



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

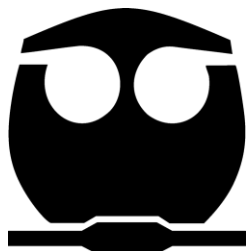
EL SULFORAFANO PREVIENE LAS ALTERACIONES  
CONDUCTUALES, HISTOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS QUE SE  
INDUCEN EN UN MODELO DE NEURODEGENERACIÓN.  
EFECTO ASOCIADO CON LA MODULACIÓN EN LOS  
NIVELES DE GLUTATIÓN

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**RICARDO ALBERTO SANTANA MARTÍNEZ**



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ

**VOCAL:** Profesor: EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ

**SECRETARIO:** Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

**1er SUPLENTE:** Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA

**2do SUPLENTE:** Profesor: LAURA CARMONA SALAZAR

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO DE PATOLOGIA VASCULAR CEREBRAL, INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGIA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELAZCO SUÁREZ”

**ASESOR DEL TEMA:**

Dra. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

RICARDO ALBERTO SANTANA MARTÍNEZ

\_\_\_\_\_

---

**Agradecimiento:**

SE AGRADECE A LA **COMISIÓN COORDINADORA DE LOS INSTITUTOS NACIONALES DE SALUD Y HOSPITALES DE ALTA ESPECIALIDAD** POR LA BECA PROBEI (PROGRAMA DE **BECAS DE INICIO A LA INVESTIGACIÓN**) OTORGADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

ESTE TRABAJO FUE APOYADO PARCIALMENTE POR UN DONATIVO DE **DGAPA PAPIIT** No. 1N201910 Y DE **CONACYT** No. 103527 y No. 129838.

---

## Agradecimientos

Le agradezco a **Dios** por estar siempre conmigo, por escucharme, por ayudarme cuando más confundido me siento y por darme la oportunidad de compartir espacio y tiempo con la gente que me rodea.

A **mis padres**, por el apoyo y cariño sincero que me han brindado desde que nací, por sus vastos e increíbles esfuerzos y sacrificios que han hecho por darme la educación, la felicidad y la oportunidad de prepararme profesionalmente, porque simplemente sin ustedes no disfrutaría de este momento, en verdad no existen palabras de gratitud que expresen lo agradecido que estoy con ustedes. Los amo.

A **mis hermanos**, por estar conmigo, por el apoyo, por los consejos y por soportarme siempre. Los quiero mucho.

A **Ere**, por todo el apoyo, cariño y comprensión que me has dado, por tu compañía y amistad que me han hecho mejor persona. Muchas gracias.

A **mis amigos de la facultad**, en especial a Paco, Paul, Gerson, Edgar, Víctor, Liz, Adriana, Fabby, Vero, Karen, Adrian, el Chelo, Berna, Brenda, Ana, Osbaldo, por brindarme su apoyo y amistad durante toda la carrera. Gracias a todos.

A la **Dra. Perla**, por brindarme su gran apoyo, interés y paciencia durante el proyecto, por la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, la admiro mucho, la considero una amiga. Muchas gracias por todo.

Gracias a todas las personas que me ayudaron y apoyaron en la elaboración de este trabajo, en especial al Dr. Rogelio, Dra. Marisol, Dr. Pedraza, Dra. Sonia, Dra. Juanita. A quienes forman ó formaron parte del laboratorio; Dra. María Elena, Dra. Penélope, Liliana, Ana, Susana, Silvia, Emanuel, Bere, Felipe e Iván. Gracias por hacer muy ameno mi estancia en el Instituto, los aprecio mucho.

**¡Hecho en CU, con respeto, gratitud y orgullo a la UNAM, Facultad de Química!**

---

## ÍNDICE

	Páginas
<b>ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
1.1. Enfermedades neurodegenerativas .....	10
1.2. Excitotoxicidad .....	12
1.2.1. Glutamato .....	12
1.2.2. Receptores de glutamato .....	13
1.2.3. Recaptura de glutamato .....	15
1.3. $\text{Ca}^{2+}$ intracelular .....	16
1.3.1. Regulación del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular .....	16
1.3.2. Aumento en los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular .....	17
1.3.3. Enzimas activadas por el $\text{Ca}^{2+}$ .....	19
1.4. Estrés Oxidante .....	20
1.4.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO) .....	21
1.4.2. Producción de ERO en la mitocondria .....	22
1.4.3. Producción de ERO como consecuencia del incremento de los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ .....	24
1.4.4. Especies reactivas de nitrógeno (ERN) .....	24
1.4.5. Antioxidantes .....	26
1.4.6. Daño en ADN, lípidos y proteínas .....	27
1.4.7. El cerebro está en desventaja ante el estrés oxidante .....	29
1.5. Ácido quinolínico: como modelo de neurodegeneración .....	29
1.5.1. Mecanismo de acción del ácido quinolínico .....	31
1.5.2. Ácido quinolínico en las enfermedades neurodegenerativas .....	32
1.6. Sulforafano (SULF) .....	33
1.6.1. Actividad antioxidante del sulforafano (Mecanismo de acción) .....	34
1.6.2. Enzimas de Fase II .....	37
1.6.3. Glutación (GSH) .....	38
1.6.4. Funciones neuroprotectoras del GSH .....	38
1.6.5. Síntesis de glutación .....	39
1.6.6. Enzimas que emplean GSH .....	40
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS</b> .....	42
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	43
3.1. Objetivo general .....	43
3.2. Objetivos particulares .....	43

---

<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	44
4.1. Reactivos .....	44
4.2. Animales .....	44
4.3. Diseño experimental .....	45
4.4. Conducta de rotación .....	46
4.5. Tinción de Nissl .....	46
4.6. Tinción de H&E y cuantificación de las lesiones .....	46
4.7. Proteínas oxidadas .....	47
4.8. Niveles de GSH .....	48
4.9. Análisis estadístico .....	49
<b>5. RESULTADOS</b> .....	50
5.1. Efecto del sulforafano sobre la conducta rotatoria .....	50
5.2. Tinción de Nissl .....	50
5.3. Tinción de H&E: área necrótica tisular .....	53
5.4. Tinción de H&E: alteraciones morfológicas .....	54
5.5. Proteínas oxidadas .....	56
5.6. Niveles de glutatión .....	56
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	58
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	64
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	64
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	65

---

## ABREVIATURAS

ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GCL	Glutamina-L-cistein ligasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GSTs	Glutación-S-transferasa
Keap1	proteína 1 asociada-ECH Kelch-like
NMDA	N-metil-D-aspartato
Nrf2	Factor relacionado al factor nuclear eritroide-2
QUIN	Ácido-2,3-piridin dicarboxílico; Ácido quinolínico
SULF	Sulforafano



---

## RESUMEN

La excitotoxicidad es un evento que se presenta en las enfermedades neurodegenerativas e involucra la sobreactivación de los receptores NMDA. Esto lleva a un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y a la sobreproducción de especies oxidantes, lo que lleva al daño y la muerte neuronal. El cerebro es vulnerable al daño oxidante y si la excitotoxicidad se mantiene por tiempos prolongados su capacidad antioxidante resulta ineficiente. El ácido quinolínico (QUIN) es un agonista selectivo de los receptores NMDA, capaz de inducir un estado oxidante/nitrosante en la célula, por lo que su administración intraestriatal se ha utilizado como modelo excitotóxico/pro-oxidante en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. Por otra parte, el sulforafano (SULF) es un isotiocianato de origen natural que se encuentra en algunos vegetales crucíferos, como el brócoli y la coliflor. Este compuesto presenta propiedades citoprotectoras al actuar como antioxidante indirecto, ya que induce la expresión de genes que codifican para las enzimas de fase II, entre las que se encuentran las relacionadas con el metabolismo del GSH, el antioxidante endógeno no enzimático más abundante del cerebro.

Con base en lo anterior, se evaluó el efecto del SULF sobre las alteraciones conductuales, morfológicas y bioquímicas que se inducen en el modelo con QUIN; además, se determinó si el efecto del SULF está relacionado con un aumento en los niveles de GSH. Se administraron 2 dosis de SULF (5 mg/kg *i.p.*) cada 24 h previo a la administración de QUIN (240 nmol). Seis días después de la administración del QUIN se midió la conducta rotatoria y un día después (7 días) se evaluó el daño histológico mediante la tinción de H&E y de Nissl. Se midió la formación de grupos carbonilo y el contenido de GSH a las 4 y 8 h después de la administración del QUIN, respectivamente.

---

La administración del SULF previa al reto excitotóxico inducido por el QUIN previene significativamente la conducta rotatoria y los cambios morfológicos ocasionados por el QUIN. Además, el tratamiento con el SULF redujo la cantidad de grupos carbonilo y restableció los niveles de GSH que se alteraron tras la administración del QUIN. Estos resultados sugieren que el SULF podría actuar como una posible herramienta terapéutica en la prevención y el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Enfermedades neurodegenerativas

El incremento en la esperanza de vida de los humanos en los países industrializados y en desarrollo, está acompañada por un inevitable y prevalente incremento de enfermedades que ocasionan alteraciones en el tejido cerebral, llamadas enfermedades neurodegenerativas (Schliebs, 2004). Este tipo de enfermedades se caracterizan por presentar una disfunción progresiva de la actividad cerebral y pérdida de la integridad neuronal; ambas inducidas por particulares déficits neurológicos, que conducen a la muerte neuronal (Hague et al., 2005). La muerte o degeneración neuronal es un fenómeno central durante el envejecimiento, y ocurre de manera prematura en el curso de numerosos padecimientos agudos y crónicos que afectan el cerebro y la médula espinal. Entre los padecimientos agudos más frecuentes se encuentran los accidentes vasculares cerebrales (isquemia-anoxia), los traumas craneoencefálicos y de la médula espinal y la epilepsia. Por otra parte, en los padecimientos crónicos se encuentran las devastadoras *enfermedades neurodegenerativas* como son: la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer (Tapia et al., 1999).

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de enfermedades del sistema nervioso con diferente etiología genética y fenotipos clínicos, y frecuentemente relacionados al envejecimiento. Las consecuencias de la neurodegeneración en estos padecimientos son devastadoras. Afectan las funciones motoras y sensoriales; así como las funciones superiores del sistema nervioso tales como la memoria, los mecanismos de pensamiento, las emociones, la inteligencia, la conciencia, el lenguaje, la personalidad y la orientación espacio-tiempo (Pasantes et al., 1999). A pesar de esto, tienen en común: 1) el curso

---

progresivo de los síntomas; 2) el reflejo de la desintegración paulatina de una parte o partes del sistema nervioso; 3) que no tienen un tratamiento etiológico y las actuaciones terapéuticas son sintomáticas en algunos casos, y paliativas en todos ellos; y 4) generan discapacidad y padecimiento físico y psíquico, entre quienes las padecen y sus familiares y/o cuidadores.

Aunque la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas son esporádicas, algunas pueden atribuirse a mutaciones genéticas específicas (Wong et al., 2002) que afectan una amplia variedad de proteínas. Sin embargo, evidencia sustancial apunta a la *excitotoxicidad* como mecanismo fundamental implicado en la degeneración neuronal (*ver más adelante*) (Dong et al., 2009).

En los últimos años se ha demostrado que los aminoácidos excitadores participan de manera fundamental en el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas. Las neuronas que contienen éstos aminoácidos juegan un papel crucial en las funciones fisiológicas tales como el aprendizaje y la memoria. La hiperactividad de los aminoácidos excitadores resulta en grandes alteraciones irreversibles en el funcionamiento sináptico neuronal (Dong et al., 2009).

No están claras las causas y los mecanismos de la muerte neuronal en estas enfermedades; sin embargo, se han propuesto tres factores entre sí que parecen jugar un papel importante en el evento excitotóxico: 1) la sobreactivación de los receptores para aminoácidos excitadores, 2) un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y 3) la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Coyle & Puttfarcken, 1993). La relación entre estos factores son múltiples y una alteración en ellos puede generar cambios que lleven a la muerte neuronal.

En la actualidad se hacen numerosos esfuerzos para lograr un entendimiento más completo sobre las alteraciones patológicas del cerebro humano. Entre ellas, las

---

enfermedades neurodegenerativas representan una de las más desafiantes pruebas para la investigación. La ciencia en las últimas décadas ha aportado conceptos que han logrado esclarecer un poco el panorama que se tiene sobre el mecanismo molecular de los desórdenes neurológicos que afectan a millones de personas en todo el mundo. Sin embargo, hasta la fecha no existen acciones terapéuticas que logren erradicar el problema de las enfermedades neurodegenerativas.

## **1.2. Excitotoxicidad**

Al mecanismo de neurodegeneración originado por la sobreactivación de los receptores de glutamato, ya sea por este aminoácido o sus análogos, se le llama **excitotoxicidad** (Sims & Zaidan, 1995). Este mecanismo se acompaña de otros eventos (aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y producción de ERO) que en conjunto originan el deterioro y la muerte neuronal.

### **1.2.1. Glutamato**

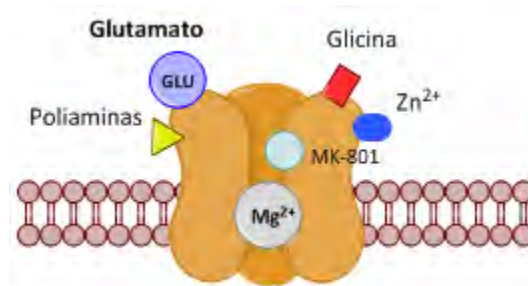
El glutamato es el principal aminoácido neurotransmisor excitatorio en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos (Greenamyre, 1986). Se calcula que es el responsable del 75% de la transmisión excitatoria rápida. Comparado con otros neurotransmisores, sus niveles son muy altos, cerca de 5-10 mmol/kg (Butcher & Hamberger, 1987), casi 1000 veces mayor que otros neurotransmisores como la dopamina (Sheldon & Robinson, 2007). Dado que el glutamato representa entre el 80-90% de la sinapsis en el cerebro, la regulación de su metabolismo tanto en neuronas como en astrocitos es de suma importancia, y un desajuste en él ocasionaría graves alteraciones en la respuesta excitatoria del cerebro (McKenna, 2007).

---

### 1.2.2. Receptores de glutamato

Se han clonado y caracterizado varias clases de receptores de glutamato: los que están acoplados a canales iónicos (receptores ionotrópicos) y los que están acoplados a proteína G (receptores metabotrópicos) (Hollmann & Heinemann, 1994). Dentro de los *receptores ionotrópicos* hay dos subtipos, denominados de acuerdo a su agonista farmacológico (ya que el agonista endógeno de todos ellos es el glutamato); los que reconocen al N-metil-D-aspartato (NMDA) y los que no responden al NMDA, pero que son activados a su vez por el ácido kaínico o por el  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (Nakanishi, 1992). Tanto los receptores NMDA como los no-NMDA están presentes en la membrana plasmática de las neuronas postsinápticas (Tapia & Corona, 2005).

Los receptores NMDA tienen propiedades únicas con respecto a los otros receptores de glutamato, su apertura depende de voltaje y tienen  $Mg^{2+}$  que los mantiene bloqueados. Además, tienen varios sitios a los cuales se unen diferentes ligandos: a) sitio de unión para el glutamato; b) sitio de unión para la glicina, que facilita la acción del glutamato; c) sitio de unión a poliaminas, que provoca efectos potenciadores o inhibidores (dependiendo de la poliamina); d) sitio al que se une el  $Mg^{2+}$  y al cual se une el (+)-5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo(a,d)cicloheptano-5,10-imina maleato (MK-801), un potente antagonista farmacológico no competitivo del receptor; y e) un sitio al cual se une el  $Zn^{2+}$  (Nakanishi, 1992) (**Esquema 1**).



**Esquema 1.** Receptor NMDA y sus diferentes sitios de unión; glutamato (GLU), glicina, poliaminas,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y MK-801.

Los receptores NMDA son permeables a  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , mientras que los receptores no-NMDA lo son a  $Na^+$  y  $K^+$ . Todos los receptores ionotrópicos se encuentran formados por diferentes subunidades, y cambios en su conformación alteran su capacidad permeable y su actividad como receptor (Coyle & Puttfarcken, 1993) (**Tabla 1**).

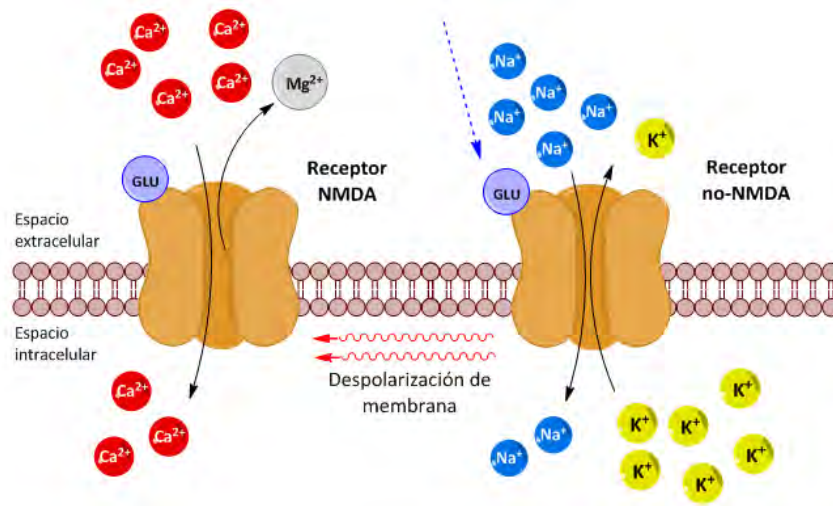
**Tabla 1.** Subunidades de los receptores ionotrópicos

Receptores Ionotrópicos		
NMDA	No-NMDA	
	AMPA	AK
NR1	GluR1	GluR5
NR2A	GluR2	GluR6
NR2B	GluR3	GluR7
NR2C	GluR4	KA1
NR2D		KA2

AMPA: amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato, AK: ácido kaínico.

La activación de los receptores no-NMDA provoca la entrada de  $Na^+$  y la salida de  $K^+$ , y la subsiguiente despolarización de la membrana plasmática; promoviendo la expulsión del  $Mg^{2+}$  que normalmente se encuentra bloqueando el canal del receptor NMDA. Una vez que el  $Mg^{2+}$  es removido, la unión del glutamato y su co-agonista (la glicina) a sus respectivos sitios activa completamente los receptores NMDA, permitiendo la entrada de más  $Na^+$  y de  $Ca^{2+}$  a la célula (Estrada-Sánchez et al., 2008). En otras palabras, la presencia simultánea de receptores de glutamato,

NMDA y no-NMDA, en la misma neurona, funciona de manera secuencial: la despolarización rápida, inicial y mediada por los receptores no-NMDA, es seguida por una despolarización prolongada debida a la activación de receptores NMDA (Esquema 2).



**Esquema 2.** Función secuencial de los receptores NMDA y no-NMDA. La unión del glutamato (GLU) a receptores no-NMDA (flecha azul punteada), ocasiona una despolarización en la membrana, provocando la salida del  $Mg^{2+}$  que mantenía bloqueado al receptor NMDA; así puede llevarse la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior de la neurona.

### 1.2.3. Recaptura del glutamato

Una vez que el glutamato activa a sus receptores, éste debe ser eliminado del espacio sináptico. De los tres mecanismos conocidos de eliminación de neurotransmisores: difusión, degradación enzimática y recaptura, esta última es el mecanismo más importante en la remoción del glutamato y cumple una doble función: por un lado termina con la acción sináptica del glutamato y por otro permite su recuperación para que ésta molécula pueda ser eventualmente reutilizada (Tapia & Corona, 2005).

La recaptura de glutamato al interior de las células se lleva a cabo por transportadores de alta afinidad que dependen del gradiente iónico de  $Na^+/K^+$



---

generado por la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . De esta manera logran transportar el glutamato desde el espacio sináptico al interior de las neuronas y las células gliales, manteniendo regulada su concentración extracelular por debajo de los niveles excitotóxicos (Shigeri et al., 2004).

### **1.3. $\text{Ca}^{2+}$ intracelular**

El  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas actúa como un segundo mensajero, integrando múltiples funciones celulares tales como la liberación de neurotransmisores, la expresión de genes, la proliferación, la excitabilidad y la regulación de la muerte celular (Buchholz et al., 2007). Por tanto, su homeostasis es clave para determinar la supervivencia o la degeneración neuronal.

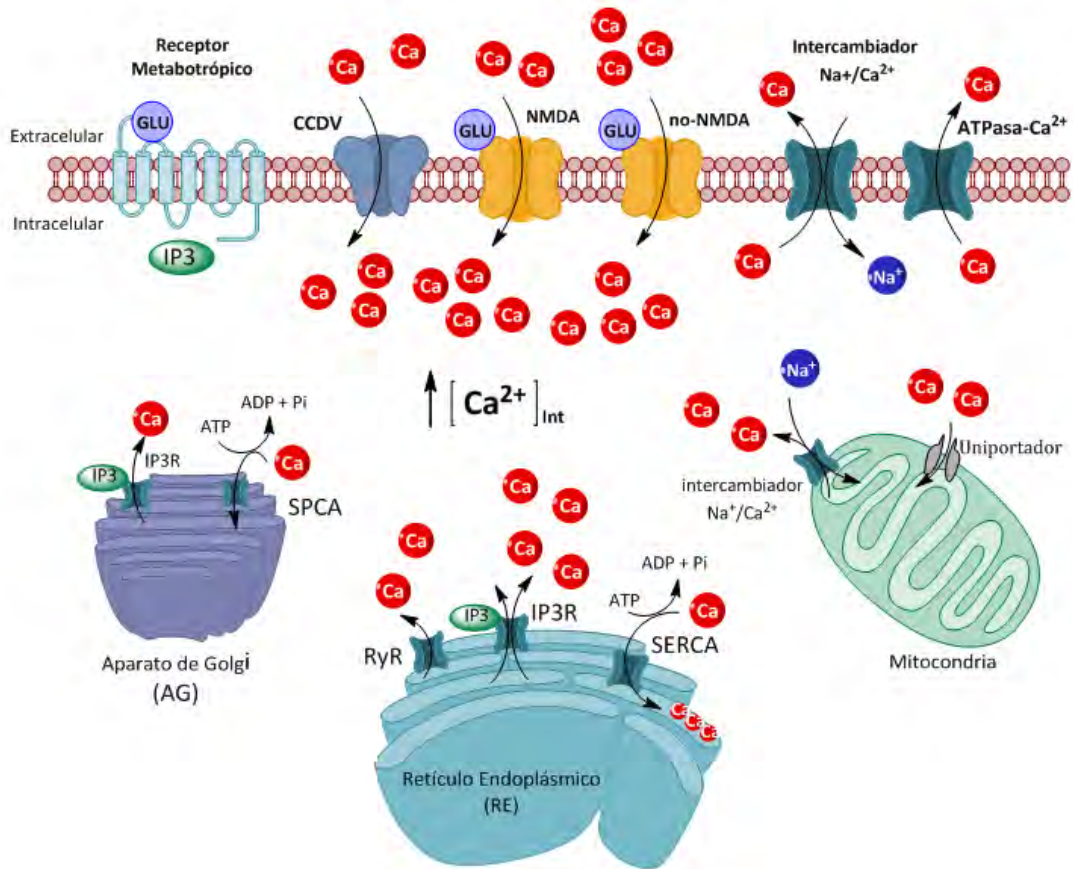
#### **1.3.1 Regulación del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular**

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se regula por secuestro, ya sea por proteínas de unión específica ó por organelos de almacenamiento (retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondria). El secuestro rápido del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático es a través de proteínas que se unen a él, como la calbindina D-28k, la calretinina y la parvalbúmina (Berridge et al., 2003). El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi secuestran el  $\text{Ca}^{2+}$  mediante una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  retículo sarco-endoplásmico y una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  secretora, respectivamente; permitiendo amortiguar cambios en su concentración (Fan et al., 2008). Por su parte, la mitocondria secuestra e internaliza  $\text{Ca}^{2+}$  libre mediante un uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  y lo libera a través de un intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Wojda et al., 2008). Estos mecanismos serían a la larga insuficientes si no se transportara el catión hacia afuera de la célula lo cual ocurre mediante otra ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  o por un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , ambos localizados en la membrana plasmática. El  $\text{Na}^+$  que penetra por este último mecanismo a su vez es expulsado por la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Pasantes et al., 1999).

---

### 1.3.2. Aumento en los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

Como se ha mencionado, un exceso de glutamato en el espacio sináptico, ocasiona un aumento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , directamente a través de la activación de los receptores que conducen  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  (receptores NMDA y algunos receptores no-NMDA) o indirectamente a través de la activación secundaria de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Mattson, 2007). Pero además, el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático aumenta cuando el glutamato activa sus receptores metabotrópicos generando inositol-(1, 4, 5) trifosfato, lo que provoca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde sus sitios de almacenamiento intracelular (Berridge et al., 2003). El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma, libera más  $\text{Ca}^{2+}$  por los receptores de rianodina. Por otra parte la despolarización de la membrana ocasiona la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Aunque los mecanismos de expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$  estén funcionando (ATPasa- $\text{Ca}^{2+}$  y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ), al igual que los de almacenamiento celular: ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  retículo sarcoplásmico y la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  secretora; éstos resultan insuficientes en función, por lo que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta considerablemente, contribuyendo al daño y la muerte celular (Wojda et al., 2008) (**Esquema 3**).



**Esquema 3.** Fuentes que contribuyen al aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. La activación de los receptores NMDA y no-NMDA generan la entrada directa de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la activación de los receptores metabotrópicos, al generar inositol-(1, 4, 5)-trifosfato (IP3), ocasiona la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los organelos de almacenamiento intracelular a través de la interacción del IP3 con sus receptores (IP3R). RyR: receptores de rianodina, CCDV: canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, SERCA: ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  retículo sarco-endoplásmico y SPCA: ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  secretora.

La liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  desde la mitocondria recibe particular atención, no sólo por su capacidad de liberar este catión lentamente a través del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , sino porque la acumulación excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial ocasiona una serie de eventos críticos para la supervivencia de la neurona. El  $\text{Ca}^{2+}$  secuestrado en la mitocondria es conducido por el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna, que a su vez despolariza la membrana. Esta reducción en el gradiente electroquímico desacopla la cadena transportadora de electrones y disminuye la síntesis de ATP (Gunter & Pfeiffer, 1990). La disminución

---

en los niveles de ATP durante el proceso excitotóxico es fatal para la neurona, ya que: 1) se afectan los mecanismos de expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (realizado por la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$ ); 2) se inhabilitan las ATPasas que introducían  $\text{Ca}^{2+}$  al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi; 3) se favorece la despolarización de la membrana plasmática generando la entrada de más  $\text{Ca}^{2+}$ ; y 4) en respuesta a una excesiva acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial se induce la apertura del poro de transición permeable. Este poro ocasiona un incremento no específico de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, posible ruptura de la membrana externa y un severo hinchamiento mitocondrial (Foster et al., 2006). Cuando el poro se encuentra abierto transitoriamente la liberación del citocromo c desde el espacio intermembranal mitocondrial puede activar las caspasas 9 y 3, y conducir a la neurona a una muerte celular programada (apoptosis). Sin embargo, si su apertura es prolongada, se induce una muerte rápida por necrosis (Nicotera & Lipton, 1999; Lipton & Nicotera, 1998).

Como consecuencia del desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones, se producen ERO, que generan un estado oxidante (*ver más adelante*) en la mitocondria, contribuyendo a su deterioro.

### **1.3.3. Enzimas activadas por el $\text{Ca}^{2+}$**

El aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular también provoca la activación de algunas enzimas como: proteasas, lipasas y endonucleasas; que contribuyen a la degeneración de diferentes componentes celulares, llevando finalmente a la muerte neuronal (Rosa & Rapoport, 2009; Dorado-Martínez et al., 2003).

Todos estos eventos, desencadenan cambios irreparables en la neurona, conduciéndola a su deterioro y a su muerte. Mientras no cese la sobreactivación de

---

los receptores, se repetirá el mismo patrón de muerte en varias neuronas hasta presentar daño local y generalizado, que se verá reflejado en cambios motores conductuales del animal/individuo.

#### **1.4. Estrés oxidante**

El cuerpo humano mantiene un balance redox constante, preservando el equilibrio entre la producción de especies oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes (enzimáticos y no-enzimáticos). La pérdida en este balance lleva a un estado de **estrés oxidante**, caracterizado por un aumento en los niveles de radicales libres y especies oxidantes que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes causando daño y muerte celular (Dorado-Martínez et al., 2003). El estrés oxidante juega un papel fundamental en las patologías neurodegenerativas (Migliore & Coppedè, 2009).

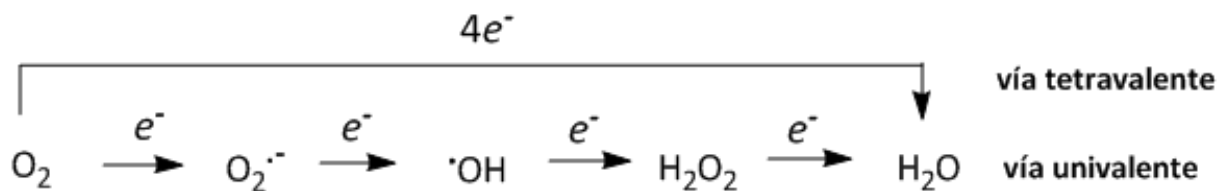
Un radical libre es cualquier especie química que contiene uno o más electrones desapareados en un orbital molecular o atómico, y que es capaz de coexistir independientemente (Halliwell, 2006). Estas especies son reactivas, ya que pueden reaccionar con cualquier molécula vecina. En biología toman importancia las especies derivadas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) (Valko et al., 2007) (**Tabla 2**). No todas las especies reactivas son radicales libres, ya que algunas no presentan esta característica, pero su importancia radica en que se pueden transformar fácilmente en radicales libres, lo que les confiere la capacidad de ser dañinas para la célula (Kohen & Nyska, 2002).

**Tabla 2.** Especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) más comunes en los sistemas biológicos.

(ERO)		(ERN)	
RADICALES		RADICALES	
Anión Superóxido	$O_2^{\cdot-}$		
Radical Hidroxilo	$\cdot OH$		
Radical Peroxílo	$\cdot OOR$	Oxido Nítrico	$\cdot ON$
Radical Perhidroxilo	$\cdot OOH$	Radical Dióxido de nitrógeno	$NO_2^{\cdot}$
Radical Alcoxilo	$\cdot OR$	Nitrato	$NO_3^{\cdot}$
Radical Dióxido de carbono	$CO_2^{\cdot-}$		
Oxígeno singulete	$O_2^1\Sigma_g$		
NO-RADICALES		NO-RADICALES	
Peróxido de hidrógeno	$H_2O_2$	Ácido nitroso	$HNO_2$
Acido hipocloroso	$HOCl$	Catión nitrosilo	$NO^+$
Ozono	$O_3$	Anión nitroxilo	$NO^-$
Oxígeno singulete	$O_2^1\Delta_g$	Tetróxido de dinitrógeno	$N_2O_4$
Peróxidos orgánicos	$ROOH$	Trióxido de nitrógeno	$N_2O_3$
Peroxinitrito	$ONOO^-$	Peroxinitrito	$ONOO^-$
Peroxinitrato	$O_2NOO^-$	Peroxinitrato	$O_2NOO^-$
Ácido peroxinitroso	$ONOOH$	Ácido peroxinitroso	$ONOOH$

#### 1.4.1. ERO

Las ERO representan la clase más importante de especies oxidantes en los sistemas vivos (Miller et al., 1990). El  $O_2$  tiene una configuración electrónica única y es un diradical. En condiciones normales, el  $O_2$  se reduce a  $H_2O$  por el complejo de la citocromo oxidasa, que transfiere  $4 e^-$  al  $O_2$  (vía tetravalente). Sin embargo, menos del 5% del  $O_2$  puede reducirse univalentemente a  $H_2O$  generando anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) como intermediarios (Halliwell, 2006) (**Esquema 4**).



**Esquema 4.** Vía de reducción tetravalente (arriba) y univalente (abajo) del  $O_2$ .

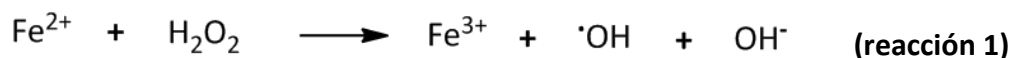
---

### 1.4.2. Producción de ERO en la mitocondria

La mitocondria es la principal fuente de  $O_2^{\cdot-}$ , generando aproximadamente el 85% del total (Dröge, 2002); mientras que el 15% de  $O_2^{\cdot-}$  restante es generado por varias oxididasas citosólicas como la NADPH oxidasa o la xantina oxidasa (Sumimoto, 2008).

En condiciones normales, durante el transporte de electrones en los complejos mitocondriales (I-IV), del 2-5% de los electrones escapan para reaccionar directamente con el  $O_2$ . Esto ocurre principalmente en los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones (Boveris & Chance, 1973). Sin embargo, la acumulación de  $Ca^{2+}$  en la mitocondria como consecuencia del evento excitotóxico, ocasiona interrupciones en la cadena transportadora de electrones y un colapso en el potencial de membrana mitocondrial, generando la liberación y acumulación de más electrones en la mitocondria, los cuales pueden reaccionar con el  $O_2$  para producir una concentración mayor de  $O_2^{\cdot-}$ . Una parte de  $O_2^{\cdot-}$  producido en el espacio intermembranal puede ser transportado al citoplasma mediante canales de aniones dependientes de voltaje (Foster et al., 2006).

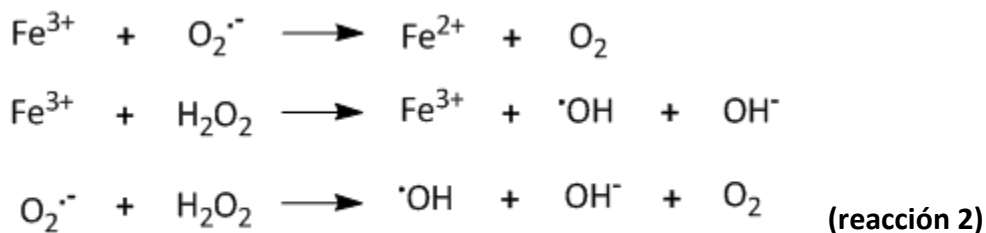
Aunque la mitocondria cuenta con enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (MnSOD), que transforma al  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  y la glutatión peroxidasa (GPx), que convierte el  $H_2O_2$  en  $H_2O$ ; si la concentración de  $O_2^{\cdot-}$  y de  $H_2O_2$  en la mitocondria rebasan los límites estimados o si la concentración de las enzimas antioxidantes son insuficientes, el  $H_2O_2$  puede convertirse en  $\cdot OH$  en presencia de Fe (reacción de Fenton) (**reacción 1**). El  $\cdot OH$  es muy reactivo y su tiempo de vida media es muy corto ( $10^{-9}$  s), así que cuando se produce *in vivo*, reacciona cerca del sitio donde se formó.



Reacción de Fenton

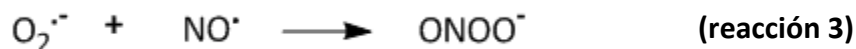
El radical  $\cdot\text{OH}$  o bien las ERO generadas ( $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pueden dañar la membrana interna mitocondrial y los complejos de la cadena respiratoria, permitiendo la liberación de los grupos prostéticos que catalizarían la reacción de Fenton. Este mecanismo se repetiría varias veces, ya que la cadena respiratoria alterada aumentaría la fuga de electrones, generando más ERO que a su vez dañarían la cadena respiratoria, perpetuando así este fenómeno y desestabilizando el equilibrio energético de la célula, lo que resultaría en la muerte de la misma.

Dentro de la célula, el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  también participa en la reacción de Haber-Weiss (**reacción 2**), que combina una reacción de Fenton y la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  por el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , para generar  $\cdot\text{OH}$  (Koppenol, 2001).



Reacción de Haber-Weiss

Alternamente el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  puede reaccionar con el óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (**reacción 3**).



Debido a la amplia distribución de las mitocondrias en el interior de las neuronas (soma, dendritas, axones y particularmente en las terminales sinápticas); el riesgo



---

de una pérdida de electrones es un evento altamente probable, que puede exacerbarse durante el evento excitotóxico.

#### **1.4.3. Producción de ERO como consecuencia del incremento de los niveles de $\text{Ca}^{2+}$**

El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ocasiona la activación de enzimas que están relacionadas con la producción de ERO, como: 1) la óxido nítrico sintasa neuronal (ONSn) que sintetiza  $\cdot\text{ON}$  (Sharma et al., 2007) (*ver más adelante*); 2) la fosfolipasa  $\text{A}_2$  que puede liberar ácido araquidónico, que al ser metabolizado por lipooxigenasas y ciclooxigenasas produce  $\text{O}_2^{\cdot-}$  como subproducto. Por otra parte, la concentración elevada de  $\text{Ca}^{2+}$  puede estimular la conversión de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, que cataliza la oxidación de la hipoxantina en xantina que a su vez es oxidada a ácido úrico. La diferencia entre estas dos enzimas es que la xantina deshidrogenasa cataliza la reacción mediante la reducción del  $\text{NADP}^+$ , mientras que la xantina oxidasa necesita reducir al  $\text{O}_2$ , generando  $\text{O}_2^{\cdot-}$  como producto. La conversión de estas 2 enzimas es irreversible y es generada por proteasas que son activadas por niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  (Harrison, 2002).

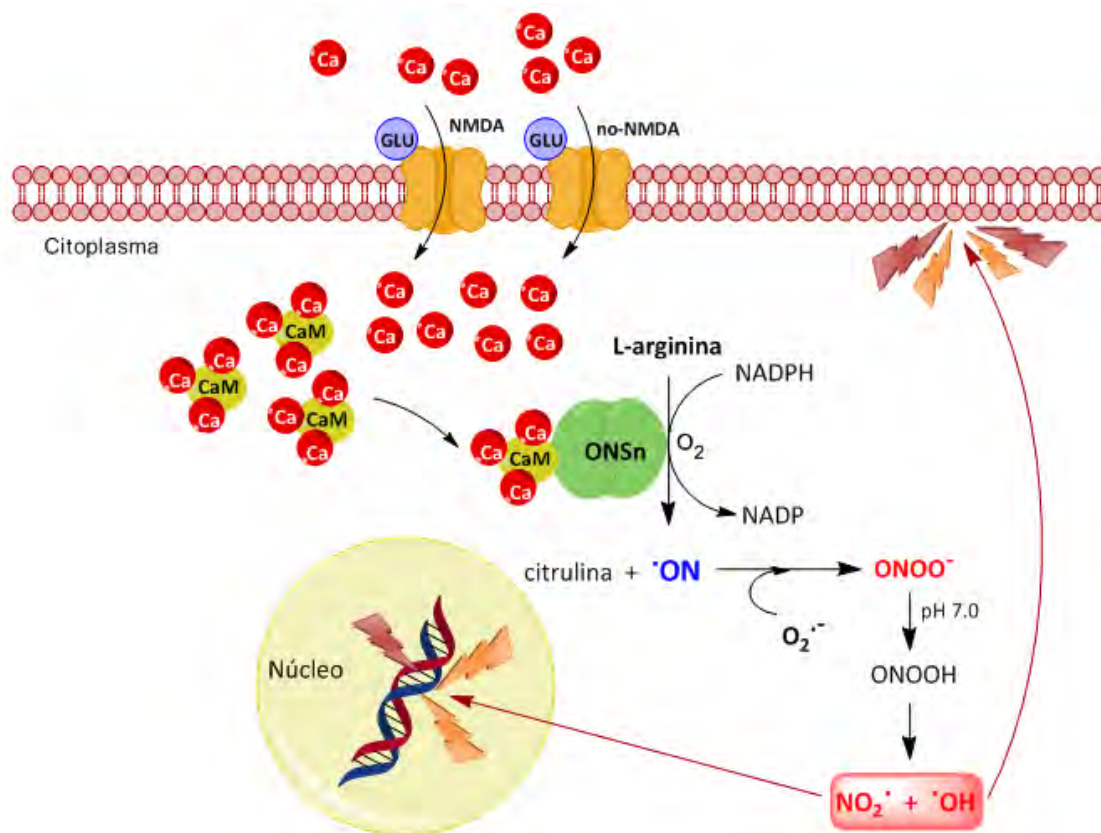
#### **1.4.4. ERN**

Las ERN en analogía con las ERO generan un estado de estrés nitrosante cuando se producen de forma excesiva, inhabilitando la capacidad de los sistemas para neutralizarlas y eliminarlas (Klatt & Lamas, 2000). Entre las ERN más importantes está el  $\cdot\text{ON}$  y las que derivan del él, como el  $\text{ONOO}^-$ , entre otras. El  $\cdot\text{ON}$  es una pequeña molécula de señalización que actúa en una gran variedad de procesos fisiológicos como: 1) control de la presión sanguínea (vasodilatador); 2) en el proceso de neurotransmisión; o 3) en la respuesta del sistema inmune en la vía

---

fagocítica (Chirino et al., 2006). El  $\cdot\text{ON}$  es generado por la enzima ONS, que cataliza la conversión de arginina en citrulina (Sharma et al., 2007).

Se han identificado tres subtipos de ONS, dos de ellas son constitutivas (ONS<sub>n</sub> y la endotelial, ONSe) y la otra es inducible (ONS<sub>i</sub>). Las tres isoformas están extensamente distribuidas en el cerebro, pero la ONS<sub>n</sub> y la ONSe están en neuronas y en el endotelio, respectivamente (Nakamura et al., 2007). Todas requieren de calmodulina para su activación pero sólo la ONS<sub>n</sub> y ONSe dependen de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , misma que aumenta por la sobreactivación de los receptores NMDA. Debido a que el  $\cdot\text{ON}$  es soluble tanto en medio acuoso como en medio lipídico, difunde con facilidad a través de las membranas, lo que le da la capacidad de dañar estructuras cercanas aunque su tiempo de vida media sea solo de algunos pocos segundos. Por otra parte, en condiciones de estrés, el  $\cdot\text{ON}$  puede reaccionar con el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  generado, produciendo cantidades significativas de  $\text{ONOO}^-$  (**reacción 3**), el cual es un potente agente oxidante que puede causar la fragmentación del ADN y la oxidación de los lípidos (Nakamura et al., 2007). Además, se ha visto que el  $\text{ONOO}^-$  reduce la recaptación de glutamato en las células gliales, favoreciendo su permanencia en el espacio sináptico. A su vez el  $\cdot\text{ON}$  puede llevar a reacciones de nitrosilación de proteínas, dañando su estructura y alterando su funcionamiento, lo que agrava el daño celular (**Esquema 5**).



**Esquema 5.** Formación del óxido nítrico ( $\cdot\text{ON}$ ) por la óxido nítrico sintasa neuronal (ONSn), tras la excitación de los receptores NMDA y no-NMDA con glutamato (GLU). El  $\cdot\text{ON}$  reacciona con el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y genera peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) que a pH fisiológico se protona a ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ) el cual se descompone en radical dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^{\cdot}$ ) y en radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), que pueden oxidar lípidos, proteínas o ácidos nucleicos.

#### 1.4.5. Antioxidantes

Ante todas estas fuentes de especies oxidantes, la célula posee una serie de mecanismos de defensa para neutralizar la excesiva producción de ERO y ERN (Coyle & Puttfarcken, 1993). Existen los sistemas antioxidantes endógenos de tipo enzimático y no-enzimático, dentro de los primeros están: las superóxido dismutasas (Cu-ZnSOD y MnSOD), las catalasas (CAT) y las peroxidasas como la glutatión peroxidasa (GPx) y la tiorredoxina peroxidasa. Dentro de los sistemas antioxidantes no-enzimáticos, destacan: la vitamina A, el ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), el ácido úrico, aminoácidos como la glicina y taurina, y

---

el tripéptido glutatión (GSH), a los que se denominan barredores (*scavengers*) de radicales libres (Coyle & Puttfarcken, 1993). Los sistemas de defensa antioxidante pueden actuar en las formas siguientes (Ames et al., 1993):

- I. Evitando el inicio de la reacción oxidante al “barrer” (cubrir o detener una reactividad química muy alta) los primeros radicales libres que se forman.
- II. Uniéndose a iones metálicos para evitar la formación de especies reactivas.
- III. Transformando los peróxidos en productos menos reactivos.
- IV. Deteniendo la propagación y el aumento de radicales libres.

*(El tema de antioxidantes endógenos se revisará con mayor profundidad en la parte de enzimas de fase II).*

#### **1.4.6. Las ERO y ERN causan daño en el ADN, los lípidos y las proteínas**

Como se mencionó, una gran variedad de ERO y ERN son producidas en el curso del metabolismo normal en los sistemas biológicos y algunos de ellos tienen varias funciones fisiológicas importantes. Sin embargo, su acumulación más allá de las necesidades de la célula pueden potencialmente dañarla de forma irreversible al oxidar directamente macromoléculas como: lípidos (fundamentalmente ácidos poliinsaturados de las membranas), proteínas o ácidos nucleicos (Migliore & Coppede, 2009).

##### *ADN*

El  $\cdot\text{OH}$  reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN, dañando las bases, así como la desoxirribosa. La lesión más estudiada en el ADN es la formación de la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG). Los continuos incidentes oxidantes generan una modificación permanente del material genético, que representa el

---

primer paso involucrado en la mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento (Valko et al., 2007).

### *Lípidos*

Los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos son extremadamente sensibles a la oxidación (lipoperoxidación). Una vez formado el radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ), este puede convertirse mediante una reacción de ciclación a endoperóxidos los cuales son precursores de malondialdehído (MDA). El MDA es uno de los dos productos principales que se forman en la lipoperoxidación, junto con el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). El MDA es mutagénico en bacterias y en células de mamíferos y carcinogénico en ratas. El 4-HNE es poco mutagénico pero parece ser el principal producto tóxico de la lipidoperoxidación (Valko et al., 2007). Además el 4-HNE puede dañar fácilmente los transportadores de glutamato, entorpeciendo su remoción del espacio sináptico. La peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares, inicia un deterioro acumulativo de las funciones membranales y provoca una disminución en la fluidez, reducción en el potencial electroquímico y un aumento en la permeabilidad de la membrana, dañando su integridad (Dorado-Martínez et al., 2003).

### *Proteínas*

La oxidación causa alteraciones en la estructura de algunas proteínas y la formación de agregados proteínicos. Estas proteínas anormales inducen daño oxidante y están presentes en las enfermedades neurodegenerativas (**Tabla 3**). La producción de radicales libres ocasiona modificaciones en las proteínas que pueden conducirla a su rápida degradación. Entre las oxidaciones que sufren los aminoácidos de las proteínas se encuentran la formación de grupos carbonilo que es un marcador temprano del daño oxidante a proteínas (Reznick & Packer, 1994).

**Tabla 3.** Relación entre la proteína alterada por estrés oxidante, la lesión fisiopatológica y la enfermedad neurodegenerativa asociada.

Proteína alterada	Lesión	Enfermedad Neurodegenerativa
$\beta$ -Amiloides	Formación de placa	Enfermedad de Alzheimer
Proteína TAU	Maraña neurofibrilar	Demencia frontotemporal
Huntingtina	Inclusiones nucleares	Enfermedad de Huntington
$\alpha$ -Sinucleína	Cuerpo de Lewy	Enfermedad de Parkinson

(Dorado-Martínez et al., 2003).

#### **1.4.7. El cerebro está en desventaja ante el estrés oxidante**

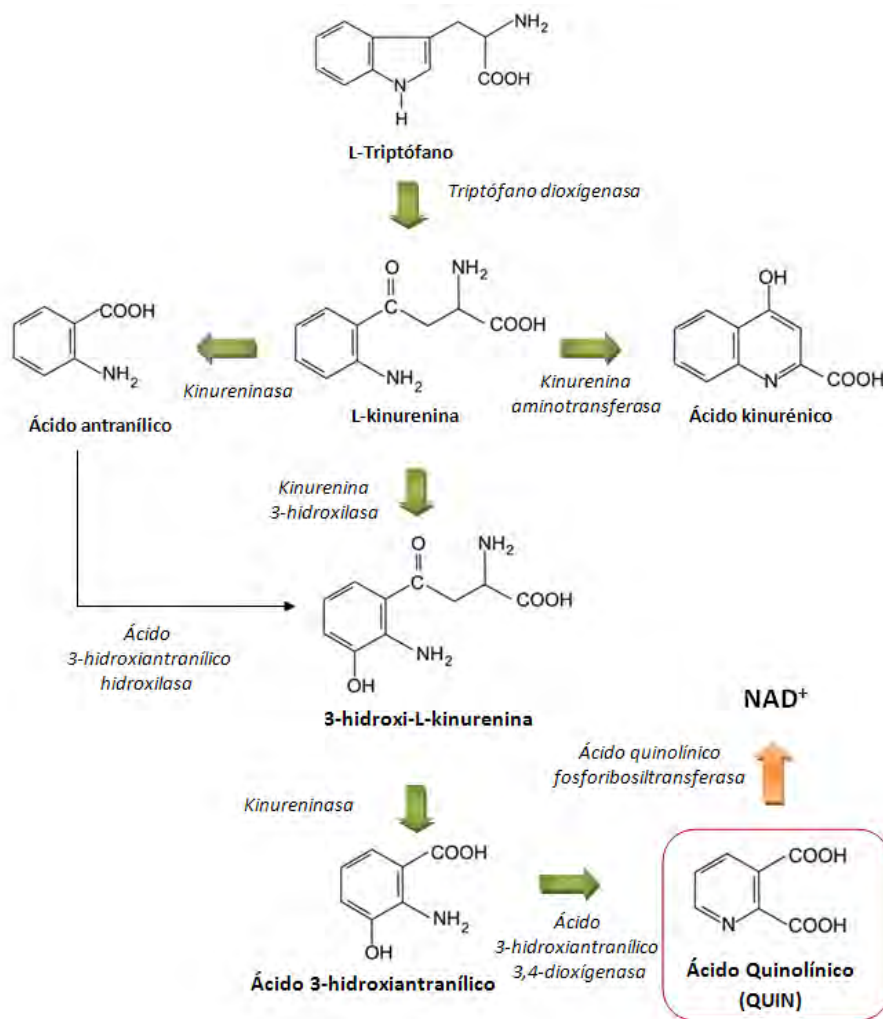
En la actualidad se reconoce que tanto el estrés oxidante como el nitrosante juegan un papel determinante en las enfermedades neurodegenerativas (Migliore & Coppedè, 2009). El cerebro es particularmente vulnerable a este tipo de daño debido a: **1)** su alto consumo de  $O_2$ ; **2)** su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados; **3)** su limitada actividad antioxidante (poca y moderada actividad de CAT, SOD y GPx); y **4)** la presencia de Fe y Cu, que propician las reacciones de Fenton y Haber Weiss.

Debido a esto, se hacen numerosos esfuerzos en la actualidad para poder combatir el desafío oxidante que se lleva a cabo en este tipo de neuropatologías y en el proceso de envejecimiento normal.

#### **1.5. Ácido quinolínico: como modelo de neurodegeneración**

Los mecanismos fisiopatológicos de los desórdenes neurodegenerativos crónicos presentan algunas características en común, como el desequilibrio en el metabolismo del triptófano, ya que se generan metabolitos neuroactivos (Zádori et al., 2009). La vía de la kinurenina es la principal ruta metabólica del L-triptófano en la mayoría de los tejidos de mamíferos, incluyendo el cerebro. Esta vía es responsable de la producción de  $NAD^+$  y  $NADP^+$ , los cuales participan en múltiples procesos metabólicos (Braidy et al., 2009). En esta vía se forman varias moléculas

neuroactivas siendo el ácido quinolínico (ácido-2,3-piridin dicarboxílico; QUIN) el más importante en términos de actividad biológica (Zádori et al., 2009) (**Esquema 6**).



**Esquema 6.** Principales componentes de la Vía de la kinurenina

El QUIN es una potente excitotoxina, cuyo efecto tóxico está relacionado con la activación selectiva de los receptores NMDA y con la producción de ERO y ERN. El QUIN es un agonista endógeno competitivo de los receptores NMDA y actúa específicamente en los subgrupos que contienen las subunidades NR2A y NR2B (Ting et al., 2009).

---

El efecto tóxico del QUIN está asociado también con su concentración en las diferentes áreas del cerebro y por la susceptibilidad de las diferentes poblaciones de neuronas a él. La concentración de QUIN varía dependiendo de la zona del cerebro, siendo la corteza cerebral donde se observan los niveles más altos y en el estriado los más bajos. Además, los niveles aumentan en el envejecimiento (Moroni et al., 1984).

### **1.5.1. Mecanismo de acción del ácido quinolínico**

Como se mencionó, la analogía estructural del QUIN con el NMDA le confiere la capacidad de actuar de manera selectiva sobre los receptores NMDA (Garthwaite & Garthwaite, 1987; Stone et al., 2000). La administración de antagonistas selectivos de los receptores NMDA tales como el ácido 2-aminofosfonoheptanóico (Foster et al., 1984), el ácido 2-amino-5-fosfonopentanóico (Garthwaite & Garthwaite, 1987) o el MK-801 (Santamaría & Ríos, 1993), disminuyen el daño neuronal ocasionado por el QUIN, sugiriendo la participación del receptor. También se ha sugerido que el QUIN puede estimular la lipoperoxidación bajo condiciones fisiológicas (Ríos & Santamaría, 1991). A su vez, la inducción de la lipoperoxidación se ha relacionado con la producción de peroxinitrito a tiempos tempranos después de la administración del QUIN (Pérez-De La Cruz et al., 2005). De acuerdo a lo anterior, las lesiones inducidas por el QUIN son atenuadas por el tratamiento con agentes que favorecen la descomposición del peroxinitrito (González-Cortés et al., 2008) o con atrapadores de ERO (Nakao et al., 1996). También se ha visto que tras la administración de QUIN, se incrementa la formación de  $O_2^{\cdot-}$  (Maldonado et al., 2010) y de  $\cdot OH$  (Santamaría et al., 2001) en las primeras horas, sugiriendo que estos radicales contribuyen al patrón de toxicidad inducido por el QUIN. Estos mecanismos pueden explicar cómo el QUIN ejerce su notable potencia neurotóxica mediante la producción de ERO y ERN.



---

La producción excesiva de ERO y ERN conduce a la célula a una muerte por necrosis (Syntichaki & Tavernarakis, 2003). Esto involucra cambios metabólicos progresivos con una producción de ATP defectuosa, mismos que se potencian por el desequilibrio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Esta pérdida de la regulación energética impide un buen funcionamiento de bombas plasmáticas permitiendo la entrada masiva de  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Na}^+$ , lo que genera un edema celular irreversible. El aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre, también activa enzimas líticas que provocan daño a nivel de proteínas, lípidos y DNA, pero además induce la activación de enzimas relacionadas a la producción de más ERO y ERN como la ONS (Aguilera et al., 2007) y la NADPH oxidasa (Maldonado et al., 2010) entre otras. Por otra parte el  $\text{Ca}^{2+}$  participa en la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato, manteniendo el proceso excitotóxico por un tiempo prolongado. Esta muerte celular repentina causa la activación de procesos apoptóticos en células vecinas, así que los efectos tóxicos del QUIN involucran ambos tipos de muerte neuronal: necrosis (Maldonado et al., 2007) y apoptosis (Nicotera & Lipton, 1999).

### **1.5.2. El QUIN en las enfermedades neurodegenerativas**

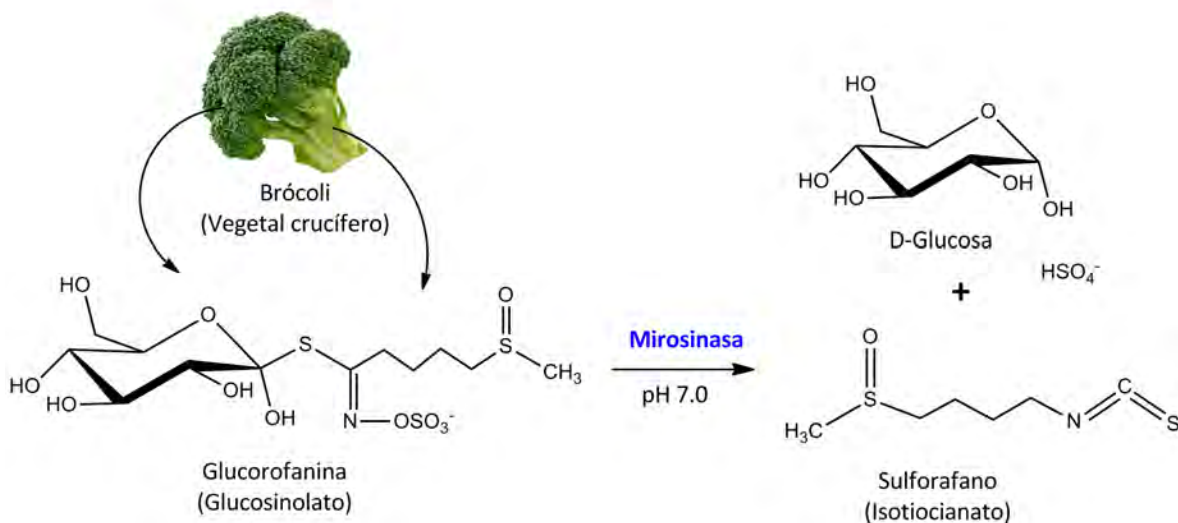
Se ha encontrado un incremento en la concentración de QUIN en el cerebro y en el fluido cerebroespinal de pacientes con enfermedades neurológicas e infecciosas. Por ejemplo, en pacientes con encefalopatía hepática, en desórdenes neurológicos relacionados al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Stone, 2001); así como en algunas enfermedades neurodegenerativas. El análisis postmortem en cerebros de pacientes con la enfermedad de Huntington en etapas tempranas, revela un incremento en el nivel de QUIN (Guidetti, 2004). Además, se ha observado un incremento en la actividad de la ácido 3-hidroxiantranílico-3,4-dioxigenasa que cataliza la conversión de ácido 3-hidroxiantranílico en QUIN (Schwarcz et al., 1988).

---

Dada la evidencia que relaciona al QUIN con la patogénesis de ciertas enfermedades neurodegenerativas, su administración intraestriatal se ha utilizado como modelo experimental para estudiar este tipo de enfermedades.

### **1.6. Sulforafano (SULF)**

Un importante número de compuestos naturales presentes en la dieta han sido asociados con el tratamiento y la prevención de algunas enfermedades, al presentar propiedades quimiopreventivas y citoprotectoras (Verkerk et al., 2009). Este es el caso de los isotiocianatos, que son fitoquímicos organosulfurados que resultan de la hidrólisis enzimática de los glucosinolatos (moléculas bio-inactivas). Estos compuestos están presentes en cantidades considerables en los vegetales crucíferos (particularmente del género *Brassica*), tales como el brócoli, la col (repollo), la coliflor y las coles de bruselas. El principal glucosinolato en el brócoli es la glucorafanina y su hidrólisis enzimática es catalizada por la enzima endógena mirosinasa (también llamada  $\beta$ -D-tioglucohidrolasa). Esta enzima se activa durante la cosecha, picado y/o masticación del vegetal (Fimognari & Hrelia, 2007). Como producto mayoritario de la hidrólisis de la glucorafanina se forma el isotiocianato alifático: **sulforafano** (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano), en una reacción dependiente del pH (Matusheski & Jeffery, 2001) (**Esquema 7**).



**Esquema 7.** Formación del sulforafano. La glucoforanina, que es un glucosinolato presente en el brócoli, se transforma a sulforafano (isotiocianato) por medio de la mirosinasa (pH neutro), que se activa durante la manipulación/masticación del vegetal.

En el brócoli fresco las concentraciones de SULF son de 11.20 mg/100 g (Galvano et al., 2007), aunque se ha visto que conforme madura el vegetal, la concentración de glucosinolatos disminuye y en consecuencia la del SULF (Nestle, 1998). El brócoli además del SULF, contiene otros componentes bioactivos como flavonoides (quercetina), minerales (selenio) y vitaminas (vitamina C), los cuales están presentes en concentraciones similares, y que son benéficos para el organismo.

En las últimas décadas, el SULF ha llamado la atención por sus propiedades quimiopreventivas y citoprotectoras. Estas últimas se atribuyen principalmente a su acción antioxidante y son las que se estudiarán a continuación.

### 1.6.1. Actividad antioxidante del sulforafano (mecanismo de acción)

El SULF es considerado un antioxidante indirecto al no participar en reacciones redox en condiciones fisiológicas (Barton & Ollis, 1979). A pesar de que los isotiocianatos son poderosos electrófilos, ya que el átomo de carbono central de la

---

estructura base R-NCS, reacciona fácilmente con nucleófilos, no hay evidencia sustancial que indique que este grupo pueda actuar como antioxidante directo bajo condiciones fisiológicas; pero tampoco que pueda comportarse como un agente pro-oxidante (Fahey & Talalay, 1999).

La propiedad del SULF para reducir el daño oxidante, se ha relacionado con su capacidad de inducir genes que codifican para enzimas que pueden reducir el estado oxidante celular (enzimas de fase II) tales como: las superóxido dismutasas (SOD), la catalasa (CAT), la NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), la glutatión reductasa (GR), la glutatión peroxidasa (GPx), la hemooxigenasa 1 (HO-1), la UDP-glucuronosil-transferasa (UGTs), la glutatión-S-transferasa (GSTs), la  $\gamma$ -glutamylcisteína ligasa (GCL), entre otras (Vasanthi et al., 2009; Angeloni et al., 2009; Innamorato et al., 2008; Zhao et al., 2007). Estas dos últimas enzimas están involucradas en la síntesis de glutatión (GSH), por lo que sus niveles también aumentan tras el tratamiento con SULF (Gao et al., 2010). Por ello, el SULF puede ser útil en enfermedades relacionadas con el daño oxidante (Vasanthi et al., 2009).

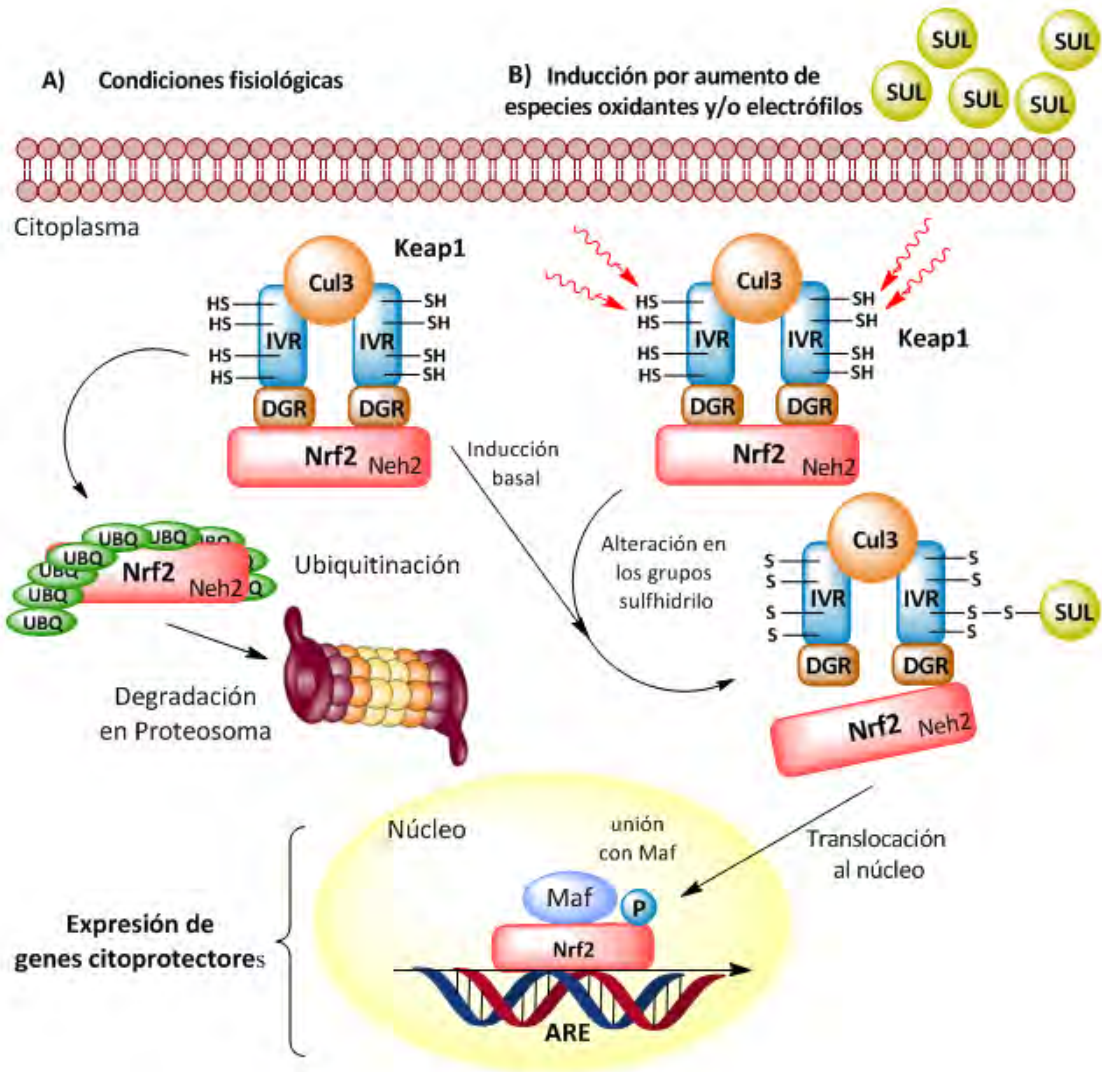
La inducción de las enzimas de fase II por el SULF es mediante el factor de transcripción Nrf2 (factor relacionado al factor nuclear eritroide-2), el cual pertenece a una familia de proteínas básicas con un característico “zipper” o cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal, misma que es responsable de su unión al ADN (Niture et al., 2010). El Nrf2 bajo condiciones basales se encuentra unido (secuestrado) a la proteína Keap1 (proteína 1 asociada-ECH Kelch-like) reprimiendo su actividad y formando un complejo Nrf2-Keap1, en el citoplasma mediante interacciones con la actina del citoesqueleto (Copple et al., 2008). Algunos autores han sugerido que el complejo Nrf2-Keap1 se encuentra en el núcleo, sin embargo está teoría no se ha demostrado (Nguyen et al., 2009). La proteína Keap1 es un dímero que funciona como una molécula sensor en la respuesta al estrés oxidante,

---

liberando al Nrf2. En ausencia de estrés, Keap1 funciona como adaptador de las enzimas que se encargan de la ubiquitinación (Culina-3, Cul3) del Nrf2 para su degradación proteosomal, previniendo la expresión innecesaria de genes antioxidantes (Kobayashi et al., 2006).

En presencia de agentes oxidantes y/o electrófilos, se perturba la unión entre los dominios de repeticiones de doble glicina (DGR) de Keap1 y el dominio Neh2 de Nrf2, debido a que estos pueden oxidar los grupos sulfhidrilos de las cisteínas que están en la región de intervención (IVR) de Keap1, e inducir la fosforilación del Nrf2, promoviendo la disociación del complejo Nrf2-Keap1 (Copple et al., 2008). Todos estos eventos culminan en la eventual translocación de Nrf2 al núcleo, donde forma heterodímeros con proteínas Maf (grandes o pequeñas), facilitando su interacción con el sitio promotor específico del ADN. Este sitio se conoce como elementos de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés), los cuales están en una secuencia “cis-acting” encontrada en la región 5´-que flanquea los genes que codifican para las enzimas de fase II (Copple et al., 2008) (**Esquema 8**).

La proteína Keap1 tiene 25 residuos de cisteína, de los cuales 9 se caracterizan por tener grupos sulfhidrilo altamente reactivos. Se cree que el SULF posee la particularidad química de interactuar con estos grupos sulfhidrilo ya sea por oxidación o por alquilación, siendo esta una vía posible por la que el SULF induce la liberación del Nrf2 del complejo Keap1-Nrf2 y la consecuente transcripción de los genes antioxidantes de las enzimas de fase II (Dinkova-Kostova et al., 2001).



**Esquema 8.** Nrf2 en condiciones fisiológicas (A) y en condiciones oxidantes (B). A) la célula degrada a Nrf2-ubiquitinado (UBQ) por el proteosoma. B) El sulforafano induce cambios en los grupos sulfhidrilo de las cisteínas del dominio IVR de Keap1, liberando y facilitando la fosforilación de Nrf2, para su translocación al núcleo, donde forma heterodímeros con Maf y se une a la secuencia ARE, induciendo la expresión de los genes de las enzimas de fase II.

### 1.6.2. Enzimas de Fase II

Las enzimas de fase II ejercen sus acciones citoprotectoras a través de varios mecanismos, ya que catalizan una gran variedad de reacciones que le confieren citoprotección a la célula contra la toxicidad de las ERO/ERN (Juge et al., 2007). Además, son capaces de convertir moléculas con capacidad carcinogénica en

---

metabolitos inactivos que son fácilmente excretados por el cuerpo, evitando que reaccionen con el ADN (Talalay, 2000).

En este trabajo se revisarán aquellas enzimas que están involucradas en el metabolismo del GSH.

### **1.6.3. Glutati3n (GSH)**

Es un tripéptido (glutamato, cisteína y glicina) de bajo peso molecular que se encuentra en altas concentraciones en todas las células. Es uno de los tioles no proteínicos más estudiados a nivel intracelular debido a que está involucrado en numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos. Particularmente en el cerebro, el GSH es considerado como el principal antioxidante al encontrarse en una concentración de 2-3 mM, la cual es mucho más alta que en el fluido cerebroespinal (Dringen, 2000). Se han asociado deficiencias en el nivel de GSH en el cerebro con enfermedades degenerativas (Aoyama et al., 2008).

### **1.6.4. Funciones neuroprotectoras del GSH**

El GSH ejerce sus funciones a través de varios mecanismos:

- I. Actúa como “scavenger” (barredor) de radicales libres, particularmente efectivo contra el  $O_2^{\cdot-}$  y  $\cdot OH$ , para este último no existen defensas enzimáticas endógenas. Esta habilidad del GSH le proporciona a la neurona una efectiva y primera línea de defensa antioxidante contra las ERO más reactivas y comunes durante los desafíos excitotóxicos (Bains & Shaw, 1997).
- II. Funciona como sustrato de otras enzimas (GPx) en la reducción del  $H_2O_2$  u otros peróxidos. En el cerebro los niveles de GPx son relativamente elevados, en comparación con los de la catalasa que también metaboliza

---

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- III. Reacciona con varios compuestos endógenos y xenobióticos mediante la GST para formar conjugados-S-glutación, los cuales son exportados al exterior de la célula (Commandeur et al., 1995). Por ejemplo el GSH puede reaccionar con el 4-HNE para formar aductos GSH-4-HNE. Este proceso es de gran importancia en la detoxificación celular (Xie et al., 1998).
- IV. Sirve como almacén y transportador de cisteína. La cisteína por si misma tiene efectos neurotóxicos mediante la producción de radicales libres, incrementando el glutamato extracelular y conduciendo a la sobreactivación de los receptores NMDA (Janáky et al., 2000).
- V. Es el principal amortiguador redox, ya que mantiene el estatus de los tioles proteínicos esenciales. El GSH puede conducir a la formación reversible del enlace disulfuro entre los grupos tiol de las proteínas (S-glutationilación). Este proceso es crítico en la prevención de la oxidación irreversible de las proteínas. En otras palabras protege a los grupos sulfhidrilo de las proteínas contra los ataques oxidantes de los radicales libres (Giustarini et al., 2004).
- VI. Puede actuar como neurotransmisor/neuromodulador, ya que la fracción  $\gamma$ -glutamil del GSH se une a los receptores NMDA, ejerciendo acciones duales (antagonista/agonista) sobre la respuesta neuronal mediada por los receptores NMDA en el cerebro.

Dada la gran variedad de funciones que desempeña el GSH en la fisiología celular, los cambios en la homeostasis del GSH se han implicado en la etiología de varias enfermedades neurodegenerativas (Schulz et al., 2000).

#### **1.6.5. Síntesis de glutación**

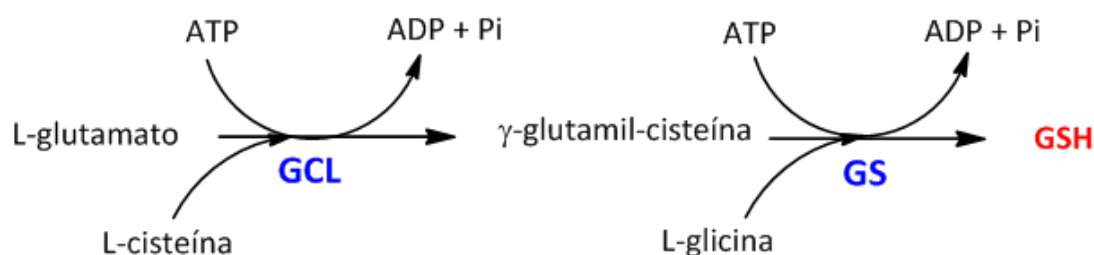
La síntesis de GSH ocurre en el citosol y comprende dos pasos enzimáticos que dependen de ATP. El primer paso es limitante y está catalizado por la glutamina-L-



---

cisteín ligasa (GCL), que depende de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ . Esta enzima está formada por dos subunidades; una cadena pesada (~73,000 KD) y una cadena ligera (~30,000 KD), que son codificadas por diferentes genes tanto en el humano como en la rata. La cadena pesada tiene la actividad catalítica y puede inhibirse por retroalimentación con GSH, mientras que la cadena ligera contribuye a la regulación de la cadena pesada. La GCL une el L-glutamato con la L-cisteína para formar el dipéptido  $\gamma$ -glutamilcisteína, este paso es regulado por la disponibilidad de la L-cisteína, lo cual es un factor crítico durante la síntesis del GSH (Aoyama et al., 2008).

El segundo paso es catalizado por la glutatión sintetasa (GS), que une la L-glicina al dipéptido formado, para producir el GSH (**Esquema 9**). Éste paso no se inhibe por retroalimentación con el GSH (Dringen, 2000).



**Esquema 9.** Síntesis de GSH. La glutamina-L-cistein ligasa (GCL) forma el dipéptido  $\gamma$ -glutamil-cisteína, para que después la glutatión sintetasa (GS) adicione L-glicina para formar el GSH.

La degradación del GSH ocurre exclusivamente en el espacio extracelular y lo realiza la  $\gamma$ -glutamiltranspeptidasa (GGT), que es la única peptidasa capaz de hidrolizar al GSH presente en los conjugados del S-GSH.

#### 1.6.6. Enzimas que emplean GSH

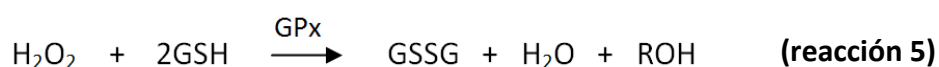
**Glutatión peroxidasa (GPx):** es una selenoproteína, de la cual existen varias isoformas: citosólica, plasmática y de fosfolípidos. Esta enzima cataliza la reducción

---

del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, empleando dos moléculas de GSH. Los productos de la reacción son el glutati6n oxidado (GSSG) y el H<sub>2</sub>O (Brigelius-Flohé, 1990) (**reacci6n 4**).



La GPx tambi6n cataliza la reducci6n dependiente del GSH de los hidroper6xidos de los 6cidos grasos; en todos los casos, el grupo per6xido (ROOH) es reducido a alcohol (ROH) (**reacci6n 5**):



**Glutati6n reductasa (GR):** es una flavoprote6na que se encuentra en el citoplasma y posee en su sitio activo FAD. Cataliza la reducci6n del GSSG, empleando NADPH como fuente de electrones (**reacci6n 6**) y se encarga de restablecer los niveles de GSH.



**Glutati6n-S-transferasa (GSTs):** Son una familia de prote6nas solubles y su funci6n primaria es catalizar la conjugaci6n de GSH con una gran variedad de compuestos org6nicos (RX) (**reacci6n 7**) (Ruzza et al., 2009). Los metabolitos despu6s de la conjugaci6n con el GSH son m6s hidrof6licos y por lo tanto biol6gicamente inactivos, adem6s son f6cilmente excretados en la orina (Basten et al., 2002).



Las GSTs tambi6n pueden reducir muchos hidroper6xidos por medio de una acci6n peroxidasa independiente de selenio y detoxificar algunos productos de la peroxidaci6n de l6pidos como el 4-HNE (Talalay, 2000).

---

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

El incremento en la esperanza de vida del humano, ha incrementado la prevalencia de los padecimientos neurodegenerativos. Esto es importante ya que frecuentemente las consecuencias de estos padecimientos son devastadoras.

Hasta ahora no existe un tratamiento que bloquee la neurodegeneración en este tipo de enfermedades; por ello, la búsqueda de agentes que ayuden a disminuir el daño y las secuelas que se generan está justificada. Por otra parte, se sabe que la excitotoxicidad y el estrés oxidante son dos mecanismos que están involucrados en la fisiopatología de estas enfermedades.

En este contexto, se ha observado que algunos compuestos de origen natural poseen propiedades citoprotectoras contra el daño oxidante, al inducir la expresión de los genes que codifican para las enzimas de fase II. Dentro de estas enzimas, se encuentran aquellas que se encargan de la síntesis de GSH, por lo que al inducir un aumento en los niveles de este antioxidante endógeno previo al daño oxidante, es posible que se pueda evitar la muerte neuronal. Por ello, en este trabajo se evaluó si la administración del SULF, puede elevar el nivel de GSH previo a la sobreproducción temprana de especies reactivas que se induce tras la administración intraestriatal de QUIN, un agonista de los receptores NMDA que se ha sido utilizado como modelo excitotóxico/pro-oxidante en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas.

Con esto se pretende evaluar si el SULF puede servir como una herramienta terapéutica contra este tipo de enfermedades, así como mejorar el entendimiento que se tiene sobre ellas.

---

Dado lo anterior, se plantea la siguiente hipótesis:

Si el reto excitotóxico neuronal inducido con el QUIN, involucra una sobreactivación de los receptores NMDA y una sobreproducción temprana de ERO, entonces al aumentar los niveles de GSH, previo al reto excitotóxico, es posible que se disminuya el daño y la muerte neuronal que se induce tras la administración de un agonista (QUIN) de estos receptores.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Evaluar el efecto del SULF sobre las alteraciones bioquímicas, morfológicas y conductuales, que se inducen tras la administración del QUIN.

#### **3.2. Objetivos Particulares**

- I. Evaluar el efecto del SULF sobre las alteraciones conductuales e histológicas ocasionadas por la administración intraestriatal del QUIN.
  
- II. Evaluar si el tratamiento con SULF, previo al reto excitotóxico disminuye el daño oxidante inducido por el QUIN en el estriado.
  
- III. Determinar si el efecto antioxidante del SULF está relacionado con el incremento de los niveles de GSH.

---

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos

El ácido quinolínico (QUIN), la apomorfina, el o-ftaldehído (OPA), el violeta de cresilo, la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), los inhibidores de proteasas, la guanidina y la estreptomina se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU). El L,D-sulforafano (SULF) se obtuvo de LKT laboratorios (St. Paul, MN, EEUU). El formaldehído se obtuvo de J.T. Baker (Ciudad de México, México).

Todos los demás reactivos fueron grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas. Se utilizó agua desionizada obtenida con un sistema Mili-RQ (Millipore, Bedford, MA, EEUU) para preparar las soluciones.

### 4.2. Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso entre 270-320 g. Se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ( $25.8 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $50 \pm 10\%$ ) e iluminación (ciclos de 12 h luz/oscuridad) en el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico, con suministro de dieta estándar (laboratory rodent diet 5001; PMI Feed Inc., Richmond, IN, EEUU) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados en los animales se llevaron a cabo de acuerdo a las Guías para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. Durante los experimentos, se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales. El estudio realizado fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

---

### 4.3. Diseño experimental

Los animales se dividieron en 4 grupos al azar como se menciona a continuación (n = 6/grupo): (1) control (CT), recibieron solución salina (vehículo) vía intraestriatal e *i.p.*; (2) sulforafano (SULF) recibieron dos dosis de SULF *i.p.* y 5 min después de la segunda recibieron vehículo intraestriatal; (3) ácido quinolínico (QUIN), recibieron 1  $\mu$ L de QUIN vía intraestriatal y vehículo vía *i.p.*; (4) QUIN + SULF, recibieron dos dosis de SULF vía *i.p.* y QUIN vía intraestriatal, 5 minutos después de la segunda dosis de SULF.

La dosis de SULF fue 5 mg/kg en vehículo, vía *i.p.* La segunda dosis se administró 24 h después de la primera. Se administró 1  $\mu$ L de QUIN equivalente a 240 nmol, disuelto en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4.

Para la administración intraestriatal de QUIN y de solución salina, se empleó un equipo estereotáxico y una microjeringa Hamilton. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (0.2 mL/250g *i.p.*) y la administración se realizó en las siguientes coordenadas: +0.5 mm anterior al bregma, -2.6 mm lateral al bregma y +4.5 mm ventral a la dura (Paxinos & Watson, 1984).

Para el análisis histológico, los animales se sacrificaron 7 días después de la inyección con QUIN, los cerebros se removieron y se colocaron en una solución de p-formaldehído 4% durante 3 días. Para la determinación del nivel de proteínas oxidadas y de GSH, los animales se sacrificaron 4 y 8h, respectivamente, después de la inyección con QUIN y el estriado derecho se extrajo y se colocó en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso. Los tiempos elegidos a los que se sacrificaron los animales en cada medición, están basados en estudios previos (Rodríguez-Martínez et al., 2000).

---

#### **4.4. Conducta de rotación**

La conducta de rotación se evaluó 6 días después de la inyección con QUIN. Los animales se inyectaron con apomorfina (1 mg/Kg s.c.) en solución salina y cada uno se colocó en una caja de acrílico para su observación. Cinco minutos después de la inyección con apomorfina, en cada animal, se registró el número de giros ipsilaterales a la lesión durante 1 h (Santamaría et al., 1996). Cada rotación se definió como un giro completo de 360°. La apomorfina genera un reto sobre las lesiones del estriado, lo que se ve reflejado en el número de giros (Susel et al., 1989). Los datos se expresan como el número de giros ipsilaterales en 1h

#### **4.5. Tinción de Nissl**

El daño neuronal se evidenció 7 días después de la inyección con QUIN o solución salina empleando la tinción de Nissl. Los cerebros se removieron, se trataron como se mencionó anteriormente (*ver tinción de H&E*) y se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor. La tinción se realizó con algunas variaciones según un procedimiento descrito anteriormente (Prophet, 1992). Las muestras se desparafinaron durante 20 minutos, se hidrataron gradualmente en xilol seguido de alcohol hasta agua corriente. Se tiñeron con violeta de cresilo durante 1 minuto. Para hacer más evidente el contraste, las muestras se sumergieron en eosina durante 15 segundos. Luego se deshidrataron con alcohol y xilol y se montaron con Permount. Se tomaron imágenes representativas de los grupos experimentales a diferentes objetivos (5x y 40x), las imágenes se obtuvieron con el programa LEICA Qwin color (Cambridge, UK).

#### **4.6. Tinción de H&E y cuantificación de las lesiones**

Siete días después de la inyección con QUIN o de solución salina, los animales se anestesiaron vía intraperitoneal con 500 µl de pentobarbital sódico y se

---

perfundieron vía transcardiaca con solución salina que contenía heparina en una proporción de 1/500 (v/v), seguida de una solución de p-formaldehído 4% (v/v) (Rodríguez et al., 1999). Los cerebros se removieron y se fijaron en una solución de p-formaldehído 4 % durante 3 días. Posteriormente, los cerebros se deshidrataron gradualmente en etanol absoluto seguido de xilol y se embebieron en parafina. Se obtuvieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de grosor en un micrótopo 820 Histo-STAT (American Instrument Exchange, Inc., Haverhill, MA, EEUU), cada 100  $\mu\text{m}$  de corte cubriendo una distancia de 300  $\mu\text{m}$  (100  $\mu\text{m}$  anteriores y 100  $\mu\text{m}$  posteriores a la lesión). Todas la muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para la visualización de los cuerpos celulares (Silva-Adaya et al., 2008). De las mismas muestras, se realizó la medición del área tisular necrótica (ATN) y se graficó en términos de porcentaje de ATN. La medición se llevó a cabo con el programa LEICA Qwin color (Cambridge, UK). Además, se obtuvo el número de células neuronales preservadas y dañadas en 10 campos seleccionados al azar (obtenidos de 3 cortes/rata) a la altura del ventrículo derecho y a lo ancho del cuerpo estriado. La cuantificación la realizó una persona en ciego en un analizador de imágenes, IM 1000 (Leica, Cambridge, UK). El criterio seguido para la identificación de daño neuronal incluyó núcleos picnóticos, vacuolización citoplásmica, atrofia neuronal, rasgos de muerte necrótica y edema intersticial. Los datos se expresaron como porcentaje de neuronas dañadas por campo.

#### **4.7. Proteínas Oxidadas**

La medición de los grupos carbonilo formados, como producto del daño oxidante en proteínas, se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico (Reznick & Packer, 1994). Las muestras de tejido se mantuvieron en hielo y se homogenizaron en 600  $\mu\text{l}$  de amortiguador de lisis (Tris-base 10 mM, NaCl 15 mM, sacarosa 0.25 mM y tritón al 1%) pH 7.9, con 6  $\mu\text{l}$  de inhibidores de proteasas. El homogenado se



---

centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 20 minutos. Se adicionó estreptomicina 10% a 400 µl del sobrenadante y se incubaron 24 h a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se tomaron 2 alícuotas de 150 µl del sobrenadante. A una se le añadió 600 µl de DNPH 10 mM y a la otra 600 µl de HCl 2.5 M (tubo blanco). Se incubaron 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad agitando en vórtex cada 15 minutos. Se añadió a cada tubo 650 µl de ácido tricloroacético (TCA) 20%, se agitaron y se incubaron a 4°C durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugaron todos los tubos a 5000 rpm a 4°C durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. El botón se resuspendió en 600 µl de TCA 10%. Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm a 4°C durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados con etanol/acetato de etilo (1:1 v/v) para remover la DNPH libre y los lípidos contaminantes, agitando en vórtex. Después de cada lavado se centrifugaron los tubos a 5000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Después del último lavado se dejó evaporar el etanol/acetato de etilo y el botón se resuspendió en 1 ml de guanidina 6 M. Los tubos se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente. El contenido de proteínas se midió en los tubos tratados con HCl a 280 nm y el contenido de grupos carbonilo se realizó en tubos tratados con DNPH a 370 nm (a esta  $\lambda$  se detectan las hidrazonas que se forman tras la reacción de los grupos carbonilo con el DNPH). Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro (DUS30 Beckman-Coulter). Los datos se presentan como nmol de DNPH por mg de proteína.

#### **4.8. Niveles de GSH**

El nivel de GSH se midió con un ensayo fluorimétrico (Hissin & Hilf, 1976). Las muestras se mantuvieron en hielo y se sonicaron en 750 µl de amortiguador de fosfatos 0.1 M y EDTA 5 mM pH 8.0. A 500 µl del homogenado se añadió 1 ml de HPO<sub>3</sub> 25% y se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 minutos a temperatura

---

ambiente. El resto del homogenado se ocupó para cuantificar proteínas por el método de Lowry. De la muestra que contiene  $\text{HPO}_3$  se tomaron 500  $\mu\text{l}$  y se añadió 4.5 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M y EDTA 5 mM pH 8.0, se agitó. De esta mezcla se tomaron 2 alícuotas de 100  $\mu\text{l}$ , a las que se les añadió 1.8 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M y EDTA 5 mM pH 8.0 y 100  $\mu\text{l}$  de o-ftaldehído. Los tubos se incubaron 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, la señal fluorescente se registró en un espectrómetro de luminiscencia (Perkin-Elmer LS55) a 420 nm de emisión y 350 nm de excitación. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de GSH por mg de proteína (Galván-Arzate et al., 2005).

#### **4.9. Análisis estadístico**

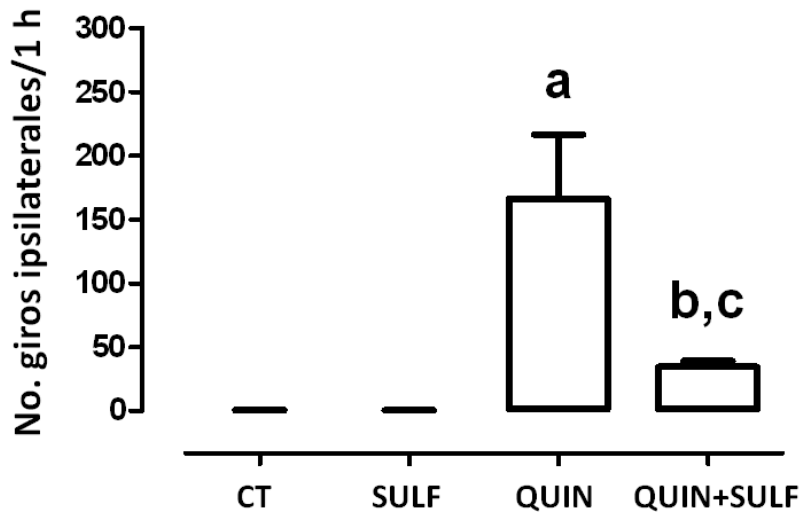
Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tuckey usando el software Prism 5.02 (GraphPad, San Diego, CA, EEUU). El área tisular necrótica se analizó por la prueba de t de student. Un valor de  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efecto del sulforafano sobre la conducta de rotación

El grupo de animales que recibió la inyección intraestriatal de QUIN mostró el mayor número de giros ipsilaterales (QUIN:  $157 \pm 30$  giros) con respecto a los otros grupos (**Figura 1**). El tratamiento con SULF previno significativamente la conducta rotatoria inducida por el QUIN (QUIN+SULF:  $40 \pm 10$  giros). Los grupos CT y SULF no presentaron este comportamiento de rotación al no realizar ningún giro ipsilateral (**Figura 1**).

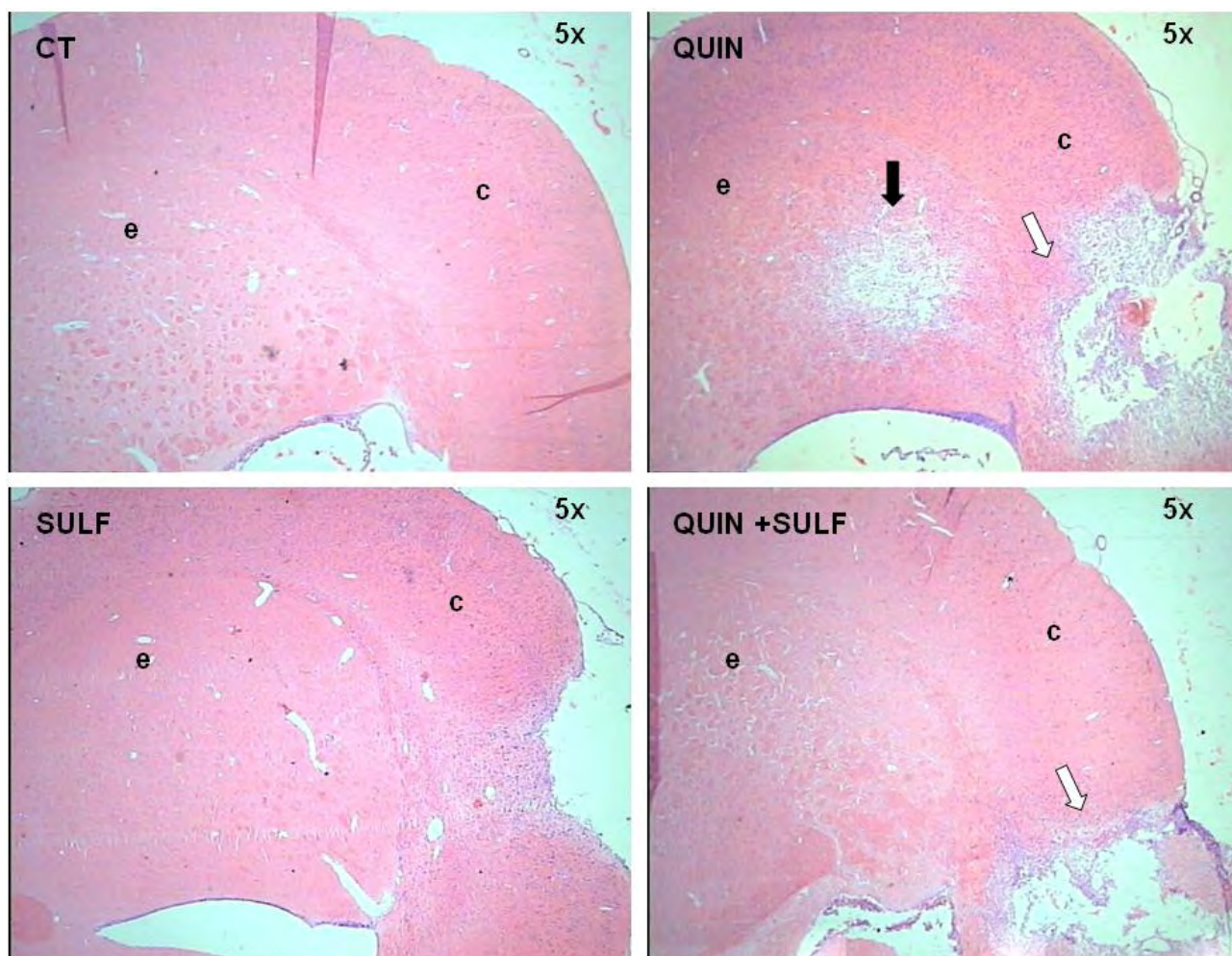


**Figura 1.** Efecto del sulforafano (SULF) sobre la conducta de rotación inducida por el ácido quinolínico (QUIN). Se presenta el número de giros ipsilaterales que realizó cada grupo durante 1 h, 5 minutos después de la administración de apomorfina (1 mg/Kg, s.c.). La medición se realizó 6 días después de la inyección con QUIN (240 nmol). Los animales tratados con SULF recibieron 2 dosis de 5 mg/kg. Los valores son la media  $\pm$  SEM (n=6). <sup>a</sup>P<0.001 vs grupo CT y SULF, <sup>b</sup>P<0.05 vs grupo QUIN y <sup>c</sup>P<0.003 vs grupo CT.

### 5.2. Tinción de Nissl

En la **figura 2** se presentan las fotografías representativas del lóbulo derecho de cada grupo obtenidas 7 días después de la administración del QUIN. Se observa el área dañada como consecuencia de la difusión del QUIN siendo el estriado la

región más afectada. El tratamiento con SULF, disminuye el daño en el estriado de forma considerable (QUIN+SULF). El grupo SULF presenta solo daño mecánico en la corteza, ocasionado por la microinyección, ya que en el estriado no se observa daño (SULF).

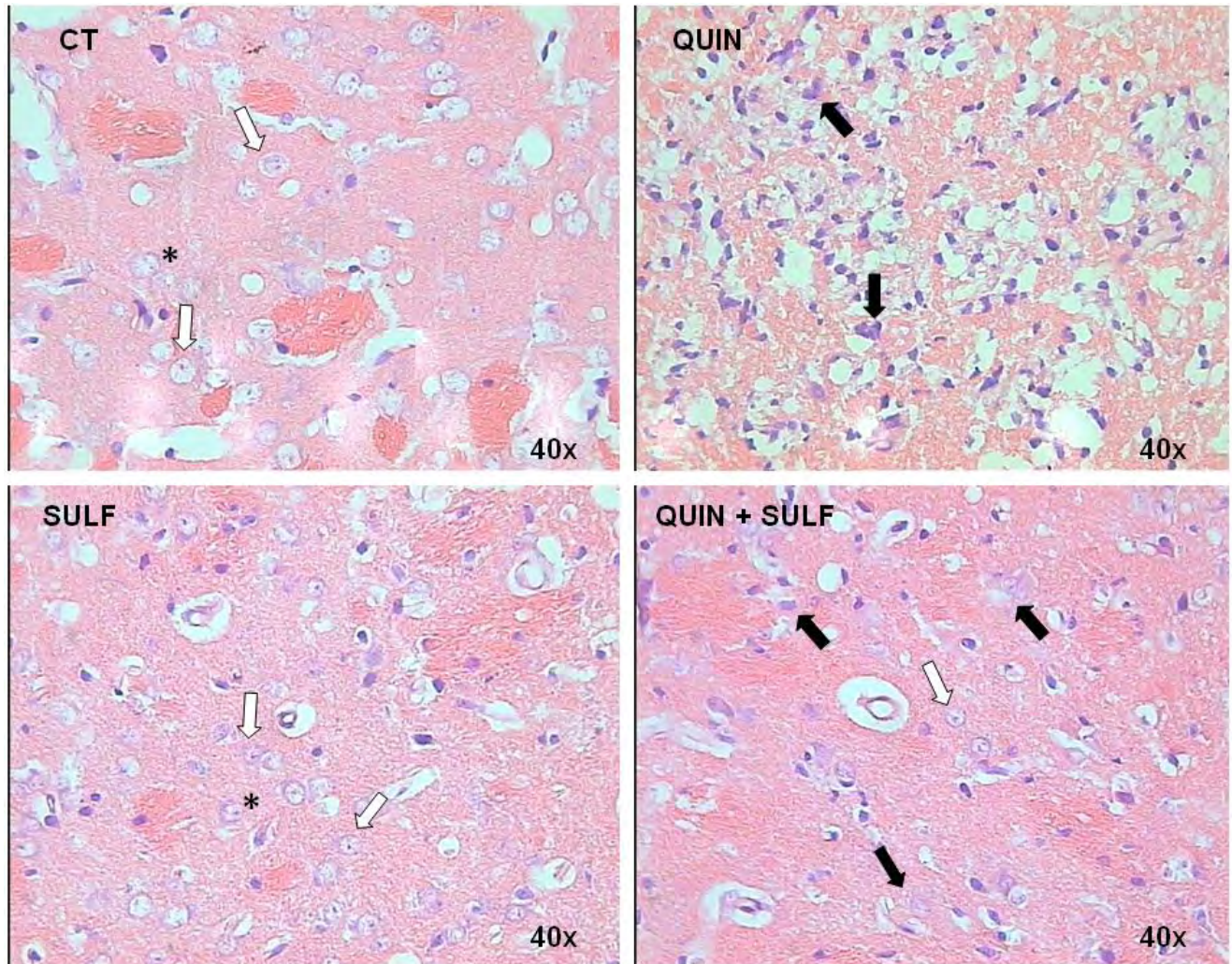


**Figura 2.** Tinción de Nissl (5x). Las flechas blancas indican el daño mecánico ocasionado en la corteza (c) por al microinyección de salina o QUIN. La flecha negra señala el área del estriado (e) dañada por el QUIN.

En la **figura 3** se observa que el grupo tratado con QUIN presenta un gran número de células dañadas y muertas, siendo notable el daño que existe en el neurópilo y el edema reticular. También se observan células del sistema inmune (microglia) así como muchos linfocitos. El grupo que recibió el tratamiento con SULF, presenta



una notable disminución en el número de células dañadas, así como el daño sobre el neurópilo. En los grupos CT y SULF, no se observa daño significativo en las neuronas ni en el neurópilo, por lo que son detectables los cuerpos de Nissl.

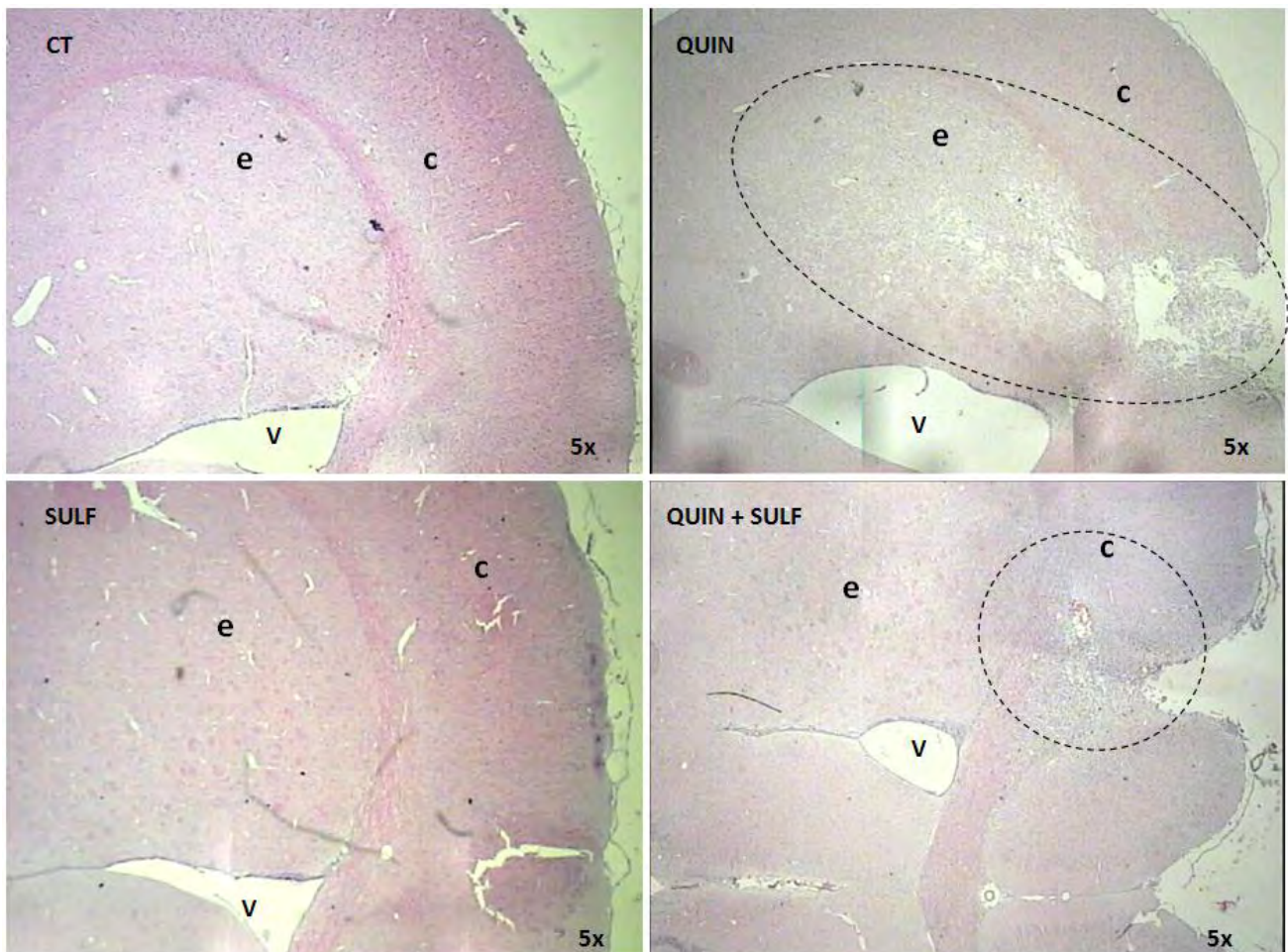


**Figura 3.** Tinción de Nissl (40x). Las flechas blancas señalan células sanas características del estriado. Las flechas negras señalan células dañadas, en proceso de muerte necrótica y apoptótica. El asterisco indica una célula con cuerpos de Nissl. Se observa que el grupo QUIN presenta el mayor número de células dañadas, por su parte el grupo QUIN+SULF presenta una disminución importante en el número de células muertas y sobre el daño al neurópilo.

### 5.3. Tinción H&E: Área necrótica tisular

Para visualizar y dimensionar el daño que genera la inyección del QUIN en el estriado, se midió el área tisular necrótica. Se observa que el QUIN difunde al estriado a la altura del ventrículo (lugar donde se realizó la toma de las fotografías) (**Figura 4A**), en la corteza el daño observado se debe principalmente al paso mecánico de la microinyección. El tratamiento con SULF reduce considerablemente el porcentaje de área necrótica en el estriado (**Figura 4B**). La cuantificación del área tisular necrótica se realizó solo en los grupos que recibieron QUIN, debido a que en la tinción de Nissl solo se observó daño mecánico en el grupo que recibió SULF y solución salina en el estriado (Figura 2).

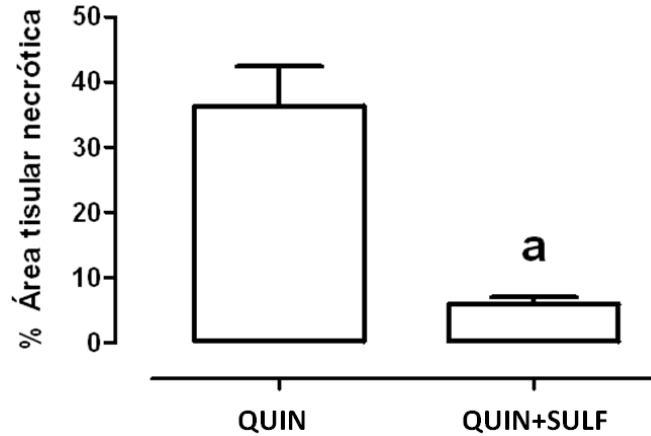
Panel A)





---

Panel B)

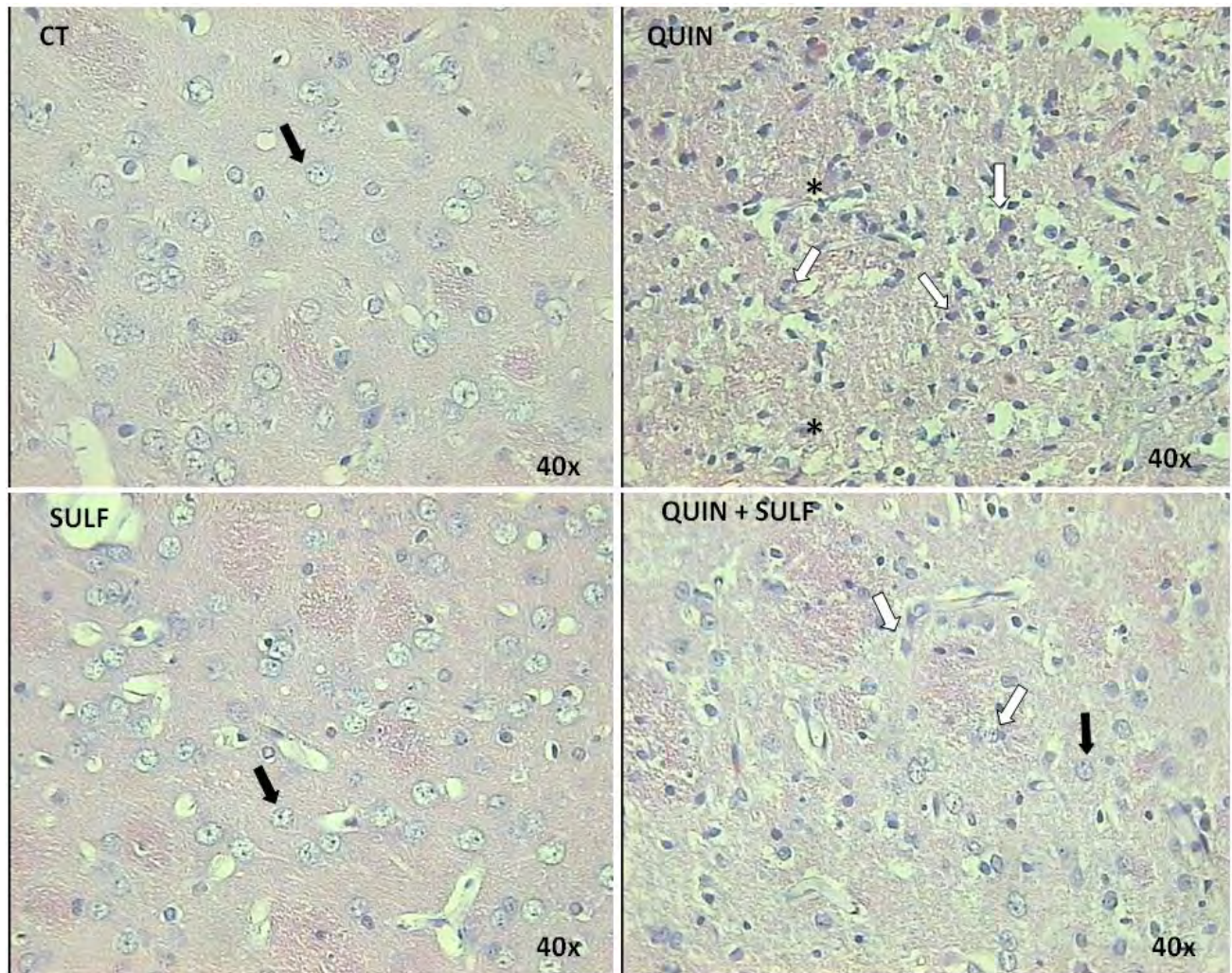


**Figura 4.** Área tisular necrótica de los grupos. En el panel A), se observa el alcance del daño ocasionado por el ácido quinolínico (QUIN). Se aprecia que el área necrótica empieza en la corteza (c) y se difunde hacia el estriado (e); mientras que en el grupo QUIN +SULF, se observa una menor área afectada en el estriado. En el panel B), se grafica el porcentaje del área tisular necrótica de los grupos QUIN y QUIN+SULF. V: ventrículo. Los valores son la media  $\pm$  SEM (n=6). <sup>a</sup>P<0.0084 vs grupo QUIN.

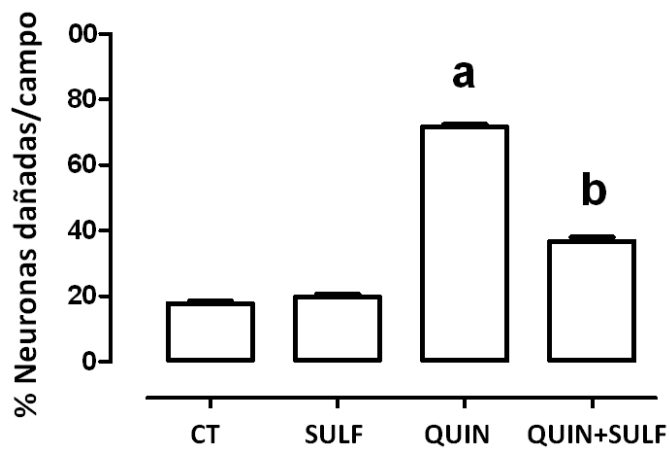
#### 5.4. Tinción de H&E: alteraciones morfológicas

La tinción de H&E se realizó para evaluar la histología convencional de las neuronas del estriado. La administración intraestriatal de QUIN provocó daño y muerte neuronal, se observan características de muerte por necrosis como: son núcleos picnóticos, cariorrexis, cariolisis; así como, algunas neuronas apoptóticas. El daño del estriado se acompaña por edema y daño en el neurópilo, producto del proceso agudo de inflamación generado por el QUIN (**Figura 5A**). En el análisis histológico en el grupo QUIN + SULF, 7 días después de la administración con QUIN, se observa que el tratamiento con SULF redujo significativamente el porcentaje de células dañadas hasta en un 50%, con respecto al porcentaje del grupo QUIN (**Figura 5B**). El grupo CT presenta un daño neuronal basal, el cual no presenta cambios significativos al recibir las dosis de SULF (grupo SULF).

Panel A)



Panel B)



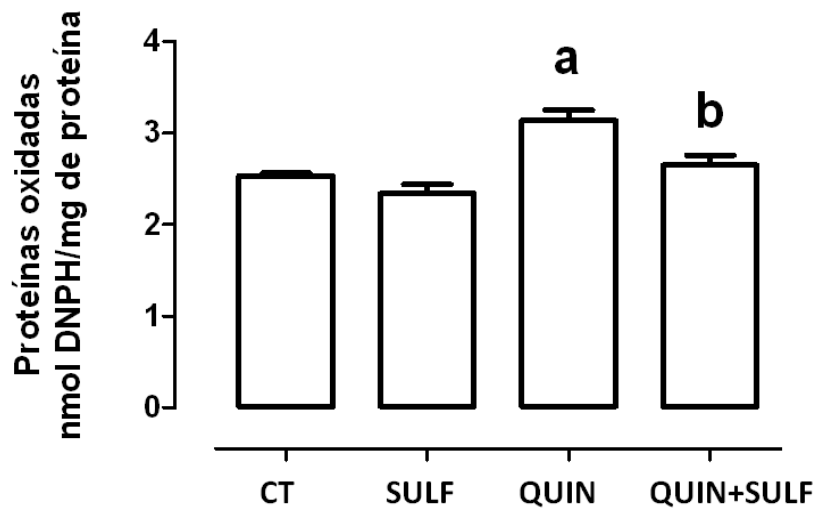
**Figura 5.** Análisis histológico mediante la tinción de H&E. En el panel A), se muestra la imagen representativa de cada grupo (40x). Se observan células características del estriado (flechas negras), neuronas necróticas (flechas blancas) y células apoptóticas (\*). En el panel B), se presenta el porcentaje de neuronas dañadas/campo tras el tratamiento con SULF y con la inyección de QUIN. Los valores son la media  $\pm$  SEM (n=6). <sup>a</sup>P<0.001 vs grupo CT y SULF, <sup>b</sup>P<0.001 vs grupo CT y QUIN.



---

## 5.5. Proteínas oxidadas

El contenido de grupos carbonilo incrementó significativamente en el grupo de animales tratados con QUIN ( $3.1 \pm 0.29$  nmol DNPH/mg de proteína), comparado con el grupo CT ( $2.5 \pm 0.08$  nmol DNPH/mg de proteína). Este efecto se revirtió parcialmente por el tratamiento con SULF (grupo QUIN+SULF:  $2.6 \pm 0.27$  nmol DNPH/mg de proteína) (**Figura 6**). Por otra parte el contenido de carbonilos en los grupos CT y SULF no cambió, aunque se observa una tendencia (no significativa) a disminuir en el grupo SULF.



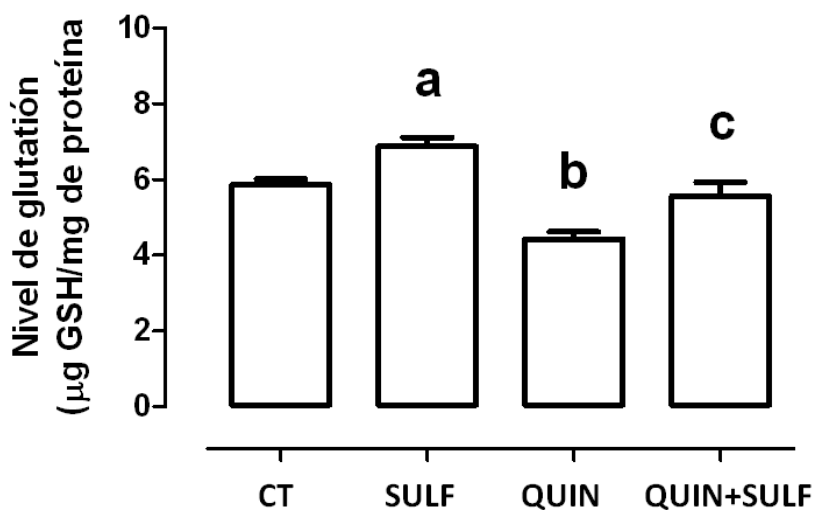
**Figura 6.** Contenido de grupos carbonilo en el estriado de los cuatro grupos. La determinación se realizó 8 h después del tratamiento con QUIN. Los valores son la media  $\pm$  SEM (n=6). <sup>a</sup>P<0.001 vs grupo CT y SULF, <sup>b</sup>P<0.05 vs grupo QUIN.

## 5.6. Niveles de GSH

El nivel de GSH en el estriado derecho de los animales del grupo CT fue de  $5.8 \pm 0.4$   $\mu$ g/mg de proteína. El tratamiento con SULF indujo un aumento significativo (SULF:  $6.9 \pm 0.6$   $\mu$ g/mg de proteína). Por otro lado, el tratamiento con QUIN induce una caída en los niveles de GSH con respecto a los del grupo CT (QUIN:  $4.4 \pm 0.5$   $\mu$ g/mg de proteína) y el pre-tratamiento con SULF logró prevenir la caída de los niveles de

---

GSH (QUIN + SULF:  $5.6 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína), mostrando una protección total tras el daño oxidante del QUIN (**Figura 7**).



**Figura 7.** Nivel de GSH medidos 4 h después de la administración del QUIN. La medición se hizo mediante un ensayo flourimétrico descrito anteriormente. Los valores son la media  $\pm$  SEM (n=6). <sup>a</sup>P<0.05 vs grupo CT, QUIN y QUIN+SULF, <sup>b</sup>P<0.01 vs grupo CT y <sup>c</sup>P<0.05 vs el grupo QUIN.

---

## 6. DISCUSIÓN

El QUIN actúa como un agonista de los receptores NMDA y es considerado como una neurotoxina capaz de semejar diferentes eventos excitotóxicos observados en algunas enfermedades neurodegenerativas. Se ha descrito que su mecanismo tóxico en el Sistema Nervioso Central no está vinculado solamente a la sobreactivación de los receptores NMDA, si no que involucra daño oxidante y un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Cruz-Aguado et al., 2000).

### *Tinción de H&E*

La capacidad del QUIN para generar ERO y ERN, pone de manifiesto sus propiedades pro-oxidantes, que se reflejan en alteraciones bioquímicas y morfológicas que ocasionan en la neurona daño y muerte celular. Se ha reportado que la alteración de la función mitocondrial genera bajos niveles de ATP conduciendo a la neurona a la muerte por necrosis (Ankarcrona et al., 1995). Entre los cambios que sufre la neurona se encuentran: inflamación mitocondrial, dilatación del retículo endoplásmico, seguida de una extensa vacuolización del citoplasma, hinchazón celular y eventualmente su lisis sin la formación de vesículas (Syntichaki & Tavernarakis, 2003). Algunos de estos cambios se observan en las neuronas de los animales tratados con QUIN (**Figura 5A**). Todas las alteraciones celulares están presentes principalmente en las neuronas del estriado y están acompañados por daño al neuropilo. En la corteza, el daño que se observa es producto principalmente de la microinyección (**Figura 4A**). A medida que la célula muere como producto del evento necrótico, ocurren cambios en la cromatina de las neuronas volviéndose laxa, para posteriormente perder la tinción del núcleo (cariolisis) (Majno & Joris, 1995). Como consecuencia de la lisis celular, los componentes celulares son liberados dentro del espacio intracelular, perjudicando células vecinas e induciendo una respuesta inflamatoria. Por esta razón, en las

---

fotografías que muestran el daño producido por el QUIN, aparece una gran cantidad de células de la microglia y de linfocitos que llegan a la zona del daño como respuesta al proceso inflamatorio. El tratamiento con SULF previene el daño que se induce con la inyección del QUIN.

#### *Tinción de Nissl*

Para tener otra prueba histológica sobre el daño neuronal al que se exponen las células del estriado tras la administración del QUIN, se realizó la tinción de Nissl. Con esta tinción se observan los cuerpos de Nissl que están presentes en las neuronas (Kádár et al., 2009). Los cuerpos de Nissl son fragmentos de retículo endoplásmico rugoso, que contienen ARNr por lo que pueden teñirse con colorantes básicos como el violeta de cresilo (Cragg, 1970). Tras el daño neuronal, los cuerpos de Nissl se pierden como consecuencia de los cambios morfológicos inducidos por el QUIN. Así que su presencia puede ser indicativa de viabilidad celular. Estudios realizados en cortes de corteza e hipocampo muestran que tras el evento de isquemia/reperfusión, se pierde en forma considerable el número de células teñidas con el violeta de cresilo y que el tratamiento con SULF revierte esta disminución (Ping et al., 2010). En este estudio, en las fotografías obtenidas con la tinción de Nissl, se muestra que en los animales tratados con QUIN disminuye el número de células teñidas, predominando linfocitos y macrófagos; además de estar presente el edema en el neurópilo (**Figura 3**). El grupo que recibió el tratamiento previo con sulforafano, presenta un mayor número de células teñidas con respecto al grupo con QUIN, sugiriendo que el SULF protege contra los cambios morfológicos (daños necróticos) neuronales ocasionados por el QUIN (**Figura 2**).

---

### *QUIN y su efecto excitotóxico*

Los animales tratados con QUIN presentan daño histológico y alteraciones bioquímicas, que se reflejan en la conducta de rotación (**Figura 1**). El daño celular puede estar relacionado con ciertas alteraciones metabólicas. Por ejemplo, se sabe que la administración intraestriatal de QUIN produce alteraciones progresivas en el funcionamiento mitocondrial, lo que genera una disminución en la producción de ATP. La subsecuente disminución en los niveles de ATP, puede conducir a la incapacidad de las neuronas para mantener el balance iónico, lo que podría causar fugas de neurotransmisores y contribuir así a la sobreactivación de los receptores NMDA (Pérez-De la Cruz et al., 2010). Estos resultados sugieren que las alteraciones en el metabolismo energético forman parte de la cascada de eventos tóxicos desatados por el QUIN (Bordelon et al., 1997). Los efectos del QUIN en el estriado comprenden una afluencia masiva de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que a su vez podría ser responsable de las anomalías del metabolismo energético, conduciendo a la degeneración y la muerte celular. Se ha demostrado que como consecuencia de la administración de QUIN en el estriado, ocurren alteraciones en la actividad de la ATPasa-de  $\text{Ca}^{2+}$ -sarco/retículo endoplásmico, lo cual implica cambios en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Fernandes et al., 2008). Todos estos eventos ocasionan un estado de estrés oxidante en las neuronas tratadas con QUIN lo que finalmente llevará a la muerte neuronal. Como se mencionó anteriormente la excitotoxicidad participa en varios desórdenes neurodegenerativos, por lo que la atenuación de los eventos que suceden durante el proceso excitotóxico, proveen una posible herramienta para tratar este tipo de enfermedades.

---

### *Proteínas oxidadas*

La formación de grupos carbonilo resulta de la oxidación de las proteínas, producto de la formación desmesurada de especies reactivas oxidantes. Las alteraciones en el funcionamiento mitocondrial y la pérdida en la homeostasis de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, generan una sobreproducción de ERO y ERN, y por lo tanto un estado de estrés oxidante en la neurona. En los resultados se demuestra un incremento significativo en el contenido de grupos carbonilo en los animales tratados con QUIN (**Figura 6**), lo que indica que la producción de ERO superó los niveles controlables por las defensas antioxidantes endógenas y que éstas se encuentran disminuidas (Rodríguez-Martínez et al., 2000). Además, se ha visto que el QUIN posee propiedades pro-oxidantes, ya que 2 h después de la microinyección de QUIN en el cuerpo estriado se induce lipoperoxidación (Santamaría & Ríos, 1993). También se ha demostrado que el QUIN tiene la habilidad de inducir la producción de  $\text{O}_2^-$  (Maldonado et al., 2010) y de formar tempranamente radicales hidroxilo (hasta 30 veces más que los niveles basales) (Santamaría et al., 2001), los cuales pueden reaccionar con macromoléculas, tales como las proteínas ó los lípidos. Los resultados obtenidos en este trabajo, aunados a los anteriores indican que el daño oxidante en las proteínas forma parte importante de la cascada de eventos tóxicos generados por el QUIN. Por otra parte, la administración previa de SULF en el grupo QUIN+SULF, redujo significativamente la cantidad de grupos carbonilo (**Figura 6**). El efecto protector del SULF podría estar relacionado con su capacidad de inducir las enzimas de fase II como la HO-1, la NQO1, la GR y la GPx, entre otras (Yoon et al., 2008). En células de músculo liso de aorta de rata se ha observado un incremento, dependiente de la concentración de SULF, de la cantidad de las enzimas de fase II (SOD, CAT, GR, GST, y NQO1), así como en los niveles de ARNm (Zhu et al., 2008). En neuronas se ha visto que el SULF actúa de forma

---

similar, pues es capaz de ejercer efectos citoprotectores asociados con su capacidad de inducir la expresión y la actividad de las enzimas de fase II (GST, GR, tiorredoxina reductasa y NQO1) en un modelo neurotóxico de Parkinson (Vauzour et al., 2010). El SULF también es capaz de aumentar los niveles de ARNm de la HO-1 y reducir el volumen de infarto en un modelo de isquemia/reperfusión en rata (Zhao et al., 2006). El tratamiento con SULF previene el daño inducido por la isquemia/hipoxia y disminuye la lipoperoxidación en corteza e hipocampo (Ping et al., 2010). Todos estos estudios, así como los resultados obtenidos en trabajo reflejan las propiedades antioxidantes del SULF sugiriendo su posible uso como neuroprotector en el tratamiento de enfermedades degenerativas.

#### *Niveles de glutatión*

Las defensas antioxidantes endógenas constituyen un mecanismo celular crucial contra la neurotoxocidad mediada por la sobreproducción de EROs. Se ha demostrado irrefutablemente de que la administración intraestriatal de QUIN genera una disminución de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. El QUIN reduce significativamente la actividad de la enzima CuZn-SOD citosólica y reduce hasta en un 50 % los niveles de GSH, mientras que los niveles de GSSG aumentan (Rodríguez-Martínez et al., 2000). En este estudio se encontró que los niveles de GSH disminuyeron significativamente en el estriado de los animales que recibieron QUIN (**figura 7**), lo cual es consistente con informes previos, en los que también se encontró una disminución en el nivel de GSH (30%) asociado con una disminución de la actividad de GR (-20%) y con un aumento en la actividad de la GST (Cruz-Aguado et al., 2000). En este último trabajo los autores sugieren que el aumento en la actividad de la GST ocurre para compensar el aumento en la producción de ERO y que la reducción de la actividad de la GR pueden ser la causa (o un factor de contribución) para el déficit de los niveles de GSH originados por el

---

QUIN. Estos estudios confirman que la excitotoxicidad en el estriado inducida por el QUIN está asociada con la generación de un estado oxidante en etapas tempranas, afectando directamente los sistemas de defensa antioxidantes.

Como se mencionó anteriormente el GSH juega un papel crucial en muchas funciones fisiológicas, principalmente manteniendo la homeostasis redox intracelular. Debido a esto, sus niveles intracelulares son de vital importancia durante los retos oxidantes (como el que se observa al administrar el QUIN). Además, las enzimas encargadas de sus síntesis deben estar en niveles adecuados y presentar una actividad óptima para producir cantidades suficientes de GSH para defender a la célula.

Por esta razón numerosos estudios han buscado compuestos que permitan mantener elevados los niveles de las defensas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) tras el reto oxidante que se presenta en varias enfermedades agudas y crónicas. En este trabajo, se encontró que el tratamiento con SULF completamente previene la disminución en los niveles de GSH inducida por el QUIN (**Figura 7**). Además, el nivel de GSH aumentó en el grupo que recibió solo SULF (**Figura 7**). Estos resultados sugieren que el efecto protector del SULF podría estar relacionado con su capacidad de inducir la activación del factor Nrf2 (Yoon et al., 2008) y el subsiguiente incremento en la expresión de los genes que codifican para las enzimas relacionadas con la síntesis del GSH; ya que los genes de estas enzimas contienen los elementos de respuesta antioxidante (ARE), que es la región a la cual se une el factor Nrf2. En estudios *in vitro* se ha descrito que el SULF aumenta los niveles de la GCL (McWalter et al., 2004), enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de GSH, por lo que la inducción de esta enzima, puede contribuir con toda seguridad al aumento de los niveles de GSH.



---

## 7. CONCLUSIONES

- I. El SULF disminuyó la conducta rotatoria y las alteraciones morfológicas inducidas por el QUIN.
- II. El efecto protector del SULF podría estar asociado con sus propiedades antioxidantes ya que disminuyó el nivel de proteínas oxidadas y previene la disminución de los niveles de GSH.
- III. La utilización del SULF podría proveer una herramienta terapéutica en la prevención y el tratamiento de ciertas enfermedades neurodegenerativas.

## 8. PERSPECTIVAS

- I. Demostrar si el efecto del SULF está asociado con la activación del factor de transcripción Nrf2.
- II. Ver si el aumento en los niveles de GSH que se encontró en el grupo tratado con SULF, involucra la inducción de la enzima de fase II encargada de su síntesis: la glutamina-L-cisteín ligasa (GCL).
- III. Evaluar el papel de las enzimas asociadas al metabolismo del GSH: glutatión peroxidasa (GPx), glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión reductasa (GR).

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera P, Chánez-Cárdenas ME, Floriano-Sánchez E, Barrera D, Santamaría A, Sánchez-González DJ, Pérez-Severiano F, Pedraza-Chaverrí J, Jiménez PD. 2007. Time-related changes in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the rat striatum in a model of Huntington's disease. *Neurotoxicology*. 28(6):1200-7.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(17):7915-22.

Angeloni C, Leoncini E, Malaguti M, Angelini S, Hrelia P, Hrelia S. 2009. Modulation of phase II enzymes by sulforaphane: implications for its cardioprotective potential. *J Agric Food Chem*. 57(12):5615-22.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 15(4):961-73.

Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. 2008. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci*. 108(3):227-38.

Bains JS, Shaw CA. 1997. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev*. 25(3):335-58.

Barton D, Ollis WD. 1979. Ed. Board. *Comprehensive organic chemistry: the synthesis and reactions of organic compounds*. Vol. 3, Pergamon, New York, USA: pp. 461-77.

Basten GP, Bao Y, Williamson G. 2002. Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells. *Carcinogenesis*. 23(8):1399-404.

---

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(7):517-29.

Bordelon YM, Chesselet MF, Nelson D, Welsh F, Erecińska M. 1997. Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem.* 69(4):1629-39.

Boveris A, Chance B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 134(3):707-16.

Braidy N, Grant R, Adams S, Brew BJ, Guillemin GJ. 2009 Mechanism for quinolinic acid cytotoxicity in human astrocytes and neurons. *Neurotox Res.* 16(1):77-86.

Brigelius-Flohé R. 1990. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med.* 27(9-10):951-65.

Buchholz JN, Behringer EJ, Pottorf WJ, Pearce WJ, Vanterpool CK. 2007. Age-dependent changes in Ca<sup>2+</sup> homeostasis in peripheral neurones: implications for changes in function. *Aging Cell.* 6(3):285-96.

Butcher SP, Hamberger A. 1987. In vivo studies on the extracellular, and veratrine-releasable, pools of endogenous amino acids in the rat striatum: effects of corticostriatal deafferentation and kainic acid lesion. *J Neurochem.* 48(3):713-21.

Chirino YI, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverrí J. 2006. Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Rev Invest Clín.* 58(4):350-8.

Commandeur JN, Stijntjes GJ, Vermeulen NP. 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol Rev.* 47(2):271-330.

---

Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. 2008. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology*. 246(1):24-33.

Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 262(5134):689-95.

Cragg BG. 1970. What is the signal for chromatolysis? *Brain Res*. 23(1):1-21.

Cruz-Aguado R, Francis-Turner L, Díaz CM, Antúnez I. 2000. Quinolinic acid lesion induces changes in rat striatal glutathione metabolism. *Neurochem Int*. 37(1):53-60.

Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Talalay P. 2001. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(6):3404-9.

Dong XX, Wang Y, Qin ZH. 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 30(4):379-87.

Dorado-Martínez C, Rugerio-Vargas C, Rivas-Arancibia S. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*. 46(6):229-35.

Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. 62(6):649-71.

Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82(1):47-95.

Estrada-Sánchez AM, Mejía-Toiber J, Massieu L. 2008. Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch Med Res*. 39(3):265-76.

---

Fahey JW, Talalay P. 1999. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol.* 37(9-10):973-9.

Fan J, Hu Z, Zeng L, Lu W, Tang X, Zhang J, Li T. 2008. Golgi apparatus and neurodegenerative diseases. *Int J Dev Neurosci.* 26(6):523-34.

Fernandes AM, Landeira-Fernandez AM, Souza-Santos P, Carvalho-Alves PC, Castilho RF. 2008. Quinolate-induced rat striatal excitotoxicity impairs endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase function. *Neurochem Res.* 33(9):1749-58.

Fimognari C, Hrelia P. 2007. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutat Res.* 635(2-3):90-104.

Foster AC, Vezzani A, French ED, Schwarcz R. 1984. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci Lett.* 48(3):273-8.

Foster KA, Galeffi F, Gerich FJ, Turner DA, Müller M. 2006. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Prog Neurobiol.* 79(3):136-71.

Galgano F, Favati F, Caruso M, Pietrafesa A, Natella S. 2007. The influence of processing and preservation on the retention of health-promoting compounds in broccoli. *J Food Sci.* 72(2):S130-5.

Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverrí J, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Vázquez-Román B, Ríos C, Santamaría A. 2005. Delayed effects of thallium in the rat brain: regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers, but moderate alterations in antioxidants, after a single administration. *Food Chem Toxicol.* 43(7):1037-45.

---

Gao SS, Chen XY, Zhu RZ, Choi BM, Kim BR. 2010. Sulforaphane induces glutathione S-transferase isozymes which detoxify aflatoxin B(1)-8,9-epoxide in AML 12 cells. *Biofactors*. 36(4):289-96.

Garthwaite G, Garthwaite J. 1987. Quinolinate mimics neurotoxic actions of N-methyl-D-aspartate in rat cerebellar slices. *Neurosci Lett*. 79(1-2):35-9.

Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I. 2004. S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med*. 8(2):201-12.

González-Cortés C, Salinas-Lara C, Gómez-López MA, Tena-Suck ML, Pérez-De La Cruz V, Rembao-Bojórquez D, Pedraza-Chaverrí J, Gómez-Ruiz C, Galván-Arzate S, Ali SF, Santamaría A. 2008. Iron porphyrinate Fe(TPPS) reduces brain cell damage in rats intrastrially lesioned by quinolinate. *Neurotoxicol Teratol*. 30(6):510-9.

Greenamyre JT. 1986. The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease. *Arch Neurol*. 43(10):1058-63.

Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R. 2004. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis*. 17(3):455-61.

Guillemin GJ, Brew BJ. 2002. Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. *Redox Rep*. 7(4):199-206.

Gunter TE, Pfeiffer DR. 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*. 258(5 Pt 1):C755-86.

Hague SM, Klaffke S, Bandmann O. 2005. Neurodegenerative disorders: Parkinson's disease and Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 76(8):1058-63.

---

Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 97(6):1634-58.

Harrison R. 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic Biol Med.* 33(6):774-97.

Hissin PJ, Hilf R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 74(1):214-26.

Hollmann M, Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 17:31-108.

Innamorato NG, Rojo AI, García-Yagüe AJ, Yamamoto M, de Ceballos ML, Cuadrado AJ. 2008. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J Immunol.* 181(1):680-9.

Janáky R, Varga V, Hermann A, Saransaari P, Oja SS. 2000. Mechanisms of L-cysteine neurotoxicity. *Neurochem Res.* 25(9-10):1397-405.

Juge N, Mithen RF, Traka M. 2007. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci.* 64(9):1105-27.

Kádár A, Wittmann G, Liposits Z, Fekete C. 2009. Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *J Neurosci Methods.* 184(1):115-8.

Klatt P, Lamas S. 2000. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem.* 267(16):4928-44.

Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M. 2006. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol.* 26(1):221-9.

---

Kohen R, Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30(6):620-50.

Koppenol WH. 2001. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep.* 6(4):229-34.

Lipton SA, Nicotera P. 1998. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium.* 23(2-3):165-71.

Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146(1):3-15.

Maldonado PD, Chánez-Cárdenas ME, Barrera D, Villeda-Hernández J, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J. 2007. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is involved in the neuronal death induced by quinolinic acid in rats. *Neurosci Lett.* 425(1):28-33.

Maldonado PD, Molina-Jijón E, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J. 2010. NAD(P)H oxidase contributes to neurotoxicity in an excitotoxic/prooxidant model of Huntington's disease in rats: protective role of apocynin. *J Neurosci Res.* 88(3):620-9.

Mattson MP. 2007. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell.* 6(3):337-50.

Matusheski NV, Jeffery EH. 2001. Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *J Agric Food Chem.* 49(12):5743-9.

McKenna MC. 2007. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res.* 85(15):3347-58.



---

McWalter GK, Higgins LG, McLellan LI, Henderson CJ, Song L, Thornalley PJ, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. 2004. Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates. *J Nutr.* 134(12 Suppl):3499S-506S.

Migliore L, Coppedè F. 2009. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res.* 674(1-2):73-84.

Miller DM, Buettner GR, Aust SD. 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med.* 8(1):95-108.

Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Aldinio C. 1984. The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several mammals and its cortical content increases during the aging process. *Neurosci Lett.* 47(1):51-5.

Nakamura T, Gu Z, Lipton SA. 2007. Contribution of glutamatergic signaling to nitrosative stress-induced protein misfolding in normal brain aging and neurodegenerative diseases. *Aging Cell.* 6(3):351-9.

Nakanishi S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* 258(5082):597-603.

Nakao N, Grasbon-Frodl EM, Widner H, Brundin P. 1996. Antioxidant treatment protects striatal neurons against excitotoxic insults. *Neuroscience.* 73(1):185-200.

Nestle M. 1998. Broccoli sprouts in cancer prevention. *Nutr Rev.* 56(4 Pt 1):127-30.

Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 284(20):13291-5.

---

Nicotera P, Lipton SA. 1999. Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19(6):583-91.

Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK. 2010. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol.* 244(1):37-42.

Pasantes H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia R. 1999. Enfermedades neurodegenerativas, mecanismos celulares y moleculares. Fondo de Cultura Económica. Mexico.

Paxinos G, Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Press.

Pérez-De la Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaría A. 2010. Huntington's disease and mitochondrial alterations: emphasis on experimental models. *J Bioenerg Biomembr.* 42(3):207-15.

Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Galván-Arzate S, Medina-Campos ON, Pérez-Severiano F, Ali SF, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A. 2005. Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron (III). *Neuroscience.* 135(2):463-74.

Ping Z, Liu W, Kang Z, Cai J, Wang Q, Cheng N, Wang S, Wang S, Zhang JH, Sun X. 2010. Sulforaphane protects brains against hypoxic-ischemic injury through induction of Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Brain Res.* 1343:178-85.

Prophet BE. 1992. Laboratory methods in histotechnology AFIP. *Am Reg Pathol.*

Reznick AZ, Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233:357-63.

---

Ríos C, Santamaría A. 1991. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res.* 16(10):1139-43.

Rodríguez E, Méndez-Armenta M, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Barroso-Moguel R, Rodríguez F, Ríos C, Santamaría A. 1999. Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum. *Toxicology.* 139(1-2):111-8.

Rodríguez-Martínez E, Camacho A, Maldonado PD, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría D, Galván-Arzate S, Santamaría A. 2000. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res.* 858(2):436-9.

Rosa AO, Rapoport SI. 2009. Intracellular- and extracellular-derived Ca (2+) influence phospholipase A(2)-mediated fatty acid release from brain phospholipids. *Biochim Biophys Acta.* 1791(8):697-705.

Ruzza P, Rosato A, Rossi CR, Floreani M, Quintieri L. 2009. Glutathione transferases as targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 9(7):763-77.

Santamaría A, Ríos C. 1993. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett.* 159(1-2):51-4.

Santamaría A, Ríos C, Solís-Hernández F, Ordaz-Moreno J, González-Reynoso L, Altagracia M, Kravzov J. 1996. Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology.* 35(1):23-8.

Santamaría A, Jiménez-Capdeville ME, Camacho A, Rodríguez-Martínez E, Flores A, Galván-Arzate S. 2001. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport.* 12(12):2693-6.

---

Schliebs R. 2004. Molecular mechanisms of neurodegeneration and neuroprotection--experimental approaches and the diseased brain. *Int J Dev Neurosci.* 22(7):441-2.

Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 267(16):4904-11.

Schwarcz R, Tamminga CA, Kurlan R, Shoulson I. 1988. Cerebrospinal fluid levels of quinolinic acid in Huntington's disease and schizophrenia. *Ann Neurol.* 24(4):580-2.

Schwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar KV, Muchowski PJ. 2010. Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol.* 90(2):230-45.

Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* 15(6):252-9.

Sheldon AL, Robinson MB. 2007. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int.* 51(6-7):333-55.

Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K. 2004. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev.* 45(3):250-65.

Silva-Adaya D, Pérez-De La Cruz V, Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Villeda-Hernández J, Binienda Z, Ali SF, Santamaría A. 2008. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J Neurochem.* 105(3):677-89.

Sims NR, Zaidan E. 1995. Biochemical changes associated with selective neuronal death following short-term cerebral ischaemia. *Int J Biochem Cell Biol.* 27(6):531-50.

---

Stone TW. 2001. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol.* 64(2):185-218.

Stone TW, Behan WM, MacDonald M, Darlington LG. 2000. Possible mediation of quinolinic acid-induced hippocampal damage by reactive oxygen species. *Amino Acids.* 19(1):275-81.

Sumimoto H. 2008. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* (13):3249-77.

Syntichaki P, Tavernarakis N. 2003. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci.* 4(8):672-84.

Talalay P. 2000. Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactors.* 12(1-4):5-11.

Tapia R, Medina-Ceja L, Peña F. 1999. On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem Int.* 34(1):23-31.

Tapia R, Corona JC. 2005. Neurodegeneration Mechanisms. *Mensaje Bioquímico,* Vol XXIX. 17-27.

Ting KK, Brew BJ, Guillemin GJ. 2009. Effect of quinolinic acid on human astrocytes morphology and functions: implications in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 6 (36):1-13.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84.

---

Vasanthi HR, Mukherjee S, Das DK. 2009. Potential health benefits of broccoli- a chemico-biological overview. *Mini Rev Med Chem*. 2009 Jun;9(6):749-59.

Vauzour D, Buonfiglio M, Corona G, Chirafisi J, Vafeiadou K, Angeloni C, Hrelia S, Hrelia P, Spencer JP. 2010. Sulforaphane protects cortical neurons against 5-S-cysteinyldopamine-induced toxicity through the activation of ERK1/2, Nrf-2 and the upregulation of detoxification enzymes. *Mol Nutr Food Res*. 54(4):532-42.

Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A, Ciska E, Holst B, Rowland I, De Schrijver R, Hansen M, Gerhäuser C, Mithen R, Dekker M. 2009. Glucosinolates in Brassica vegetables: the influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Mol Nutr Food Res*. 53 Suppl 2:S219.

Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. 2008. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*. 60(9):575-90.

Xie C, Lovell MA, Markesbery WR. 1998. Glutathione transferase protects neuronal cultures against four hydroxynonenal toxicity. *Free Radic Biol Med*. 25(8):979-88.

Yoon HY, Kang NI, Lee HK, Jang KY, Park JW, Park BH. 2008. Sulforaphane protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through induction of the Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol*. 75(11):2214-23.

Zádori D, Klivényi P, Vámos E, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L. 2009. Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. *J Neural Transm*. 116(11):1403-9.

Zhao J, Kobori N, Aronowski J, Dash PK. 2006. Sulforaphane reduces infarct volume following focal cerebral ischemia in rodents. *Neurosci Lett*. 393(2-3):108-12.

---

Zhao X, Sun G, Zhang J, Strong R, Dash PK, Kan YW, Grotta JC, Aronowski J. 2007. Transcription factor Nrf2 protects the brain from damage produced by intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 38(12):3280-6.

Zhu H, Jia Z, Strobl JS, Ehrich M, Misra HP, Li Y. 2008. Potent induction of total cellular and mitochondrial antioxidants and phase 2 enzymes by cruciferous sulforaphane in rat aortic smooth muscle cells: cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Cardiovasc Toxicol*. 8(3):115-25.