



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES REDOX DEL ÁCIDO
3-HIDROXIANTRANÍLICO: UN ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

GUSTAVO IGNACIO VÁZQUEZ CERVANTES



**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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Caracterización de las propiedades redox del 3-hidroxi-antranílico: un estudio
in vitro e *in vivo*.**

Índice.

Resumen	1
Introducción	3
Radicales libres y estrés oxidativo.....	3
La vía de las Kinureninas.....	4
El ácido 3-hidroxi-antranílico.....	6
Justificación.....	8
Hipótesis.....	8
Objetivo.....	9
Objetivos particulares.....	9
Método	9
Ensayos sintéticos.....	9
Atrapamiento de anión peroxinitrito.....	9
Atrapamiento de anión superóxido.....	10
Atrapamiento de peróxido de hidrógeno.....	10
Atrapamiento de radical hidroxilo.....	11

Protección contra degradación de DNA.....	11
Protección contra degradación de proteínas.....	12
Capacidad quelante de Fe ²⁺	12
Ensayos <i>in vitro</i>	13
Obtención de tejido.....	13
Cuantificación de proteínas Lowry.....	13
Producción de especies reactivas de oxígeno.....	13
Peroxidación de lípidos.....	14
Funcionalidad celular.....	14
Ensayos <i>in vivo</i>	15
Administración de 3HAA.....	15
Pruebas de conducta.....	15
Obtención de muestras.....	16
Pruebas bioquímicas.....	16
Evaluación histológica.....	16
Resultados	17
Discusión	26

Conclusiones	28
Referencias	29
Índice de figuras.	
Figura 1. Vía de la kinureninas.....	5
Figura 2. Ácido 3 hidroxiantranílico.....	7
Figura 3. Ubicación de <i>Bregma</i>	15
Figura 4. Capacidad atrapadora de 3HAA.....	17
Figura 5. Efecto quelante de Fe ²⁺ de 3HAA.....	18
Figura 6. Degradación de DNA y proteína.....	19
Figura 7. Producción de ROS y peroxidación de lípidos.....	21
Figura 8. Reducción de MTT.....	22
Figura 9. Conducta de giro.....	23
Figura 10. Pruebas bioquímicas.....	24
Figura 11. Preparaciones de Klüver-Barrera.....	25

Abreviaturas.

3HAA. Ácido 3-hidroxiantranílico.

3HK. 3-hidroxikinurenina.

3NP. Ácido 3-nitropropiónico.

AMPA. α -amino-3-hidroxi-metil-4-isoxazolepropionato.

DNA. Ácido desoxirribonucléico.

Fe²⁺. Hierro (II).

FeSO₄. Sulfato ferroso.

H₂O₂. Peróxido de hidrógeno.

HAAO. Ácido 3-hidroxiantranílico oxigenasa.

IDO. Indolamina-2,3-dioxigenasa.

KAT. Kinurenina amino transferasa.

KMO. Kinurenina monooxigenasa.

KYN. Kinurenina.

KYNA. Ácido kinurénico.

NAD⁺. Nicotinamina adenín dinucleótido.

NMDA. N-metil-D-aspartato.

$O_2^{\cdot-}$. Anión superóxido.

$\bullet OH$. Radical hidroxilo.

$ONOO^-$. Anión peroxinitrito.

QPRTasa. Ácido quinolínico fosforribosil transferasa.

QUIN. Ácido quinolínico.

ERBs. Especies reactivas de bromo.

ERCls. Especies reactivas de cloro.

ERCs. Especies reactivas de cobre.

ERIs. Especies reactivas de hierro.

ERNs. Especies reactivas de nitrógeno.

EROs. Especies reactivas del oxígeno.

TDO. Triptófano-2,3-dioxigenasa.

Trp. Triptófano.

VK. Vía de las kinureninas.

α -7nACh. Alfa-7-nicotínico.

Resumen.

La vía de las kinureninas (VK) es la principal ruta del metabolismo oxidativo del triptófano en distintos órganos y tejidos del ser humano, se expresa principalmente en cerebro hígado y riñón. Esta vía metabólica se ha correlacionado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la Esquizofrenia y las enfermedades de Huntington, de Alzheimer y de Parkinson. Algunos metabolitos producidos por esta vía han sido considerados como agentes neuroprotectores y antioxidantes mientras que otros actúan como moléculas excitotóxicas y oxidantes. En especial el ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA), un metabolito de la VK que presenta un papel dual, ya que se ha informado que este metabolito puede actuar como antioxidante ejerciendo protección, sin embargo hay otros informes que demuestran que el 3HAA puede actuar como un agente capaz de generar estrés oxidativo. Con el fin de aclarar la función del ácido 3HAA el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad atrapadora y antioxidante de esta molécula en sistemas de química combinatoria, *in vitro* e *in vivo*. Se emplearon sistemas sintéticos de producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), anión peroxinitrito ($ONOO^-$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para determinar cual es la especie reactiva de oxígeno que atrapa este metabolito (5-500 μM). Adicionalmente, se evaluó el efecto de 3HAA (10-100 μM) en la degradación de DNA y proteína inducida por $\cdot OH$ así como la determinación de su efecto quelante de Fe^{2+} . Por otra parte, se evaluó el efecto de 3HAA (10-100 μM) en la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), lipoperoxidación y funcionalidad celular en homogenados de cerebro de rata expuestos a $FeSO_4$ y $ONOO^-$. Finalmente determinamos el efecto en la conducta de giro, marcadores de daño oxidativo y muerte celular después de la inyección intraestriatal de 3HAA (5, 10 y 50 nmoles).

Encontramos que el 3HAA es un atrapador efectivo de $\cdot OH$ y $ONOO^-$, y que presenta propiedades quelantes de Fe^{2+} y de protección contra la degradación de DNA y

proteínas. Por otra parte, 3HAA es capaz de disminuir la producción de ROS y la peroxidación lipídica en homogenados de cerebro inducida por los pro-oxidantes evaluados. En los experimentos *in vivo*, encontramos que cinco días post-cirugía las ratas presentan conducta de giro, cambios morfológicos en el estriado inyectado y la disminución de funcionalidad celular lo cual sugiere daño celular por parte de 3HAA. En conjunto los resultados obtenidos sugieren que, en condiciones *in vitro*, el 3HAA puede actuar como un buen antioxidante, sin embargo *in vivo* esta propiedad cambia posiblemente debido a que el ambiente es más complejo y poco controlado. Por lo que es necesario en futuros trabajos determinar si el mecanismo daño celular ocasionado por 3HAA *in vivo* es dependiente de ciertos tipos celulares, así como evidenciar el mecanismo preciso por el cual el 3HAA ejerce tanto propiedades antioxidantes como la promoción de la muerte celular.

Introducción.

Radicales libres y estrés oxidativo. Los radicales libres son moléculas con un electrón desapareado en su último orbital lo que las hace capaces de reaccionar fácilmente con otras moléculas haciendo de estas a su vez moléculas muy reactivas. La participación de estos radicales libres en reacciones metabólicas genera especies reactivas, las cuales pueden o no ser radicales libres pero tienen propiedades oxidantes lo cual les permite seguir promoviendo el daño oxidativo. Las especies reactivas pueden ser de oxígeno (EROs), hierro (ERIs), cobre (ERCs), nitrógeno (ERNs), cloro (ERCIs), bromo (ERBs) (Dorado-Martínez *et al.*, 2003; Halliwell, 2006). En sistemas biológicos la especie química más común generadora de procesos oxidativos es el $O_2^{\cdot-}$, este radical libre se forma cuando una molécula de oxígeno atrapa a un electrón libre de su entorno. El exceso de $O_2^{\cdot-}$ puede formar $\cdot OH$ o combinarse con el óxido nítrico para formar $ONOO^{\cdot-}$ (Lorenzo-Velázquez *et al.*, 2008). Estas EROs son generadas de manera natural en los diversos compartimentos celulares, principalmente en la mitocondria, donde se generan aproximadamente el 90% de EROs, como consecuencia de la fosforilación oxidativa y al escape de electrones de la cadena respiratoria que pueden reaccionar con el oxígeno y otros receptores de electrones (Lagouge y Larsson, 2013). De manera natural las EROs participan directamente en la defensa contra infecciones así como en la coordinación procesos inflamatorios actuando como segundos mensajeros (Halliwell, 2006). Cuando hay un desequilibrio en la producción de EROs y los mecanismos antioxidantes ocurre estrés oxidativo, este daño genera la oxidación de carbohidratos, lípidos, proteínas

y nucleótidos, lo cual produce disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis. Los procesos oxidantes pueden ser reversibles o irreversibles dependiendo del tiempo que dure el estrés y la efectividad de las defensas antioxidantes (Dorado-Martínez *et al.*, 2003). En humanos, debido a la alta tasa de consumo de oxígeno, la alta cantidad de lípidos y ácidos grasos, y la baja actividad de enzimas antioxidantes del sistema nervioso central, este desbalance está relacionado con patologías tales como la Esquizofrenia y las enfermedades de Alzheimer, de Huntington y de Parkinson, entre otros padecimientos caracterizados por la neurodegeneración progresiva debido a la generación de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad e inflamación. La vía de las kinureninas ha sido relacionada con el desarrollo de estas enfermedades (Dringen *et al.*, 2000; Halliwell, 2006).

La vía de las kinureninas. El triptófano es un aminoácido aromático que forma parte de los aminoácidos esenciales para el ser humano, es decir que no lo puede sintetizar y el único modo de conseguirlo es mediante la dieta. Una vez superada la barrera hematoencefálica el triptófano puede derivar en distintos productos endógenos como proteínas, serotonina y en kinureninas. Estas últimas son productos del metabolismo oxidativo del triptófano conocido como vía de las kinureninas (VK), la cual es la principal ruta metabólica para este aminoácido en diferentes órganos y tejidos, iniciada por la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), presente en muchos tejidos con excepción del hígado, y por la triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO), presente en el hígado, y cuyo producto final es el nicotinamida

adenín dinucleótido (NAD⁺) (Figura 1; Darlington *et al.*, 2010; Chen y Guillemin 2009).

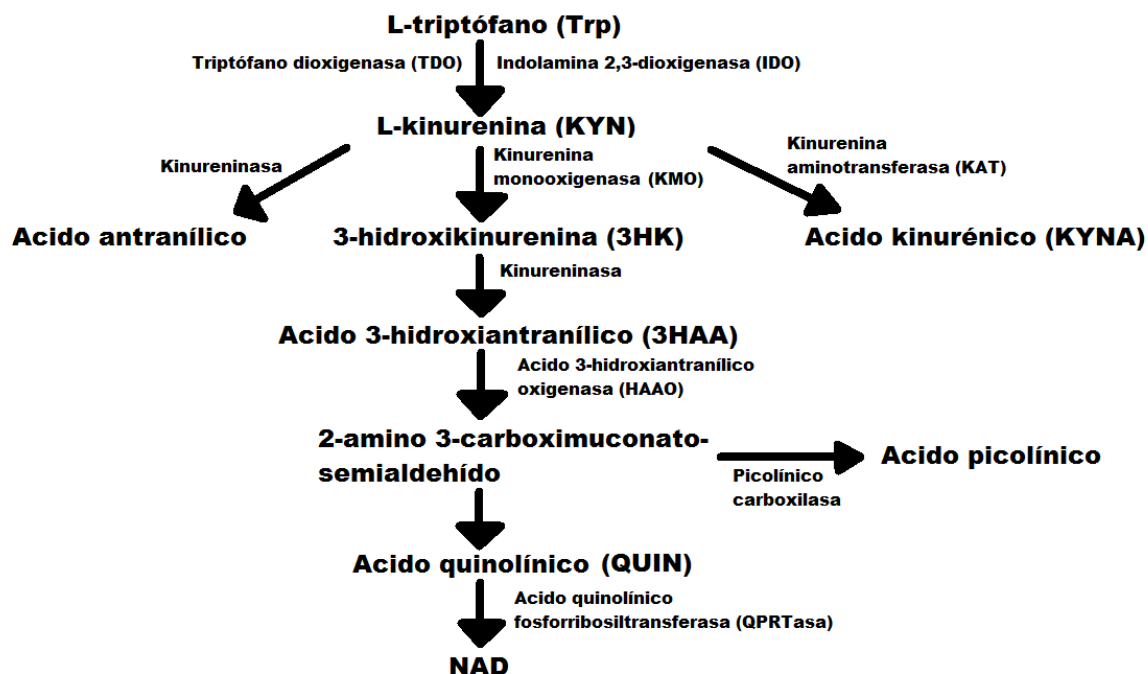


Figura 1. Vía de las kinureninas.

Algunos metabolitos de importancia en esta vía han sido probados como antioxidantes efectivos capaces de atrapar especies reactivas como el $\bullet\text{OH}$ y el ONOO^- , y otras EROs y ERNs así como de prevenir la peroxidación de lípidos. Tal es el caso del ácido kinurénico (KYNA) que además es antagonista de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) y alfa-7-nicotínicos ($\alpha 7\text{nACh}$) (Lugo-Huitrón *et al.*, 2011; Stone *et al.*, 2002; Hilmas *et al.*, 2001). El incremento de KYNA en cerebro ha sido correlacionado con el desarrollo de la esquizofrenia (Cozzi *et al.*, 1999), como protector contra isquemia (Erhardt *et al.*, 2001) y como inhibidor de la liberación del factor de necrosis tumoral α (Riedemann *et al.*, 2003). Por otro lado, el ácido

quinolínico (QUIN) ha sido caracterizado como agonista de receptores NMDA, lo que promueve el incremento de la concentración de calcio intracelular, disfunción mitocondrial, déficit energético, incremento de EROs y ERNs, y muerte de neuronas GABAérgicas y colinérgicas (Pérez-De la Cruz *et al.*, 2012). Además, el QUIN junto con el ácido 3-nitropropiónico (3NP) ha sido utilizado como modelo excitotóxico para simular los síntomas degenerativos de la enfermedad de Huntington (Pérez-de la Cruz *et al.*, 2010).

Se ha demostrado también el papel controversial de otros de sus productos, como la 3-hidroxicinurenina (3HK) de la cual se ha reportado la capacidad de generar estrés oxidativo, daño y muerte neuronal (Okuda *et al.*, 1998), así como de tener propiedades mutagénicas (Kuzenova, 1969). En contraste, se ha demostrado que 3HK es capaz de atrapar radicales libres en medios sintéticos y de disminuir la peroxidación de lípidos *in vitro* (Christen *et al.*, 1990; Leipnitz *et al.*, 2007; Ramírez-Ortega, datos no publicados). Bajo las mismas condiciones duales se encuentra el ácido 3-hidroxi-antranílico.

El ácido 3-hidroxi-antranílico. Dentro de este grupo de metabolitos controversiales se encuentra el ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA), molécula derivada de la hidrólisis de la 3-hidroxicinurenina mediante la enzima kinureninasa o a partir de la oxidación del ácido antranílico. El 3HAA puede producir ácido quinolínico, mediante la enzima 3-hidroxi-antranilato dioxigenasa, o ácido picolínico, mediante la aminocarboximuconato semialdehído descarboxilasa (Chen & Guillemin, 2009). En cuanto a su estructura el ácido 3-hidroxi-antranílico se

compone de un anillo aromático con un grupo carboxilo en el carbono 1, un grupo amino en el carbono 2 y un grupo hidroxilo en el carbono 3 (Figura 2).

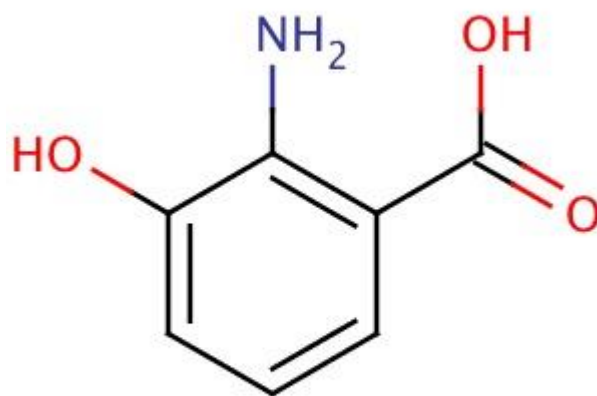


Figura 2. Acido 3-hidroxiantranílico.

Con base en el papel que presenta, se ha considerado que el 3HAA es un metabolito que produce radicales libres y especies reactivas del oxígeno (Dai & Gupta, 1990), funciona como desacoplante de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y es capaz de disminuir el consumo de oxígeno celular (Quagliarello *et al.*, 1964), lo que activa procesos de muerte celular en células T, neuronas y astrocitos (Sun-Mi *et al.*, 2010; Braidy *et al.*, 2009). Se considera que el 3HAA tiene un efecto mutagénico que causa aberraciones cromosómicas en células hematopoyéticas de ratón (Kuznezova, 1969), y se ha asociado con el desarrollo de cáncer de vejiga (Allen *et al.*, 1957). Por otra parte, existen reportes que colocan al 3-HAA como un efectivo agente atrapador de radicales libres y ROS (Leipnitz *et al.*, 2007), capaz de acarrear electrones a modo de que puede

recuperar el flujo de estos en la cadena respiratoria bloqueada (Quagliarello *et al.*, 1966). Además esta molécula tiene un efecto antiinflamatorio y neuroprotector mediante la supresión de la producción de citocinas y quimiocinas, y la activación de la enzima hemooxigenasa-1 (Krause *et al.*, 2011).

Dado el papel dual de este metabolito es de importancia caracterizar los mecanismos de acción por los cuales presentan este carácter anti- y pro- oxidante para poder correlacionarlo con lo observado en las diferentes patologías en las cuales está involucrado.

Justificación. Debido a la importancia de los metabolitos de la vía de las kinureninas en el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas, es importante esclarecer la función de cada uno de sus productos en sistemas y modelos que equiparen las condiciones patológicas, para así determinar su posible función como blanco en el tratamiento de dichas enfermedades. En este caso, el 3HAA es un metabolito que ha sido descrito como una molécula con distintos efectos, contrarios unos de otros, en cultivos celulares y en medios sintéticos por lo que es necesario comprobar sus capacidades como agente neuroprotector o neurotóxico.

Hipótesis. Debido a los grupos funcionales que posee en su estructura, el 3HAA será capaz de interactuar con los radicales libres y EROs lo que generará tanto una capacidad atrapadora eficiente como una propiedad protectora contra la degradación de DNA y proteínas. Este efecto se reflejará en los estudios

bioquímicos en donde el efecto del estrés oxidante disminuirá por la acción de este metabolito tanto *in vivo* como *in vitro*.

Objetivo. Determinar las propiedades de atrapamiento, quelantes, antioxidantes o pro-oxidantes de 3HAA en sistemas *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos particulares.

Determinar la capacidad atrapadora de 3HAA en medios sintéticos mediante ensayos espectrofotométricos de atrapamiento de ONOO^- , $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$; así como la capacidad quelante y de protección contra degradación de DNA y proteínas en sistemas generadores de estrés oxidativo.

Determinar el efecto de 3HAA *per se* en los marcadores de daño oxidativo así como en la co-incubación con agentes pro-oxidantes: FeSO_4 (100 μM) y ONOO^- (25 μM) en homogenados de cerebro de rata. Los marcadores a evaluar son producción de EROs, peroxidación lipídica y funcionalidad celular.

Determinar el efecto de la administración intraestriatal de 3HAA (5, 10 y 50 nmol) sobre la conducta rotatoria, marcadores de daño oxidativo, viabilidad celular y alteraciones morfológicas.

Método.

Ensayos sintéticos.

Atrapamiento de anión peroxinitrito (ONOO^-). Se llevó a cabo de acuerdo a métodos establecidos (Khaur *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2003), en donde se mezclaron agua, 3HAA (5-500 μM), DTPA 1 Mm, diclorofluoresceína diacetato

1.75 mM, y ONOO^- 35 μM previamente sintetizado en el laboratorio a partir de H_2O_2 0.7 M, KNO_2 0.6 M y NaOH 1.2 M; Posteriormente la mezcla se agitó y la absorbancia se determinó a 500 nm en espectrofotómetro cada minuto durante tres minutos.

Atrapamiento de anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Se llevó a cabo siguiendo los métodos establecidos (Nishikimi *et al.*, 1972; Furuno *et al.*, 2002; Suzumura *et al.*, 1999; Ponti *et al.*, 1978), en el cual se mezcló dimetil sulfóxido, HEPES 20 mM (pH 7.4), PMS 0.1 mM, NBT 1 mM, 3HAA (5-500 μM) y NADH 2.5 mM; inmediatamente la mezcla se agitaba y pasaba a una celda de cuarzo, y se leía la absorbancia a 560nm en espectrofotómetro durante tres minutos, tomando lectura de esta cada minuto.

Los resultados de estas dos pruebas fueron expresados, con base en las pendientes de las rectas generadas por las cuatro absorbancias obtenidas por ensayo (minuto 0-3) y comparadas respecto a un control sin 3HAA, como porcentaje de atrapamiento tomando en cuenta como 100% el ensayo con 3HAA 500 μM .

Atrapamiento de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Realizado de acuerdo a técnicas establecidas (Lee & Halliwell, 2001), se mezcló metanol al 100%, H_2O_2 50 μM , 3HAA (5-500 μM) y reactivo de Fox preparado con nueve volúmenes de hidroxitolueno butilado 4 mM diluido en metanol al 100% y un volumen de naranja de xilenol 1 mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56 mM diluidos en ácido sulfúrico

250 mM; la mezcla se dejaba incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente era leída en espectrofotómetro a una absorbancia de 560 nm.

Atrapamiento de radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$). Realizado a partir de técnicas establecidas (Leipnitz *et al.*, 2007), se mezcló ácido ascórbico 100 μM , desoxirribosa 3 mM, H_2O_2 500 μM , buffer de fosfatos 20 mM con cloruro de potasio 140 mM (pH 7.4), 3HAA (5-500 μM) y EDTA 100 μM con FeCl_3 20 μM ; la mezcla fue incubada durante una hora a 37°C; posteriormente se adicionó 1ml de solución ácido tiobarbitúrico al 10% con ácido tricloroacético al 0.67% y se calentó a 100°C durante diez minutos; se dejó enfriar y leyó la absorbancia a 532 nm.

Los resultados de estas pruebas se expresaron como porcentaje de atrapamiento considerando como 100% el ensayo realizado con 3-HAA 500 μM

Degradación de DNA. Realizado con base en técnicas establecidas (Kocha *et al.*, 1997). En tubos de 2 ml se mezcló buffer de fosfatos 20 mM, EDTA 0.8 mM, sulfato ferroso amoniacal 0.8 mM, ácido ascórbico 1.6 mM, 6 μl de muestra de DNA de ratones Knock Out (con el gene KAT ausente), peróxido de hidrógeno al 2% y 3HAA (10-100 μM). Los tubos fueron incubados durante diez minutos a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con buffer de carga (Azul de bromofenol 0.25%, Tris HCl 10 mM (pH 7.6), EDTA 60 mM, glicerol 60%). Las muestras fueron corridas en geles de agarosa a 70 V durante una hora.

Se obtuvieron imágenes de los geles mediante el programa geldoc y se analizó la densitometría de los barridos obtenidos por carril. Los resultados se

expresaron en porcentaje de densitometría tomando en cuenta como 100% el ensayo control sin sulfato de hierro ni 3HAA.

Degradación de proteínas. Siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, se mezcló albúmina sérica bovina al 1%, 3HAA (10-100 μ M), ácido ascórbico 1.6 mM, EDTA 0.8 mM, sulfato ferroso amoniacal 0.8 mM y peróxido de hidrógeno al 2%; la mezcla fue incubada durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 250 μ l de ácido tricloroacético al 20% y se centrifugó a 4,000 rpm durante dos minutos; el botón producido fue resuspendido en 500 μ l de hidróxido de sodio 0.1 M. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% durante una hora a 150 V; pasado este tiempo los geles fueron teñidos con solución de azul de Coomassie al 2% durante 24 horas y desteñidos con solución desteñidora, preparada con metanol y ácido acético, otras 24 horas.

Se obtuvieron imágenes de los geles mediante el programa geldoc y se analizó la densitometría de los barridos obtenidos por carril. Los resultados se expresaron en porcentaje de densitometría tomando en cuenta como 100% el ensayo control sin sulfato de hierro ni 3HAA.

Capacidad quelante de Fe²⁺. Se realizó de acuerdo a las técnicas establecidas por Carter (1971) y Viollier *et al.* (2000). Se mezclaron buffer de acetato de amonio al 10% (pH 10), 3HAA (5-500 μ M), sulfato de hierro amoniacal al 70% con ácido sulfúrico al 0.1% y ferrozina 10 mM preparada con acetato de amonio 0.1 M; las

muestras se incubaron durante diez minutos a temperatura ambiente y se leyó en espectrofotómetro la absorbancia a 560 nm.

Los resultados se expresaron como porcentaje de quelación respecto a un control con EDTA.

Ensayos *in vitro*.

Obtención de tejido. El tejido utilizado se obtuvo de ratas (*Ratus ratus*) de la cepa Wistar con un rango de peso entre 250 y 300g. Las ratas se sacrificaron por decapitación posteriormente se extrajo el cerebro, el cual fue homogenizado (1:10 m/v) en buffer fisiológico Krebs-Ringer (NaCl 118.06 mM, KCl 4.74 mM, CaCl 1.71 mM, MgSO₄ 1.17 mM, glucosa 0.9 mM, NaH₂PO₄ 12.83 mM, Na₂HPO₄ 2.95 mM, pH 7.4). Los homogenados se mantuvieron almacenados a una temperatura de -20°C.

Cuantificación de proteínas Lowry (Lowry *et al.*, 1951). En tubos de ensayo se mezclaron 2 µl de homogenado de cerebro, 198 µl de agua bidestilada y 1 ml de solución C de Lowry (50 volúmenes de Na₂CO₃ 2%, NaOH 0.4%, tartrato de sodio 0.02%; un volumen de Cu₂(SO₄)₃ 0.5%); se incubó la mezcla durante diez minutos a temperatura ambiente y se adicionaron 100 µl de reactivo de Follin al 50%; se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 30 minutos; finalmente se determinó la absorbancia a 550 nm.

Producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Basada en la oxidación de la 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA; LeBel *et al.*, 1992). En tubos de 2 ml se mezclaron 500 µl de homogenado de cerebro, 3HAA (10-100 µM) y los pro-

oxidante FeSO_4 (5 μM) ó ONOO^- (25 μM) hasta un volumen final de 1.5 ml. La mezcla se incubó durante dos horas a 37°C, se adicionaron 100 microl de DCFDA 75 μM y se volvió a incubar a 37°C durante 30 minutos; se centrifugaron los tubos a 8,000 rpm durante diez minutos, la absorbancia de las muestras fue leída en un fluorometro con 495 nm de excitación y 520 nm de emisión.

Las absorbancias obtenidas fueron estandarizadas con las lecturas de la cuantificación de proteína. Los resultados se expresaron como porcentaje de producción de EROs respecto al control

Peroxidación de lípidos. Realizada de acuerdo a literatura (Ohkawa *et al.*, 1979), en tubos de 2 ml se mezclaron 250 μl de homogenado de cerebro, 3HAA (10-100 μM), y los pro-oxidantes FeSO_4 (5 μM) ó ONOO^- (25 μM) hasta un volumen final de 500 μl . Se incubó la mezcla a 37° C durante dos horas, posteriormente se adicionaron 500 μl de ácido tiobarbitúrico (TBA) y se puso a hervir durante 20 minutos; se centrifugaron los tubos a 8,000 rpm durante diez minutos; finalmente la absorbancia fue determinada a 532 nm.

Las lecturas de peroxidación de lípidos se estandarizaron con las lecturas de la cuantificación de proteína. Los resultados se expresaron como porcentaje de peroxidación de lípidos respecto al control.

Funcionalidad celular. Se midió respecto a la reducción de MTT (Pérez de la Cruz, 2008). Brevemente, en tubos de 2 ml se mezclaron 300 μl de homogenado de cerebro, 3HAA (10-100 μM) y FeSO_4 (5 μM) ó ONOO^- (25 μM). La mezcla se incubó durante dos horas a 37°C, posteriormente adicionaron 5 μl de MTT (5

mg/ml) y se volvió a incubar durante 30 min. Pasado el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron a 5,000 rpm durante tres minutos; el botón formado se resuspendió en isopropanol ácido; la absorbancia de las muestras se determinó a 570 nm en espectrofotómetro.

Los resultados se expresaron como porcentaje de producción de ROS, porcentaje de reducción de MTT respecto al control.

Ensayos *in vivo*.

Administración de 3-HAA. Se administró 1 µl de 3HAA (5, 10 ó 50 nmoles) intraestriatalmente en ratas Wistar mediante cirugía estereotáxica. La ubicación de las coordenadas del estriado (AP -0.5mm, Lateral ±2.6mm, Ventral -4.5mm respecto a *Bregma*) se localizaron mediante un atlas del cerebro de rata (Figura 3; Paxinos y Watson, 1997).

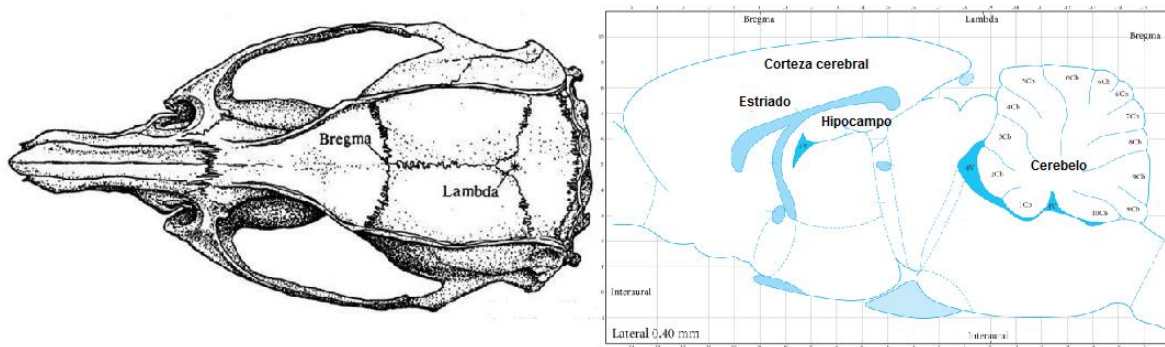


Figura 3. Ubicación de Bregma en el cráneo de una rata Wistar y ubicación del estriado en el cerebro de rata (Paxinos y Watson, 1997).

Prueba de conducta. Cinco días después de la administración con 3HAA, las ratas se sometieron a una prueba de conducta de giro, que consiste en observar el

número de giros que cada individuo da sobre su propio eje durante 30 minutos después de la administración de 1 mg/kg de apomorfina para evaluar si existe algún daño neuromotor inducido por la administración precedente.

Obtención de muestras. Posterior a la realización de la evaluación conductual, los individuos destinados para pruebas bioquímicas se sacrificaron mediante decapitación y se recuperó el estriado de cada uno. Los órganos se homogenizaron (1:10 p/v) en amortiguador fisiológico Krebs-Ringer. Por otro lado, los individuos destinados para evaluación histológica se perfundieron con solución salina y sus órganos se fijaron con paraformaldehído (NaCl 136.89 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 10.14 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, PFA 1.33 M, pH 7.4), posteriormente se extrajo el cerebro. Los cerebros fijados se deshidrataron mediante la inmersión de estos en recipientes con agua, etanol y xilol en gradientes de concentración; finalmente los cerebros se incluyeron en parafina a 56°C.

Pruebas bioquímicas. Se realizaron pruebas de peroxidación de lípidos, producción de EROs, viabilidad celular y cuantificación de proteínas inmediatamente después de haber conseguido los homogenados de los tejidos mencionados anteriormente.

Evaluación histológica. Se obtuvieron cortes coronales de 5 µm de los cerebros incluidos en parafina en la región del estriado con un microtomo; en un portaobjetos se colocaron dos cortes y se obtuvieron tres portaobjetos por cerebro. Se realizó la tinción Klüver-Barrera con violeta de cresilo para determinar muerte celular. Se obtuvieron imágenes de las preparaciones y se realizó un conteo

celular en el que se evaluaba el número de células muertas o amorfas en las preparaciones con violeta de cresilo, en todo el campo.

Resultados.

La capacidad atrapadora de 3HAA sólo fue observada en el radical hidroxilo (IC_{50} $500\mu M$) y en peroxinitrito (IC_{50} $50\mu M$) (Figura 4 a y b respectivamente); para el anión superóxido encontramos efecto atrapador mas no muestra un comportamiento concentración-dependiente. En el caso de peróxido de hidrógeno no hay efecto alguno por parte de 3HAA (datos no presentados).

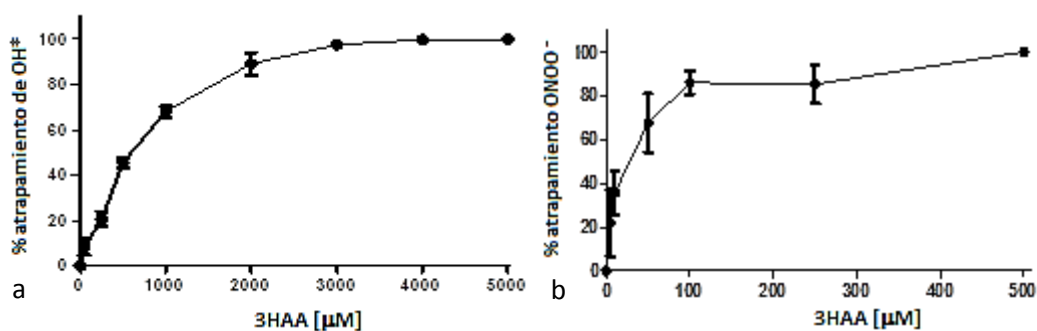


Figura 4. Capacidad atrapadora de 3HAA para radical hidroxilo (a) y peroxinitrito (b) en medios sintéticos. Se observa un efecto concentración dependiente.

El 3HAA presentó efecto quelante sobre el Fe^{2+} de manera concentración-dependiente respecto al control (Figura 5).

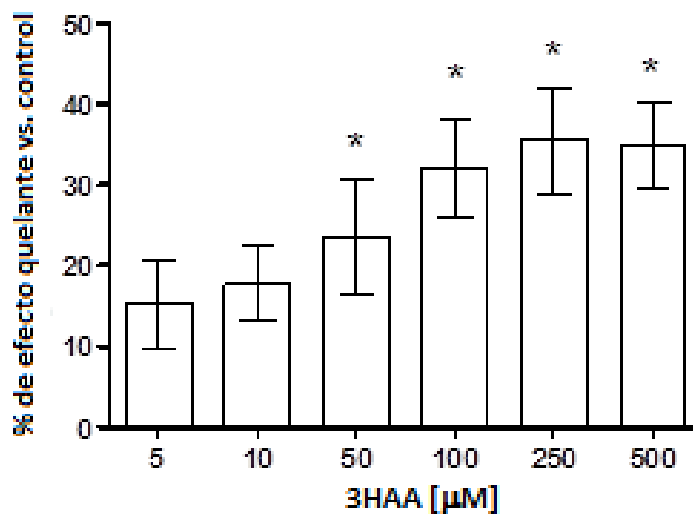


Figura 5. Efecto quelante de Fe^{2+} de 3HAA, las concentraciones de 50, 100, 250 y 500 μM presentaron efecto significativo respecto al control que representa al 0% (*, $p \leq 0.05$) ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey ($n=5$).

El efecto de 3HAA contra la degradación de DNA y proteína se determinó a partir de los datos de densitometría de los geles de agarosa y poliacrilamida respectivamente obtenidos mediante el programa *Quantity One* (Figura 6 a y b). Para la degradación de DNA se observa que 3HAA no tiene efecto alguno cuando es incubado con el DNA, mientras que el sistema generador de $\cdot\text{OH}$ induce una degradación de alrededor del 30% de DNA y este efecto es atenuado de manera concentración dependiente por 3HAA (Figura 6 c). Para el caso de proteína se puede observar que el 3HAA tampoco presenta un efecto al incubarlo con la albúmina mientras que la proteína sufre alrededor de un 30% de degradación cuando es expuesta al $\cdot\text{OH}$ y este efecto es prevenido por la co-incubación con 3-HAA (Figura 6 d).

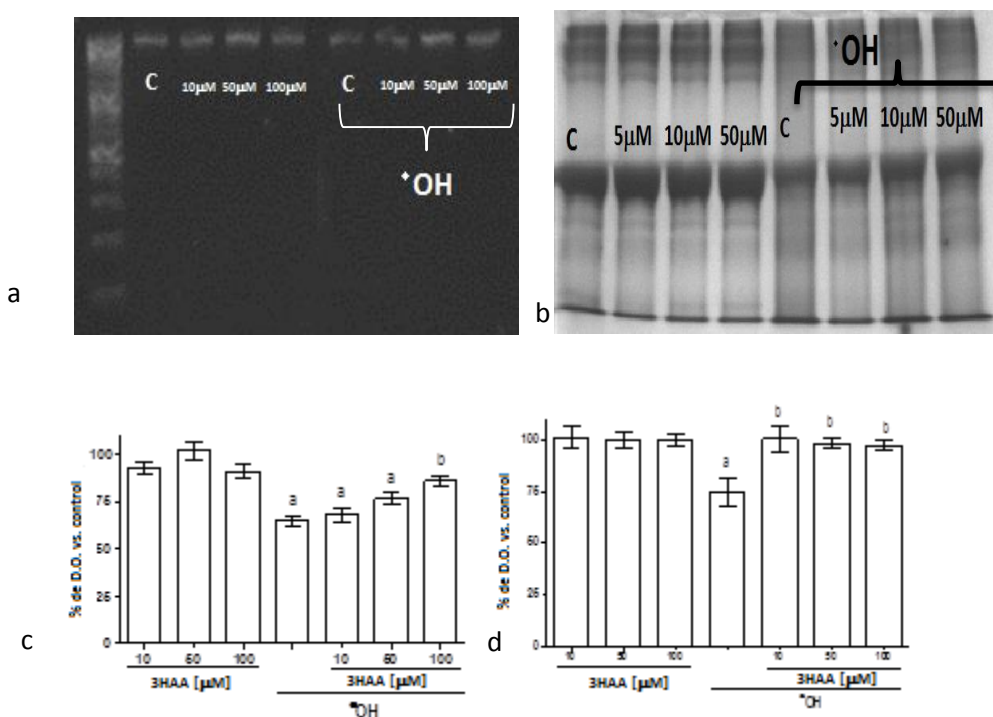


Figura 6. Efecto de 3HAA sobre la degradación de DNA y proteína inducida por $\cdot\text{OH}$. Foto del gel de agarosa del ensayo de degradación de DNA (a) y del gel de poliacrilamida del ensayo de degradación de proteína (b). Cuantificación del efecto protector contra degradación de DNA (c) y

proteína (d) de 3HAA mediante datos de densitometría de los geles de agarosa y poliacrilamida. Las barras marcadas con la letra “a” representan valores significativamente diferentes al control (100%), las barras marcadas con la letra “b” representan valores significativamente diferentes al control en presencia de $\bullet\text{OH}$ ($p \leq 0.05$). ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey ($n=5$).

Respecto al control (100%) 3HAA no tuvo efecto en la disminución de la producción, en presencia de los agentes pro-oxidantes FeSO_4 (5 μM) y ONOO^- (25 μM) el aumento de producción de EROs fue significativamente diferente respecto al control ($p \leq 0.05$). El 3HAA tampoco presentó un efecto protector en presencia de FeSO_4 ni de ONOO^- , sin embargo es importante resaltar que 3HAA no potencia el daño causado en presencia de FeSO_4 ni de ONOO^- (Figura 7A). En la peroxidación lipídica se observa que por sí solo el 3HAA no presenta diferencias respecto al control (100%); en presencia de FeSO_4 (5 μM) como de ONOO^- (25 μM) la peroxidación se ve aumentada significativamente respecto al control ($p \leq 0.05$). El 3HAA en presencia de FeSO_4 no tiene un efecto antioxidante; sin embargo, en presencia de ONOO^- 3HAA logró disminuir el efecto de este marcador de daño oxidativo ($p \leq 0.05$, Figura 7B).

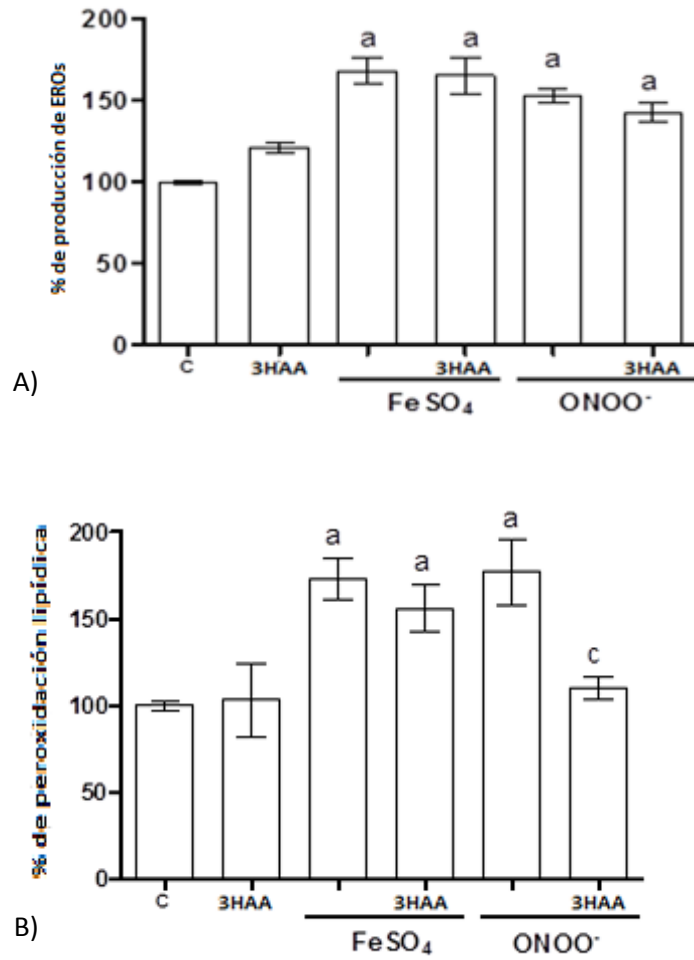


Figura 7. A) Porcentaje de producción de EROs producido en cerebro respecto al control (100%). B) Porcentaje de peroxidación de lípidos en homogenados de cerebro respecto al control (100%). Valores significativamente diferentes del control (a, $p \leq 0.05$), valores significativamente diferentes del control ONOO⁻ (c, $p \leq 0.05$). ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey (n=5).

Se observó en el ensayo de reducción de MTT que 3HAA disminuyó la viabilidad celular respecto al control así como el FeSO_4 (5 μM) y ONOO^- (25 μM) y no hubo recuperación de la misma con 3HAA en presencia de FeSO_4 (5 μM) ó ONOO^- (25 μM ; Figura 8). Aunque el 3HAA tampoco es capaz de potenciar el daño realizado por los agentes oxidantes.

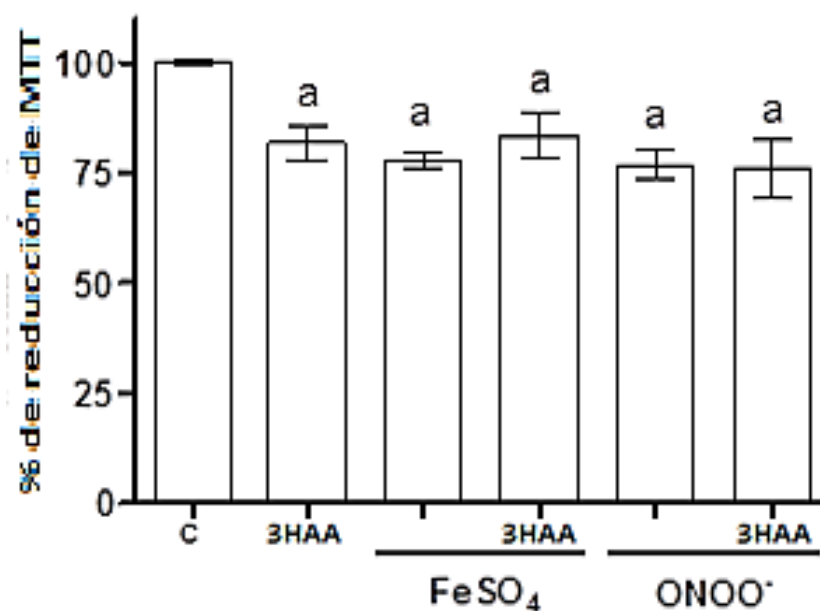


Figura 8. Porcentaje de reducción de MTT en homogenados de cerebro respecto al control (100%). Valores significativamente diferentes del control (a, $p \leq 0.05$). ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey ($n=5$).

Cinco días después de la administración intraestriatal de 3HAA, se evaluó la conducta de giro de las ratas y se observaron aumentos significativos a partir de 10nmol de 3HAA respecto al control. Este aumento en la conducta giratoria sugiere que existe daño celular, el cual se incrementó significativamente con la administración de 10 y 50 nmol de 3HAA (Figura 9).

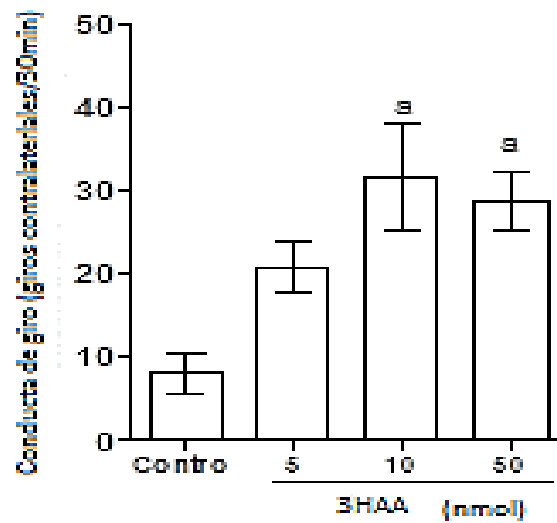


Figura 9. Evaluación conductual de ratas administradas intraestriatalmente con 3HAA. Número de vueltas contralaterales a la lesión dadas en 30 minutos. Valores significativamente diferentes del control (a, $p \leq 0.05$). ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey ($n=5$).

El ensayo *in vivo* demostró que 3HAA 50nmol disminuye significativamente la producción de EROs en 40% respecto al control (Figura 10 A); la peroxidación de lípidos también disminuyó significativamente entre 30% y 40% con 3HAA 10 y 50nmol respectivamente (Figura 10 B). Sin embargo, la viabilidad celular también disminuyó significativamente con 3HAA (5, 10 y 50 nmol) entre 35% y 70% (Figura 10 C).

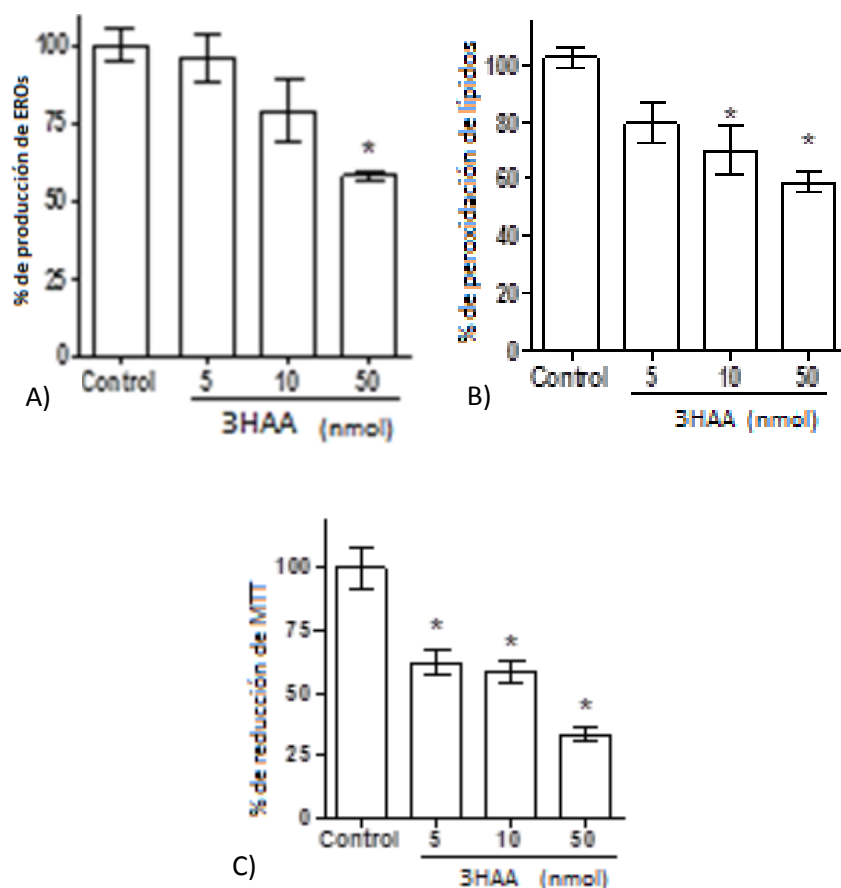


Figura 10. A) Producción de especies reactivas de oxígeno, B) porcentaje de peroxidación de lípidos y C) viabilidad celular de homogenados de cerebro de ratas administradas con 3HAA (5, 10 y 50 nmol). Valores significativamente diferentes del control (*, $p < 0.05$). ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey ($n=5$).

Se observó un aumento en el daño celular dentro de los estriomas dependiente de la concentración de 3HAA el cual se nota al observar cuerpos coloreados dentro de los estriomas, del mismo modo se encontró un aumento en el número de células en apoptosis o en procesos de muerte celular identificadas por la degradación del núcleo y la deformación de las células (Figura 11). Este daño celular confirma los resultados de la prueba de conducta de giro (Figura 9).

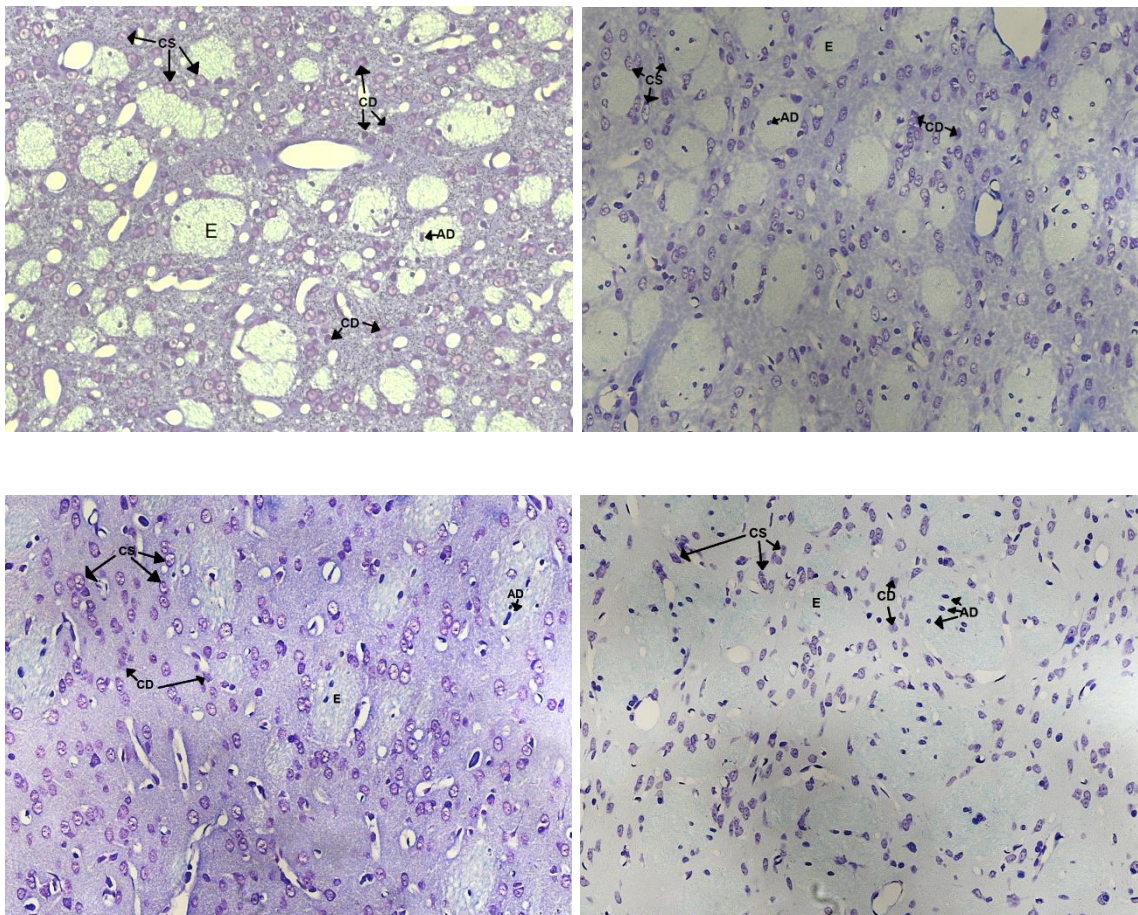


Figura 11. Imágenes de las preparaciones teñidas mediante el método Klüver-Barrera de los cerebros tratados con solución salina (a), 3HAA 10 nmol (b), 50 nmol (c) y 100 nmol (d). Se señalan estructura de interés. Estrioso (E), célula sana (CS), célula degenerada (CD) y astrocito degenerado (AD).

Discusión.

Se ha demostrado que el 3HAA tiene un efecto atrapador de anión superóxido, de peroxinitrito, de peróxido de hidrógeno y de radical hidroxilo (Leipnitz *et al.*, 2007), aunque no se ha definido que este efecto haya sido dependiente de la concentración. Bajo nuestras condiciones encontramos que 3HAA tuvo la capacidad de atrapar tanto peroxinitrito como radical hidroxilo de manera concentración dependiente (Figura 4). También se demostró un patrón variable de atrapamiento de anión superóxido, mas no se halló que 3HAA pueda atrapar peróxido de hidrógeno.

Nosotros demostramos que el 3HAA presenta capacidad quelante de Fe^{2+} , significativa a partir de 50 μM respecto al control, de manera concentración dependiente (Figura 5). Esta capacidad puede ser explicada por el potencial electroquímico de la molécula así como por su comportamiento de óxido-reducción, dado que se ha descrito el potencial de 3HAA para oxidarse con facilidad así como para donar electrones (Giles *et al.*, 2002).

El efecto de 3HAA sobre la degradación de DNA y proteína se puede deber tanto a la capacidad atrapadora de radical hidroxilo, el cual es producido por la reacción de Fenton entre el peróxido de hidrógeno y el sulfato ferroso del sistema, como a la capacidad quelante de 3HAA demostrada en estos ensayos.

Los ensayos bioquímicos *in vitro* demostraron que en cerebro el 3HAA no disminuye la producción EROs, en presencia de sulfato ferroso o peroxinitrito, ni la peroxidación lipídica en presencia de sulfato ferroso; sin embargo el 3HAA es

capaz de disminuir la peroxidación lipídica en presencia de ONOO^- , esto es posible dado que 3HAA presentó una capacidad de atrapamiento de ONOO^- ($\text{IC}_{50}=50 \mu\text{M}$) mucho mayor que de FeSO_4 ($\text{IC}_{50}=500 \mu\text{M}$); esto da razón de la capacidad antioxidante de 3HAA (Leipnitz *et al.*, 2007), sin embargo el ensayo de viabilidad mitocondrial no se observó un efecto de recuperación por parte de 3HAA en presencia de peroxinitrito o de sulfato ferroso.

In vivo, el 3HAA disminuyó la producción de EROs y de peroxidación de lípidos a una concentración de $50 \mu\text{M}$; sin embargo, también disminuyó la viabilidad celular. Se ha demostrado que el 3HAA puede disminuir el consumo de oxígeno en cultivos celulares y de desacoplar el sistema respiratorio celular (Quagliarello *et al.*, 1964); este descenso en el consumo de oxígeno producido por 3HAA puede disminuir la producción de EROs y por tanto la peroxidación de lípidos. Este efecto desacoplante es capaz de disminuir la funcionalidad mitocondrial observada en el ensayo de viabilidad celular. Se ha demostrado que 3HAA es capaz de disminuir los niveles de NAD^+ y de promover la muerte celular de neuronas y astrocitos mediante actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Braidy *et al.*, 2009). El desacoplamiento energético inducido por 3HAA puede producir este efecto en la disminución de NAD^+ y es posible que la muerte celular inducida por 3HAA sea independiente de la producción de EROs y se encuentre más relacionada con este déficit energético. Este efecto de muerte celular puede ser dirigido, es decir, el 3HAA solamente daña ciertos tipos celulares, en este caso neuronas y astrocitos.

Además, estos datos correlacionan con los parámetros conductuales obtenidos en los mismos animales, dado que un aumento en la conducta de giro está relacionado con la degeneración del tejido estriatal (Willis *et al.*, 1993) basado en el diferencial de excitación de neuronas dopaminérgicas entre ambos hemisferios al administrar de forma sistémica apomorfina, la cual excita a los receptores de dopamina, que sugiere nuevamente muerte celular aun cuando este fenómeno sea independiente de la producción de EROs. Esto corrobora que 3HAA daña células involucradas con el desempeño motriz de las ratas, neuronas y astrocitos.

Conclusiones.

Estos datos sugieren que, bajo nuestras condiciones de trabajo, 3HAA es capaz tanto de atrapar radical hidroxilo y peroxinitrito como de presentar propiedades quelantes y de protección contra la degradación de DNA y proteínas.

In vitro el efecto antioxidante de 3HAA se observó solamente en presencia de ONOO⁻ disminuyendo la peroxidación lipídica, sin embargo, la administración intraestriatal de 10 y 50 nmoles de 3HAA es capaz de disminuir la producción de EROs y la lipoperoxidación a pesar de la disminución de la viabilidad celular, el aumento en la conducta de giro y el aumento de células dañadas.

Es necesario para futuros proyectos determinar si el mecanismo de daño celular del 3HAA descrito en este trabajo es especializado hacia ciertos tipos celulares y si este mecanismo es independiente de las capacidades antioxidantes aquí demostradas.

Referencias.

- Allen MJ, Boyland E, Dukes CE, Horning ES, Watson JG. Cancer of the Urinary Bladder Induced in Mice with Metabolites of Aromatic Amines and Tryptophan. *British Journal of Cancer* 1957; 11(2):212-28.
- Braidy N, Grant R, Brew BJ, Adams S, Jayasena T, Guillemin GJ. Effects of Kynurenine Pathway Metabolites on Intracellular NAD Synthesis and Cell Death in Human Primary Astrocytes and Neurons. *International Journal of Tryptophan Research* 2009; 2:61-9.
- Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (Ferrozine). *Analytical Biochemistry* 1971; 40:450-58.
- Chen Y, Guillemin GJ. Kynurenine Pathway Metabolites in Humans: Disease and Healthy States. *International Journal of Tryptophan Research* 2009; 2:1-19.
- Christen S, Peterhans E, Stocker R. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: Possible implication for inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87: 2506-10.
- Cozzi A, Carpenedo R, Moroni F. Kynurenine hydroxylase inhibitors reduce ischemic brain damage: studies with (m-nitrobenzoyl)-alanine (mNBA) and 3,4-dimethoxy-[N-4-(nitrophenyl)thiazol-2-yl]-benzene-sulfonamide (Ro 61-

8048) in model of local or global ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism* 1999; 19(7):771-7.

Dai W, Gupta SL. Regulation of indoleamine 2,3-oxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. Upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha. *The Journal of Biological Chemistry* 1990; 265(32):19871-7.

Darlintong LG, Forrest CM, Mackay GM, Smith RA, Smith AJ, Stoy N, Stone TW. On the Biological Importance of the 3-hydroxyanthranilic acid: Anthranilic Acid Ratio. *International Journal of Tryptophan Research* 2010; 3:51-59.

Dorado Martínez C, Rugerio Vargas C, Rivas Arancibia S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina* 2003; 46(06):229-35.

Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European Journal of Biochemistry* 2000; 267(16):4912-6.

Erhardt S, Blennow K, Nordin C, Skogh E, Lindström LH, Engberg G. Kynurenic acid levels are elevated in the cerebrospinal fluid in patients with schizophrenia. *Neuroscience Letters* 2001; 313(1-2):96-8.

Furuno K, Akasako T, Sugihara N. The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2002;25(1):19-23.

- Giles GI, Collins CA, Stone TW, Jacob C. Electrochemical and in vitro evaluation of the redox-properties of kynurenine species. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 300:719-24.
- Halliwel B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 2006; 27(6):1634-58.
- Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *Journal of Neuroscience* 2001; 21:7463-73.
- Khaur H, Lyras L, Jenner P, Halliwel B. Artefacts in HPLC detection of 3-nitrotyrosine in human brain tissue. *Journal of Neurochemistry* 1998; 70: 2220-2223.
- Kocha T, Yamaguchi M, Ohtaki H, Fukuda T, Aoyagi T. Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron- hydroxyl radicals on the degradation of albumin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 1337:319-26.
- Krause D, Suh HS, Tarassishin L, Cui QL, Durafourt BA, Choi N, Bauman A, Consenza-Nashat M, Antel JP, Zhao ML, Lee SC. The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid plays anti-inflammatory and neuroprotective roles during inflammation: role of hemeoxygenase-1. *The American Journal of Pathology* 2011; 179(3):1360-72.

- Kuzenova LE. Mutagenic effect of 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid. *Nature* 1969; 222: 484-5.
- Lagouge M, Larsson NG. The role of mitochondrial mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of Internal Medicine* 2013; 273(6):529-43.
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe of 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology* 1992; 5(2):227-31.
- Lee HL, Halliwell B. Antioxidant and prooxidant abilities of foods and beverages. *Methods in Enzymology* 2001; 335:181-190.
- Lee SM, Lee YS, Choi JH, Park SG, Choi IW, Joo YD, Lee WS, Lee JN, Choi I, Seo SK. Tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid selectively induces activated T cell death via intracellular GSH depletion. *Immunology Letters* 2010; 132:53-60.
- Leipnitz G, Schumacher C, Dalcin KB, Scussiato K, Solano A, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Latini A, Wajner M. In vitro evidence for an antioxidant role of 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid in the brain. *Neurochemistry International* 2007; 50(1):83-94.
- Lorenzo-Velázquez B, Lorenzo Fernández P, Moreno González A, Lisozaín Hernández I, Leza Cerro JC, Moro Sánchez MA, Portolés Pérez A. 2008. *Farmacología básica y clínica*. 18ª ed. Ed. Médica Panamericana. Hong Kong, China. 1369pp. p332.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Follin (phenol) reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951; 193:261-75.

Lugo-Huitrón R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muñiz P, Carrillo-Mora P, Pedraza-Chaverrí J, Silva-Adaya D, Maldonado PD, Torres I, Pinzón E, Ortíz-Islas E, López T, García E, Pineda B, Torres-Ramos M, Santamaría A, La Cruz VP. On the Antioxidant Properties of Kynurenic Acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicology and teratology* 2011; 33(5):538-47.

Nishikimi M, Appaji N, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical Biophysical Research Communications* 1972;46(2):849-54.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979; 95:351-358.

Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *Journal of Neurochemistry* 1998; 70(1): 299-307.

Paxinos G, Watson C. 1997. *The rat brain, in stereotaxic coordinates*. 6th edition. Academic Press. Sydney, Aus. 456pp.

Pérez-de la Cruz V. 2008. Caracterización de los patrones de déficit energético y estrés oxidativo/nitrosativo inducidos por el peroxinitrito en modelos experimentales de la enfermedad de Huntington. Universidad Autónoma Metropolitana.

Pérez-de la Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaría A. Huntington's disease and mitochondrial alterations: emphasis on experimental models. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2010; 42(3):207-15.

Pérez-de la Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaría A. Quinolinic Acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *International Journal of Tryptophan Research* 2012; 5:1-8.

Ponti V, Dianzani MU, Cheeseman K, Slater TF. Studies of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulphate. *Chemico-biological Interactions* 1978;23:281-291.

Quagliariello E, Palmieri F, Alifano A, Papa S. 3-Hydroxyanthranilic acid-mediated respiration in the inhibited respiratory chain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1966; 113:482-9.

Quagliariello E, Papa S, Saccone C, Alifano S. Effect of 3-hydroxyanthranilic acid on the mitochondrial respiratory system. *Biochemistry Journal* 1964; 91:137-46.

- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nature Medicine* 2003; 9(5):517-24.
- Saito K, Jin, D-H, Ogawa T, Muramoto K, Hatakeyama E, Yasuhara T, Nokihara K. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 3668-3674.
- Stone TW, Addae JI. 2002. The Pharmacological Manipulation of Glutamate Receptors and Neuroprotection. *European Journal of Pharmacology* 2002; 447:285-296.
- Suzumura K, Yasuhara M, Narita H. Superoxide anion scavenging properties of fluvastatin and its metabolites. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 1999;47(10):1477-80.
- Viollier E, Inglett PW, Hunter K, Roychoudhury AN, Van Cappellen P. The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Applied Geochemistry* 2000; 15:785-90.
- Willis GL, Sandyk R. Amphetamine-induced rotational behavior in rats: relationship to hypothalamic and striatal degeneration. *The International Journal of Neuroscience* 1993. 1993; 71(1-4):135-46.