que estão envolvidos na proteção antioxidante. Contudo, há ainda outros genes ativados por este que contribuem para: codificar produtos que atuam na remoção de compostos tóxicos da peroxidação lipídica; codificar enzimas que têm um papel na eliminação e reparação de

produtos de oxidação; e ajudar a remover produtos oxidantes produzidos no processo de reparação de ADN danificado.⁶

4.2 | Genes desintoxicantes ativados pelo Nrf2

Para as centenas de milhões de pessoas em todo o mundo que são expostas diariamente a níveis substanciais de tóxicos, a desintoxicação pode ser o mecanismo citoprotetor dependente do Nrf2 mais relevante.⁶

Há um total de 25 genes ativados pelo Nrf2 sendo que, cada um codifica uma enzima diferente que atua na desintoxicação de vários xenobióticos tóxicos.

Entre estes 25 genes, há 12 que têm um papel no metabolismo de vários xenobióticos tóxicos que contêm carbono. Não são responsáveis pela conjugação, mas auxiliam no processo.

Há também, entre estes 25 genes desintoxicantes, 5 ativados pelo Nrf2 que aumentam a conjugação da glutathione, 1 que aumenta a conjugação do sulfato e 2 que promovem a glucuronidação. Cada um destes 8 genes tem o papel de aumentar a excreção dos tóxicos, após conjugação.²⁰

Existem ainda outros genes ativados pelo Nrf2, que aumentam o transporte dos químicos xenobióticos para fora da cela, promovendo a subsequente excreção do corpo²⁰.

Dois genes potencialmente importantes na desintoxicação, não referidos anteriormente, são o Mt1 e Mt2 que codificam a metalotioneína e são induzidos pelo Nrf2²¹.

A metalotioneína tem o papel de quelar, transportar e excretar tanto metais fisiológicos (como o zinco, cobre e selênio) como xenobióticos (como o cádmio, mercúrio, chumbo e arsênio)²². No entanto, num estudo a curto prazo de toxicidade de cádmio, foi concluído que os efeitos nas respostas antioxidantes foram mais importantes do que os efeitos produzidos pela metalotioneína na produção de resistência à toxicidade do cádmio²¹.

Foi também mostrado que o Nrf2 estimula a excreção de mercúrio, sendo que os autores atribuem tal capacidade ao aumento de glutathione reduzida. É importante lembrar que a glutathione é o tiol de baixo peso molecular mais comum no corpo e, atendendo a que mercúrio, chumbo, cádmio e arsênio, todos reagem com grupos tiol, será expectável que o aumento da glutathione reduzida, dependente do Nrf2, contribua para a desintoxicação destes metais tóxicos²³.

4.3 | Efeitos Anti-inflamatórios do Nrf2

A ativação de Nrf2 produz vários efeitos anti-inflamatórios, nomeadamente, diminuição de NF- κ B e diminuição de uma série de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, ciclo-oxigenase-2 (COX-2), metaloproteinase e forma indutível da óxido nítrico sintase (iNOS).⁶

A interação entre o Nrf2 e o NF- κ B é muito complexa, tendo cada um o efeito de aumentar e diminuir o outro. Apesar de ser claro o facto de que a via do NF- κ B é inibida por muitos ativadores do Nrf2, o mecanismo específico responsável por este acontecimento ainda é algo incerto. No entanto, novas evidências indicam que o NF- κ B pode reprimir reciprocamente, a sinalização do Nrf2 ao nível da transcrição²⁴.

Dois efeitos anti-inflamatórios diretos do Nrf2 são a estimulação da transcrição do gene da citocina IL-10²⁵, anti-inflamatória, e também diminuição das respostas regulatórias produzidas pelo TGF- β ²⁶.

Resumindo, o Nrf2 produz um vasto número de efeitos anti-inflamatórios, muitos deles mediados pela diminuição da atividade da NF- κ B e outros pelo aumento da IL-10, dependente do Nrf2⁶.

4.4 | Biogénese e Autofagia Mitocondrial

A maioria das doenças listadas na Tabela I são caracterizadas pela disfunção do metabolismo energético e mitocondrial. O Nrf2 produz o aumento da biogénese mitocondrial ao ativar um largo número de genes envolvidos no metabolismo energético, ativando também um gene relacionado que contribui na ação - o Nrf1²⁷.

É sabido que o Nrf2 e a AMPK têm imensa influência um no outro, sendo que esta última é estimulada pelo AMP, que monitoriza os níveis de energia. Posto isto, é possível que esta seja uma importante interação no controlo de respostas mitocondriais²⁸.

Há também alguns nutrientes, estimulantes do Nrf2, que atuam ainda aumentando o processo de autofagia pelo qual mitocôndrias, outros organelos danificados e agregados nocivos de proteínas (envolvidos no processo de doenças neuro degenerativas, por exemplo) são degradados. Parte deste processo de autofagia ocorre através de um processo dependente do Nrf2²⁹.

4.5 | Doenças prevenidas e/ou tratadas pelo aumento de Nrf2, pelo menos em modelos animais

O aumento dos níveis de Nrf2 tem demonstrado prevenir e/ou tratar uma alargada lista de doenças crónicas, presentes na Tabela I. Reciprocamente, baixar ou eliminar as funções do Nrf2 tem mostrado um aumento na suscetibilidade a essas mesmas doenças.

A maioria destes estudos foram realizados em modelos animais, embora também haja um aumento de estudos humanos a ser reportados.

Diseases
Cardiovascular diseases including atherosclerosis, ischemic cardiovascular disease, vascular endothelial dysfunction, and heart failure
Neurodegenerative diseases including Alzheimer's, Parkinson's, ALS, Huntington's diseases
Cancer (prevention)
Chronic kidney diseases
Metabolic diseases: Type 2 diabetes; metabolic syndrome; obesity
Several types of toxic liver disease
Chronic lung diseases including emphysema, asthma, and pulmonary fibrosis
Sepsis
Autoimmune diseases
Inflammatory bowel disease
HIV/AIDS
Multiple sclerosis
Epilepsy

Tabela I Lista de doenças tratadas ou prevenidas pelo aumento dos níveis de Nrf2 Todas estas doenças têm em comum eventos de *stress* oxidativo ou inflamação, e, em muitas delas, também é sabido haver envolvimento de disfunção mitocondrial. (Adaptado de Martin L Pall et al., 2015)⁶

Para além destas doenças, há informações de outras, que podem ser prevenidas ou tratadas com o aumento de Nrf2, embora tenham sido menos estudadas do que as presentes na Tabela I. Estas incluem hemoglobinopatias como anemia falciforme e β -talassémia, malária, doenças da espinal medula, traumas cerebrais, depressão severa, esquizofrenia e bipolaridade, úlceras gástricas, glaucoma, cataratas e hiperplasia benigna da próstata.

É claro que ainda precisamos de muito mais investigação relativamente a estas atividades do Nrf2 atrás nomeadas, mas estes estudos sugerem que o espectro no qual o Nrf2 consegue ser protetor, pode ser maior do que o abrangido pela Tabela I⁶.

5. | Aumento de Nrf2 por nutrientes e outros fatores

A Tabela 2 indica uma lista de fatores que têm demonstrado atuar, pelo menos em parte, aumentando o Nrf2. Cada um dos nove fatores listados na Tabela 2 tem extensa literatura sobre os seus efeitos benéficos para a saúde.

Health-promoting factors
Many but not all phenolic antioxidants
<i>Gamma</i> -tocopherols and tocotrienols (but α -tocopherol has little activity)
Isothiocyanates from broccoli, cabbage and other cruciferous foods
Triterpenoids and other terpenes
Sulfur compounds including allyl sulfides in garlic/onion/allium foods
Many carotenoids with lycopene apparently the most active
Fish oil (long chain omega-3 fatty acids DHA and EPA)
Modest oxidative stress (hormesis)
Exercise, works in part via modest oxidative stress; may also work in the vasculature via laminar shear stress

Tabela 2 Lista de fatores que promovem aumento dos níveis de Nrf2 Apesar de todos os nove terem apresentado influência no aumento de Nrf2, muitos deles podem claramente atuar de outras formas que não envolvem o Nrf2 para promover a saúde. (Adaptado de Martin L Pall et al., 2015)⁶

Os compostos fenólicos atuam através de diferentes mecanismos para aumentar o Nrf2. No entanto, alguns fenólicos são completamente inativos no processo. Os que parecem atuar mais diretamente são os *orto* ou *para* dihidroxifenóis, que podem ser oxidados a quinonas, aumentando então o Nrf2.¹² O papel do anel fenólico é visto também no segundo tipo de químicos presentes na Tabela 2: as diferentes formas de Vitamina E. As estruturas com *gama* são muito mais ativas que o α -tocoferol no que toca ao aumento do Nrf2.³⁰ O α -tocoferol, que é a forma comum encontrada nos suplementos de vitamina E, tem modesta atividade no aumento de Nrf2. No entanto, pode diminuir a atividade *in vivo* porque aumenta a degradação das outras formas de vitamina E no corpo, nomeadamente as duas anteriormente mencionadas.³¹

Três destas classes de químicos atuam através dos seus produtos de oxidação para aumentar os níveis de Nrf2. Os ácidos gordos ómega-3 de cadeia longa - docosa-hexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA); os carotenoides atuam primariamente, e possivelmente de forma total, por via dos seus produtos de oxidação; e muitos antioxidantes fenólicos através das quinonas, seus produtos de oxidação.

Há ainda outros compostos fitoquímicos capazes de aumentar o Nrf2, alguns mais difíceis de caracterizar que aqueles listados na Tabela 2. Por exemplo, alguns compostos fenólicos derivados de plantas que também aumentam o Nrf2. Derivados de plantas crucíferas também promovem o aumento de Nrf2, tal como o ácido α -lipóico. Foi também reportado que o butirato produzido pela fermentação de fibra no cólon estimula o aumento de Nrf2 no colonócitos.⁶

O exercício está associado com um aumento do fluxo de glicose e oxigênio através da mitocôndria, sendo um processo que aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), tal como o superóxido, funcionando em parte devido a um modesto *stress* oxidativo. No entanto, foi demonstrado que as típicas alterações na expressão genética, relacionadas com o exercício, são completamente anuladas pela ingestão diária de suplementos de vitamina C e E em doses de 1000mg e 400 UI, respectivamente. Uma revisão destacou 23 estudos que mostram que a ingestão de suplementos antioxidantes interfere com as adaptações que os treinos físicos induzem.³² Como é apoiada a ideia de que o Nrf2 é ativado por um sinal pro-oxidante suave, doses altas de suplementos antioxidantes podem atenuar os sinais requeridos para que sejam ativadas defesas endógenas.³³

6. | Sulforafano e outros ativadores Nrf2 usados como suplementos

É do conhecimento comum que vegetais crucíferos (como por exemplo o brócolo, o repolho, couve-flor, couve-de-bruxelas) são uma boa fonte de micronutrientes. No entanto, o seu valor para a saúde humana vai muito para além dos seus nutrientes: os fitoquímicos que contêm, capazes de modificar a expressão genética.³⁴

A maioria dos estudos em crucíferos têm-se focado no brócolo, *Brassica oleracea* (vegetal e rebentos), como fonte de compostos bioativos com potencial nutrigenómico. Nestas últimas duas décadas, o interesse no papel do brócolo tem aumentado, seguindo as evidências de que a indução de enzimas de desintoxicação possa ser responsável pela maioria dos benefícios para a saúde atribuídos à ingestão de vegetais.³⁵

Após o isolamento do sulforafano derivado do brócolo, foi constatado que era um ativador de enzimas de fase II importante e muito potente.³⁶

O sulforafano [I-isotiocianato-(4R)-(metilsulfenil) butano: $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})(\text{CH}_2)_4\text{-N}=\text{C}=\text{S}$] é uma pequena (MM=177.29) molécula alifática lipofílica sulfurada, que não está presente nos crucíferos ou outras plantas. Em vez disso, as plantas do género *Brassica* contêm um precursor biologicamente inativo, a glucorafanina (GRN), que está contida no vacúolo da célula da planta em conjunto com uma enzima, a mirosinase (MYR), que está compartimentada separadamente.³⁷ É apenas quando se dá a rutura da célula da planta que a GRN e a MYR entram em contacto, produzindo enzimaticamente o sulforafano (Fig. 4).³⁸

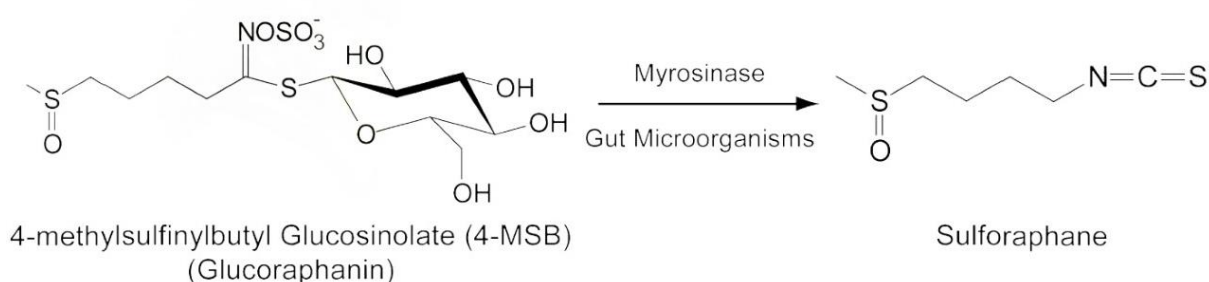


Fig. 4 Processo de formação do sulforafano O sulforafano é produzido pela conversão enzimática da glucorafina sob ação da mirosinase (Adaptado de Boddupalli et al., 2012)³⁹

Comparativamente com o seu precursor estável GRN, o sulforafano é relativamente instável. Tal facto traz implicações para aspetos culinários do brócolo e outros crucíferos. O brócolo não é o único vegetal que rende sulforafano, mas é o que rende as maiores quantidades, com o seu conteúdo de GRN a ser, aproximadamente, 75% dos glucosinolatos totais.⁴⁰

Cortar, mastigar ou provocar a rutura das células da planta de outra forma inicia a síntese de sulforafano que pouco tempo depois, ao contrário do seu precursor estável (GRN), começa a degradar-se.⁴¹

O Sulforafano é um indutor monofuncional, ou seja, induz apenas as enzimas de Fase II. De relevância clínica é o facto de as enzimas de Fase II terem uma semivida relativamente longa. Num estudo, usando células epiteliais de pigmento retinal de adulto (ARPE-19), a NQO1 esteve ativa mais de cinco dias.⁴²

O Sulforafano é um indutor potente de Nrf2 com consequente indução de defesas celulares. Em cultura celular o efeito é rápido, com a ativação pelo sulforafano a ocorrer dentro de 30 minutos em células de epitélio bronquial humano BEAS-2B. Usando análise

microarray para investigar o efeito do sulforafano no fígado de um rato murino selvagem, foi constatado o aumento de expressão de 1725 genes após 3 horas e, passadas 12 horas, 3396 genes foram alterados.⁴³

6.1. | Quinona Redutase (NQO1) Avaliador de Capacidade de Indução

A atividade da NQO1 é utilizada como um procedimento rápido de screening e biomarcador de atividade anticarcinogénica de fitoquímicos⁴⁴.

O termo “Valor CD” descreve a concentração necessária para duplicar a atividade de NQO1 em hepatócitos de rato murino⁴⁵. O valor CD é útil para comparar potenciais efeitos nutrigenómicos de compostos bioativos ingeríveis. Estes também são importantes para classificar a *Brassica spp.* de acordo com o seu potencial anticancerígeno relativo. Quando vários crucíferos foram comparados relativamente ao seu efeito indutor de Nrf2, os isotiocianatos (ITCs) do repolho, couve e nabo revelaram menos capacidade de indução que o sulforafano derivado do brócolo. Esta propriedade pode explicar, parcialmente, a razão pela qual o brócolo é mais investigado do que as outras plantas pertencentes à *Brassica spp*⁴⁶.

Em informação de estudos comparando os valores CD de fitoquímicos bem conhecidos, o sulforafano mostrou a maior potência, visto que apenas uma concentração de 0.2µM é necessária para duplicar a atividade da NQO1⁴⁵. Comparativamente, os valores CD de outros fitoquímicos são mais baixos, sendo que os compostos que apresentam as concentrações molares mais baixas são os compostos com mais atividade de indução. Assim, os valores CD conhecidos para fitoquímicos disponíveis em suplementos orais comuns são: *andrographolides* (1.43 µM), quercetina (2.50 µM), β-caroteno (7.2 µM), resveratrol (21 µM), índole-3-carbinol do brócolo vegetal maduro (50 µM), clorofila (250 µM), α-criptoxantina (1.8 mM), e zeaxantina (2.2 mM). Em outro estudo, mais recente, foram também apurados os seguintes resultados: curcumina (2.7 µM), silimarina (3.6 µM), tamoxifeno (5.9 µM), ácido ascórbico (>50 µM). Posto isto, a atividade indutora de NQO1 destes fitoquímicos é, comparativamente, sulforafano > *andrographolides* > quercitina > curcumina > silimarina > tamoxifeno > beta-caroteno > resveratrol > clorofila > α-criptoxantina > zeaxantina⁴⁶.

É notável que o valor CD do sulforafano seja 13,5 vezes superior ao da curcumina, 18 vezes superior que a silimarina, e 105 vezes superior que o resveratrol, todos fitoquímicos que são extensamente promovidos pelos seus aclamados efeitos promotores de saúde. Muitos dos suplementos que afirmam focar a desintoxicação são baseados em ingredientes como a

clorofila ou vitamina C tendo, no entanto, uma capacidade indutora de NQO1 comparativamente baixa⁴⁶.

6.2. | Biodisponibilidade

À parte das variações da capacidade de indução do Nrf2, uma segunda barreira para a eficácia clínica é a biodisponibilidade. Quando a biodisponibilidade é baixa, estudos de culturas celulares podem exagerar na concentração intracelular que um composto ingerido pode atingir, sendo pouco provável demonstrar o benefício clínico indicado pelo trabalho *in vitro*⁴⁷. Para que seja considerado o potencial de eficácia clínica de um fitoquímico, o composto ativo e/ou algum dos seus metabolitos ativos deve atingir as células alvo numa concentração apropriada. A disponibilidade oral dos polifenóis é, tipicamente, <10% variando entre 2 e 20%, sendo que muitos a têm bastante próximo de 1%⁴⁸. É também importante referir que cozinhar e processar os alimentos reduz significativamente o conteúdo em polifenóis⁴⁶.

Muitos suplementos contêm moléculas fitoquímicas como a curcumina (curcuma), catequinas (chá verde), resveratrol (uvas) e ácido elágico (amoras e romã), por exemplo. Muitas das evidências usadas para promover suplementos com estes compostos são de estudos *in vitro* ou animais, com evidências clínicas limitadas para suportar as afirmações. Suplementos contendo estes fitoquímicos alegam frequentemente o seu efeito antioxidante, apesar da quantidade a atingir a circulação e as células alvo ser raramente adequado para alterar o estado “redox”⁴⁹. Culturas celulares pré-clínicas e estudos animais podem envolver altas doses de fitoquímico. Essas doses são raramente práticas a nível clínico, considerando a média de ingestão presente na dieta que é, aproximadamente 1 grama por dia de compostos fracamente biodisponíveis⁵⁰.

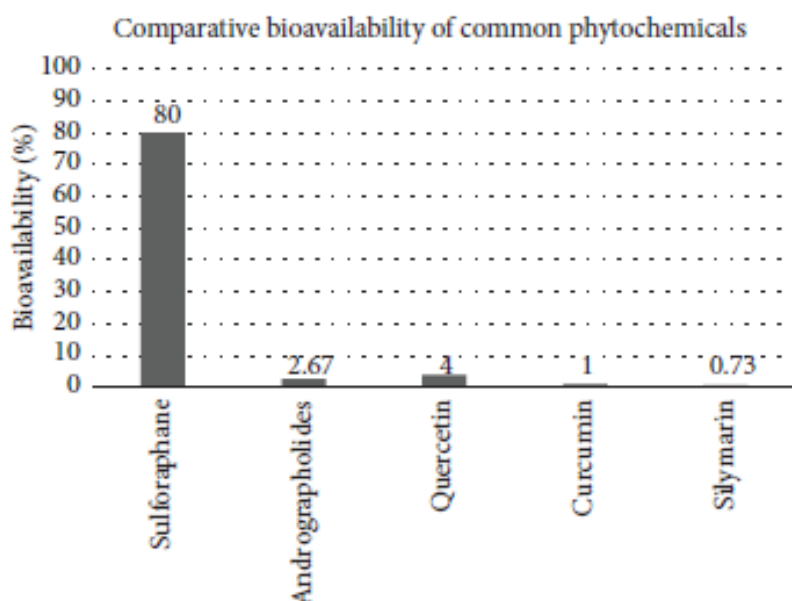


Fig. 4 Biodisponibilidade comparativa de fitoquímicos comumente utilizados em suplementos O Sulforafano apresenta a maior biodisponibilidade. (Retirado de Houghton, 2016)⁴⁶

A curcumina, o resveratrol e silibina (principal componente ativo da silimarina) são exemplos de suplementos populares de polifenóis, para os quais os achados pré-clínicos não podem ser prontamente extrapolados para o ambiente clínico.

A figura 4 compara a biodisponibilidade de vários polifenóis com o sulforafano (curcumina ~1%⁵¹, resveratrol <1%⁵² e silibina ~0,73%⁵³). Em cada caso, a biodisponibilidade sistêmica compara a concentração plasmática de uma dose oral com uma dose intravenosa e é expressa em porcentagem.⁴⁶

6.2.1. | Curcumina

A curcumina é estimada por ter atividade anti-inflamatória *in vitro* em virtude da sua capacidade de inibir o fator de transcrição NF-kB.⁵⁴ Num estudo que investigava a inflamação em tenócitos humanos, para que houvesse inibição da inflamação induzida pela IL-1 β , foram necessárias altas doses de 5-20 μ M.⁵⁵ No entanto, doses orais muito altas de curcumina em humanos (até 8g) levaram a que os níveis intracelulares atingissem apenas 0.5-2.0 μ M, claramente não alcançando uma concentração da mesma ordem. Suplementos comumente recomendados até 180mg foram indetectáveis no plasma.⁵⁶

No entanto, há evidência de efeito no tecido gastrointestinal, onde o transporte ocorre através de uma simples membrana de enterócitos. Pacientes com cancro colorectal foram administrados com doses até 3.6g diárias de curcumina. O M₁G, um marcador de dano de

DNA, diminuiu 38% no tecido coloretal, mostrando que a dose diária de 3,6g tem eficácia farmacológica a nível dos colonócitos mas com distribuição negligenciável fora do intestino, confirmando a sua pobre biodisponibilidade.⁵⁷

6.2.2. | Resveratrol

O resveratrol recebeu atenção internacional após estudos em animais indicarem que era responsável por um efeito promotor de longevidade.⁵⁸ Apenas animais injetados com resveratrol desde o nascimento viveram mais tempo; aqueles que começaram a meia-idade não obtiveram benefício a este nível. O benefício parece ser devido ao aumento da expressão de genes de sobrevivência, dos quais alguns são também expressos durante restrição calórica.⁵⁹

Este efeito de longevidade nunca foi testado em humanos, portanto a dose apropriada não é conhecida nem o seu benefício confirmado. Apesar de ser bem absorvido, o resveratrol apresenta uma biodisponibilidade baixa: de uma dose oral de 25mg em humanos, pelo menos 70% apareceram como metabolitos no plasma, com a maior parte da dose oral a ser recuperada na urina.⁵² Tal como a curcumina, o resveratrol é rapidamente absorvido pelos enterócitos/colonócitos, pelo que apresenta potenciais benefícios a nível intestinal. Uma revisão de 3650 publicações sobre o resveratrol, conclui que as evidências não são fortes o suficiente para justificar a recomendação do resveratrol a humanos para além da dose que se obtém da dieta, que é estimada ser ~4mg diárias para adultos.⁶⁰

6.2.3. | Silimarina

A silimarina, o principal complexo flavonoide encontrado na *Silybum marianum*, tem um longo historial em termos de uso tradicional em doenças relacionadas com o fígado sendo que existe disponível em suplementos associados a desintoxicação hepática.⁶¹ A silibinina, composto mais ativo do complexo, é insolúvel em água, com a baixa biodisponibilidade de 0,73%.⁵³ Quando a desintoxicação por otimização das enzimas de fase II for o objetivo, talvez seja de valor considerar tanto os valores CD como a biodisponibilidade. Mais uma vez, estas evidências colocam sérias dúvidas sobre a eficácia de certos fitoquímicos nas doses tipicamente encontradas nos suplementos promovidos no mercado. Não obstante, outros ensaios publicados mostram que a silimarina exhibe propriedades hepatoprotetoras em humanos, indicando que outro mecanismo deve ser responsável, que não a ativação do Nrf2.⁶¹

6.2.4. | Sulforafano

Brócolos com MYR inativada resultam numa diminuição de 10-20% na conversão para isotiocianato. Apesar de a microflora do cólon apresentar atividade semelhante com a enzima MYR, a conversão para os isotiocianatos ativos varia entre 1% e 40% da dose, sendo que existe uma vasta variedade na população de bactérias. Como tal, os suplementos inativos em MYR são imprevisíveis, uma vez que nem os consumidores nem os médicos têm forma de saber se um indivíduo porta microflora com atividade MYR e em que extensão. Posto isto, a presença de mirosinase ativa leva ao aumento substancial da biodisponibilidade do sulforafano.⁴⁶

A natureza lipofílica e o baixo peso molecular do sulforafano permitem uma difusão passiva para as células. É rapidamente absorvido, sendo que atinge o pico de concentração plasmática logo passada uma hora após ingestão.⁶²

A biodisponibilidade absoluta oral foi de 80%, na dose mais baixa estudada. No entanto, na dose mais alta estudada, a biodisponibilidade foi de apenas 20%. Esta observação levanta a possibilidade de que o sulforafano possa ser, em alguma extensão, absorvido através de um mecanismo dependente de transporte, que fica saturado com doses mais elevadas. Para além disso, os isotiocianatos têm uma grande afinidade pelas proteínas plasmáticas, presumidamente pela sua fácil interação com grupos – SH, e é concebível que o sulforafano, quando em doses altas, sature os locais de ligação deixando uma porção livre disponível para o metabolismo e excreção. É importante referir que a albumina contém um único resíduo livre de cisteína (Cys34) e que os valores decrescentes de semivida observados, dependentes de dose, são concordantes com tal mecanismo. Não obstante, em doses mais baixas, não foram verificadas diferenças relevantes de concentração plasmática entre as 6 e 24h após administração intravenosa ou oral visto que, mais uma vez de acordo com o que foi referido anteriormente, nestas condições o sulforafano se encontra maioritariamente ligado às proteínas plasmáticas estando, nestas circunstâncias, indisponível para ser metabolizado e excretado.

Em suma, o sulforafano é rapidamente absorvido atingindo alta biodisponibilidade absoluta, em doses baixas. No entanto, demonstra uma farmacocinética dependente da dose, com a biodisponibilidade a diminuir com o aumento da dosagem. Esta observação implica que o consumo de suplementos de sulforafano possa não ser tão eficaz como pensado, no que toca à obtenção de elevadas concentrações plasmáticas do composto.⁶³

7. | Regulação Negativa da via Nrf2/ARE

Como tem sido referido, a ativação do Nrf2 tem potencial terapêutico e a indução da via Nrf2/ARE produz uma resposta celular contra o *stress* oxidativo. No entanto, há preocupações relativamente ao estímulo desta via de sinalização. *Keap1-knockout mice* indicou que constante ativação do Nrf2 pode ter resultados adversos sérios como hiperqueratose do trato digestivo superior e promoção da aterosclerose (Fig. 5).¹²

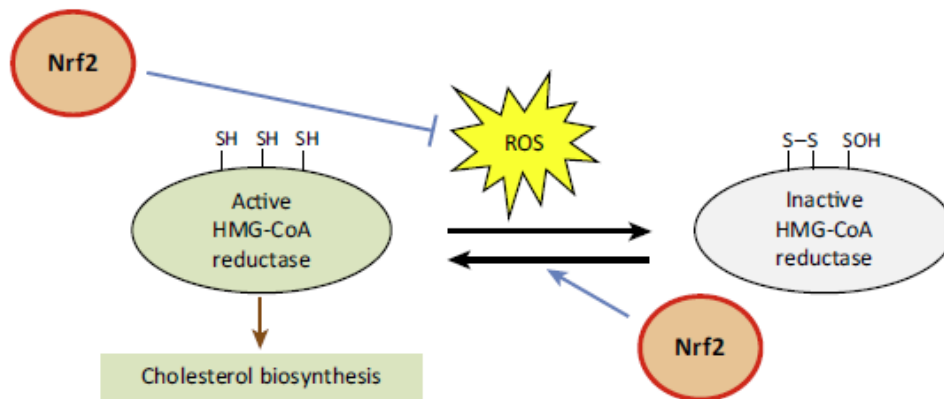


Fig. 5 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase, que catalisa o passo limitante na síntese do colesterol é mostrado como exemplo de uma enzima que é inativada pelo *stress* oxidativo e que é regulada indiretamente pelo Nrf2. Ao diminuir o *stress* oxidativo, há um aumento de HMG-CoA redutase ativa que conduz ao aumento da biossíntese de colesterol e, por consequência, aumento da aterosclerose. (Adaptado de Hayes et al., 2014)²⁰

Para além disso, é interessante que a diminuição da expressão de Nrf2, mediada por RNA interferente em células cancerígenas do pulmão, induza a formação de ROS, suprima o crescimento tumoral e aumente a sensibilidade a quimioterapia, que induz a morte celular.⁶⁴

Portanto, a inibição da via Nrf2/ARE pode fornecer uma abordagem benéfica contra a resistência a fármacos, em tratamentos apropriados.¹²

8. | Conclusão

O Nrf2 desempenha funções fulcrais na defesa do nosso organismo, tanto contra agressões externas como de produtos do nosso próprio metabolismo. O conhecimento presente neste documento sustenta que é, de fato, peça fundamental na resposta celular ao stress, induzindo a expressão de enzimas de proteção e manutenção celulares e, portanto, central à homeostasia, afirmando-se como um foco interessante para resolução de distúrbios de saúde. Do ponto de vista da nutrigenômica, a ativação do Nrf2 é um dos processos bem conhecidos que sustenta, em termos mecanísticos e moleculares, a influência de compostos ingeridos na dieta na modificação da expressão génica e, logo, no metabolismo.

As afirmações presentes em suplementos manifestam-se exageradas uma vez que, como foi visto, a capacidade de indução e biodisponibilidade são muito baixas para desencadear uma resposta significativa a nível sistémico, à exceção do sulforafano. Contudo, alguns demonstram eficácia prática a nível gastrointestinal.

O sulforafano, apesar de apresentar a maior capacidade de indução e biodisponibilidade, comparando com os outros fitoquímicos citados, não exhibe essa valência para doses mais altas, sendo que também é um entrave à obtenção de elevadas concentrações plasmáticas e efeitos sistémicos.

Para além disso, foi também verificado que há situações em que a regulação negativa da via Nrf2/ARE é benéfica, e que o aumento exagerado e continuado é prejudicial.

Concluindo, devemos adotar uma alimentação saudável e equilibrada, assim como um estilo de vida que promova a saúde sem conceber a ideia de que existe o elixir da vida, realizando exercício físico e informando-nos sobre os suplementos que queremos tomar, não admitindo à partida como verdadeiros os argumentos apresentados nas embalagens.

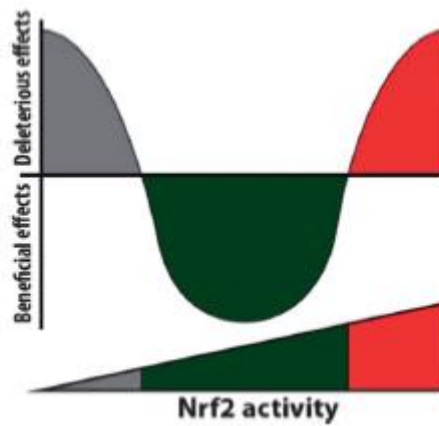


Fig. 6 Efeitos da ativação génica regulada pelo Nrf2 Baixos níveis de Nrf2 (indicado a cinzento) em condições como o envelhecimento que leva a níveis reduzidos de genes e enzimas citoprotetoras. Induzindo o Nrf2 usando químicos dietéticos presentes em frutas e vegetais providência proteção contra várias doenças (indicado a verde). Estimulação contínua e altos níveis de Nrf2 (mostrado a vermelho) conduzem a efeitos nefastos tais como aterosclerose e resistência a vários fármacos. (Tirado de Kumar et al., 2014)¹²

9. | Referências Bibliográficas

1. Ghosdal, S., Pashman, S., Odom, D., Furr, H. & McGrane, M. Vitamin A depletion is associated with low phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA levels during late fetal development and at birth in mice. *J Nutr* **133**, 2131–e (2003).
2. Menon, B. *et al.* Prevalence of low dietary calcium intake in patients with epilepsy: a study from South India. *Neurol India* **58**, 209–212 (2010).
3. Naushad, S. M., Radha, A. & Devi, R. Role of parental folate pathway single nucleotide polymorphisms in altering the susceptibility to neural tube defects in South India. *J Perinat Med* **38**, 63–69 (2010).
4. Mohan, V., Sandeep, S., Deepa, R., Shah, B. & Varghese, C. Epidemiology of type 2 diabetes: Indian scenario. *Indian J Med Res* **125**, 217–230 (2007).
5. Neeha, V. S. & Kinth, P. Nutrigenomics research: A review. *J. Food Sci. Technol.* **50**, 415–428 (2013).
6. Pall, M. L. & Levine, S. Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by health promoting factors. *Sheng Li Xue Bao* **67**, 1–18 (2015).
7. Hyman, M. *Ultra-metabolism: the simple plan for automatic weight loss.* (Atria Books, 2006).
8. Ramachandran, A. The Indian diabetes prevention programme shows that lifestyle modification and metformin prevent type 2 diabetes in Asian Indian subjects with impaired glucose tolerance (IDPP1). *Diabetologia* **49**, 289–297 (2006).
9. Gobard, B. & Hurlimann, T. Nutrigenomics for global health: ethical challenges for underserved populations. *Curr. Pharmacogenomics Person. Med.* **7**, 205–214 (2009).
10. Katoh, Y., Iida, K. & Kang, M.-I. “Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 342–350 (2005).
11. Kobayashi, A., Kang, M.-I. & Okawa, H. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7130–7139 (2004).
12. Kumar, H., Kim, I., More, S. V. & Kim, B. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *R. Soc. Chem.* **2**, (2014).
13. Copple, I. M., Goldring, C. E. & Jenkins, R. E. The hepatotoxic metabolite of acetaminophen directly activates the keap1-Nrf2 cell defense system. *Hepatology* **48**, 1292–1301 (2008).
14. Talalay, P. & Dinkova-Kostova, A. T. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch. Biochem. Biophys.* **501**, 116–123 (2010).
15. Lewis, K. N., Mele, J., Hayes, J. D. & Buffenstein, R. Nrf2, a guardian of healthspan and gatekeeper of species longevity. *Integr. Comp. Biol.* **50**, 829–843 (2010).
16. Wang, L. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor interacts with nuclear factor erythroid 2-related factor 2 to mediate induction of NAD(P)H:quinoneoxidoreductase 1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch. Biochem. Biophys.* **537**, 31–38 (2013).
17. Singh, S., Chakravarti, D. & Edney, J. A. Relative imbalances in the expression of estrogen-metabolizing enzymes in the breast tissue of women with breast carcinoma. *Oncol. Rep.* **14**, 1091–1096 (2005).

18. Siegel, D., Gustafson, D. L. & Dehn, D. L. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol. Pharmacol.* **65**, 1238–1247 (2004).
19. Lajin, B. & Alachkar, A. The NQO1 polymorphism C609T (Pro187Ser) and cancer susceptibility: a comprehensive metaanalysis. *Br. J. Cancer* **109**, 1325–1337 (2013).
20. Hayes, J. D. & Dinkova-Kostova, A. T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci* 199–218 (2014).
21. Wu, K. C., Liu, J. J. & Klaassen, C. D. Nrf2 activation prevents cadmium-induced acute liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol* **263**, 14–20 (2012).
22. Sears, M. E. Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification--a review. *Sci. World J.* (2013).
23. García-Niño, W. R. & Pedraza-Chaverri, J. Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food Chem Toxicol* **69**, 182–201 (2014).
24. Buelna-Chontal, M. & Zazueta, C. Redox activation of Nrf2 and NF-κB: A double end sword? *Cell Signal* **25**, 2548–2557 (2013).
25. Sandberg, M., Patil, J., D'Angelo, B., Weber, S. G. & Mallard, C. NRF2-regulation in brain health and disease: Implication of cerebral inflammation. *Neuropharmacology* **79**, 298–306 (2014).
26. Kim, J., Cha, Y. N. & Surh, Y. J. Protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res* **690**, 12–23 (2010).
27. Vomhof-Dekrey, E. E. & Picklo, M. J. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *J Nutr Biochem* **23**, 1201–1206 (2012).
28. Mo, C. *et al.* The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice. *Antioxid Redox Signal* **20**, 574–588 (2014).
29. Nezis, I. P. & Stenmark, H. p62 at the interface of autophagy, oxidative stress signaling, and cancer. *Antioxid Redox Signal* **17**, 786–793 (2012).
30. Hsieh, T. C., Elangovan, S. & Wu, J. M. Differential suppression of proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells exposed to alpha-, gamma- and delta-tocotrienols is accompanied by altered expression of oxidative stress modulatory enzymes. *Anticancer Res* **30**, 4169–4176 (2010).
31. Sontag, T. J. & Parker, R. S. Influence of major structural features of tocopherols and tocotrienols on their omega-oxidation by tocopherol-omega-hydroxylase. *J Lipid Res* **48**, 1090–1098 (2007).
32. Peternelj, T.-T. & Coombes, J. S. Antioxidant supplementation during exercise training: beneficial or detrimental? *Sport. Med.* **41**, 1043–1069 (2011).
33. Muthusamy, V. R., Kannan, S. & Sadhaasivam, K. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 366–376 (2012).
34. Kensler, T. W., Egner, P. A. & Agyeman, A. S. Keap1-Nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane. *Top. Curr. Chem.* **329**, 163–178 (2013).
35. Prochaska, H. J., Santamaria, A. B. & Talalay, P. Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 2394–2398 (1992).
36. Madureira, D. J. *et al.* Systems toxicology approach to understand the kinetics of benzo(a)pyrene uptake, biotransformation, and DNA adduct formation in a liver cell model.

- Chem. Res. Toxicol.* **27**, 443–453 (2014).
37. Razis, A. F. & Noor, N. M. Sulforaphane is superior to glucoraphanin in modulating carcinogen-metabolising enzymes in Hep G2 cells. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **14**, 4235–4238 (2013).
 38. Botti, M. G., Taylor, M. G. & Botting, N. P. Studies on the mechanism of myrosinase— investigation of the effect of glycosyl acceptors on enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 20530–20535 (1995).
 39. Boddupalli, S. *et al.* Induction of phase 2 antioxidant enzymes by broccoli sulforaphane : perspectives in maintaining the antioxidant activity of vitamins A , C , and E. **3**, 1–15 (2012).
 40. Clarke, J. D., Riedl, K. & Bella, D. Comparison of isothiocyanate metabolite levels and histone deacetylase activity in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 10955–10963 (2011).
 41. Jin, Y., Wang, M. & Rosen, R. T. Thermal degradation of sulforaphane in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3121–3123 (1999).
 42. Gao, X., Dinkova-Kostova, A. T. & Talalay, P. Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes, and mouse leukemia cells against oxidative damage: the indirect antioxidant effects of sulforaphane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, (2001).
 43. Hu, R., Xu, C. & Shen, G. Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Cancer Lett.* **243**, 170–192 (2006).
 44. Jeffery, E. H. & Stewart, K. E. Upregulation of quinone reductase by glucosinolate hydrolysis products from dietary broccoli. *Methods Enzymol.* **382**, 457–469 (2004).
 45. Fahey, J. W. *et al.* Chlorophyll, chlorophyllin and related tetrapyrroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes. *Carcinogenesis* **26**, 1247–1255 (2005).
 46. Houghton, C. A., Fassett, R. G. & Coombes, J. S. Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician’s Expectation Be Matched by the Reality? *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2016). doi:10.1155/2016/7857186
 47. Cho, H.-J., Kim, J.-E., Kim, D.-D. & Yoon, I.-S. In vitro-in vivo extrapolation (IVIVE) for predicting human intestinal absorption and first-pass elimination of drugs: principles and applications. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **40**, 989–998 (2014).
 48. Hu, M. Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. *Mol. Pharm.* **4**, 803–806 (2007).
 49. Nicholson, S. K., Tucker, G. A. & Brameld, J. M. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proc. Nutr. Soc.* **67**, (2008).
 50. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727–747 (2004).
 51. Yang, K.-Y., Lin, L.-C., Tseng, T.-Y. & Wang, S.-C. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **853**, 183–189 (2007).
 52. Walle, T. Bioavailability of resveratrol. *Annals New York Acad. Sci.* **1215**, 9–15 (2011).
 53. Javed, S., Kohli, K. & Ali, M. Reassessing bioavailability of silymarin. *Altern. Med. Rev.* **16**, 239–249 (2011).
 54. Shehzad, A., Rehman, G. & Lee, Y. S. Curcumin in inflammatory diseases. *BioFactors* 66–77

(2013).

55. Buhrmann, C., Mobasheri, A. & Busch, F. Curcumin modulates nuclear factor kB (nf-kB)-mediated inflammation in human tenocytes in vitro: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.* **286**, 28556–28566 (2011).
56. Sharma, R. A., Euden, S. A. & Platton, S. L. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6847–6854 (2004).
57. Sareen, R., Jain, N. & Pandit, V. Curcumin: a boon to colonic diseases. *Curr. Drug Targets* **14**, 1210–1218 (2013).
58. Pearson, K. J., Baur, J. A. & Lewis, K. N. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab.* **8**, 157–168 (2008).
59. Morselli, E., Maiuri, M. C. & Markaki, M. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis.* **1**, (2010).
60. Vang, O., Ahmad, N. & Baile, C. A. What is new for an old molecule? systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One* **6**, 491–504 (2011).
61. Pradhan, S. C. & Girish, C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J. Med. Res.* **124**, 491–504 (2006).
62. Cornblatt, B. S., Ye, L. & Dinkova-Kostova, A. T. Preclinical and clinical evaluation of sulforaphane for chemoprevention in the breast. *Carcinogenesis* **28**, 1485–1490 (2007).
63. Hanlon, N. *et al.* Absolute bioavailability and dose-dependent pharmacokinetic behaviour of dietary doses of the chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in rat. *Br. J. Nutr.* **99**, 559–564 (2008).
64. Singh, A., Boldin-Adamsky, S., Thimmulappa, R. K. Rath, S. K., Ashush, H., Coulter, J. Blackford, A., Goodman, S. N., Bunz, F. Watson, W. H. Gabrielson, E. Feinstein, E. Biswal, S. *Cancer Res.* **68**, 7975–7984 (2008).