



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto del peroxinitrito en la síntesis de ácido kinurénico
empleando como precursores D- y L-kinurenina en cerebelo de
rata: un estudio *in vivo* e *in vitro*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Tonali Blanco Ayala

**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Verónica Pérez de la Cruz
2013**





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

<p>1. Datos del alumno Blanco Ayala Tonali 56 511 882 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 307761987</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. Verónica Pérez de la Cruz</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr. José Pedraza Chaverri</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dra. Liliana Carmona Aparicio</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dra. Iris Natzielly Serratos Álvarez</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Efecto del peroxinitrito en la síntesis de ácido kinurénico empleando como precursores D- y L- kinurenina en cerebelo de rata: un estudio <i>in vivo</i> e <i>in</i> <i>vitro</i>. 62 p 2013</p>

Dedicatorias

Agradecimientos

**Efecto del peroxinitrito en la síntesis de ácido
kinurénico empleando como precursores D- y L-
kinurenina en cerebelo de rata: un estudio *in vivo* e *in
vitro*.**

Índice

1. ABREVIATURAS	8
2.0 RESUMEN.....	10
3.0 ANTECEDENTES	11
3.1 ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO	11
3.1.1 Radicales libres y especies reactivas del oxígeno	11
3.1.2 Peroxinitrito (ONOO ⁻)	11
3.1.3 ERO, ERN, radicales libres y daño a macromoléculas.....	13
3.1.4 Estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas	14
3.2 MECANISMOS ANTIOXIDANTES	16
3.3 VÍA DE LAS KYNURENINAS (VK)	17
3.3.1 Metabolitos neuroactivos de la VK	18
3.3.2 Vías de síntesis de KYNA	20
3.3.2.1 D-aminoácidos en la síntesis de KYNA.....	21
3.3.2.2 ERO/ERN y la formación de KYNA	22
3.4 KYNA en enfermedades neurodegenerativas.....	24
3.5 KYNA como antioxidante	24
3.6 KYNA en cerebelo	25
3.7 CEREBELO	26
3.7.1 Generalidades.....	26
3.7.2 Astrocitos, neurotransmisores y receptores presentes en cerebelo	29
3.7.2.1 Acetilcolina	29
3.7.2.2 Glutamato	29
3.7.2.3 GABA.....	30
3.7.2.4 Catecolaminas	30
3.7.2.5 Serotonina	31
3.7.3 Funciones no-motoras del cerebelo	32
4.0 JUSTIFICACIÓN	33
5.0 HIPÓTESIS	34
6.0 OBJETIVO GENERAL	34
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
7.0 MÉTODOS	35
7.1 Materiales y animales.....	35
7.2 Síntesis de ONOO ⁻	35
7.3 Experimentos in vivo	36
7.3.1 Cirugía estereotáxica.....	36
7.3.1.1 Establecimiento del área de implante	36
7.3.1.2 Implantación de cánulas.....	36
7.3.2 Microdiálisis.....	37
7.4 Preparación de homogenados e incubación.....	38
7.5 Cuantificación de KYNA por HPLC	39
7.5.1 Muestras de microdiálisis.....	39
7.5.2 Muestras de homogenados	39
8.0 RESULTADOS	40
8.1 Experimentos in vivo	40
8.1.1 Producción de KYNA in vivo a partir de la infusión de D-KYN ó L-KYN por microdiálisis en el cerebelo de ratas Wistar.....	40
8.1.2 Efecto del AOAA en los niveles extracelulares de KYNA in vivo a partir de L- y D-KYN en cerebelo.....	41

8.1.3 Efecto del ONOO⁻ en los niveles extracelulares de KYNA a partir de L- y D-KYN en cerebelo.	43
8.2 Experimentos in vitro	44
8.2.1 Efecto de inhibidores de la DAAO y el inhibidor AOAA no específico de las KAT en la producción de KYNA a partir de L-KYN en homogenados de cerebelo.	44
8.2.2 Efecto del ONOO⁻ en la producción de KYNA a partir de L-KYN en presencia de inhibidores de la DAAO y el inhibidor AOAA no específico de las KAT en homogenados de cerebelo.	46
8.2.3 Efecto de inhibidores de la DAAO y el inhibidor AOAA no específico de las KAT en la producción de KYNA a partir de D-KYN en homogenados de cerebelo.	48
8.2.4 Efecto del ONOO⁻ en la producción de KYNA a partir de D-KYN en presencia de inhibidores de la DAAO y del AOAA en homogenados de cerebelo.	50
9.0 DISCUSIÓN:	52
10.0 CONCLUSIONES	57
11.0 PERSPECTIVAS	58
12.0 Bibliografía	59

1. ABREVIATURAS

AA	ácido antranílico
AB	ácido benzoico
AK	ácido kójico
AOAA	ácido aminoxiacético
ChAT	colina acetiltransferasa
cP	células de Purkinje
DA	dopamina
DAAO	D-aminoxidasa
D-KYN	D-kynurenina
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	esclerosis lateral amiotrófica
EP	Enfermedad de Parkinson
ERBr	Especies reactivas de bromo
ERCl	Especies reactivas de cloro
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GABA	γ-aminobutírico
GB	glía de Bergman
GSH	glutación
3-HA	ácido 3-hidroxiantranílico
3-HAO	3-hidroxiantranilato dioxigenasa
3-HK	3-hidroxikinurenina
5-HT	serotonina
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
IDO	indolamina deshidrogenasa
KAT	Kinurenina aminotransferasa
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
KYNA	Ácido kinurénico
L-KYN	L-kynurenina
nAChR	Receptores α-7-nicotínicos
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
NO ₂ ⁺	ión nitronio

NO ₂	dióxido de nitrógeno
3, 5 MCP	3-ácido carboxílico-5-metilpirrasol
OH•	radical hidroxilo
O ₂ ⁻	anión superóxido
¹ ΔO ₂	oxígeno singlete
OH*	radical hidroxilo
ONOO ⁻	Anión peroxinitrito
ONOOH	ácido peroxinitroso
PIC	ácido piconílico
P5P	piridoxal-5-fosfato
QPRT	quinolinato fosforibosil transferasa
QUIN	ácido quinolínico
RL	radicales libres
RNA _m	RNA mensajero
rNMDA	receptores N-metil-D-aspartato
rAMPA	receptores ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónicos
ROO•	radical peroxilo
SOD	succinato deshidrogenasa
TDO	triptófano deshidrogenasa
TNF-α	factor de necrosis tumoral
VK	Vía de las kynureninias

2.0 RESUMEN

El KYNA es un metabolito endógeno resultado del catabolismo del L-TRP, antagonista de receptores glutamatérgicos tipo NMDA y de nAChR, con efectos neuroprotectores y anticonvulsivos además de un importante rol en la regulación glutamatérgica y dopaminérgica. KYNA es sintetizado en cerebro de manera preferencial por las KAT (I y II). Sin embargo, los niveles aumentados de KYNA en enfermedades neurodegenerativas como EA, EP y EH, no han podido ser atribuidos directamente sólo a la acción enzimática. Por lo que, recientemente diversos grupos han reportado rutas alternativas de formación en cerebro que involucran al enantiómero D-KYN y a la interacción de los precursores con ERO. El elevado consumo de oxígeno en el cerebro da pie al aumento de ERO/ERN como el ONOO⁻, que es un agente oxidante con niveles de síntesis aumentados en condiciones patológicas. En este proyecto, exploramos mecanismos alternativos de síntesis de KYNA en cerebelo de rata a través de la interacción directa entre el ONOO⁻ y los precursores D-KYN ó L-KYN, en modelos *in vitro* e *in vivo*. Los resultados obtenidos en ambos modelos reflejan que la presencia de ONOO⁻ incrementa los niveles de KYNA a partir de ambos precursores. En los experimentos *in vitro* el ONOO⁻ estimula la producción de KYNA a partir de L-KYN en un ≈286.14% mientras que a partir de D-KYN lo hace en un 282.38%. El mismo fenómeno sucede en los experimentos *in vivo* en los que la producción de KYNA incrementa ≈285.63% a partir de L-KYN y ≈151.9% a partir de D-KYN. Para descartar que el efecto observado con ONOO⁻ estuviese relacionado directamente con la acción enzimática utilizamos inhibidores para las KAT y la DAAO. El porcentaje de inhibición del AOAA a partir de L-KYN fue de ≈85.12% y para D-KYN sólo el 27.03%. Este efecto fue observado también *in vivo*, ya que la producción de KYNA a partir de L-KYN en presencia de AOAA fue abatida en un porcentaje mayor al 50% mientras que con D-KYN, sólo fue de ≈11.4%. Finalmente, dada la alta concentración de la DAAO en la glía de cerebelo, probamos en homogenados el efecto en los niveles de KYNA en presencia de varios de sus inhibidores: 3,5 MCP, AK ó AB. Tanto el AK como el AB logran disminuir de manera significativa los niveles de KYNA a partir de ambos enantiómeros, sin embargo, el efecto es más evidente en el caso de D-KYN. El inhibidor 3,5 MCP no disminuye de manera significativa los niveles de KYNA a partir de L-KYN no así para D-KYN en donde los disminuye en un ≈65%. Tanto el AK como el AB han sido reportados como atrapadores de ERO, por lo que la disminución en los niveles de KYNA en presencia de ONOO⁻ puede estar enmascarada por esta acción antioxidante. Derivado de estos resultados, se propone un mecanismo alternativo, no enzimático, de formación de KYNA que implica la interacción directa entre el ONOO⁻ y ambos precursores de KYNA.

3.0 ANTECEDENTES

3.1 ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

El estrés oxidativo/nitrosativo se define como el desbalance entre las especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno y los mecanismos endógenos antioxidantes. Se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes causando daño y muerte celular.

3.1.1 Radicales libres y especies reactivas del oxígeno

Los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado y pueden existir de forma independiente. La inestabilidad de su configuración electrónica les confiere una alta reactividad, siendo ésta la base de su toxicidad y de su corta vida media (Mitjavila *et al*, 2001; Boots *et al*, 2008).

Normalmente en los organismos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los derivados del oxígeno. Se utiliza el término especies reactivas del oxígeno (ERO) como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas de la reducción incompleta del oxígeno, incluyendo tanto los derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes fácilmente convertibles en radicales. De las ROS destacan el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el oxígeno singulete ($^1\Delta\text{O}_2$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De forma análoga existen especies reactivas del cloro (ERCl), del bromo (ERBr) y del nitrógeno (ERN) (Halliwell, 2006). Una vez formados, éstas especies reactivas son capaces de interactuar entre sí, dando lugar a radicales libres y especies aún más reactivas. Por ejemplo, el óxido nítrico (NO) y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ pueden estar presentes de manera simultánea y reaccionar rápidamente para dar lugar al peroxinitrito (ONOO^-) (Beckman *et al*, 1990).

3.1.2 Peroxinitrito (ONOO^-)

El ONOO^- es un potente agente oxidante capaz de reaccionar directamente con distintos blancos celulares (Quijano *et al.*, 1997; Radi *et al.*, 1991). En condiciones

patológicas se ha reportado que la forma inducible de la óxido nítrico sintasa está incrementada en diversos tipos celulares amplificando la velocidad de síntesis de óxido nítrico, que a su vez, reacciona con el anión superóxido aumentando directamente los niveles de ONOO^- (Beckman et al., 1994). En sitios de inflamación se observa la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se activa en células musculares lisas y en macrófagos, generando un aumento en la concentración de óxido nítrico del orden de micromolar (Moncada et al, 1989). La concentración de O_2^- también se ve aumentada en procesos inflamatorios durante la estimulación de neutrófilos y macrófagos (Marletta et al, 1988; Moncada et al,1991; Koppenol, 1992). Macrófagos activados y neutrófilos son capaces de producir NO y O_2^- a tasas similares. Durante su descomposición, en sistemas fisiológicos, el ONOO^- es capaz de iniciar reacciones que dan lugar a potentes oxidantes tales como el OH^\bullet , ión nitronio (NO_2^+) y el dióxido de nitrógeno (NO_2). El peroxinitrito existe en un equilibrio de protonación con un $\text{pKa} = 6.8$ (Radi et al, 1991), por lo que la relación entre la forma protonada (ONOOH) y desprotonada (ONOO^-) depende del pH local, en condiciones fisiológicas (pH 7.4) un 80 % se encuentra en forma aniónica (Radi et al, 2000). La inusual estabilidad del ONOO^- como anión contribuye a su toxicidad, ya que le permite difundirse lejos de su sitio de formación e incluso traspasar membranas celulares. A pH fisiológico el ONOO^- puede volverse altamente reactivo, mediante tres distintas rutas: 1) la descomposición mediada por el ión hidrógeno para formar un intermediario denominado ácido peroxinitroso ONOOH , el cual tras una ruptura homolítica da lugar al OH^\bullet y NO_2 (Beckman et al, 1990), 2) reacción directa del anión con grupos sulfhidrilos (Radi et al., 1991), y 3) reacción con iones metálicos para formar un potente agente nitrosativo similar al NO_2^+ (Ischiropoulos et al, 1992, Beckman et al/ 1992). Debido a las diferentes moléculas blanco con las que puede reaccionar a nivel celular, el peroxinitrito tiene una vida media menor a los 100 ms que le permite un potencial traslado intra o extracelular no mayor a los 20 μm (Radi et al, 1998; Romero et al, 1999). Los efectos biológicos y su detección dependen de la habilidad para

atravesar membranas celulares. En ese sentido se ha comprobado que tanto la especie aniónica (ONOO⁻) mediante canales aniónicos, como la forma protonada (ONOOH) mediante difusión pasiva son capaces de hacerlo y ambos procesos coexisten a pH fisiológico (Marla *et al*, 1997; Denicola *et al*, 1998).

Sin embargo, dado que la velocidad de reacción con diversas moléculas blanco es similar a la velocidad de difusión del peroxinitrito, el hecho de que ocurra reacción o difusión va a depender de factores como la concentración de los blancos potenciales, el sitio de formación y concentración del peroxinitrito, la cinética con los blancos presentes y la difusión (Romero *et al*, 1999). Independientemente de los derivados radicales que pueda formar al sufrir homólisis, el peroxinitrito es capaz de reaccionar directamente con distintas moléculas blanco mediante la oxidación por uno o dos electrones. Cuando la oxidación ocurre por dos electrones la molécula de peroxinitrito (ONOO⁻ o ONOOH) reacciona con una cinética de segundo orden que depende de la concentración de la molécula blanco, de modo que la constante aparente de descomposición de peroxinitrito aumenta en forma lineal con la concentración de ésta (figura 7, reacciones I y II) (Radi *et al*, 2000, 2001). Puede reaccionar además de forma directa con tioles presentes en el sitio activo de ciertas peroxirredoxinas (ej: triparredoxina peroxidasa) en el orden $10^5 - 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Trujillo *et al*, 2004), y en aminoácidos libres, albúmina y glutatión, entre otros, con constantes cinéticas que se encuentran en el orden de $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Radi *et al*, 1991; Quijano *et al*, 1997).

Finalmente, dada su naturaleza oxidante, el ONOO⁻, por si sólo, o dando lugar a otros agentes oxidantes, es capaz de causar peroxidación lipídica, oxidación de grupos sulfhidrilo, daño al ADN, hidroxilación, así como la oxidación de centros Fe-S y Zn-tiolato (Sampson *et al.*, 1996).

3.1.3 ERO, ERN, radicales libres y daño a macromoléculas

Debido a su alta reactividad, tanto ERO como ERN y radicales libres, pueden ocasionar daño celular, siendo potencialmente tóxicos, mutagénicos o carcinogénicos. El ADN, los lípidos y las proteínas son las macromoléculas más sensibles al daño

oxidativo. En la Fig. 1.0, se muestra la formación cronológica de ERO durante la cadena respiratoria en la mitocondria, culminando en la formación de $\text{OH}\cdot$ el cual es capaz de interaccionar directamente con lípidos y ADN. Además de dar lugar a mutaciones, la interacción directa de las especies reactivas y radicales libres con el ADN puede provocar otras alteraciones tales como, el rompimiento de la hebra de ADN, entrecruzamiento de enlaces peptídicos-ADN y oxidación de purinas induciendo muerte celular por apoptosis (Dizdaroglu *et al*, 2002; Waris y Ahsan, 2006). Por otro lado, el daño a lípidos es el campo más estudiado dentro de las interacciones de las especies reactivas y macromoléculas. Debido a sus enlaces dobles, los ácidos grasos poliinsaturados son excelentes blancos para las especies reactivas, las cuales al interaccionar con ellos ocasionan peroxidación lipídica, este fenómeno es una reacción en cadena que inicia cuando el ácido graso blanco pierde un átomo de hidrógeno convirtiéndose en un radical lipídico, éste a su vez reacciona con el oxígeno creando un radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). Este radical peroxilo dará lugar a un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico por sustracción de un átomo de hidrógeno de un segundo ácido graso y, así sucesivamente de una molécula a otra. Finalmente, la interacción que puedan tener con las proteínas puede causar daños que incluyen peroxidación, cambios en su estructura terciaria, alteración de determinados residuos de aminoácidos, e incluso fragmentación, inactivación y degradación proteica (Davis, 1987) esto puede dar como resultado severas alteraciones como pérdida de la actividad enzimática, en el balance energético e interferencia con los potenciales de membrana (Kohen y Niska, 2002).

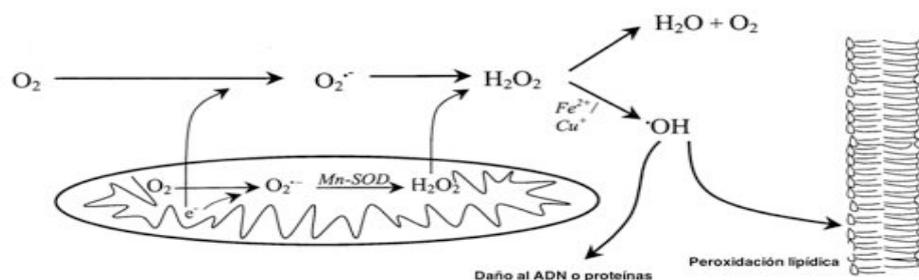
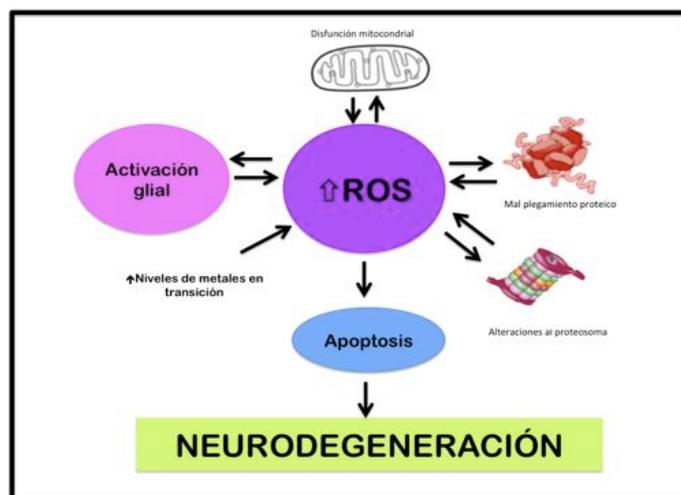


Fig. 1.0 Modificado de Nordberg & Arnér, 2001. Esquema simplificado que muestra la generación cronológica de las especies reactivas de oxígeno y radicales libres, y

3.1.4 Estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas

El cerebro utiliza cerca del 20% del total de oxígeno consumido por el cuerpo, el cual puede dar lugar a la producción de radicales libres y a un aumentado número de ERO y ERN. La particular susceptibilidad del cerebro por ERO/ERN se le atribuye a su alta tasa metabólica y a su reducida capacidad de regeneración celular. El proceso de neurodegeneración ha sido atribuido a la interacción de varios factores, incluyendo factores ambientales y predisposición genética. Sin embargo, el desbalance en el estado redox del organismo, así como alteraciones en los niveles y metabolismo de algunos metales, es una de las teorías más sólidas dentro del estudio de las enfermedades neurodegenerativas, siendo que la mayoría de las características en estas enfermedades presentan estos factores en común. La enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) son algunas enfermedades neurodegenerativas asociadas a componentes oxidativos. Todas ellas tienen en común disfunción mitocondrial, un aumentado daño oxidativo, agregación anormal de proteínas y proteosomas, alteraciones en el metabolismo de metales (principalmente Fe), inflamación y excitotoxicidad (Rivas-Arancibia *et al*, 2011), algunos de estos factores se encuentran representados en la figura 2.0 en donde se esquematiza que al converger todos, dan lugar a un proceso de neurodegeneración. Además que varios indicadores de daño oxidativo por ERO/ERN han sido reportados dentro de las regiones cerebrales específicas que presentan una neurodegeneración selectiva para cada enfermedad.

Fig. 2.0 Modificada de Federico *et al.*, 2012. Esquematización de los distintos mecanismos celulares que contribuyen a la neurodegeneración.



3.2 MECANISMOS ANTIOXIDANTES

La cantidad excesiva de ERO/ERN o radicales libres necesita ser controlada convirtiéndolos en moléculas inocuas o bien, atrapándolas justo después de su formación. Estos mecanismos protectores en conjunto, constituyen el sistema de defensa antioxidante cuyo objetivo es prevenir el daño celular por radicales libres y especies reactivas que pueden estar relacionadas con enfermedades neurodegenerativas y en general, a las características propias del envejecimiento. El objetivo principal de los sistemas antioxidantes es entonces, mantener la homeostasis redox en el organismo. Estos sistemas pueden ser exógenos o endógenos. Dentro de los exógenos encontramos a los antioxidantes naturales como la vitamina A (retinol), C (ácido ascórbico) y E (tocoferol), además de los antioxidantes polifenólicos como los flavonoides. Dentro de los sistemas endógenos, destacan los sistemas de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa, aldehído deshidrogenasa y sulfiredoxina, todos pertenecientes a la clase de sistemas antioxidantes enzimáticos; por otra parte encontramos al glutatión (GSH) dentro de los sistemas antioxidantes endógenos no enzimáticos y el cual representa la defensa antioxidante más importante en el sistema nervioso central (Main *et al*, 2012) Sin embargo, además de estos sistemas, en el organismo se han desarrollado otros mecanismos que contribuyen a combatir la generación excesiva de especies reactivas y radicales libres. Un ejemplo de estos sistemas, es el correspondiente a la vía de las kinureninas la cual da lugar a la síntesis de metabolitos capaces de atrapar eficientemente especies reactivas y radicales libres (Lugo-Huitrón *et al*, 2012).

3.3 VÍA DE LAS KYNURENINAS (VK)

La vía de las kinureninas (VK; Fig 3.0) es la principal ruta catabólica dentro del metabolismo del triptófano en mamíferos (Wolf, 1974). Más del 95% del triptófano ingerido de la dieta es dirigido hacia esta ruta, mientras que sólo el 1% es convertido a serotonina (5-HT) (Peters, 1991). La VK se encuentra presente en humanos, roedores y otros mamíferos, principalmente en cerebro e hígado; es la responsable de la biosíntesis del nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y otros metabolitos neuroactivos, a los que nos referiremos como kinureninas; éstos incluyen a: kinurenina (KYN) (Lapin *et al*, 1982), ácido kinurénico (KYNA), 3-hidroxicinurenina (3-HK) (Eastman, 1989; Moroni, 1999), ácido picolínico (PIC) (Melillo *et al*, 1996) y ácido quinolínico (QUIN) (Lapin *et al*, 1982; Shwarcz *et al*, 1983; Stone, 1993). La localización celular de la VK está demostrada en macrófagos (Heyes *et al*, 1996), células de la microglía (Espey *et al*, 1997) y astrocitos (Moffett *et al*, 1993, Saito *et al*, 1993b; Speciale & Shwarcz, 1993). Han sido detectadas dos enzimas diferentes para el inicio de la degradación del triptófano, las cuales dependen del tejido: En hígado, el anillo indólico del L-triptófano es abierto oxidativamente por la triptófano dioxigenasa (TDO) para producir N-formil kinurenina. En cerebro, así como en otros tejidos periféricos, la enzima responsable de esta reacción es la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). La N-formil kinurenina es transformada a L-kinurenina (L-KYN) por la L-KYN formamidasa, precursor inmediato de tres distintas enzimas: kinureninasa (formando ácido antranílico, AA), kinurenina 3-hidroxisilasa (formando 3-HK) y kinurenina aminotransferasa (KAT; formando KYNA, por transaminación irreversible). Descendiendo en la ruta, a partir de la 3-HK, la kinureninasa, una enzima piridoxal-fosfato dependiente, localizada en el dominio citosólico, da lugar al ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HA), o bien, a través de la hidroxilación del ácido antranílico por enzimas microsomales de hidroxilación. Posteriormente, la enzima 3-hidroxi-antranilato dioxigenasa (3-HAO) abre el anillo de 3-HA para producir un intermediario inestable (2-amino-3-carboximuconato semialdehído) que es transformado inmediatamente a

QUIN. Finalmente, el QUIN es transformado a NAD^+ gracias a la enzima quinolato fosforibosil transferasa (QPRT), localizada en astrocitos.

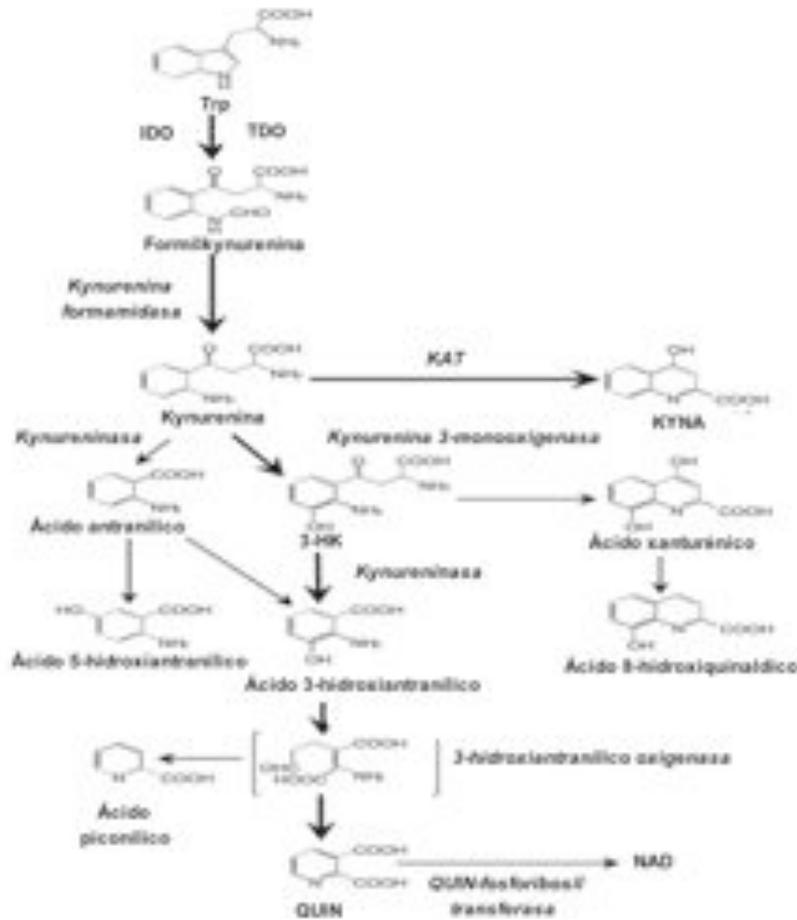


Figura 3.0 Vía de la kinureninas (modificada de Rodgers *et al*, 2009)

3.3.1 Metabolitos neuroactivos de la VK

QUIN, es un agonista endógeno de los receptores N-metil-D-aspartato (nNMDA) para glutamato, se le atribuyen efectos neurotóxicos debido a su habilidad para inducir la activación excesiva de los nNMDA, provocando un incremento del Ca^{2+} citosólico, agotamiento del ATP y del ácido γ -aminobutírico (GABA) así como la muerte apoptótica específica de neuronas GABAérgicas y colinérgicas (Foster *et al*, 1983; Schwarcz *et al*, 1984; Santamaría & Ríos, 1993; Stone, 1993; Moroni *et al*, 1999; Chiarugi *et al*, 2001). Esta neurotoxina ha sido ampliamente utilizada para inducir químicamente, en modelos de animales (Schwarcz *et al*, 1983; Beal *et al*, 1986), la enfermedad de Huntington (EH); ya que una sola dosis intraestriatal de QUIN (100

nmol) es capaz de mimetizar varias de las características neuroquímicas e histológicas de la enfermedad (Schwarcz *et al*, 1983; Beal *et al*, 1986, Ferrante *et al*, 1993). Además de que el desbalance en su producción ha sido implicada en diversos desórdenes neurodegenerativos (Stone y Perkins, 1981; Moroni *et al*, 1986; Schwarcz *et al*, 1988; Heyes *et al*, 1990, 1992; Stone, 1993; Heyes, 1996)

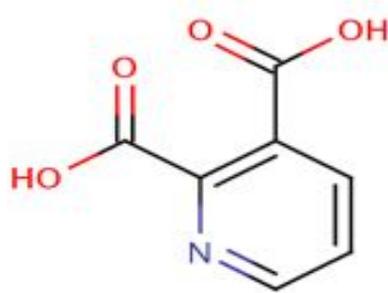


Fig. 4.0 Estructura química del ácido quinolínico (QUIN)

KYNA, ha sido ampliamente reportado como antagonista de receptores ionotrópicos (IC_{50} : $>100 \mu M$) (Perkins y Stone, 1982; Stone, 1993). A concentraciones fisiológicas (50–100 nM), actúa selectivamente como antagonista en los rNMDA para glutamato (bloqueando el sitio co-agonista para glicina; IC_{50} : $\approx 8 \mu M$; Parsons *et al.*, 1997), así como inhibidor no competitivo para el receptor α -7-nicotínico (α 7nACh; IC_{50} : $\approx 7 \mu M$; Hilmas *et al.*, 2001). KYNA ejerce acciones anticonvulsivas y antiexcitotóxicas (Foster *et al*, 1984), propiedades neuroprotectoras que se le atribuyen principalmente a su antagonismo sobre los receptores para aminoácidos excitadores. Reportes en estriado, sugieren que el incremento en los niveles de KYNA resulta en una marcada reducción de los niveles de glutamato (Carpenedo *et al*, 2001; Rassoulpour *et al*, 2005a), este efecto se encuentra mediado por un mecanismo dependiente de los α 7nACh, que a su vez da lugar a un descenso en los niveles extracelulares de dopamina (DA) (Rassoulpour *et al*, 2005a) sugiriendo un rol importante tanto en la transmisión glutamatérgica como en la dopaminérgica. Además recientemente se ha reportado como ligando para el receptor GPR-35 expresado en células de los ganglios

basales y las pertenecientes al sistema inmune (Wang et al, 2006); la expresión de este receptor se encuentra aumentada durante la inflamación, por lo que, se ha propuesto que KYNA puede incidir sobre él inhibiendo las señales proinflamatorias, como la secreción del factor de necrosis tumoral TNF- α . Variaciones en los niveles de KYNA se han ligado a distintas patologías y enfermedades neurodegenerativas. Un aumento en los niveles de KYNA ha sido asociado con eventos anticonvulsivos (Foster *et al*, 1984), alteraciones cognitivas (Shwarcz *et al*, 2002), esquizofrenia (Erhardt *et al*, 2003), Alzheimer (Baran *et al*, 1999), Esclerosis Lateral Amiotrófica (Füvesi *et al*, 2012). Mientras que, un descenso en los niveles de KYNA ha sido reportado en enfermedades neurodegenerativas tales como: Parkinson, Esclerosis múltiple y Huntington (Shwarcz & Pellicciari, 2002)

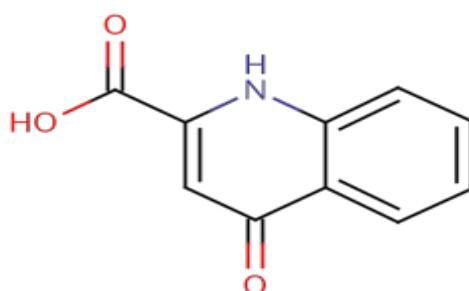


Fig. 5.0 Estructura química del ácido kinurénico (KYNA)

3.3.2 Vías de síntesis de KYNA

El KYNA en cerebro, es sintetizado en los astrocitos a partir de su precursor inmediato L-kinurenina y liberado rápidamente hacia el medio extracelular (Carpenedo *et al*, 2001; Rassolpour *et al*, 2005a). La transformación de kinurenina a KYNA es principalmente atribuida a la transaminación irreversible del precursor por las kinurenina aminotransferasas I y II (KAT I y II), localizadas preferencialmente en las células gliales (Guillemin *et al.*, 2001). Siendo la KAT II la principal responsable de esta reacción dado que su pH óptimo se encuentra dentro del rango fisiológico (pH 7.4) a diferencia de la KAT I (pH 9.6) (Guidetti *et al.*, 1997). Ambas enzimas poseen una baja afinidad por su sustrato (≈ 1 mM) en comparación a la kynurenina 3-

monooxigenasa (KMO) quien posee el valor más bajo de Km ($78\mu\text{M}$) y con ello mayor afinidad por la kynurenina dirigiendo así la VK hacia la formación de NAD/QUIN (Bender y McCreanor, 1982), por lo que en esta ruta de formación, la tasa de síntesis de KYNA está regulada por la disponibilidad de kinurenina.

3.3.2.1 D-aminoácidos en la síntesis de KYNA.

La D-KYN es generalmente considerada como la forma enantiomérica menos favorecida para la síntesis de KYNA. Sin embargo, la D-KYN puede ser producida a partir de D-TRP por la TDO en mamíferos, dado que esta enzima posee valores de Km similares para D- y L-TRP (Baran y Shwarcz, 1993). Adicionalmente, ha sido reportada la presencia de D-TRP en la orina de humanos mediante electroforesis capilar con hidroxipropil- β -ciclodextrina como diferenciador quiral. Aunque la fuente de D-TRP aún no ha sido totalmente esclarecida, se ha propuesto que puede ser resultado de la acción de bacterias intestinales o bien ser producto de procesos de racemización de proteínas en el procesamiento de los alimentos. Incluso, la producción de D-KYN a partir de D-TRP puede estar aumentada durante infecciones bacterianas, que a su vez, pudiera desencadenar respuestas inflamatorias que sobre-regulan la expresión de laIDO (Johnson *et al.*, 2009). La presencia de los D-aminoácidos de manera natural, no es un hecho aislado, ya que se ha reportado que poseen un papel importante en la regulación de diversos procesos como el crecimiento, la transmisión neuronal, la secreción hormonal, entre otras (Khoronenkova *et al.*, 2009).

Además estudios *in vitro* e *in vivo* en ratas y conejos han mostrado que D-KYN es convertida a KYNA en tejidos periféricos (Mason y Berg 1952; Loh y Berg 1971), y que la concentración de KYNA en plasma es incrementada posterior a la administración sistémica de D-KYN en ratas y ratones (Fukushima *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Incluso, estudios en sistemas experimentales carentes de α -cetoglutarato, un cofactor que necesitan las KAT's, reportan que KYNA es eficientemente sintetizado a partir de

D-KYN, hecho que no ocurre para el caso de la L-KYN (Miller *et al.*, 1953). Apoyando esta aseveración, estudios recientes han proporcionado evidencia que establece que la conversión de D-KYN a KYNA es llevada a cabo por la D-aminooxidasa (DAAO), una enzima que cataliza la deaminación oxidativa de los D-aminoácidos (Loh y Berg 1971; Fukushima *et al.* 2009; Ishii *et al.* 2010). Adicionalmente, Fukushima y colaboradores (2008) encontraron que el valor de T_{max} en plasma para KYNA fue alcanzada a los 5 minutos después de la administración de D-KYN, lo que sugiere que la transformación de D-KYN a KYNA ocurre muy rápidamente. Paralelamente, este mismo grupo reportó que la administración de un inhibidor de la DAAO suprime sólo parcialmente la producción de KYNA. Por otro lado, resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo (Pérez de la Cruz, 2012) en los cuales se realizó diálisis reversa en el estriado de ratas anestesiadas, se observó que la D-KYN incrementa los niveles de KYNA extracelular de manera dosis- y tiempo-dependiente, llegando hasta ~300 % sobre los valores basales. Resaltando que, el empleo del ácido amino-oxiacético (AOAA), un inhibidor inespecífico de las kinurenina aminotransferasas, reduce sólo parcialmente los niveles de KYNA, lo cual sugiere mecanismos alternos de la producción KYNA por D-aminoácidos.

3.3.2.2 ERO/ERN y la formación de KYNA

Existe evidencia que apoya la interacción directa entre las ERO/ERN y derivados indólicos especialmente aquellos con sustituciones alifáticas en la posición 3-, como ocurre en específico con el Trp (Peyrot y Ducrocq, 2008). Politi en 1991, describe una ruta alternativa de formación de KYNA en la que, una vez acontecida la transaminación oxidativa del Trp, el derivado indol-3-pirúvico resultante es oxidado por ERO dando lugar a un intermediario inestable que sufre ciclización espontánea y forma KYNA (I, Fig. 6.0). Por otro lado, Hardeland en 2001 demuestra que la producción de KYNA a partir de L-KYN en homogenados de *Lingulodinium polyedrum*, incrementa considerablemente en presencia de paraquat (aceptor de e⁻ y formador de H₂O₂ y O₂⁻) y carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP; generador de H₂O₂ y

desacoplador en la fosforilación oxidativa), el incremento oscila entre el 53% para el primero y 65% para el segundo, respecto a los controles. Por otro lado, cuando se bloquea la cadena de transporte de e^- del fotosistema II de *L. polyedrum*, añadiendo diclorofenildimetilurea (DCMU), y por ende la formación de ROS disminuye, la producción de KYNA a partir de L-KYN se reduce cerca del 42% en la primera hora de incubación. Adicionalmente, se ha reportado que KYNA puede ser formado a partir de L-KYN en presencia de H_2O_2 por sí solo, a una tasa baja pero sustancial, gracias a la desaminación oxidativa provocada por los radicales libres generados a partir del peróxido de hidrógeno formando un intermediario inestable que sufre ciclización espontánea para dar lugar a KYNA (Zsizsik y Hardeland, 2001b; II, Fig. 6.0). La interacción directa de ROS/ RNS con los derivados del Trp es reflejada en su eficiencia como atrapadores de OH^\bullet y ROO^\bullet , ello favorece su propia oxidación y la interacción con otros radicales y ERO como $O_2^{\bullet-}$, NO^\bullet y $ONOO^-$. Además es importante mencionar que a pH fisiológicos y una baja concentración de CO_2 , el $ONOO^-$ reacciona con el *N*-acetil-Trp, produciendo principalmente kinureninas y derivados 1-nitrosos (Suzuki *et al*, 2004; Peyrot *et al*, 2003; Yamakura *et al*, 2006).

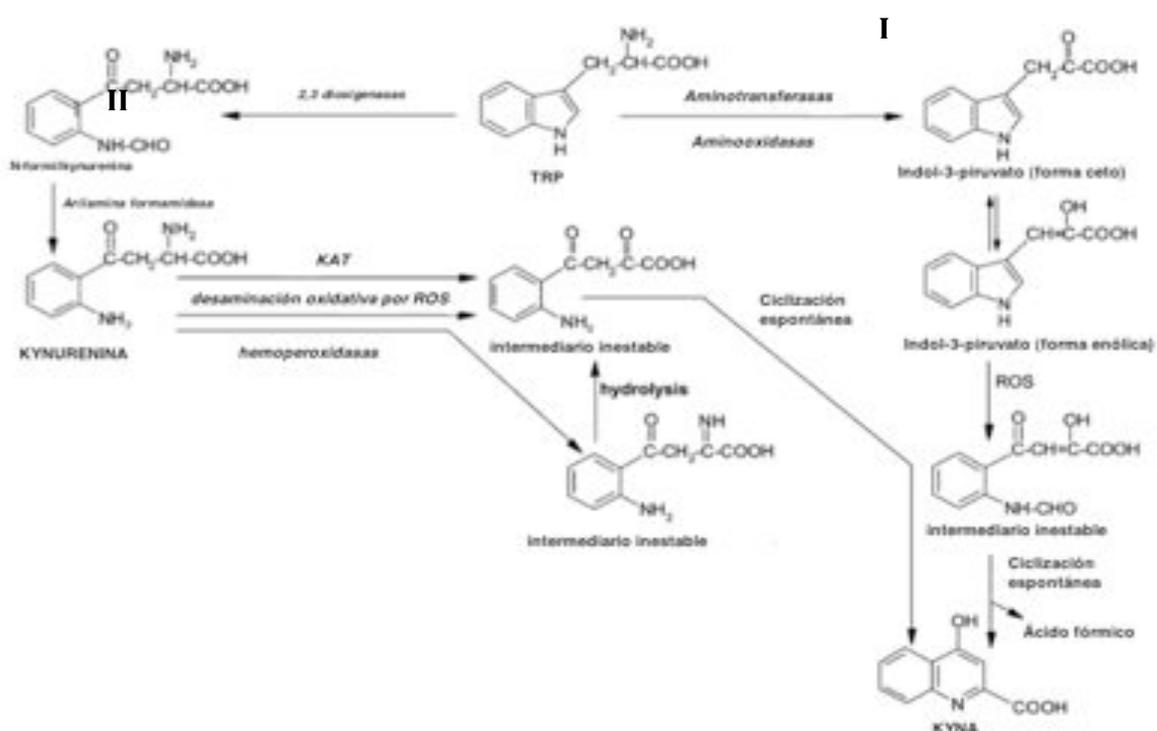


Fig. 6.0 Modificada de Hardeland & Zsizsik 2002. Rutas enzimáticas y no-enzimáticas de formación de ácido kinurénico y ácido xanturénico. El proceso de hidrólisis representado en negritas hace referencia a nuevas vías de formación de ácido kinurénico a partir de kynurenina que involucran la acción de hemoperoxidasas y/o ERO .

3.4 KYNA en enfermedades neurodegenerativas

Dada su acción sobre los receptores NMDA y $\alpha 7$ nACh, y a su capacidad como atrapador de radicales libres, las variaciones en los niveles de KYNA han sido relacionadas con distintos desórdenes neurodegenerativos (Erhardt *et al*, 2004; Reinhard, 2004; Schwarcz y Pellicciari, 2002; Stone y Darlington, 2002). En la EH, los niveles de KYNA son prácticamente nulos en el núcleo caudado resultado de la reducida actividad de KAT I y II en el estriado de cerebros de pacientes con esta enfermedad. La reducción de la actividad de las KATs aunado a la incrementada actividad de la IDO/TDO en pacientes con EH dirige la VK hacia la formación de ácido quinolínico dando lugar a eventos de estrés oxidativo y excitotoxicidad. En etapas tempranas de la EA, los niveles de KYNA así como la expresión de las KATs han demostrado una tendencia a incrementarse como respuesta de compensación por los altos niveles de QUIN (Baran *et al*, 1999). Por otro lado, también se ha demostrado que a medida que progresa la enfermedad los niveles de KYNA disminuyen, y se ha sugerido que la formación de KYNA depende del metabolismo energético, mismo que se encuentra alterado en las etapas tempranas de la EA lo que explicaría los cambios en los niveles de KYNA conforme el progreso de la enfermedad. Finalmente en la EP, los incrementados niveles de 3-HK, ponen de manifiesto la tendencia de la VK en esta patología a favorecer la síntesis de 3-HK a partir de L-KYN sobre la de KYNA, característica que a su vez, puede ser responsable de la susceptibilidad que presentan las neuronas de estos pacientes al daño oxidativo (Ogawa *et al*, 1992).

3.5 KYNA como antioxidante

KYNA es capaz de atrapar distintos radicales libres bajo distintas condiciones experimentales (Goda *et al.*, 1996; Hardeland *et al.*, 1999; Hardeland y Zsizsik, 1997; Zsizsik y Hardeland, 2001a; Zsizsik y Hardeland, 1999a,b). Resultados derivados de nuestro grupo de trabajo corroboran esta propiedad, demostrando en ensayos *in vitro* de sistemas sintéticos de generación de radicales libres y especies reactivas, que

KYNA es capaz de atrapar eficazmente $O_2^{\cdot-}$ y OH^{\cdot} (IC_{50} : 212 y 209 μM , respectivamente), así como $ONOO^-$ (IC_{50} : 598.4 μM). Resaltando, que los valores de atrapamiento de KYNA son 10 veces más efectivos que GSH para atrapar $O_2^{\cdot-}$. Del mismo modo, en homogenados de cerebro y cerebelo, KYNA redujo la cantidad de ROS formadas en condiciones pro-oxidantes (inducidas por $FeSO_4$) así como la peroxidación lipídica en los mismos, este efecto se observó incluso cuando al medio de incubación se agregaban antagonistas (MK801, memantina) para los receptores NMDA, evidenciando así, su capacidad antioxidante sobre la antagonista (Lugo-Huitrón, 2012).

3.6 KYNA en cerebelo

La presencia de KYNA en cerebelo ha sido ampliamente reportada en concentraciones que oscilan entre los 140 ± 0.02 fmol/mg de tejido en humanos (Waldemar *et al*, 1988), y 63.6 ± 8.5 fmol/mg de tejido en ratas (Swartz *et al*, 1990). Recientemente, se ha reportado en experimentos *in vivo* que 30 min posteriores a la administración intraperitoneal de cualquiera de las formas enantioméricas D- ó L-KYN (30 mg/kg) en ratones, resulta en un incremento en la concentración de KYNA en cerebelo: 12.9 ± 1.0 nM y 45 ± 14.1 nM, respectivamente. Incluso, se observó que la producción de KYNA a partir de D-KYN es más eficiente en cerebelo que en el prosencéfalo (12.9 ± 1.0 nM vs 4.6 ± 0.04 nM), y que la producción por L-KYN (5 veces más) sigue siendo mayor con respecto a D-KYN (Wang *et al.*, 2012; Pérez-De la Cruz *et al.*, 2010). Esta diferencia regional ha sido atribuida principalmente a la alta concentración de la D-AAO en cerebelo (Horiike *et al*, 1994; Moreno *et al*, 1999; Verrall *et al*, 2007). Estudios de microdiálisis en ratas, han demostrado que tanto la DAAO como las KAT son responsables de la conversión de D-KYN a KYNA en el cerebro; y que, en cerebelo la D-AAO es responsable de más del 90% de la transformación de D-KYN a KYNA (Ogaya *et al.*, 2010; H.-Q.; Pérez-De la Cruz *et al.*, 2012), hecho que correlaciona con la robusta inmunoreactividad para la D-AAO y su mRNA detectada en esta región (Verrall *et al*, 2007). La conversión de D-KYN a KYNA

dada principalmente por la DAAO es confirmada por el hecho de que en presencia de inhibidores de la enzima, ya sea ácido fólico, un inhibidor que compite por los D-aminoácidos ó el ácido benzoico (inhibidor competitivo de la DAAO, forma puentes de hidrógeno entre su grupo carboxilato y los residuos Arg 283 y Tyr 228 de la enzima, Mattevi *et al.*, 1996), la producción de KYNA disminuye considerablemente (Pérez-De la Cruz *et al.*, 2012). Por otro lado, es importante mencionar que la producción de KYNA a partir de DKYN tanto en homogenados como en experimentos *in vivo* de microdiálisis en cerebelo no se ve afectada en presencia del ácido aminooxiacético (AOAA) (Pérez-De la Cruz *et al.*, Congreso Society for Neuroscience 2012) un inhibidor de las KAT que bloquea de manera inespecífica atacando la base Schiff formada entre el cofactor piridoxal-5-fosfato (P5P) y la enzima (Beeler y Churchich 1976), no así, en presencia del ácido fólico, con el cual la producción de KYNA por DKYN es significativamente disminuida (96%, $p < 0.01$) (Pérez-De la Cruz *et al.*, Congreso Society for Neuroscience 2012).

3.7 CEREBELO

3.7.1 Generalidades

El cerebelo en mamíferos es una estructura encefálica originada a partir del metencéfalo, está situado en la fosa craneana posterior (Martin, 2004), puede dividirse en series reproducibles de pliegues anteroposteriores denominados lóbulos, situados en tres regiones principales: vermis, paravermis y hemisferios (White y Sillitoe, 2012). Desde el punto de vista funcional, se describen tres lóbulos: anterior, posterior y nódulo flocculonodular.

Existen tres aspectos en la anatomía del cerebelo que lo hacen una estructura singular: es el único que recibe información prácticamente de todas las regiones cerebrales, la simpleza y uniformidad de la organización celular de la corteza cerebelosa que se repite fidedignamente a través de sus capas, y la gran cantidad de neuronas que contiene, ≈ 50 billones de neuronas, que corresponde aproximadamente a la mitad del total de neuronas en todo el cerebro (Rammani, 2006). Aunque el

bauplan de la corteza cerebelosa es similar entre vertebrados, existen algunas diferencias en la distribución de las células granulares y de Purkinje, difieren también en su forma externa, la disposición de sus neuronas, la prominencia de las conexiones aferentes y eferentes, así como la diferenciación de las interneuronas inhibitorias de la capa molecular en células estrelladas y células en cesto (Voogd y Glikstein, 1998).

La corteza del cerebelo está organizada en tres capas que rodean a la materia blanca y a los núcleos cerebelosos: molecular, de Purkinje y granular (Fig. 7.0)

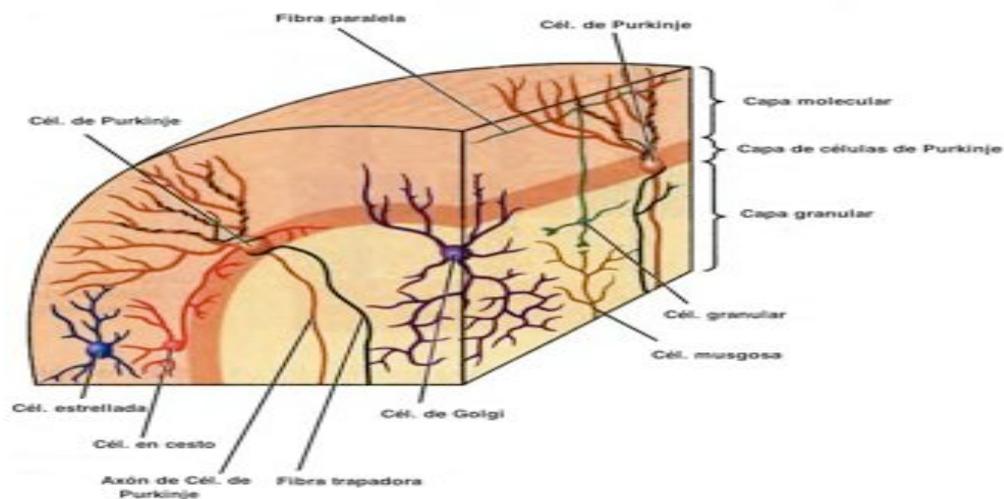


Fig. 7.0 Modificado de Voogd y Gilkstein, 1998. Capas y componentes celulares de la corteza cerebelosa

En estas capas, se reconocen cuatro tipos de neuronas: granulares, de Purkinje, células de Golgi, células estrelladas y células en cesto, interconectadas en un circuito por las fibras trepadoras y musgosas. Las células granulares, son las más abundantes, de naturaleza glutamatérgica, las únicas interneuronas excitatorias del cerebelo, sus axones ascienden hacia la capa molecular donde se bifurcan dando lugar a las fibras paralelas que hacen sinápsis con las células de Purkinje y otras interneuronas. Las células de Purkinje son de gran tamaño, de naturaleza gabaérgica y proyección inhibitoria, cada una recibe la información de una única fibra trepadora, sus axones se proyectan a través de la sustancia blanca cerebelosa para hacer sinapsis con neuronas de los núcleos cerebelosos profundos. Las células Golgi, son

interneuronas que inhiben a las células granulares (Fig. 7.0), en ellas colocan tanto GABA como glicina. Finalmente, las interneuronas denominadas células estrelladas y células en cesto se localizan en la capa molecular, reciben información de las fibras paralelas, son puramente GABAérgicas y se encargan de enviar señales inhibitorias a las células de Purkinje (Fig 8.0). La interacción de cada una de estas células, a través de las capas de la corteza, dan origen a un circuito delicadamente regulado en el que se identifican dos entradas excitatorias principales al cerebelo: las fibras trepadoras y las musgosas. Mientras que las fibras trepadoras hacen sinapsis directamente a las células de Purkinje, las musgosas hacen sinapsis primero con las granulares y dan lugar a las fibras paralelas que posteriormente hacen sinapsis con las células de Purkinje y las interneuronas estrelladas y en cesto. Para que finalmente, las células de Purkinje proyecten sus axones, y con ello su acción inhibitoria, reduciendo los elevados niveles de actividad neural en los núcleos cerebelosos profundos (Fig 8.0)

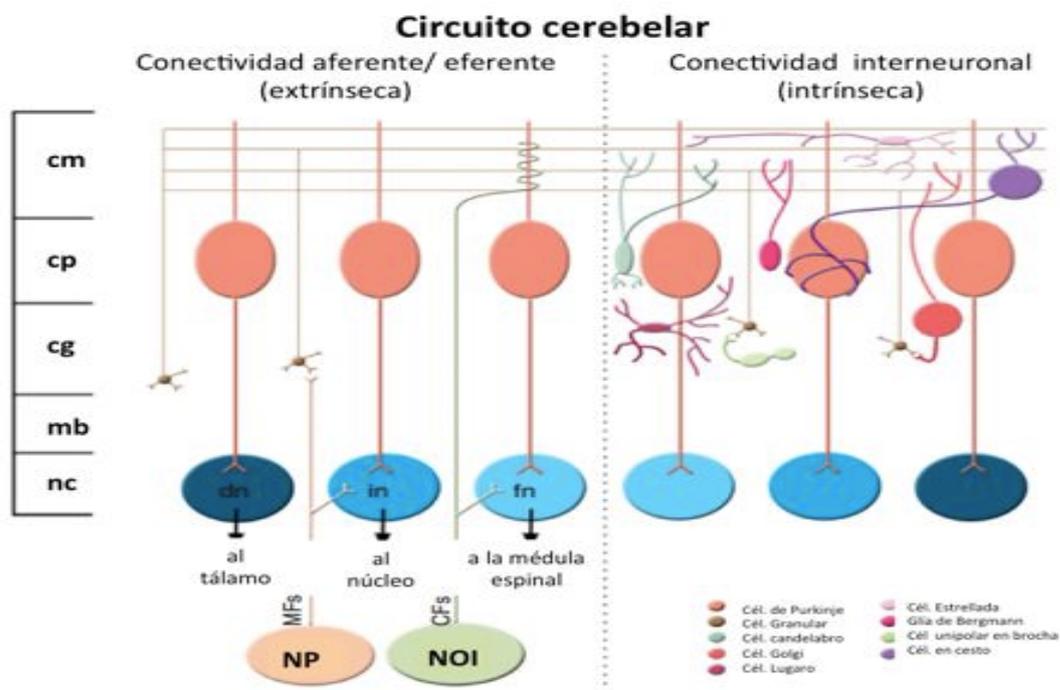


Fig. 8.0 Circuito cerebelar. Se esquematiza como las fibras trepadoras (CFs) originadas exclusivamente en el núcleo de la oliva inferior (NOI). En contraste, las fibras musgosas (MFs) originadas a partir de un gran número de células del núcleo precerebelar (NP). Las CFs terminan sobre neuronas del núcleo cerebelar (fn, núcleo fastigial; in, núcleo intermedio; dn, núcleo dentado) y en dendritas de células de Purkinje. Las MFs terminan en neuronas del núcleo cerebelar, en dendritas de células granulares, y en células unipolares en brocha. Distintos tipos de interneuronas residen en cada una de las tres capas celulares cerebelosas haciendo conexión específica dentro de la corteza cerebelar. Las proyecciones eferentes de la corteza cerebelosa (axones de las células de Purkinje) y del cerebelo (axones del núcleo cerebeloso) están organizadas topográficamente. Capas del cerebelo: capa molecular (cm), capa de células de Purkinje (cp), capa granular (cg), materia blanca (mb), núcleo cerebeloso (nc). Modificada de White y Sillitoe, 2012.

3.7.2 Astrocitos, neurotransmisores y receptores presentes en cerebelo

Existen dos tipos de astrocitos descritos en el cerebelo: glía de Bergman (GB) en la capa molecular y astrocitos protoplásmicos en velamen en la capa granular. Los somas de la GB se encuentran en la capa de células de Purkinje donde forman rosetas alrededor de estas células, durante el desarrollo temprano se encargan de guiar a las células granulares a su destino final. La posición anatómica de estas células sugiere que son capaces de interactuar funcionalmente con otras neuronas del cerebelo. Existen varios elementos celulares expresados en la GB dependiendo del proceso que se esté llevando a cabo, por ejemplo, el transportador de glutamato-aspartato (TGLAS) es densamente expresado cuando los niveles de glutamato en el espacio extracelular aumentan dando lugar a la activación de los receptores AMPA presentes en la BG (Hoogland, 2010).

3.7.2.1 Acetilcolina

En el cerebelo se encuentran presentes las enzimas necesarias para la síntesis de este neurotransmisor: colina acetiltransferasa (ChAT) y acetilcolinaesterasa, con niveles particularmente altos durante las etapas más tempranas del desarrollo, consistentes con la aparición de la innervación colinérgica en el cerebelo fetal, la extensión de los conos axónicos y la formación sináptica.

En el cerebelo adulto tanto la acetilcolina como los receptores del sistema colinérgico están presentes en las células de Purkinje (cP), las granulares y las de Golgi. De hecho, es a través de los receptores muscarínicos que las fibras musgosas son capaces de modular la actividad inhibitoria de las cP (Kwong, 2000).

3.7.2.2 Glutamato

Una intensa inmunoreactividad a glutamato (Glu) está distribuida principalmente en la capa molecular y en los somas de las células granulares. La presencia de receptores glutamatérgicos varía durante el desarrollo pre y postnatal. A pesar de ello, se han detectado receptores NMDA (rNMDA) y AMPA (rAMPA) en el cerebelo fetal. Los rNMDA presentes tanto en la capa molecular como en la granular incrementan con la

edad, mientras que los rAMPA en la capa granular incrementa hasta los \approx 40 años y luego disminuye cerca de los 60 años. La presencia de ambos receptores significa la existencia de transmisión glutamatérgica en el cerebelo (Kwong, 2000).

3.7.2.3 GABA

La presencia de GABA ha sido extensamente reportada en las capas del cerebelo, especialmente en las cP, células estrelladas, en cesto y fibras musgosas. GABA aparece muy temprano en el desarrollo, y su presencia va en aumento con respecto a la maduración de las células nerviosas, lo que sugiere que puede jugar un rol importante estimulando la diferenciación neuronal. De entre las células positivas para GABA_A son las granulares con la mayor inmunoreactividad, seguidas de las células estrelladas, en cesto y de Golgi, siendo las cP las que expresan este tipo de receptor más débilmente. Una particularidad de los receptores GABA_A (rGABA_A) es que están presentes en las neuronas pero no en sus terminales axonales, lo cual sugiere su naturaleza postsináptica en el circuito inhibitorio mediado por GABA en el cerebelo. En cuanto a su regulación, dado que el incremento en rGABA_A coincide con el periodo de sinaptogénesis en la capa granular de la corteza cerebelar (Altman, 1972) puede implicar que los contactos excitatorios de las fibras musgosas y/o el contacto inhibitorio de las células Golgi son los encargados de regular la expresión de GABA_A (Sigel y Buhr, 1997; Carlson *et al*, 1998). El receptor GABA_B también se encuentra presente tanto en el cerebelo de ratas como en el de humanos, éste se expresa principalmente en las cP.

3.7.2.4 Catecolaminas

Neuronas y fibras catecolaminérgicas han sido descritas en cerebelo (Fuxe 1965, Hökfel y Fuxe 1969, Bloom *et al* 1971, Landis *et al* 1975, Yamamoto *et al* 1977, Kimoto *et al* 1981, Felten *et al* 1986). A partir de métodos inmunohistoquímicos se ha detectado, en la corteza cerebelar y los núcleos profundos, la presencia de dos de las principales enzimas involucradas en el sistema catecolaminérgico, la tirosina hidroxilasa (TH) y la dopamina- β -hidroxilasa (DBH). La aparición de cP y células

granulares positivas para TH y DBH, pueden ser identificadas desde muy temprano tanto en modelos animales (Hayashi, 1987) como en fetos humanos (Yew *et al*, 1995), alrededor de la semana 16-18 de gestación. Derivado de su temprana aparición se ha sugerido que, además de la neurotransmisión, pueden estar implicadas en otras funciones: ejerciendo influencias neurotróficas durante el desarrollo del cerebelo (Konig *et al*, 1988), induciendo la diferenciación de las cP (Lauder y Bloom, 1974) y participando en la generación de las redes necesarias para el establecimiento de los circuitos neuronales definitivos (Yeh y Woodward, 1983). Posterior al nacimiento, y ya en la edad adulta las fibras noradrenérgicas están presentes en todas las capas de la vermis anterior del cerebelo. Estudios con 6-hidroxidopamina en cerebros adultos han dejado de manifiesto la influencia inhibitoria que ejerce la corteza cerebelar en el sistema límbico a través del núcleo fastigial (o del techo) (Maiti y Snider, 1975).

3.7.2.5 Serotonina

Estudios en modelos animales indican que la serotonina (5-HT) se encuentra presente en cerebelo en el desarrollo postnatal. Las fibras serotoninérgicas se encuentran predominantemente distribuidas en la capa de cP, la capa interna granular, la zona celular de migración entre la capa de cP y el núcleo profundo. Por otro lado, la capa externa granular, así como la capa molecular raramente contienen fibras serotoninérgicas (Bishop *et al*, 1985 a,b). Por otro lado, se han encontrado receptores 5-HT en la corteza cerebelar de humanos durante el desarrollo prenatal y postnatal (Del Olmo *et al*, 1994). En el feto, un incremento en éstos receptores se observa para la semana 34 de gestación, incluso en las capas granular y molecular; sin embargo, postnatalmente, ocurre un descenso considerable, tal que a la edad de 4 años la presencia de receptores 5-HT es casi imperceptible. En rata, los receptores 5-HT son encontrados principalmente en las células gliales del cerebelo durante el desarrollo prenatal y postnatal (Verge *et al*, 1991). La aparición de receptores 5-HT durante del desarrollo prenatal en la corteza cerebelar no coincide con el desarrollo de la innervación serotoninérgica; por lo que, se ha propuesto que éstos receptores pueden

ejercer funciones de inducción en la ramificación de neuritas, elongación y formación de sinapsis (Haydon *et al*, 1984; Sikick *et al*, 1990)

3.7.3 Funciones no-motoras del cerebelo

Tradicionalmente, al cerebelo se le atribuyen funciones principalmente de control motor y coordinación. Sin embargo, resultados recientes derivados de estudios neuroanatómicos, clínicos así como de neuroimagen, han sustancialmente extendido el rol fisiológico cerebelar hacia la regulación tanto cognitiva como afectiva (Baillieux *et al*, 2008). Estudios neuroanatómicos han demostrado que existe conectividad entre el cerebelo y las áreas de la corteza media prefrontal (mCPF) (Krienen y Buckner, 2009). Además de que se ha comprobado que el cerebelo es capaz de modular la liberación de dopamina (DA) hacia la mCPF a través de dos vías neuronales originadas en el núcleo dentado (ND) (Rogers *et al*, 2011). Este hallazgo merece especial atención dado que la liberación de DA en la mCPF está asociado a padecimientos neurológicos como el autismo (Ernst, 1997) y la esquizofrenia (Bennet, 1998). Adicionalmente, estudios recientes en modelos murinos arrojaron que la degeneración de células de Purkinje aunado a lesiones en el ND dan lugar a déficits en el aprendizaje sensoriomotriz y visoespacial (Joyal *et al*, 2001; Noblett y Swain, 2003). Paralelamente se ha reportado que lesiones cerebelares o atrofas, y/o anomalías durante su desarrollo resultan en deficiencias cognitivas o emocionales asociadas al autismo, déficits en la memoria de asociación, habilidad verbal, planeación y memoria de trabajo (Botes-Marquard, 1993; Bracke-Tolkmit *et al*, 1989; Schmahmann y Sherman, 1998, Kumar *et al*, 2010, Rapoport *et al*, 2000, Schmahmann, 1991). Varios de estos hallazgos, incluso se han conjuntado en la denominación de dos síndromes directamente asociados con el cerebelo: El Síndrome cerebelar cognitivo-afectivo (CCAS) y el Síndrome de la fosa posterior (PFS) ambos provocados por daños estructurales y/o funcionales del cerebelo, provocados por lesiones agudas, crónicas o incluso desde el desarrollo temprano del cerebelo (Baillieux *et al*, 2008).

4.0 JUSTIFICACIÓN

Cerebelo es una región con características particulares en cuanto a composición celular, conectividad hacia otras regiones y metabolismo. La información disponible acerca de la VK en esta región es escasa, específicamente aquella relacionada con la síntesis de KYNA, un antagonista endógeno de amplio espectro para receptores de aminoácidos excitadores (principalmente rNMDA). Los reportes que existen al respecto señalan algunas singularidades respecto a las demás regiones del cerebro: la administración sistémica de D-KYN genera un rápido incremento en los niveles de KYNA mucho más pronunciado en cerebelo que en prosencéfalo, la diferencia entre la síntesis de novo a partir de L-KYN comparada con la de D-KYN es mucho más estrecha, fenómenos que se han relacionado con la alta concentración de DAAO en esta región. Sin embargo, es importante señalar que la DAAO en mamíferos posee una mayor afinidad por D-metionina y D-prolina, además de que cerebelo posee los valores más bajos -con respecto a las demás regiones cerebrales- de concentración, K_m y V_{max} de la KAT II (usando L-KYN como sustrato), la principal enzima responsable de la síntesis de KYNA en las demás regiones. Por lo que, considerando que las variaciones en los niveles de KYNA son una característica de enfermedades neurodegenerativas y desórdenes psiquiátricos, dado su efecto neuromodulador/neuroprotector y considerando además al metabolismo propio del cerebro que incluye un alto consumo de oxígeno y con ello una elevada producción de ERO/ERN, resulta importante indagar otros mecanismos alternativos de síntesis de KYNA que tomen en cuenta el incremento en la concentración de estas especies considerando el hecho de que los derivados del TRP son capaces de interactuar directamente con ellas. De comprobar que esto es posible se contribuiría a esclarecer el origen en las variaciones de KYNA aún cuando la actividad enzimática se mantenga constante, proponer un mecanismo alternativo de síntesis, e incluso nos permitiría trazar las líneas de conectividad entre el catabolismo del TRP en cerebelo y otras regiones cerebrales, principalmente con la corteza cerebral.

5.0 HIPÓTESIS

Si el anión peroxinitrito (ONOO^-) es capaz de interactuar con los grupos funcionales localizados en la estructura química de los precursores inmediatos (D- y L-KYN) en cerebelo, entonces, parte del incremento en los niveles de KYNA se deberá a este fenómeno de manera independiente a la acción enzimática en este tejido.

6.0 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la producción de KYNA a partir de los precursores D- o L-KYN es estimulada por la presencia de ONOO^- en experimentos *in vivo* e *in vitro*.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar por HPLC los niveles de KYNA a partir de un estudio *in vivo* mediante microdiálisis reversa en el que se administrará el precursor inmediato: L- o D-KYN, en ausencia o presencia del inhibidor AOAA, y del prooxidante ONOO^- .
- Determinar en los dializados qué tan disminuidos resultan los niveles de KYNA al inhibir las KATs en cerebelo y compararlo con el posible aumento obtenido tras la administración de ONOO^- .
- Determinar el aumento en los niveles de KYNA en homogenados de cerebelo en presencia de L- o D-KYN, y en ausencia o presencia del AOAA, así como de distintos inhibidores de la DAAO: ácido fólico, ácido benzoico y ácido 5-metilpirazol-3-carboxílico.
- Determinar el efecto del ONOO^- en los niveles de KYNA en homogenados de cerebelo al añadir de L- o D-KYN en presencia o ausencia del AOAA y de los inhibidores de la DAAO.

- Comparar el aumento en los niveles de KYNA en las distintas condiciones establecidas, para determinar si parte de ese incremento es independiente de la actividad enzimática.

7.0 MÉTODOS

7.1 Materiales y animales

Todos los reactivos empleados se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). Las soluciones D- y L-KYN (1mM), AOAA (10mM), ácido kójico (10 mM), ONOO⁻ (100 μM) se prepararon usando agua desionizada obtenida de un sistema purificador Milli-Q (Millipore). Para la preparación del ácido benzoico (stock 10 mM) el agua se calentó previamente para lograr que se disolviera. El ácido 5-metil-pirazol-3-carboxílico (MPC), se disolvió en 5 ml de una mezcla: 4.7 ml de amortiguador PBS (137 nM NaCl, 2.7 nM KCl, 8.1nM Na₂HPO₄•2H₂O, 1.76 nM KH₂PO₄, pH 7.4)/ 0.15 ml etanol 100%/ 0.15ml Polietilenglicol.

Se usaron ratas *Wistar* macho (280-320 g) para la realización de este trabajo. En el caso de aquellos sometidos a cirugía para la implantación de cánulas, se mantuvieron de manera individual en una caja de acrílico con agua y alimento suficiente. Los cuartos del bioterio se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (25 ± 3° C), humedad (50 ± 10 %), y luz (12:12 ciclo luz:oscuridad).

7.2 Síntesis de ONOO⁻

El ONOO⁻ se sintetizó de la manera descrita por Floriano-Sánchez et al., 2006, mezclando, en baño de hielo, 5 ml de la solución de H₂O₂ 0.7M en HCl 0.6 M con 5 ml de KNO₂ 0.6 M, casi instantáneamente se detiene la reacción con NaOH 1.2 M frío. El H₂O₂ residual se remueve usando una columna de MnO₂ prelavada con 1.2 M NaOH durante 20 minutos. La mezcla obtenida se almacena a -20 °C por una noche. Se recolecta la capa de líquido amarillo y se mantiene a -20 °C. La concentración de (ONOO⁻) se determina antes de cada experimento a 302 nm utilizando un coeficiente

de extinción molar de $1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Para el caso de los experimentos *in vivo* la concentración de ONOO^- fue de $50 \mu\text{M}$.

7.3 Experimentos *in vivo*

7.3.1 Cirugía estereotáxica

7.3.1.1 Establecimiento del área de implante

Para la parte *in vivo*, lo primero que se realizó antes de la implantación de cánulas, fue corroborar que las coordenadas seleccionadas para la corteza cerebelar fueran correctas. Por lo que, con nuestras coordenadas AP: -11, frente a bregma; L: +2, a partir de bregma, y V:-4, desde dura, realizamos una cirugía intracerebelar e inyectamos colorante azul de metileno. En la figura 12.0 que se muestra a continuación, se comprueba que las coordenadas utilizadas para todas las cirugías de implantación de cánulas se localizan en la corteza cerebelar.



Fig. 12.0 Corte longitudinal de cerebelo. Se señala con flechas, la lesión en la corteza cerebelar.

7.3.1.2 Implantación de cánulas

Para el procedimiento quirúrgico, se usaron ratas macho Wistar (280-320g), las cuales fueron anestesiadas con ketamina (80mg/kg) y xilazina (101 mg/kg). Se realizaron cuatro perforaciones a nivel de cráneo, tres de las cuales fueron para colocar tornillos de soporte y el cuarto para la implantación tal como se muestra en un equipo de estereotaxia, donde se implantó, de manera unilateral, la cánula guía (BASi) en la corteza cerebelar (AP: -11, frente a bregma; L: +2, a partir de bregma, y V:-4, desde dura, Paxinos y Watson) con algunas modificaciones de Wu H-Q, 2010. La cánula guía, así como los tornillos (de apoyo para sostener el implante), fueron fijados con acrílico dental.



Fig. 9.0 Cánula implantada en el cerebelo de una rata *Wistar*.

7.3.2 Microdiálisis

Tres días posteriores a la cirugía estereotáxica fue insertada una cánula de microdiálisis (BASi, membrana de 2mm de longitud de membrana), a través de la cánula guía fija en la corteza cerebelar. La cánula de microdiálisis fue luego acoplada a una bomba de microperfusión ajustada a una velocidad de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Seis protocolos distintos fueron probados, siendo cada rata su propio control: L-KYN, D-KYN, L-KYN+AOAA, D-KYN+AOAA, LKYN+ONOO⁻, DKYN+ ONOO⁻. Los animales con libre movimiento, y acceso a comida y agua, fueron infundidos primero durante 2h para establecer la línea base con solución fisiológica Ringer (en mM): NaCl, 144; KCl, 4.8; MgSO₄, 1.2; CaCl₂, 1.7 . El inhibidor AOAA o el pro-oxidante ONOO⁻ se infundieron durante 30 min posteriores al establecimiento de la línea base. Enseguida se infundían los precursores de KYNA en cualquiera de sus formas isoméricas (D ó L) durante 2h. Finalmente, durante cuatro horas más, se infundía nuevamente solución Ringer. Para todos los casos la recolección de las muestras se realizó cada 30 min durante un período de 8h, y se almacenaron en un REVCO a -70 °C, hasta su cuantificación por HPLC. En la figura 10.0 se observa el sistema de microdiálisis montado y en proceso.



Fig. 10.0. Sistema de microdiálisis. En la imagen se muestra una rata Wistar macho durante el procedimiento experimental realizado en un sistema de microdiálisis individual (BASi).

Experimentos *in vitro*

7.4 Preparación de homogenados e incubación

Para los experimentos *in vitro*, se emplearon como sistemas biológicos homogenados de tejido de rata, se extrajo el cerebelo, y se homogenizó 1:10 en amortiguador Krebs-Ringer (NaCl 118.5 mM, KCl 4.75 mM, CaCl₂ 1.77 mM, MgSO₄ 1.18 mM, glucosa 5 mM, NaH₂PO₄ 12.9 mM y NaHPO₄ 3 mM; pH 7.4). Se tomaron 80 µl de homogenado 1:10 (p/v) que fueron incubados en ausencia o presencia de D- ó L-KYN 100 µM. Para determinar si la producción de KYNA era independiente de la actividad de las KATs se añadió AOAA, un inhibidor no-específico de aminotransferasas, en la mezcla que contenía previamente a los precursores D- ó L-KYN 100 µM. Para observar el efecto del ONOO⁻ sobre la producción de KYNA, se añadió a la mezcla de incubación con los precursores D- ó L-KYN 100 µM, 25 µM de ONOO⁻. Adicionalmente, se probaron tres inhibidores de la DAAO: ácido kójico, ácido benzoico y MCP, todos a una concentración de 1 mM, para determinar si la producción de KYNA estaba mediada por esta enzima. Finalmente, se realizaron tratamientos en presencia de ONOO⁻ 25

μM , con la inhibición simultánea de las KAT's o de la DAAO. Para todos los casos el volumen final fue de 200 μl y la incubación fue a 37°C durante 2h. La reacción se detuvo con 1ml HCl 0.1 N. Una vez detenida la reacción, se centrifugó a 6, 000 g durante 10 min a 4°C. Posteriormente se recupera el sobrenadante y se descarta el pellet, y del primero se cuantificó fluorométricamente la cantidad de KYNA producido mediante HPLC a una λ de excitación: 344 nm; emisión: 398 nm. Las muestras se conservan en frío en un REVCO a -70°C.

7.5 Cuantificación de KYNA por HPLC

7.5.1 Muestras de microdiálisis

Las muestras se procesaron, inmediatamente después de su recolección o almacenadas en un REVCO a -20 °C para ser leídas en el HPLC el día siguiente. Se inyectaron 20 μl de muestra en el cromatógrafo de líquidos de alta afinidad acoplado a un detector de fluorescencia (S-200, Perking Elmer) para la cuantificación de KYNA. Usando una fase móvil constituida de la siguiente manera: 250 mM Acetato de Zinc, 50 mM Acetato de Sodio y 3% de acetonitrilo (pH 6.2) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. KYNA fue detectada fluorométricamente (excitación: 344 nm; emisión: 398 nm). El tiempo de retención de KYNA es de aproximadamente 7 min. De acuerdo con el método de detección transcurridos los 12 min, se obtuvo el área y la altura del pico de KYNA para cada caso. En cada corrida se colocó una curva de KYNA que iba a partir de los 200 fmoles hasta los 10 fmoles, para asegurarnos de la selectividad de nuestro compuesto y así mismo estandarizar las concentraciones obtenidas.

7.5.2 Muestras de homogenados

Las muestras se centrifugaron durante 10 min y 6, 000 g en una microcentrifuga, se descartó el pellet y se tomaron 100 μl del sobrenadante al que se le agregaban 100 μl adicionales de agua grado HPLC. Sólo 20 μl fueron tomados por el autoinyector del HPLC en donde fueron cuantificados los niveles de KYNA gracias al detector de fluorescencia. En cada corrida se colocó una curva de KYNA (200, 100, 50, 20 y 10

fmoles), para asegurarnos de la selectividad de nuestro compuesto y así mismo calcular las concentraciones obtenidas.

8.0 RESULTADOS

8.1 Experimentos *in vivo*

8.1.1 Nivles extracelulares de KYNA a partir de la infusión de D-KYN ó L-KYN por microdiálisis en el cerebelo de ratas Wistar.

Mediante microdiálisis reversa se determinó que los niveles extracelulares de KYNA en cerebelo incrementaban tras la infusión de sus precursores y que además, ésta podía generarse de manera eficiente con ambas formas enantiómericas, D-KYN ó L-KYN (100 μ M). En la figura 13.0, podemos apreciar gráficamente el incremento en los niveles de KYNA extracelular a través del tiempo, en las primeras 2h sólo se infundió solución fisiológica Ringer para el establecimiento de la línea base, la cual nos sirve de referencia para registrar la concentración endógena original en la corteza cerebelar de cada animal y considerarla como el 100% del cual partimos para comparaciones posteriores. En las siguientes 2h, el precursor fue administrado a una concentración de 100 μ M obteniendo un pico máximo al tiempo 4h (2h a partir de la infusión de los precursores), los niveles regresan paulatinamente a los valores basales durante las 4h posteriores en el proceso de microdiálisis al realizar el cambio nuevamente a la solución Ringer. Los resultados obtenidos reflejan que tras la administración de L-KYN, los niveles de KYNA extracelular incrementan $1712 \pm 213.2\%$ (Tabla 1.0), es decir, son aproximadamente 1612 veces mayores a los niveles basales. Para el caso de D-KYN, el incremento de KYNA extracelular es aproximadamente 894 veces mayor a los niveles endógenos basales, correspondiente a un incremento del $994.7 \pm 91.25\%$ (Tabla 1.0). En ambos casos, el aumento en los niveles de KYNA extracelular producido durante la administración del precursor, en cualquiera de sus formas, resultó significativamente mayor al compararlo con los niveles. La producción de

KYNA a partir de D-KYN y LKYN es diferencial, al comparar los valores obtenidos para cada precursor se obtuvo que la producción de KYNA a partir de L-KYN es significativamente mayor que la originada por D-KYN en cerebelo $p < 0.05$.

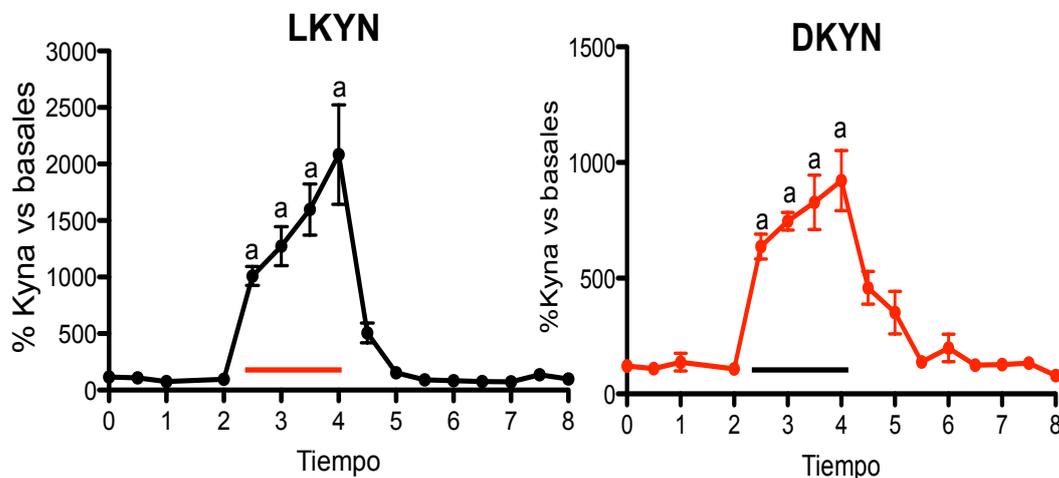


Fig. 13.0. Niveles extracelulares de KYNA a partir de los precursores D-KYN ó L-KYN en cerebelo. Utilizando microdiálisis reversa D- y L-KYN fueron infundidos (tiempo administración indicado por la barra) en el cerebelo de ratas *Wistar* macho de manera independiente durante 2h posteriores al establecimiento de la línea base, ambos a una concentración de 100 μM . Los niveles de KYNA fueron medidos a partir de los dializados recolectados cada 30 min. durante 8h. Los datos obtenidos se representan como las medias \pm el error estándar en porcentaje respecto a los valores basales (D-KYN, $n=11$; L-KYN, $n=13$). El porcentaje de aumento en la producción de KYNA tras la infusión de D-KYN ó L-KYN resultó significativo al ser comparado vs cada uno de los valores de la línea base, mediante pruebas *Wilcoxon* para muestras pareadas $p < 0.05$.

8.1.2 Efecto del AOAA en los niveles extracelulares de KYNA in vivo a partir de L- y D-KYN en cerebelo.

Para comprobar si el aumento en los niveles extracelulares de KYNA en cerebelo era dependiente directamente de la actividad enzimática de las KAT, se realizó un tratamiento en el cual se infundió AOAA (1mM), un inhibidor no específico de las KAT, 30 min antes de la administración de los precursores D-KYN ó L-KYN (100 μM). Los resultados obtenidos nos muestran un efecto diferencial entre el efecto ejercido por el AOAA dependiendo de la forma enantiomérica utilizada. La producción de KYNA a partir de L-KYN en presencia de AOAA es visiblemente disminuida (Fig. 14.0 b), si comparamos que el aumento en los niveles de KYNA a partir de L-KYN es de $1712 \pm 213.2\%$ (Tabla 1.0) y que, al infundir el inhibidor AOAA es de sólo $573.3 \pm 223.7\%$, el

efecto de inhibición que resulta es del 66.5 %, es decir, más de la mitad de la producción de KYNA en cerebelo a partir de L-KYN está ligada directamente a la acción enzimática de las KAT. Por otro lado, es interesante resaltar que esto no sucede cuando es administrado el precursor en su forma D-KYN (Fig. 14.0 a) , ya que el porcentaje de aumento de KYNA obtenido es de $994.7 \pm 91.25\%$ (Tabla 1.0) y el correspondiente al tratamiento con AOAA es de 860.6 ± 170.5 (Tabla 1.0), es decir, el porcentaje de inhibición del AOAA al infundir la forma D-KYN es de sólo el 11.4%. Lo cual refleja que más del 80% de la producción de KYNA en cerebelo a partir de la forma D-KYN no está siendo llevada a cabo por las KAT.

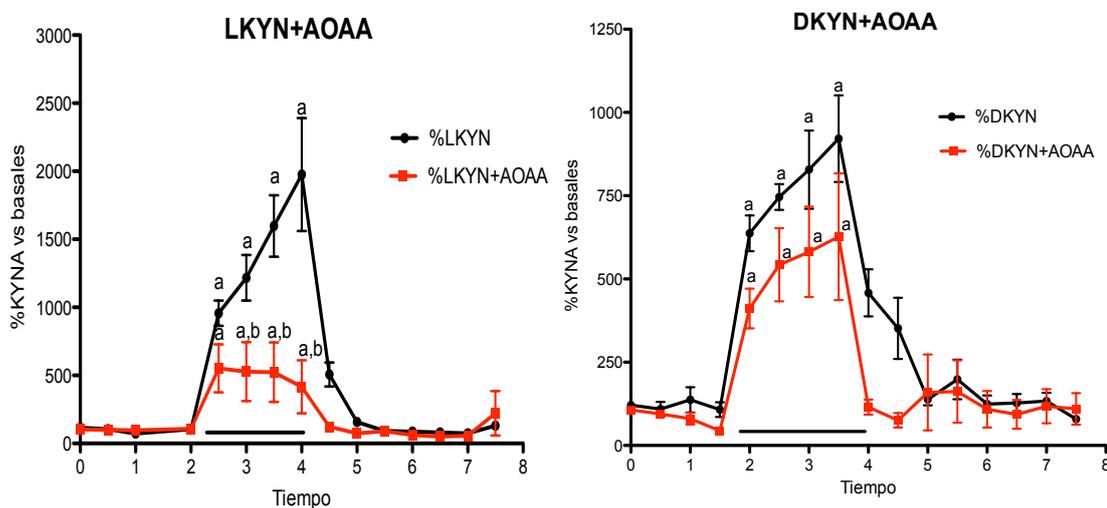


Fig. 14.0. Niveles extracelulares de KYNA a partir de los precursores D-KYN ó L-KYN (100 μ M): efecto del AOAA. Utilizando microdiálisis reversa D- ó L-KYN fueron infundidos (tiempo administración indicado por la barra) en el cerebelo de ratas *Wistar* macho de manera independiente ó con la adición del inhibidor AOAA (1mM;) (tiempo indicado por la flecha) infundido 30 min antes de la administración de cualquiera de los precursores, y posterior, al establecimiento de la línea base. KYNA fue medido en los dializados recolectados cada 30 min en ausencia o presencia del inhibidor durante 8 h. Los datos obtenidos se representan como las medias \pm el error estándar en porcentaje respecto a los valores basales (D-KYN, n=11; L-KYN, n=13; D-KYN+AOAA n=5, L-KYN+AOAA n=4). Se determinó el efecto en los niveles extracelulares de KYNA por el AOAA en aquellas ratas que en distintos días recibieron ambos tratamientos: D-KYN y D-KYN+AOAA ó L-KYN y L-KYN+AOAA, siendo cada una su propio control. Los resultados fueron comparados de manera pareada por pruebas *Wilcoxon* primero de manera individual a través del tiempo respecto a los valores basales para cada tratamiento (^a) y después, entre tratamientos con una prueba Mann Whitney para muestras no pareadas (^b) $p < 0.05$.

8.1.3 Efecto del ONOO^- en los niveles extracelulares de KYNA a partir de L- y D-KYN en cerebelo.

De los experimentos anteriores resalta la producción diferencial por ambos enantiómeros. Además se evidenció que el mayor incremento en los niveles extracelulares KYNA en cerebelo a partir de D-KYN no fue significativamente disminuido tras la inhibición de las KAT. Por lo que, en este experimento *in vivo* se probó si la producción de KYNA es estimulada por la presencia del anión ONOO^- . Para estos tratamientos, se infundió el pro-oxidante ONOO^- (50 μM) 30 min antes de la administración de D-KYN ó L-KYN (100 μM). Los resultados arrojan que existe un aumento en los niveles extracelulares de KYNA en presencia de ONOO^- al administrar ambos precursores. El aumento para el caso de la forma L-KYN es de 4890 ± 1603 % lo que representa un aumento aproximado del 185.6% con respecto al 1712 ± 213.2 % de los niveles extracelulares de KYNA a partir de L-KYN en ausencia del anión ONOO^- tal como se muestra en la figura 15.0. Mientras que, lo obtenido para la forma D-KYN es un aumento del 1514 ± 352.6 en presencia del anión ONOO^- en comparación al 994.7 ± 91.25 %, es decir, en presencia del ONOO^- los niveles extracelulares de KYNA incrementa un 52.2%. Para corroborar si las diferencias entre los tratamientos en ausencia o presencia del anión ONOO^- eran significativas, se compararon los valores respecto a los niveles basales tomando en cuenta el tiempo y el tratamiento en el lapso de tiempo 2-4h durante el cual fueron administrados los precursores obteniendo en ambos casos diferencias significativas $p < 0.05$. Por lo que, la presencia del anión ONOO^- aumenta los niveles extracelulares de KYNA en cerebelo.

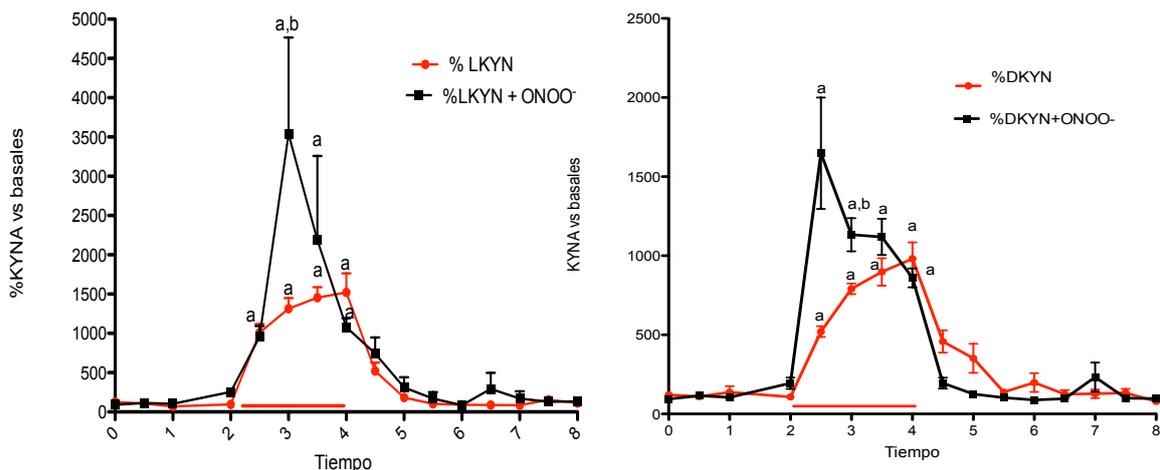


Fig.15.0. Efecto del pro-oxidante ONOO^- en los niveles extracelulares *in vivo* de KYNA a partir de la infusión de los precursores D-KYN ó L-KYN (100 μM). Utilizando microdiálisis reversa D- ó L-KYN fueron infundidos (tiempo administración indicado por la barra) en el cerebelo de ratas *Wistar* macho de manera

independiente ó con la adición del pro-oxidante ONOO⁻ (50 µM; tiempo indicado por la flecha) infundido 30 min antes de la administración de cualquiera de los precursores, y posterior, al establecimiento de la línea base. KYNA fue medido en los dializados recolectados cada 30 min en ausencia o presencia del pro-oxidante durante 8 h. Los datos obtenidos se representan como las medias ± el error estándar en porcentaje respecto a los valores basales (D-KYN, n=11; L-KYN, n=13; D-KYN+ ONOO⁻ n=7, L-KYN+ ONOO⁻ n=6). Se determinaron los niveles extracelulares de KYNA por el ONOO⁻ en aquellas ratas que en distintos días recibieron ambos tratamientos: D-KYN y D-KYN+ONOO⁻ ó L-KYN y L-KYN+ONOO⁻, siendo cada una su propio control. Los resultados fueron comparados por pruebas *Wilcoxon* para muestras pareadas primero de manera individual a través del tiempo respecto a los valores basales para cada tratamiento (^a) y después, entre tratamientos (^b) p< 0.05.

Tabla 1.0 Niveles extracelulares de KYNA en cerebelo de rata mediante microdialísis reversa de D- y L-KYN (100 µM) : efecto de AOAA y ONOO⁻. Los datos se presentan como porcentajes respecto a los valores basales ± error estándar. D-KYN (n= 11), D-KYN+AOAA (n=5), D-KYN+ONOO⁻ (n=7), L-KYN (n=13), L-KYN+AOAA (n=4), L-KYN+ONOO⁻(n=6).

%KYNA vs basales	LKYN	DKYN	LKYN+ AOAA	DKYN+ AOAA	LKYN+ ONOO ⁻	D-KYN+ ONOO ⁻
Cerebelo	1712±213.2	994.7±91.25	573.3±223.7	860.6±170.5	4890±1603	1514±352.6

8.2 Experimentos *in vitro*

Las preparaciones biológicas de tejido en homogenados representan un buen modelo de experimentación *in vitro* dada la conservación de los componentes celulares y enzimáticos propios del tejido.

8.2.1 Efecto de inhibidores de la DAAO y el inhibidor AOAA no específico de las KAT en la producción de KYNA a partir de L-KYN en homogenados de cerebelo.

En la tabla 2.0 se muestra que la producción de KYNA extracelular en homogenados de cerebelo de rata aumenta en un 1811 ± 289.0% en presencia del precursor L-KYN (100 µM) . Para comprobar si ésta producción era resultado de la acción directa de las aminotransferasas (KAT) o de la D-aminoxidasa (DAAO), incubamos a los homogenados de cerebelo en buffer Krebs fisiológico pH 7.2 a 37°C durante 2h en presencia de inhibidores de la DAAO todos a una concentración de 1mM ó en

presencia de AOAA. Los resultados obtenidos arrojan una notable disminución en la producción de KYNA a partir de L-KYN en homogenados de cerebelo cuando es adicionado el AOAA, obteniendo un aumento de sólo el $269.5 \pm 31.57\%$ vs un $1811 \pm 289.0\%$ en ausencia del inhibidor, lo que establece que existe una inhibición del 85.12% de la producción de KYNA. Por otro lado, aunque la inhibición provocada por los inhibidores de la DAAO (ácido benzoico, ácido kójico y 3,5 MCP) en la producción de KYNA por L-KYN no resulta significativamente disminuida (Fig. 16.0.). Los resultados obtenidos para ácido benzoico, ácido kójico y 3,5 MCP ($1052 \pm 231.9\%$, $1274 \pm 291.6\%$, $1229 \pm 276.0\%$, respectivamente; Tabla 2.0) reflejan una tendencia de inhibición de aproximadamente 30% si consideramos que el aumento de KYNA a partir de L-KYN en su ausencia es de $1811 \pm 289.0\%$.

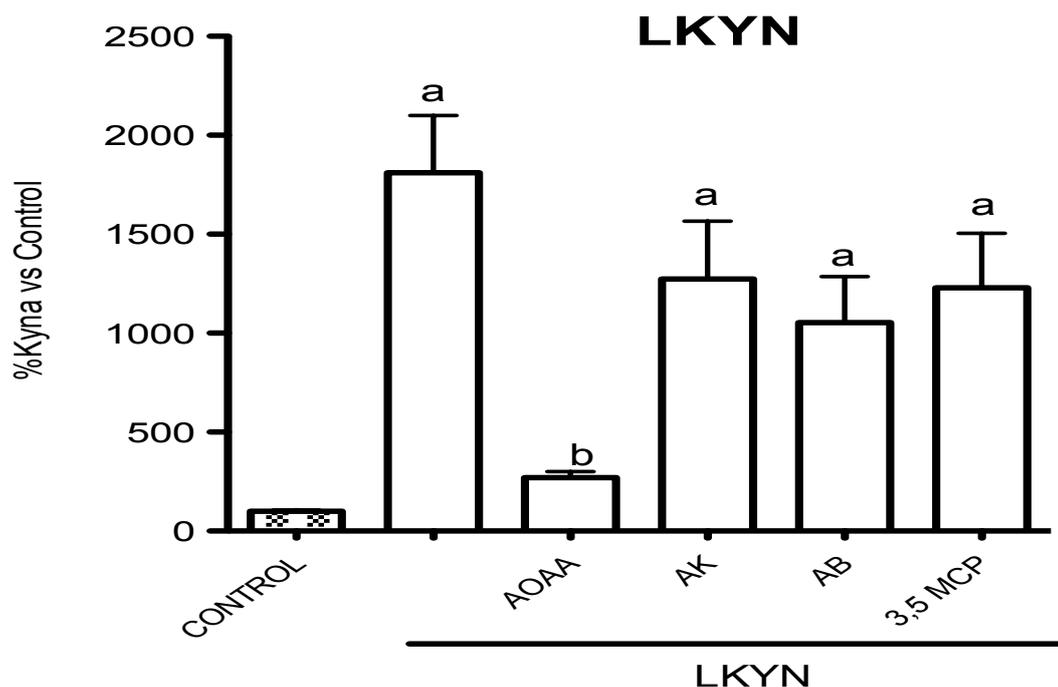


Fig. 16.0. Se muestra el efecto comparativo en la producción de KYNA a partir de L-KYN en presencia de inhibidores para la DAAO y AOAA para las KAT. Producción de KYNA a partir de L-KYN expresada como porcentaje respecto al control \pm el error estándar, en presencia de los distintos inhibidores: AOAA, ácido kójico, ácido benzoico, 3,5 MCP. Se indican las diferencias significativas con respecto al control ^a y con respecto a L-KYN ^b de acuerdo con una prueba de ANOVA de una vía seguida por una prueba Bonferroni $p < 0.05$.

Tabla 2.0. Efecto de la inhibición enzimática de las KAT o la DAAO en la producción de KYNA en homogenados de rata de cerebelo a partir de L-KYN. Los datos son representados como las medias en porcentaje respecto al control \pm el error estándar de cada tratamiento: L-KYN (n=29), L-KYN+AOAA(n=17), L-KYN+BENZOICO(n=8), L-KYN+KÓJICO(n=8) y L-KYN+3,5 MCP(n=8).

%KYNA vs control	LKYN	LKYN+ AOAA	LKYN+ BENZOICO	LKYN+ KÓJICO	LKYN+ 3,5 MCP
Cerebelo	1811 \pm 289.0	269.5 \pm 31.57	1052 \pm 231.9	1274 \pm 291.6	1229 \pm 276.0

8.2.2 Efecto del ONOO⁻ en la producción de KYNA a partir de L-KYN en presencia de inhibidores de la DAAO y el inhibidor AOAA no específico de las KAT en homogenados de cerebelo.

Para comprobar si el aumento en los niveles de KYNA extracelular producidos a partir de L-KYN es estimulado en presencia del anión ONOO⁻ y descartar que se deba solamente a la acción enzimática ya sea de la DAAO ó de las KAT, se realizaron experimentos en los cuales se incubó por 2h a condiciones fisiológicas y en buffer Krebs, homogenados de cerebelo con inhibidores para ambas enzimas, en presencia del ONOO⁻. La tabla 3.0 resume los resultados obtenidos en estos experimentos, en ella se registra que la presencia de anión ONOO⁻ y el precursor L-KYN estimula 186.14 veces más la producción de KYNA con respecto a aquellos tratamientos en donde sólo se incubó con L-KYN. Al probar los distintos inhibidores enzimáticos, se obtuvo que tanto el AOAA como el ácido kójico son capaces de disminuir significativamente el aumento estimulado por la presencia de anión ONOO⁻, es importante resaltar que para el caso del AOAA la producción de KYNA no sufre la misma inhibición (85.12%) presentada en ausencia del anión ONOO⁻, sino que, los valores de producción de KYNA sólo son llevados hasta aquellos obtenidos en presencia sólo de L-KYN. Por el contrario, la presencia del inhibidor 3,5 MCP no afecta

de manera significativa a la producción de KYNA estimulada por el ONOO^- . Finalmente, en el caso del ácido benzoico la disminución resulta gráficamente evidente (Fig. 17.0) pero sólo parcialmente significativa.

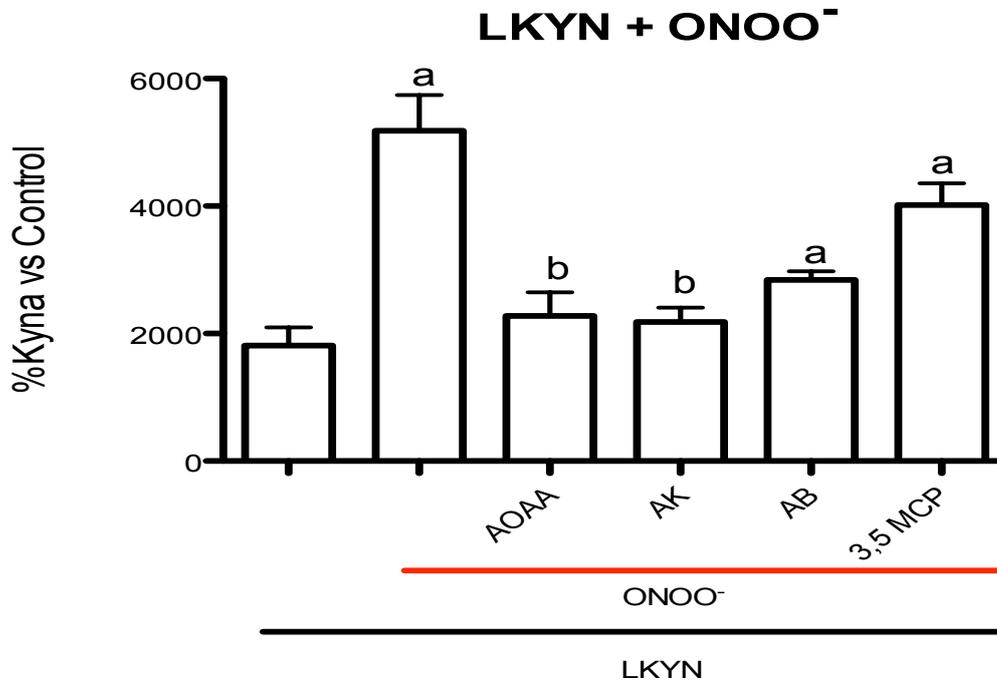


Fig. 17.0. Se muestra el efecto comparativo en la producción de KYNA a partir de L-KYN en presencia de inhibidores para la DAAO y AOAA para las KAT, en ausencia o presencia del anión ONOO^- . Producción de KYNA en porcentaje respecto al control \pm el error estándar, en presencia del anión ONOO^- en ausencia o presencia de los distintos inhibidores enzimáticos: A=AOAA, K=ácido kójico, B=ácido benzoico, 3,5 MCP. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Bonferroni, obteniendo valores significativos respecto a L-KYN ^a y a L-KYN+ ONOO^- ^b $p < 0.05$.

Tabla 3.0. Efecto del pro-oxidante ONOO⁻ en la producción de KYNA en homogenados de rata de cerebelo a partir de L-KYN con la inhibición simultánea de las KAT ó la DAAO. Los datos son representados como la medias en porcentaje respecto al control \pm el error estándar de cada tratamiento: L-KYN (n=29), L-KYN+ONOO⁻(n=29), L-KYN+ONOO⁻+AOAA(10), L-KYN+ONOO⁻+BENZOICO(n=8), L-KYN+ONOO⁻+KÓJICO(n=10) y L-KYN+ONOO⁻+3,5 MCP(n=14).

%KYNA	LKYN	LKYN+	LKYN+	LKYN+	LKYN+	LKYN+
vs		ONOO ⁻				
control			+AOAA	KÓJICO	BENZOICO	3,5 MCP
Cerebelo	1811 \pm 289.0	5182 \pm 561.6	2276 \pm 369.2	2184 \pm 225.6	2843 \pm 135.3	4019 \pm 340.3

8.2.3 Efecto de inhibidores de la DAAO y el inhibidor AOAA no específico de las KAT en la producción de KYNA a partir de D-KYN en homogenados de cerebelo.

En los experimentos in vivo, se observa que existe una producción diferencial de KYNA dependiendo del enantiómero utilizado como precursor. Se evaluó a capacidad de inhibición del ácido kójico, ácido benzoico, 3,5 MCP y AOAA (1mM) con respecto a la disminución en la producción de KYNA en presencia de D-KYN. Después de incubar los homogenados de cerebelo durante 2h a 37°C en buffer Krebs con D-KYN la producción de KYNA aumentó 988 \pm 65.4% con respecto al control (Fig. 18.0). Este aumento resulta severamente disminuido cuando a los tratamientos con D-KYN se les añadieron los inhibidores de la DAAO, obteniendo una disminución de \approx 65% (337.3 \pm 67.77%, ácido kójico; 347.3 \pm 65.82% ácido benzoico y 311.5 \pm 52.18% 3,5 MCP; Tabla 4.0) vs. el aumento de KYNA sólo por D-KYN: 988 \pm 65.4%. Esta disminución resultó significativa de acuerdo a lo arrojado por los datos estadísticos. Por otro lado, el AOAA aunque en menor medida también tuvo un efecto significativo en la producción de KYNA a partir de D-KYN, al inhibir cerca del 27% de la producción original sólo con D-KYN. Finalmente, es importante subrayar que la producción de

KYNA a partir de D-KYN aún en presencia de los inhibidores sigue siendo significativamente mayor al control para todos los casos.

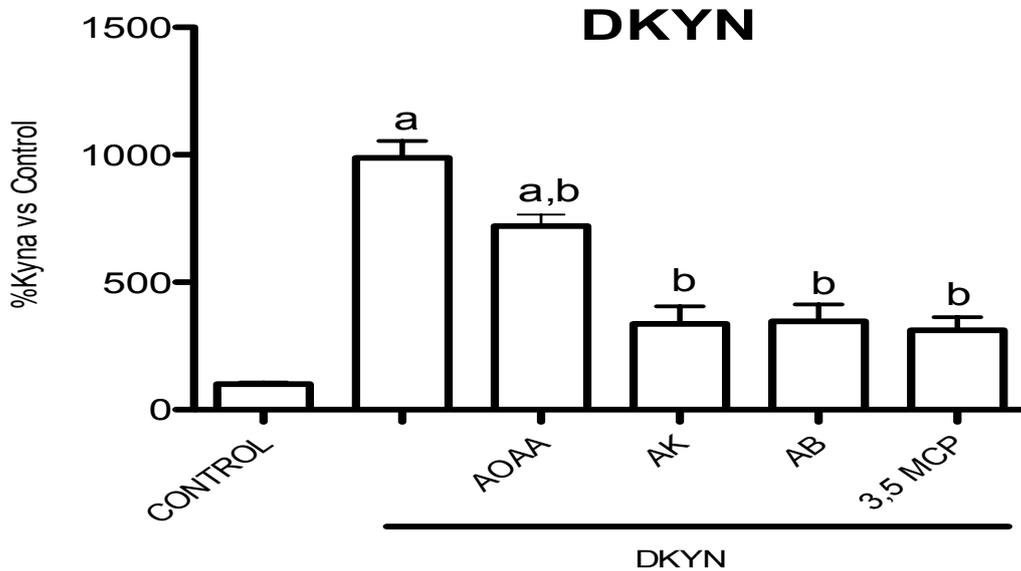


Fig. 18.0. Se muestra el efecto comparativo en la producción de KYNA a partir de D-KYN (DKYN) en presencia de inhibidores para la DAAO y AOAA para las KAT. a) Producción de KYNA a partir de D-KYN expresada como porcentaje respecto al control \pm el error estándar, en presencia de los distintos inhibidores: AOAA: ácido aminooxiacético, AK: ácido kójico, AB: ácido benzoico, 3,5 MCP. Se indican las diferencias significativas con respecto al control ^a y con respecto a D-KYN ^b de acuerdo con una prueba de ANOVA de una vía seguida por una prueba Bonferroni $p < 0.05$.

Tabla 4.0. Efecto en la producción de KYNA en homogenados de rata de cerebelo a partir de D-KYN en presencia de inhibidores enzimáticos de las KAT y de la DAAO. Los datos son representados como la medias en porcentaje respecto al control \pm el error estándar de cada tratamiento: D-KYN (n=25), D-KYN+AOOA(17), D-KYN+BENZOICO(n=8), D-KYN+ KÓJICO(n=8) y D-KYN+3,5 MCP(n=8).

%KYNA vs control	DKYN	DKYN+ AOAA	DKYN+ KÓJICO	DKYN+ BENZOICO	DKYN+ 3,5 MCP
Cerebelo	988 \pm 65.4	720.9 \pm 44.8	337.3 \pm 67.77	347.3 \pm 65.82	311.5 \pm 52.18

8.2.4 Efecto del ONOO^- en la producción de KYNA a partir de D-KYN en presencia de inhibidores de la DAAO y del AOAA en homogenados de cerebelo.

En los experimentos previos, tanto *in vitro* como *in vivo*, se comprobó que los niveles de KYNA son incrementados en presencia de cualquiera de las formas enantioméricas L-KYN ó D-KYN. En estos experimentos se comprobó que el ONOO^- es capaz de estimular la producción de KYNA a partir de D-KYN tal como sucede con la forma L-. Los resultados graficados en la Fig. 18.0 así como los valores obtenidos de producción de KYNA arrojan un porcentaje de inhibición mayor al 50% para el caso de los inhibidores de la D-AAO. Aquí comprobamos qué tanto influye la presencia de estos inhibidores cuando a los tratamientos se les incuba por 2h a 37°C en buffer Krebs con el anión ONOO^- . Como se muestra de manera resumida en la Tabla 5.0 y en la Fig. 19.0), que la producción estimulada por la presencia del anión ONOO^- , se ve mermada cuando añadimos inhibidores de la DAAO, disminuyendo de manera significativa. Los porcentajes de producción de KYNA, para el caso del ácido kójico y del ácido benzoico disminuyen con respecto a D-KYN+ ONOO^- más del 70%: 86.1 y 75.6% respectivamente; el 3,5 MCP también disminuye de manera significativa esta producción en un 66.1%, mientras que el AOAA sólo lo hace en un 24.9% de manera no significativa. El ácido kójico, provoca una disminución en los niveles de KYNA significativamente menores que el tratamiento de D-KYN sin el ONOO^- .

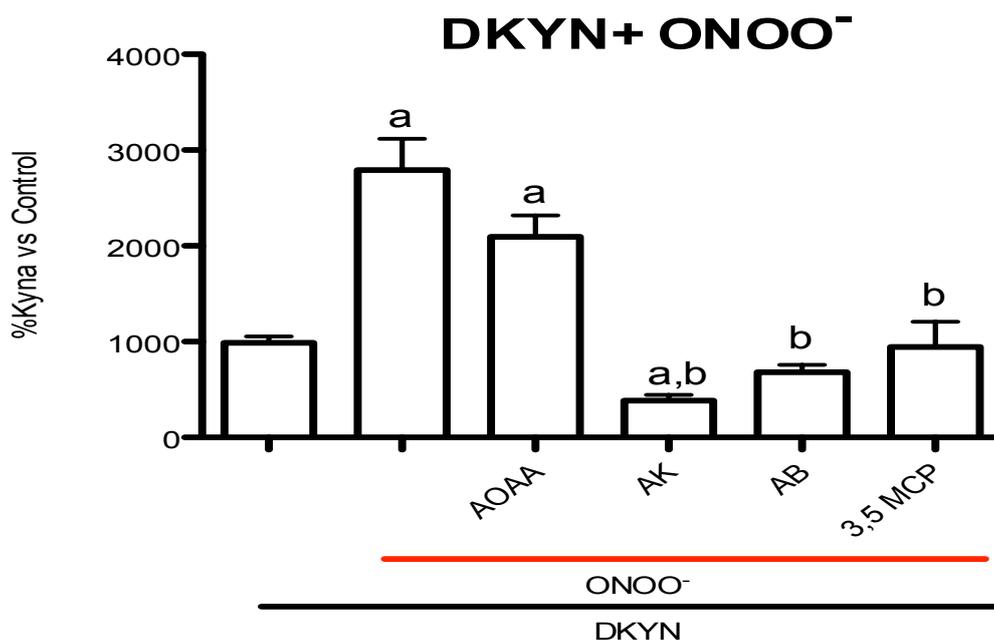


Fig. 19.0. Se muestra el efecto comparativo en la producción de KYNA a partir de D-KYN (barra negra) en presencia de inhibidores para la DAAO y AOAA para las KAT, en ausencia o presencia del anión ONOO^- (barra roja). Producción de KYNA en porcentaje respecto al control \pm el error estándar, en presencia del anión ONOO^- en ausencia o presencia de los distintos inhibidores enzimáticos: AOAA: ácido aminoacético, AK:ácido kójico, AB:ácido benzoico, 3,5 MCP. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Bonferroni, obteniendo valores significativos respecto a D-KYN ^a y a D-KYN+ ONOO^- ^b $p < 0.05$.

Tabla 5.0. Efecto del ONOO^- en la producción de KYNA en homogenados de rata de cerebelo a partir de D-KYN inhibiendo de forma simultánea a las KAT o a la DAAO. Los datos son representados como la medias en porcentaje respecto al control \pm el error estándar de cada tratamiento: D-KYN (n=25), D-KYN+ ONOO^- +AOAA(14), D-KYN+ ONOO^- +BENZOICO(n=8), D-KYN+ ONOO^- +KÓJICO(n=14) y D-KYN+ ONOO^- +3,5 MCP(n=7).

%KYNA vs control	DKYN	DKYN+ ONOO^-	DKYN+ ONOO^- +AOAA	DKYN+ ONOO^- +KÓJICO	DKYN+ ONOO^- +BENZOICO	DKYN+ ONOO^- +3,5 MCP
Cerebelo	988.4 \pm 65.4	2790 \pm 328.3	2094 \pm 222.8	386.5 \pm 56.8	680.4 \pm 76.7	946.3 \pm 260.6

9.0 DISCUSIÓN:

Las fluctuaciones en los niveles endógenos de KYNA en el SNC han recibido en recientes años especial atención dada su incidencia en la transmisión glutamatérgica, dopaminérgica y colinérgica, al mismo tiempo han sido señaladas como característica común de enfermedades neurodegenerativas con un perfil oxidativo. Los experimentos realizados en este trabajo, se encuentran orientados a contribuir al esclarecimiento de las rutas no canónicas de formación de KYNA, específicamente en cerebelo. Los resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro* confirman por un lado, lo reportado por Ogaya *et al* (2010) y Pérez de la Cruz *et al* (2012): la formación de KYNA a partir de D-KYN es posible y se lleva a cabo eficientemente en cerebelo. A partir de los experimentos *in vivo* de microdiálisis reversa se observó un incremento de ≈ 900 veces respecto a los valores basales de KYNA durante la infusión directa de D-KYN en la corteza cerebelar de ratas *Wistar*. Del mismo modo, en los experimentos *in vitro* llevados a cabo en amortiguador fisiológico la incubación de D-KYN dio lugar a un incremento en un 988% en la producción de KYNA en homogenados de cerebelo. Ambos valores resultaron significativamente menores a los obtenidos a partir de L-KYN tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, el efecto observado en la producción de KYNA en presencia de distintos inhibidores enzimáticos fue distinto para cada forma enantiomérica. Mientras que la administración de AOAA inhibió en un $\approx 70\%$ la producción de KYNA a partir de L-KYN en cerebelo, la obtenida a partir de D-KYN sólo se vio disminuida en un $\approx 11\%$, es decir, este resultado refleja que la actividad de las KAT contribuye sólo ligeramente a la producción de KYNA cuando ésta es a partir de la forma D-KYN. Estudios realizados por Fukushima *et al.*, (2009) e Ishii *et al.*, (2010), proporcionaron evidencia de la conversión de D-KYN a KYNA por la DAAO, una enzima que cataliza la deaminación oxidativa de los D-aminoácidos. Por lo que, basados en estas aseveraciones probamos la contribución de la acción enzimática de

la DAAO en la producción de KYNA a partir de D-KYN. Los resultados *in vitro* demuestran que la producción de KYNA a partir de ambos precursores se ve mermada por la presencia de los inhibidores de la DAAO, sin embargo, la inhibición es más remarcada en el caso de la isómero D-KYN. Es importante resaltar que contrario a lo esperado, la disminución en la producción de KYNA a partir de L-KYN en presencia de los inhibidores de la DAAO resulta significativa para el caso del ácido kójico y el ácido benzoico, no así para el caso del 3,5 MCP donde la disminución que no es significativa. Además de que la producción de KYNA a partir de D-KYN en presencia de estos inhibidores no es totalmente abatida y al mismo tiempo, sigue siendo significativamente mayor a los controles. Entonces, si la formación de KYNA para ambas formas enantioméricas no es abatida totalmente al inhibir los mecanismos enzimáticos involucrados y más aún, si el incremento remanente posterior al tratamiento con los inhibidores sigue siendo significativo con respecto a los niveles endógenos, deben existir otros mecanismos involucrados que contribuyen al incremento en los niveles de KYNA. Por lo que, basados en el hecho de que las enfermedades neurodegenerativas en especial EA, EH y EP, poseen un perfil oxidativo y un aumento reportado en la cantidad de ERO/ERNRNS como causa y consecuencia de su condición, además del incremento antes mencionado en los niveles de KYNA, no es descabellado pensar que ambos fenómenos tengan relación. En los experimentos realizados aquí, exploramos esta hipótesis al determinar el efecto que ejerce la presencia de ONOO^- (considerada una ERO y ERN), bajo las mismas condiciones en las que realizamos los demás experimentos, en la producción de KYNA a partir de ambas formas enantioméricas. Los resultados obtenidos arrojan que la presencia de ONOO^- estimula significativamente la producción de KYNA, tanto *in vivo* como *in vitro*. El comportamiento gráfico del incremento en los niveles de KYNA en los experimentos *in vivo*, refleja que la interacción entre los precursores y el ONOO^- ocurre de manera inmediata, ya que el pico máximo de producción de KYNA se recorre prácticamente a la primera media hora de infusión tanto de D-KYN como de L-

KYN, disminuyendo a través del tiempo, ésto debido probablemente a la corta vida media del ONOO^- . El incremento en la producción de KYNA observado en estos experimentos resultó significativamente mayor en presencia de ONOO^- . Este mismo incremento, pero de una manera mucho más significativa se observa en los experimentos *in vitro*, en donde se obtuvo un aumento aproximado de 5182% respecto al control a partir de L-KYN en presencia de ONOO^- y de 2790% en el caso de D-KYN. En los experimentos subsecuentes, realizados bajo las mismas condiciones pero ahora en presencia de inhibidores enzimáticos se reprodujo la respuesta diferencial anteriormente observada entre ambos enantiómeros. Mientras que el AOAA, disminuye el incremento de KYNA obtenido en presencia de ONOO^- a partir de L-KYN a prácticamente la mitad ($\approx 44\%$) sólo lo hace en un $\approx 25\%$ para el caso de D-KYN, lo que una vez más refleja que la producción de KYNA a partir de la forma D-KYN depende en menor medida de las KAT. Por otro lado, la presencia de inhibidores de la DAAO reducen la producción de KYNA en presencia de ONOO^- en más del 65%, siendo los efectos del ácido kójico y los del ácido benzoico los más acentuados. Cabe mencionar que esta reducción acentuada en presencia del ácido kójico y del benzoico también ocurre cuando la producción es a partir de la forma L-KYN. Entonces, la producción de KYNA se ve estimulada en presencia de ONOO^- a partir de cualquiera de las formas enantioméricas, aunque el porcentaje de aumento sigue siendo mayor a partir de L-KYN, el AOAA tiene efecto diferencial entre ambas isoformas ejerciendo sólo un ligero efecto cuando se trata de la forma D-KYN, lo mismo sucede para el caso del 3,5 MCP para el caso de la producción de KYNA a partir de L-KYN. Sin embargo, tanto el ácido kójico como el ácido benzoico logran disminuir de manera significativa el porcentaje de aumento de KYNA a partir de ambas isoformas, esto más allá de hablarnos de una falta de especificidad al inhibir la DAAO, nos remite a la característica común que guardan estos compuestos: poseen estructuras en anillo con grupos hidroxilo disponibles para poder ejercer un actividad antioxidante atrapando tanto ROS como RNS, que para el caso del ácido benzoico y el ácido kójico ha sido

previamente reportada. De esta manera, el acentuado efecto de los inhibidores en la producción de KYNA especialmente a partir de D-KYN estaría siendo enmascarado por su capacidad antioxidante, por lo que, no queda claro a qué característica atribuirle la disminución en los niveles de producción de KYNA si a la capacidad de estos compuestos por combatir con la DAAO por los D-aminoácidos, o a su capacidad como antioxidante, atrapando al anión ONOO^- . Estructuras en anillo con grupos OH como sustituyentes es una característica también de los derivados del Trp, reportados como atrapadores de $\text{OH}\cdot$ y $\text{ROO}\cdot$. Por otro lado, el incremento de ROS y RNS ampliamente reportado en condiciones patológicas y enfermedades neurodegenerativas es un escenario propicio para la interacción de estas especies reactivas con los derivados del Trp y otras moléculas antioxidantes. Por ejemplo, en condiciones patológicas se ha reportado que la forma inducible de la óxido nítrico sintasa está incrementada en diversos tipos celulares amplificando la velocidad de síntesis de óxido nítrico, que a su vez, reacciona con el anión superóxido aumentando directamente los niveles de ONOO^- (Beckman et al., 1994) esto aunado a la inusual estabilidad del ONOO^- que le permite difundirse lejos de su sitio de formación e incluso traspasar membranas celulares, dicho sea de paso es factor clave en su toxicidad. Para el caso de las enfermedades neurodegenerativas, en específico en la EA una elevada nitración proteica (marcador de oxidación de proteínas), de las proteínas τ es una característica relacionada con la severidad y el avance del padecimiento. En este punto, es importante mencionar que la cuantificación de la 3-N-tirosina es uno de los marcadores de nitración de moléculas en nuestro organismo. Resultados reportados por Suzuki et al, (2004); Peyrot et al, (2003) y Yamakura et al, (2006) confirman que a pH fisiológicos y una baja concentración de CO_2 , el ONOO^- reacciona con el N-acetil-Trp, produciendo principalmente kinureninas y derivados 1-nitrosos. Por otro lado, no es la primera vez que se reporta que la producción de KYNA a partir de L-KYN es estimulada en presencia de sustancias generadoras de ROS (H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$) y a su vez, disminuida por sustancias que disminuyen la cantidad de ROS (Hardeland, 2001). En

este caso, se usa específicamente ONOO^- de manera directa en condiciones *in vitro* y por primera vez, *in vivo* como un agente pro-oxidante capaz de estimular la producción de KYNA en presencia de sus precursores, en ambas formas enantioméricas. Entonces, basados en el hecho de que el ONOO^- es un agente nitrosativo capaz de interactuar directamente con un amplio espectro de moléculas orgánicas dentro de nuestro organismo, que además sus niveles pueden estar incrementados en condiciones patológicas y de neurodegeneración, y que tanto D- como L-KYN son capaces de atrapar aniones ONOO^- , esto por un lado podría estar favoreciendo la propia oxidación de los precursores favoreciendo su interacción con otras ERO/ERN o por otro lado, a la interacción directa con los grupos funcionales expuestos en el segundo anillo abierto, el ONOO^- intercambiando electrones con el grupo amino del precursor dando lugar a la ciclización espontánea del anillo en el cual se mantendrán en resonancia los electrones hasta formar la estructura estable del ácido kinurénico con un grupo hidroxilo en la posición para y un carboxilo en la meta tras la liberación de una molécula de agua, este mecanismo es representado en la Fig. 14.0 y es propuesto por nuestro equipo de trabajo.

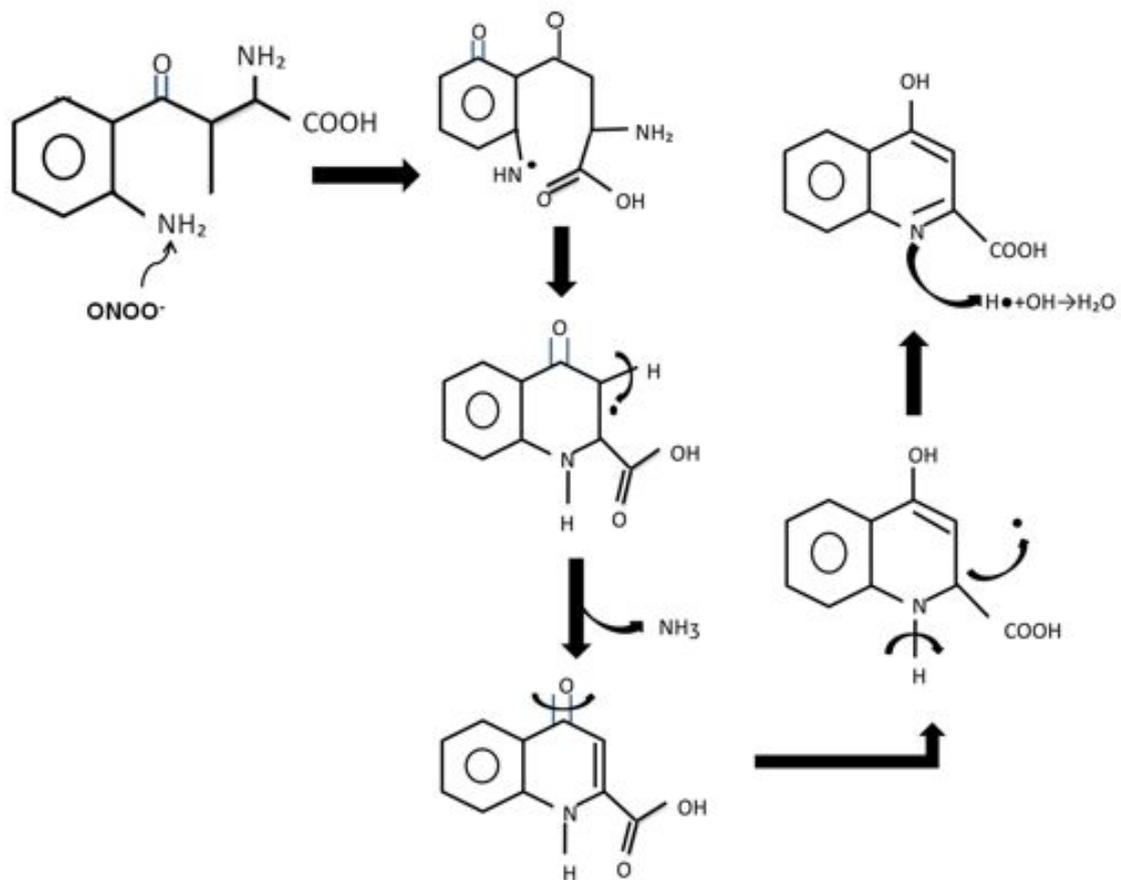


Fig.14.0 Reacción química propuesta de la interacción química entre ONOO⁻ y L-KYN para formar ácido kinurénico.

10.0 CONCLUSIONES

- Los niveles de KYNA en cerebelo a partir de la infusión de ambos precursores D-KYN y L-KYN en los experimentos de KYNA es significativa.
- La infusión de AOAA en cerebelo produce un efecto diferencial entre las distintas formas enantioméricas en los niveles de KYNA, con un efecto mucho mayor para la forma L-: 66.5% de inhibición y sólo 11.4% para el caso de D-KYN.
- El ONOO⁻ es capaz de estimular la producción de KYNA en más del 50% a partir de la producción obtenida previamente para ambas isoformas, con una producción significativamente mayor a partir de L-KYN.

- El pico máximo de producción de KYNA se recorre hacia la primera media hora, dada la corta vida media del ONOO⁻.
- La producción de KYNA incrementa en los homogenados de cerebelo de rata al incubarlos con ambos precursores D-KYN y LKYN.
- La inhibición del AOAA en la producción de KYNA en homogenados de cerebelo resulta en 85% a partir de L-KYN y sólo de 25% para D-KYN.
- Los inhibidores de la DAAO ácido kójico y ácido benzoico disminuyen de manera significativa los niveles de KYNA producidos a partir de ambas formas enantioméricas tanto D-KYN como L-KYN. Con un efecto significativamente menor para el caso de la forma D-KYN.
- La presencia del anión ONOO⁻ estimula la producción de KYNA en homogenados de cerebelo a partir de ambas isoformas.
- La producción estimulada por el anión ONOO⁻ es significativamente atenuada en presencia de ácido kójico y ácido benzoico, ambos previamente reportados como sustancias antioxidantes.

11.0 PERSPECTIVAS

- ✓ Determinar la repercusión en la síntesis *in vivo* de KYNA tras la administración del precursor en ambas formas enantioméricas utilizando penicilamina, un atrapador específico del ONOO⁻.
- ✓ Indagar si la inhibición de la DAAO tras la administración de ácido kójico abate significativamente de KYNA aún en presencia del ONOO⁻.
- ✓ Evaluar la actividad enzimática de la DAAO en homogenados de cerebelo en ausencia o presencia de ONOO⁻, antioxidantes e inhibidores de la enzima.

12.0 Bibliografía

1. Andersen, J. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: a cause or consequence?. *Nat rev neurosci*. Publicado en línea. Doi: 10.1038/nrn 1434.
2. Baran H, Shwarcz R, 1993. Regional differences in the ontogenetic pattern of kynurenine aminotransferase in the rat brain. *Dev. Brain Res.*74: 283-286.
3. Baran, H.; Jellinger, K.; Deecke, L. 1999. Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.*106: 165
4. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 1620–1624.
5. Beeler T. and Churchich J. E. 1976. Reactivity of the phosphopyridoxal groups of cystathionase. *J. Biol. Chem.* 251, 5267–5271.
6. Bender D, McCreanor G. 1982. The preferred route of kynurenine metabolism in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 717.
7. Bishop GA, Ho RH, King JS. 1985 a. An immunohistochemical study of serotonin development in the opossum cerebellum. *Anat Embryol.* 171: 325-338.
8. Bishop GA, Ho RH, King JS. 1985 b. Localization of serotonin immunoreactivity in the opossum cerebellum. *J Comp Neurol.* 235: 301–321.
9. Del Olmo E, Díaz A, Guirao-Piñeyro M, Del Arco C, Pascual J, Pazos A. 1994. Transient localization of 5-HT_{1A} receptors in human cerebellum during development. *Neurosci Lett.* 166: 149–152.
10. Denicola, A., J.M. Souza, and R. Radi. 1998. *Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes.* Proc Natl Acad Sci U S A. **95**(7): p. 3566-71
11. Foster, A. C.; Vezzani, A; French, E. D.; Shwarcz, R. 1984. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci Lett.*48:273.
12. Erhardt, S.; Schwieler, L.; Engberg, G. 2003. Kynurenic acid and schizophrenia. *Adv Exp Med Biol.* 527: 155
13. Erhardt S, Schwieler L, Emanuelsson C, Geyer M. 2004. Endogenous kynurenic acid disrupts prepulse inhibition. *Biol Psychiatry.* 56:255–60.
14. Füvesi J, Rajda C, Bencsik K, Toldi J, Vécsei L. 2012. The role of kynurenines in the pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis: therapeutic implications. *J Neural Transm.* 119:225-34.
15. Goda K, Kishimoto R, Shimizu S, Hamane Y, Ueda M. 1996. Quinolinic acid and active oxygens. Possible contribution of active oxygen during cell death in the brain. *Adv Exp Med Biol.* 398:247–54.
16. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Oxford Univ. Press, London.
17. Hardeland R, Zsizsik BK. 1997. Kynurenic acid as a free radical scavenger: measurements of educt and product fluorescence and of light emission from an excited intermediate state. In: Hardeland R, editor. *Biological rhythms and antioxidative protection*. Göttingen: Cuvillier. 153–60
18. Hardeland R, Zsizsik BK, Poeggeler B, Fuhrberg B, Holst S, Coto-Montes A. 1999. Indole-3-pyruvic and -propionic acids, kynurenic acid, and related metabolites as luminophores and free-radical scavengers. *Adv Exp Med Biol.* 467:389–95.
19. Hardeland R, B.K. Zsizsik. 2002. Formation of kynurenic and xanthurenic acids from kynurenine and 3-hydroxykynurenine in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*: role of a novel, oxidative pathway. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* 133:383–392 Hayashi M. 1987. Ontogeny of glutamic acid

- decarboxylase, tyrosine hydroxylase, choline acetyltransferase, somatostatin and substance P in mokey cerebellum. *Brain Res.* 429:181-186.
20. Haydon PG, McCobb DP, Kater SB. 1984. Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science.* 226: 561.
 21. Heyes, M.P., Wyler, A.R., Devinsky, O., Yergey, J.A., Markey, S.P., Nadi, N.S. 1990. Quinolinic acid concentrations in brain and cerebrospinal fluid of patients with intractable complex partial seizures. *Epilepsia.* 31: 172– 177.
 22. Heyes, M.P. 1996. The kynurenine pathway and neurologic disease. Therapeutic strategies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 398: 125–129.
 23. Ischiropoulos, H. 1998. Biological tyrosine nitration: A pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 356: 1–11.
 24. Johnson III, B.A., Baban, B., Mellor, A.L. 2009. Targeting the immunoregulatory indoleamine 2,3 dioxygenase pathway in immunotherapy. *Immunotherapy* , 645–661.
 25. Konig N, Wilkie MB, Lauder JM. 1988. Tyrosine hydroxylase and serotonin containing cells in embryonic rat rhombencephalon: a whole-mount immunocytochemical study. *J Neurosci Res.* 20: 212–233.
 26. Koppenol, W.H., et al. 1992. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol.* 5(6): 834-42.
 27. Main PA, Angley MT, O'Doherty CE, Thomas P, Fenech M. 2012. The potential role of the antioxidant and detoxification properties of glutathione in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Metab (Lond).* 9:35
 - Maiti A, Snider RS. 1975. Cerebellar control of basal forebrain seizures: amygdala and hippocampus. *Epilepsia.* 16: 521–533.
 28. Marla, S.S., J. Lee, and J.T. Groves. 1997. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:14243-8.
 29. Marletta, M.A., et al. 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry.* 27: 8706-11.
 30. Mattevi A, Vanoni MA, Todone F, Rizzi M, Teplyakov A, Coda A, Bolognesi M, and Curti B. 1996. Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b2. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7496–7501.
 31. Moncada, S. and E.A. Higgs. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 21: 361-74.
 32. Koppenol, W.H., et al. 1992. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol.* 5: 834-42.
 33. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs. 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 38:1709-15.
 34. Marletta, M.A., et al. 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry.* 27: p. 8706-11.
 35. Moroni, F., Lombardi, G., Carla, V., Pellegrini, D., Carassale, G.L., Cortesini, C. 1986. Content of quinolinic acid and of other tryptophan metabolites increases in brain regions of rats used as experimental models of hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.* 46, 869–874
 36. Nordberg J & Arnér E. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine.* 31: 1287–1312.
 37. Ogawa, T.; Matson, W. R.; Beal, M. F.; Myers, R. H.; Bird, E. D.; Milbury, P.; Saso, S. 1992. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology.* 42: 1702.
 - Peters, J. C. 1991. Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 294: 345-358.

38. Peyrot F, Martin M-T, Migault J et al. 2003. Reactivity of peroxynitrite with melatonin as a function of pH and CO₂ content. *Eur J Org Chem*.1:172–181.
39. Peyrot, F; Ducroq C. 2008. Potential role of triptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res*. Vol 45:235-246.
40. Politi, V., Lavaggi, M.V., Di Stazio, G., Margonelli, A. 1991. Indole-3-pyruvic acid as a direct precursor of kynurenic acid. In: Schwarcz, R., Young, S.N., Brown, R.R. (Eds.), *Kynurenine and serotonin pathways. Progress in tryptophan research*. Plenum, New York, pp. 515–518.
41. Quijano, C., Romero, N., and Radi, R. 2005. Tyrosine nitration by superoxide and nitric oxide fluxes in biological systems: Modeling the impact of superoxide dismutase and nitric oxide diffusion. *Free Rad. Biol. Med.* 39: 728–741.
42. Quijano, C., et al 1997. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem J*. **322 (Pt 1)**: 167-73.
43. Radi, R., et al. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*. 7: 4244-50.
44. Radi, R. 1998. Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem Res Toxicol*. 1 **11**: 720-1.
45. Radi, R., Denicola, A., Alvarez,B., Ferrer-Sueta,G., and Rubbo,H. 2000. The biological chemistry of peroxynitrite, en *Nitric oxide: Biology and pathobiology*. Ignarro,L.J.: San francisco, California. p. 57-82
46. Radi, R., et al. 2001. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med*. **30**: 463-88.
47. Rammani, N. 2006. The primate cortico-cerebellar system: anatomy and functions. *Nature Reviews*. 7: 511-522.
48. Reinhard Jr JF. 2004. Pharmacological manipulation of brain kynurenine metabolism. *Ann NY Acad Sci*. 1035:335–49.
49. Romero, N., et al., 1999. Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys*. **368**: 23-30.
50. Sampson J. B., Rosen H., Beckman J. 1996. Peroxynitrite-Dependent Tyrosine Nitration Catalyzed by Superoxide Dismutase, Myeloperoxidase, and Horseradish Peroxidase. *Pathological and clinical aspects of nitric oxide*. **20**: 210-18.
51. Schwarcz R, Pellicciari R. 2002. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther*. 303:1-10.
52. Schwarcz, R., Tamminga, C.A., Kurlan, R., Shoulson, I.1988. Cerebrospinal fluid levels of quinolinic acid in Huntington's disease and schizophrenia. *Ann. Neurol*. 24: 580–582.
53. Selva Rivas-Arancibia, Cesar Gallegos-Ríos, Nancy Gomez-Crisostomo, Ever Ferreira-Garcidueñas, Dulce Flores Briseño, Luz Navarro and Erika Rodríguez-Martínez (2011). *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disease, Neurodegenerative Diseases - Processes, Prevention, Protection and Monitoring*, Dr Raymond Chuen-Chung Chang (Ed.), ISBN: 978-953-307-485-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/neurodegenerative-diseases-processes-prevention-protection-and-monitoring/oxidative-stress-and-neurodegenerative-disease>.
54. Shukla V, K. Mishra S, C. Pant H. 2011. Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv in Phar Sci*. Volume 2011. ID 572634.
55. Sikick L, Hickok JM, Todd RD. 1990. 5-HT_{1A} receptors control neurite branching during development. *Dev Brain Res*. 56: 169–271.
56. Stone, T.W., Perkins, M.N. 1981. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur. J. Pharmacol*. 72: 411–412.
57. Stone, T.W., 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharm. Rev*. 45: 309–379.

58. Stone TW, Darlington LG. 2002. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 1:609–20.
59. Suzuki T, Mower HF, Friesen MD et al. 2004. Nitration and nitrosation of N-acetyl-L-tryptophan and tryptophan residues in proteins by various reactive nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 37:671–681.
60. Trujillo, M., et al. 2004. Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi tryptaredoxin peroxidases catalytically detoxify peroxyxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J Biol Chem.* **279**:34175-82.
61. Ugartondo V. 2009. Tesis: Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Facultad de Farmacia Departamento de Fisiología. Universidad de Barcelona.
62. Uttara, B., Singh A. V., Zamboni P., Mahajan R. T. 2009. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharm.* Vol 7: 65-74.
63. Verge D, Matthiessen L, Daval G, Bailly Y, Kia HK, Hamon M. 1991. Localization of 5-HT_{1A} serotonin receptors in the cerebellum of young rats. *Neurochem Int.* 19: 425–431.
64. Voogd J & M Glickstein. The anatomy of the cerebellum. *Cerebellum.* 1998. Vol. 21: 370-376.
65. White, J. J. & R. V. Sillitoe. 2012. Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Dev Biol.* Doi: 10.1002/wdev.65
66. Yamakura F, Ikeda K. Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species. *Nitric Oxide* 2006; 14:152–161
67. Yeh HH, Woodward DJ. 1983. Noradrenergic action in the developing rat cerebellum: interaction between norepinephrine and synaptically- evoked responses of immature Purkinje cells. *Brain Res.* 313: 207–218.
68. Yew D. T. & Chan W. Y. 1995. Tyrosine hydroxylase and dopamine-β-hydroxylase-positive neurons and fibres in the developing human cerebellum—an immunohistochemical study. *Neurosci.* 65: 453–461.
69. White, J. J., Sillitoe, R. 2012. Development of the cerebellum: from gene expressions patterns to circuit maps. *WIREs Dev Biol.* Doi: 10.1002/wdev.65
70. Wolf, H. 1974. Studies on tryptophan metabolism in man. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 136 (Suppl.): 1-186.
71. Zsizsik BK, Hardeland R. 1999b. Kynurenic acid inhibits hydroxyl radical-induced destruction of 2-deoxyribose. In: Hardeland R, editor. Studies on antioxidants and their metabolites. Göttingen: Cuvillier. 92–4.
72. Zsizsik, B; Hardeland, R. 2001. Formation of kynurenic acid from L-kynurenine in light-exposed homogenates of *Lingulodinium polyedrum*: Effects of CCCP, paraquat and DCMU. *Actions and Redox Properties of Melatonin and other Aromatic Amino Acid Metabolites.* 193-196.
73. Zsizsik BK, Hardeland R. 2001^a. A putative mechanism of kynurenic acid oxidation by free radicals: scavenging of two hydroxyl radicals and superoxide anion, release of •NO and CO₂. In: Hardeland R, editor. Actions and redox properties of melatonin.