



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Modulación de la expresión del factor de
crecimiento nervioso (NGF) por radiación
ionizante en diferentes tejidos de ratón.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

LUIS ÁNGEL ALBARRÁN PONCE



DIRECTOR DE TESIS:

BIÓLOGO CESAR VALDOVINOS FLORES

2014



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.

1. Datos del alumno

Luis Ángel Albarrán Ponce

56 60 47 77

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

306000605

2. Datos del Tutor

Biólogo

Cesar

Valdovinos

Flores

3. Datos del Sinodal 1

Doctora

María Eugenia

Gonsebatt

Bonaparte

4. Datos del Sinodal 2

Doctor

Guillermo Cirano

Espinosa

García

5. Datos del Sinodal 3

Doctora

Alicia

Negrón

Mendoza

6. Datos del Sinodal 4

Doctora

Regina Dorinda

Montero

Montoya

7. Datos del Trabajo Escrito

Modulación de la expresión del factor de crecimiento nervioso (NGF) por radiación ionizante en diferentes tejidos de ratón.

75 pp

2014

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, a cargo de la Dra. María Eugenia Gonsebatt, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a la Universidad Nacional Autónoma de México, porque no sólo fue mi escuela desde hace ya 9 años, sino porque también es mi casa y forma una parte inseparable de mí. Por darme todas las oportunidades e impulsar mi conocimiento y mis capacidades, por haberme permitido ser de los pocos privilegiados que tienen la oportunidad de estudiar en la mejor Universidad de México y una de las mejores del mundo. Porque ser universitario es un orgullo y un honor... GOYA!

A Cesar, por toda la paciencia que tuviste conmigo a lo largo de todo este camino, por todos los consejos, las opiniones, las correcciones, las charlas y las ayudas cuando ya no veía soluciones. Gracias por haber sido mi tutor.

A la Dra. Gonsebatt, por aceptarme en el laboratorio desde el principio y por darme las oportunidades para crecer y fomentar mi formación como científico. Gracias también por todos los comentarios, sugerencias, correcciones y consejos.

A los miembros de mi jurado: Dr. Guillermo Espinosa, Dra. Alicia Negrón y Dra. Regina Montero, por el tiempo que se tomaron para revisar mi trabajo, así como por las correcciones y sugerencias que me ayudaron a mejorarlo.

Al Dr. Pavel Petrosyan, por toda su ayuda con las técnicas de laboratorio, gracias por hacer de mí una persona capaz dentro del laboratorio y por su peculiar manera de enseñar a ser bien hecho.

A todas las personas que forman parte del laboratorio: a la Dra. Rubio por todos los comentarios y sugerencias que me ayudaron a mejorar. A Carla, Lucio, Daniela, gracias por ser mis amigos además de ser mis compañeros y por escucharme en los momentos que de verdad necesito. A Jorge Maciel gracias por compartir charlas no tan científicas sobre música y guitarras jaja. A Jorge Limón por las charlas y los consejos y la orientación tanto académica como técnica. A Cristina, Celeste, Karla, Maritza, Gerardo, Renato y Alan.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), que me durante la realización de este trabajo me otorgó la Beca PAPIIT de "Conclusión de Estudios" como parte del proyecto "Efecto de la Exposición a Arsénico en el Transporte de Aminoácidos (L-Glutamato/Cistina) en Cerebro de Ratones Neonatos" IN 207611.

DEDICATORIAS

A mis papás Luis e Isabel, porque ustedes me han dado todo y siempre me han apoyado para lograr lo que deseo, por todo lo que hacen por mí y por su esfuerzo, su sacrificio y su cariño infinitos. Por hacer de mí el hombre que soy, por guiarme siempre y no dejarme solo nunca, por celebrar mis logros y acompañarme en mis fracasos, por ser mi mejor ejemplo en todo, por ser mis mejores maestros y mis mejores amigos, simplemente porque la vida me dio los mejores papás que hubiera podido pedir. Nunca podré retribuirles todo, pero quiero que sepan que este logro es tan suyo como mío, porque sin ustedes nunca habría llegado hasta aquí. Los amo infinitamente.

A mis hermanos, ustedes son una parte fundamental de mí, les agradezco que siempre estén conmigo, por quererme incondicionalmente, por reír conmigo cuando estoy feliz, por hacerme reír cuando estoy triste y por aguantarme los berrinches cuando estoy enojado. Muchas gracias por ser mis mejores amigos y mis mejores compañeros, gracias por todo lo que hemos vivido y todo lo que vamos a vivir. Los amo.

A mi abuelita Zenaida, por cuidarme siempre y por darme tanto cariño, por verme no sólo como tu nieto, sino como tu hijo, porque todo tu esfuerzo hizo de mí un buen muchacho y un buen hombre, gracias por ser mi segunda mamá. A mis tíos David, Óscar, Sergio y Blanca, por cuidarme y también consentirme, por ser parte vital de mi crianza y seguir siéndolo. A mi abuelita Clementina porque eres un ejemplo de unidad, de amor y de protección para toda la familia y porque sigues dándonos lo mejor de ti a pesar de todo. A mis tíos Enrique, Clementina, Javier, Nancy, Bárbara, Concha, por todo su cariño y su apoyo inagotable. A mis primos Erik, Isra, Zac, Brenda, Alan, Yam, Elías, Miguel, Conchita, nosotros no sólo somos primos, somos mejores amigos y nos acompañaremos hasta las últimas consecuencias, gracias por todas las inigualables experiencias vividas a su lado.

A Silvana, cada vez que quiero escribir algo para ti me parece como si las palabras no fueran capaces de expresar lo que siento. Eres mi prueba viviente de que imposible sólo es una palabra, eres mi ejemplo de lucha, paciencia y dedicación, eres todas mis fuerzas cuando no tengo ganas, mi motor para seguir adelante a pesar de todo, mi inspiración para lograr cosas magníficas y todos mis motivos en este mundo. Tú eres la principal razón por la que mi vida es bella, representas todo lo bueno en mí y eres mi definición favorita de felicidad. Gracias por amarme justo como soy, por

darme lo mejor de ti y por acompañarme e impulsarme durante este tortuoso camino hacia la titulación. Gracias por ser quien eres, así de maravillosa, cariñosa y perfecta, gracias por ser mi cómplice y mi todo. Te amo como nunca me pude haber imaginado y no quiero mi vida si no es a tu lado. Sé que si estamos juntos no hay ningún obstáculo que nos impida lograr lo que queramos, porque juntos somos invencibles y finalmente, porque esta aventura que se llama vivir es mucho más bonita cuando tú me miras.

A mis mejores amigos Roy, Sergio, Lalo, José Luis, ustedes son prácticamente mis hermanitos y con ustedes viví una de las épocas más increíbles de mi vida. Gracias por casi 12 años de amistad leal y verdadera, por todas las risas y por todas las tonterías, gracias por tantos momentos, por los abucheos en la banda, por tantas fiestas, tantas borracheras y por tantas experiencias. Los quiero hartos.

A las “perras”: Karina, Lynn, Ana, Yaya, Tania y Morra, porque la prepa y, por ende mis primeros años como universitario, fueron maravillosos gracias a ustedes. Gracias por ser mi apoyo cuando más lo necesité, porque a pesar de la distancia el cariño se mantiene y porque pasamos juntos por esa transición extraña de pubertos a “adultos” jaja. Los quiero.

A mis amigos de la facultad: Alma, gracias por tantas pláticas y jalones de oreja jaja, por todos los recuerdos padres en las prácticas (muchas de ellas en la playa por cierto!!! :D); a Montse y Aurora, porque todas las risas y todas los berrinches y las prácticas; a Alejandro y Mario, gracias por todas las reunioncillas cheleras y las pajareadas mañaneras, por las pláticas académicas y no académicas y los primeros recuerdos de la facultad; a Fer, aunque no tuvimos tantas materias juntos has sido un excelente amigo y eres una gran persona, gracias por tu amistad sincera y por las experiencias chidas (ejem tooooodo recursos naturales jaja); a Marco, gracias por las risas y todos los buenos ratos ; a Aida, tú estuviste ahí cuando de veras necesité de alguien, gracias por todo y por enseñarme tantos lugares raros de la ciudad.

A todos aquellos que han creído en mí y me han ayudado a lograr lo que he logrado, por todos los que me dieron su cariño, por los que ya no están conmigo y también para aquellos que van a estar. Una disculpa a todos los que por cuestiones de espacio no cupieron.

ÍNDICE	
AGRADECIMIENTOS _____	III
DECICATORIAS _____	IV
RESUMEN _____	VII
INTRODUCCIÓN _____	VIII
1. MARCO TEÓRICO _____	1
1.1. Radiación Ionizante _____	1
1.1.1. Energía Lineal de Transferencia (LET) _____	3
1.1.2. Fuentes de exposición a radiación ionizante _____	4
1.2. Efectos biológicos de la radiación ionizante _____	5
1.2.1. Efecto espectador de la radiación ionizante _____	8
1.2.2. Radiosensibilidad _____	9
1.3. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidante _____	10
1.3.1. Daño oxidante en los seres vivos _____	13
1.3.2. Antioxidantes _____	14
1.4. Neurotrofinas _____	17
1.4.1. Receptores neurotróficos _____	18
1.5. Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) _____	20
1.5.1. NGF 7S _____	22
1.5.2. Vías de Señalización de NGF _____	23
1.5.3. NGF y su relación con la respuesta antioxidante _____	25
2. JUSTIFICACIÓN _____	28
3. HIPÓTESIS _____	29
4. OBJETIVOS _____	29
4.1. Objetivo General _____	29

4.2. Objetivos Particulares _____	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS _____	30
5.1. Irradiación de los animales _____	30
5.2. Sacrificio de los animales y extracción de tejidos _____	30
5.3. Extracción de RNA _____	31
5.4. Determinación de pureza e integridad de RNA _____	31
5.5. Síntesis de cDNA (Retrotranscripción) _____	32
5.6. PCR Tiempo Real (qPCR) _____	32
5.7. Extracción y determinación de proteínas _____	35
5.8. Ensayo de Western Blot _____	35
5.9. Análisis densitométrico de los Western Blots _____	37
5.10. Análisis Estadístico _____	37
5.11. Ética _____	38
6. RESULTADOS _____	39
6.1. Pureza e integridad de RNA _____	39
6.2. Curvas de eficiencia de amplificación para <i>ngfb</i> y GAPDH _____	39
6.3. Expresión de los niveles de mRNA de <i>ngfb</i> en cerebro _____	40
6.4. Modulación de la fosforilación de TrkA en cerebro, bazo y corazón _____	41
6.5. Translocación nuclear de Akt en cerebro, bazo y corazón _____	44
7. DISCUSIÓN _____	47
8. CONCLUSIONES _____	55
9. PERSPECTIVAS _____	56
APÉNDICES _____	57
10. REFERENCIAS _____	61

RESUMEN

La radiación ionizante, es un tipo de radiación capaz de desplazar los electrones de los átomos de la materia con la cual interactúa. La absorción de este tipo de radiación por parte de las células es capaz de producir alteraciones tanto en la estructura como en la función de las biomoléculas perjudicando así a los organismos. Dicho daño es dependiente de la tasa de proliferación, la tasa metabólica y el grado de diferenciación de cada tejido y puede ser creado por acción directa de la radiación (alteración de la estructura atómica de las macromoléculas) o por acción indirecta (generación de radicales libres como consecuencia de la radiólisis del agua). Debido a que el agua es el mayor componente de las células, el daño por acción indirecta de la radiación es más relevante, puesto que se generan especies reactivas de oxígeno que pueden cambiar el estado redox de la célula y de esta manera inducir daño celular. El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una neurotrofina involucrada en el desarrollo, sobrevivencia, diferenciación y plasticidad de neuronas simpáticas y sensoriales. Además de estas funciones, existen evidencias que demuestran que NGF está involucrado en la respuesta antioxidante en el SNC y otros tejidos como el hígado. Estas respuestas se logran una vez que NGF se une a TrkA, un receptor tirosina-cinasa específico para esta neurotrofina, y se inicia la cascada de señalización NGF/TrkA/PI3k/Akt. En este trabajo, se investigó la modulación de la transcripción de *ngfb*, la fosforilación de TrkA y la translocación de Akt a núcleo en tres órganos de ratones machos con radiosensibilidades distintas (cerebro, bazo y corazón) 1h después de ser irradiados de cuerpo completo con 0.5, 2.5 y 4 Gy de rayos γ . La irradiación moduló de manera positiva la transcripción de *ngfb* en las dosis intermedias y altas, esta determinación sólo pudo hacerse en el cerebro. El tratamiento también moduló la fosforilación de TrkA de manera positiva en el cerebro en la dosis más alta y de manera negativa en el bazo en la dosis más baja, no se observaron cambios en el corazón. Por otro lado, no se registraron diferencias significativas en la translocación de Akt a núcleo en ninguno de los tres órganos evaluados. De esta manera, los resultados sugieren que el cerebro es el único órgano en que se la cascada de señalización NGF/TrkA/PI3k/Akt podría encontrarse activa probablemente para proteger al tejido del daño producido por la irradiación, ya sea activando vías antioxidantes o vías de sobrevivencia, mientras que en el bazo la radiación γ induce una baja en la señalización de dicha vía. Además, las respuestas observadas presentan un comportamiento de tipo órgano-dependiente asociado con el grado de radiosensibilidad reportado para cada tejido.

INTRODUCCIÓN

La radiación ionizante se ha encontrado presente en la Tierra desde el momento de su creación, y por tanto también ha estado presente en la existencia de todos los seres vivos del planeta. No obstante, este tipo de radiación puede generar daños importantes en las células dependiendo de la tasa de proliferación, la tasa metabólica y el grado de diferenciación de cada tejido. Los efectos dañinos antes mencionados, son producidos mayormente debido a la generación de radicales libres presentes en la forma de ERO's y ERN's como consecuencia de la radiólisis del agua. En este sentido, las células han desarrollado sistemas de defensa antioxidante que les permiten contender con el insulto tóxico representado por el estrés oxidante. Por otro lado, se cuenta con evidencias que demuestran que el factor de crecimiento nervioso (NGF), una neurotrofina involucrada en el desarrollo, sobrevivencia y diferenciación nerviosa, participa activamente en la generación de la respuesta antioxidante tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*. Aunado a todos estos hechos, la actividad antropogénica ha incrementado de manera importante las fuentes de exposición en humanos a este tipo de radiación, aumentando a su vez los riesgos de generación de daño. Es por ello que en este trabajo se pretende entender el papel que juega NGF y su cascada de señalización después de un evento de irradiación de cuerpo completo en un modelo murino en órganos que presentan distintos grados de sensibilidad a la radiación ionizante.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Radiación ionizante

La radiación es el proceso de transmisión de ondas o partículas a través de algún medio o en el vacío, también se puede denominar radiación a las propias ondas o partículas (Attix, 1986). La radiación ionizante tiene la capacidad de desplazar un electrón orbital de un átomo perteneciente a la materia con la cual interactúa, a este fenómeno se le conoce como ionización (Bushong, 2013).

Las radiaciones ionizantes pueden caracterizarse con base en su actividad medida en Becquerel (Bq), o con base en su energía expresada como electrón-volts (eV) (Coss-Rojas, 2014). Un Bq representa el número de núcleos atómicos que se desintegran por unidad de tiempo (Coss-Rojas, 2014), mientras que un electrón-volt (eV) es igual a la energía adquirida por un electrón cuando pasa por un campo eléctrico constante con un potencial de 1 volt (Kudryashov, 2008). La energía que se requiere para que un electrón escape de un átomo abarca un rango que va de los 4 a los 25 eV, por tanto las radiaciones ionizantes deben de llevar una energía que exceda estos valores para producir ionizaciones (Attix, 1986).

En general se puede decir que existen dos tipos de radiación ionizante: fotones de radiación electromagnética, como los radiación γ y rayos X y la radiación corpuscular (partículas aceleradas provenientes de los núcleos atómicos de los elementos *e. g.* electrones, protones, neutrones, partículas alfa, partículas beta, entre otras) (Kudryashov, 2008). El primer tipo se caracteriza por contar con longitudes de onda que se encuentran por debajo de los 10^{-12} m en el espectro electromagnético. El rango de energía emitido por este tipo de radiación ionizante va desde los 2.6 keV (rayos X) hasta los 6.1-7.1 MeV (radiación γ). La diferencia entre ambos tipos de fotones radica en el hecho de que los radiación γ son emitidos de un núcleo atómico o como resultado de las reacciones entre materia y anti-materia y los rayos X se emiten de electrones que cambian de nivel energético en un átomo o al disminuir su velocidad cuando interaccionan con un campo coulombiano (Attix, 1986).

La radiación puede ionizar a la materia tanto directa como indirectamente. Las partículas cargadas pueden depositar su energía directamente en la materia a través de interacciones coulombianas, este tipo de radiación se conoce como *radiación directamente ionizante*. Las partículas no cargadas (radiación γ , rayos X y neutrones) transfieren su energía a partículas cargadas presentes

en la materia con la cual interactúan y son estas partículas cargadas quienes a su vez generan ionizaciones, a esta interacción se le conoce como *radiación indirectamente ionizante* (Attix, 1986).

Los fotones de radiación γ pueden interactuar con la materia por tres fenómenos diferentes (Attix, 1986):

- **Efecto Compton.** El fotón interactúa con uno de los electrones poco ligados presentes en las capas exteriores del átomo. La energía cedida por el fotón se libera en parte en forma de energía cinética en el electrón, mientras que el resto de la energía se libera en forma de un nuevo fotón. En los tejidos, el efecto Compton es predominante en eventos que involucran fotones con energías que van desde los 30 keV hasta los 20 MeV. La probabilidad de que este efecto ocurra casi no depende del número atómico (Z) del medio absorbente o absorbedor (Figura 1.1a).
- **Efecto fotoeléctrico.** Es resultado de la interacción entre un fotón y uno de los electrones presentes en las capas más internas (K, L o M) de un átomo. El fotón cede toda su energía, parte de ésta es empleada en la liberación del electrón, mientras que el resto se libera en forma de energía cinética presente en el electrón. Este efecto es común en fotones de baja energía (< 30 KeV en tejido) y es dependiente de la Z del absorbedor (Figura 1.1b).
- **Producción de Pares.** El fotón se convierte en un par de partículas como resultado de su interacción con el campo coulombiano presente en el núcleo atómico. Las partículas creadas son un electrón y su antipartícula, un positrón (de igual masa que el electrón pero con carga positiva). La probabilidad de que ocurra es proporcional a la Z del absorbedor (Figura 1.1c).

2

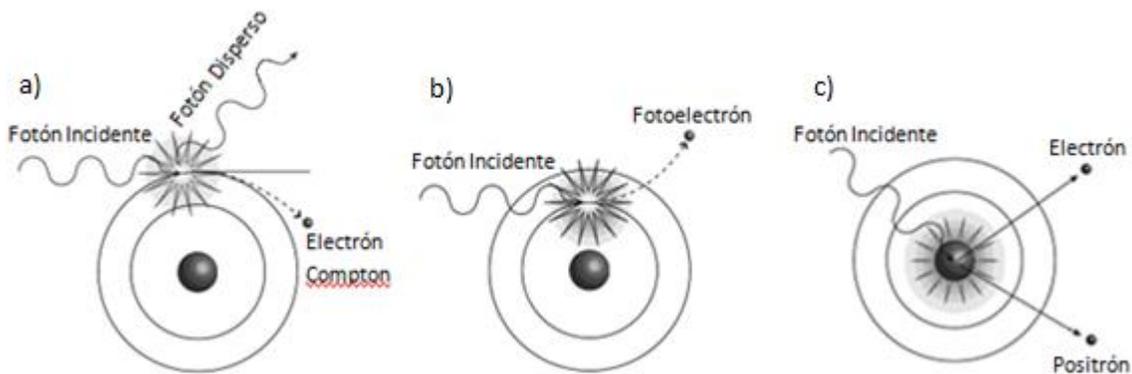


Figura 1.1. Esquematación de los efectos producidos por la interacción de la radiación γ con la materia: a) Efecto Compton, b) Efecto Fotoeléctrico y c) Producción de Pares (Modificado de Bryan, 2013).

En la Figura 1.2, se muestran las relaciones de la interacción de la radiación γ con la materia en función de la energía de la radiación y la Z del absorbedor.

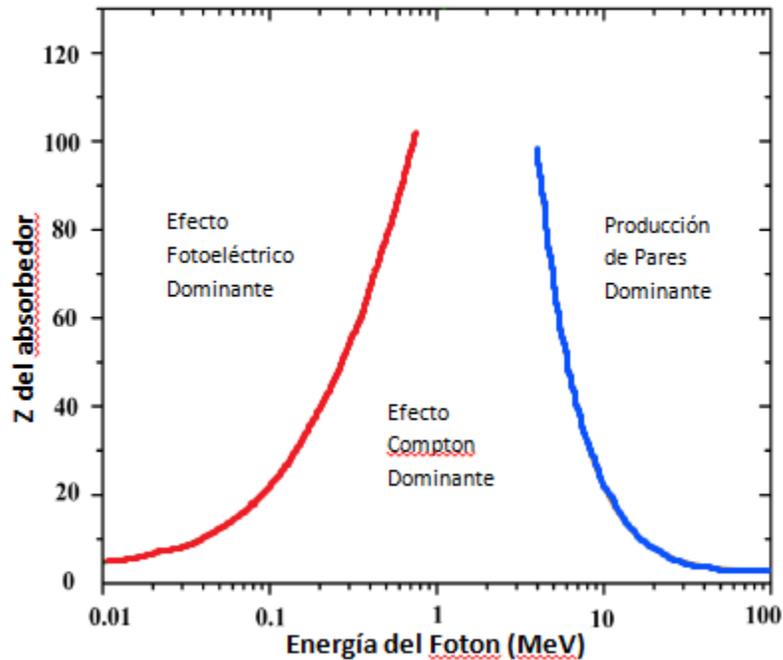


Figura 1.2. Importancia relativa de los tres tipos de interacción de los radiación γ con la materia. Las curvas representan los valores de número atómico (Z) y energía del fotón (E_γ) para los cuales la aparición de los efectos tienen la misma probabilidad (Modificado de Attix, 1986).

1.1.1. Energía lineal de transferencia (LET)

Si una partícula o un haz de partículas radiactivas penetran en un material, sus trayectorias pueden trazarse con base en los efectos producidos por la ionización. Éste evento sólo se observa en la interacción de materia con partículas directamente ionizantes. Las partículas indirectamente ionizantes no dejan dicha huella directamente, ésta sólo se hace evidente por la acción de partículas secundarias, si es que éstas últimas llevan una carga eléctrica (Kudryashov, 2008).

La transferencia lineal de energía (LET por sus siglas en inglés), es la energía perdida por unidad de longitud de una partícula dentro de los límites de un rastro de ionización (dE/dx). Las cantidades de energía perdida se expresan en $\text{keV}/\mu\text{m}$ (Kudryashov, 2008).

La radiación ionizante también puede clasificarse en radiación de alta y de bajo LET. La radiación de bajo LET abarca un patrón de ionización menor a $1 \text{ keV}/\mu\text{m}$ y la de alta LET comprende valores

entre 1 y 1000 keV/ μm . De manera general, los fotones se consideran radiación de baja LET, mientras que las partículas cargadas pesadas (protones ó partículas α) se consideran de alta LET (Attix, 1986). Esta transferencia de energía y sus efectos en las células son parte de los fenómenos estudiados en este trabajo.

1.1.2. Fuentes de exposición a radiación ionizante.

La radiación ionizante puede provenir de dos fuentes principales: la radiación ambiental natural y la radiación producida por el hombre. Dentro de las fuentes de radiación natural más importantes se encuentran los depósitos de elementos radiactivos, *e. g.* uranio y torio, presentes en las rocas ígneas y sedimentarias que conforman la corteza de la Tierra, mismas que también son usadas en construcción (UNSCEAR, 2008; Revisado por Coss-Rojas, 2014). Los rayos cósmicos (fotones y partículas cargadas provenientes del Sol y otras estrellas), también forman parte de la radiación natural (Bushong, 2013). Asimismo, existen cantidades traza de radionúclidos presentes en los organismos como metabolitos naturales o, en algunos casos, como consecuencia de la ingesta, dentro de los cuales el potasio y el carbono son los más importantes (Revisado por Coss-Rojas, 2014). No obstante, la fuente más importante de radiación ambiental es el radón, un gas ubicuo producido como resultado del decaimiento natural del uranio (Bushong, 2013).

4

Aunado a las fuentes de radiación ambiental, se deben de considerar las fuentes de radiación producidas por el hombre. Dentro de este ámbito, las radiaciones empleadas en procedimientos médicos aportan la mayor parte de la exposición antropogénica (Revisado por Coss-Rojas, 2014). En los últimos años, la exposición a radiación ionizante de uso clínico se ha incrementado hasta alcanzar cerca del 50% de la exposición total en humanos (Figura 1.3) (NCRP, 2009). Los procedimientos que incluyen el uso de radiaciones ionizantes en la medicina incluyen al radiodiagnóstico (rayos X), la medicina nuclear y la radioterapia (Bushong, 2013; Coss-Rojas, 2014). Otras fuentes de radiación producida por el hombre involucran a los procesos de generación de energía nuclear, los accidentes nucleares, el transporte de material radiactivo y las pruebas de armas nucleares (UNSCEAR, 2008).

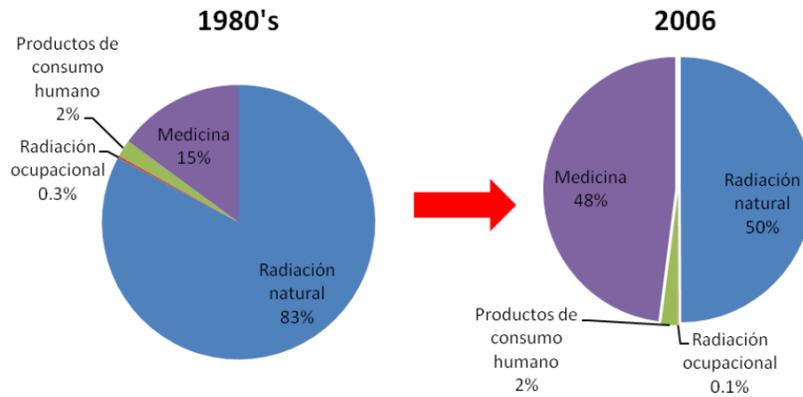


Figura 1.3. Representación del porcentaje de exposición a radiaciones ambientales naturales y radiaciones producidas por el hombre. En los últimos 30 años, la exposición a radiación por procedimientos médicos se ha incrementado (Tomado de Coss-Rojas, 2014).

1.2. Efectos biológicos de la radiación ionizante.

La interacción de radiación ionizante con los seres vivos puede tener efectos deletéreos en las células que los componen. En la mayoría de los casos, las lesiones generadas son consecuencia del daño producido en el DNA (Hall y Giaccia, 2012), expresado en la forma de alteraciones genéticas tales como aberraciones cromosómicas, cambios en la ploidía, formación de micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas, mutaciones y amplificaciones de genes, y deleciones (Morgan, 2003).

Platzman (1958) separó la absorción de fotones de alta energía en las células en cuatro fases que pueden delimitarse con relativa claridad, éstas son:

1. **Etapa Física.** Implica la deposición de energía causada por la radiación incidente y la consecuente generación de electrones secundarios (10^{-16} s).
2. **Etapa Físico-Química.** Se presenta una rápida reorganización de las especies altamente inestables producidas en la primera etapa. Al final de esta etapa, los radicales se encuentran en una distribución no homogénea (10^{-12} s).
3. **Etapa de Química no Homogénea.** Las especies químicamente reactivas difunden y reaccionan unas con otras o con el ambiente celular hasta que todas las reacciones se completan (10^{-6} s).
4. **Etapa Biológica.** Las células responden a los daños causados por los productos formados en las etapas anteriores. Durante esta etapa se inducen las respuestas que derivan en las

consecuencias a largo plazo de la exposición a la radiación (10^{-3} s o más largo dependiendo del medio).

Las radiaciones ionizantes pueden ejercer sus efectos a través de dos maneras. La primera de éstas se presenta cuando se producen ionizaciones de manera directa en las estructuras atómicas de las macromoléculas, produciendo alteraciones en su estructura y función, éstos se conocen como efectos directos. Por su parte, los efectos indirectos de la radiación se presentan cuando los radicales libres, principalmente especies reactivas de oxígeno (EROs) generados como consecuencia de la radiólisis del agua, interactúan con las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de las células (Riley, 1994; Azzam, 2012; Hall, 2012) (Figura 1.4). Se ha reportado también que las EROs generadas pueden interactuar con el óxido nítrico (NO) y generar especies reactivas del nitrógeno (ERN's) que a su vez pueden dañar también a las células (Riley, 1994; Jay-Gerin y Ferradini, 2000).

6

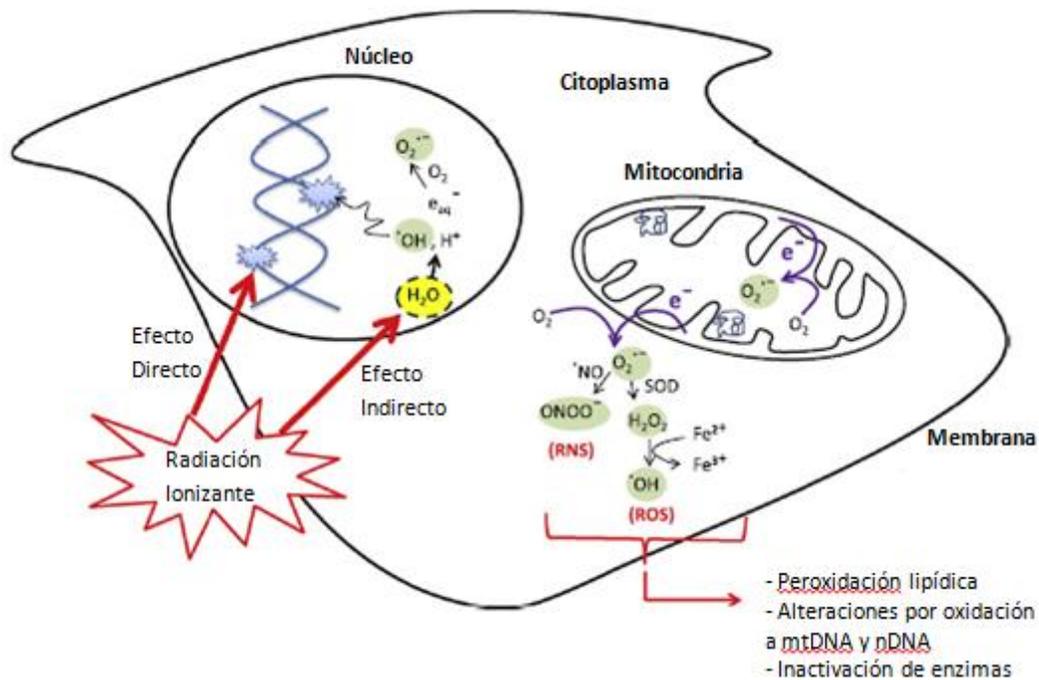


Figura 1.4 Esquemización de los efectos producidos por la acción directa e indirecta de la radiación ionizante en los sistemas biológicos (modificado de Azzam, et al., 2012).

Puesto que las células están compuestas en su mayoría por agua ($\approx 80\%$), los daños causados por la acción indirecta de la radiación adquieren una mayor relevancia en las células, debido a que el desbalance entre las especies reactivas generadas y la capacidad antioxidante del sistema deriva

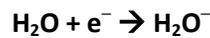
en la generación de estrés oxidante (Riley, 1994; Hall, 2012). Se calcula que aproximadamente 2/3 del daño que causa la radiación ionizante al DNA se produce por el efecto indirecto (Azzam, 2012).

De acuerdo con Vázquez-Vázquez (2011), los radicales producidos por la radiólisis del agua siguen el mecanismo descrito a continuación:

La absorción de radiación ionizante por parte de una molécula de agua resultará en una ionización (*i. e.* la molécula de agua perderá un electrón). Como consecuencia de ésta ionización, se formará un ión positivo:



El electrón liberado por la ionización puede ser capturado por otra molécula de agua y, como resultado, se formará otro ión, ésta vez negativo:



Ambos iones son altamente inestables y se descomponen para dar origen a nuevos iones y radicales:



Los iones H^+ y OH^- pueden combinarse para volver a formar una molécula de agua. Sin embargo, el radical OH^\bullet es capaz de reaccionar prácticamente con todas las moléculas presentes en los organismos. Los radicales OH^\bullet también pueden reaccionar entre sí para formar peróxido de hidrógeno, una molécula altamente tóxica:



Debido a su alta reactividad, el radical OH^\bullet difunde poco en el medio y se considera que muchos de los daños causados por el efecto indirecto de la radiación están mediados por éste radical. En contraste, el H_2O_2 tiene una alta capacidad de difusión, aunque este radical no es tan reactivo en una solución acuosa, se ha reportado que en concentraciones mayores a 50 μM puede generar oxidaciones en grupos SH de las proteínas (Revisado por Halliwell, 1994).

De manera general se han descrito dos tipos de efectos de la radiación ionizante relacionados con la dosis en los humanos: los efectos somáticos y los efectos genéticos (Apéndice I) (Fajardo, 2001; Angelo, 2004).

1.2.1. Efecto espectador de la radiación ionizante.

Además de los efectos observados en las células directamente expuestas a radiación ionizante, existen evidencias que demuestran que células que no fueron expuestas directamente a la radiación, muestran las mismas alteraciones que las células irradiadas, *i. e.* se comportan como si hubiesen sido expuestas, éste fenómeno se conoce como “efecto espectador” (Revisado por Mothersill y Seymour, 2004; Rzeszowska *et al.*, 2009; Blyth y Sykes, 2011) (Figura 1.5). El efecto espectador engloba una amplia gama de alteraciones genéticas entre las que destacan rearrreglos cromosómicos, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, deleciones, duplicaciones y mutaciones y amplificaciones de genes (Koturbash, 2006).

La generación de este efecto se ha demostrado tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*. En particular, se ha demostrado que los efectos de la exposición a radiación se pueden observar en cultivos celulares expuestos a medio de cultivo de células irradiadas (Zhou *et al.*, 2002). En modelos murinos, se ha observado que al irradiar únicamente la cabeza se presentan cambios epigenéticos y marcadores de apoptosis en el bazo (Koturbash *et al.*, 2008).

8

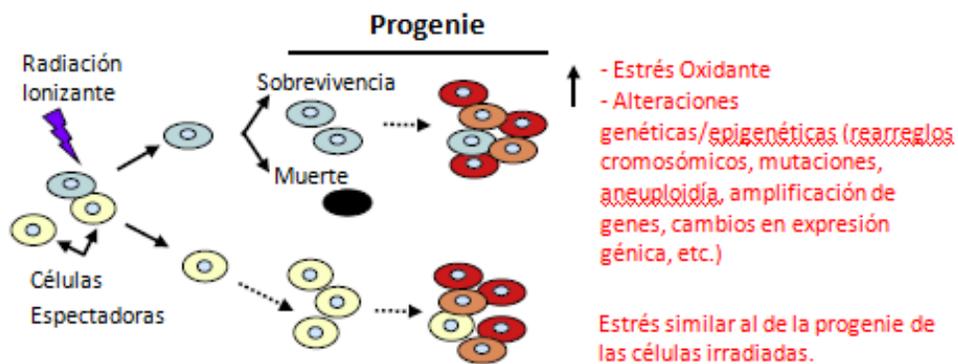


Figura 1.5. En el efecto espectador de la radiación ionizante, las células directamente expuestas a la radiación pueden ya sea morir o sobrevivir. La progenie de las sobrevivientes presentará alteraciones genéticas y epigenéticas, dichas alteraciones también pueden inducirse en células que no fueron directamente irradiadas. Usualmente, los efectos en las células espectadoras se observan en las siguientes generaciones (modificado de Azzam, 2012).

A pesar de que el mecanismo de acción del efecto espectador no se conoce por completo, se ha demostrado que los efectos observados en las células espectadoras podrían deberse a un evento de señalización química iniciado por las células directamente irradiadas. Éstas son capaces de liberar diversos factores en el medio (*e. g.* EROs, factores clastogénicos o citocinas) que pueden afectar a las células adyacentes (por uniones gap) o difundir a través del plasma y causar daños en otros sitios del organismo (Mothersill y Seymour, 2004; Morgan y Sowa, 2005).

Los daños causados por la radiación se pueden mantener incluso en la progenie de las células espectadoras (Azzam, 2012). En un estudio realizado por Marozik *et al.*, (2007), se demostró que al exponer cultivos celulares con el suero de sobrevivientes del accidente de Chernobyl, se genera una gran cantidad de micronúcleos y se reduce la viabilidad celular, lo que sugiere que el efecto espectador puede permanecer en individuos irradiados por largos periodos de tiempo, en este caso 20 años. Además de estas evidencias, en un estudio en que se emplearon truchas arcoíris expuestas a rayos X se demostró que los individuos irradiados pueden liberar los factores clastogénicos en el agua y que éstos últimos pueden generar daños en órganos tales como las branquias o la cola en peces no expuestos a radiación incluso cuando los peces originalmente irradiados han sido removidos del estanque (Mothersill *et al.*, 2006).

1.2.2. Radiosensibilidad.

La radiosensibilidad se define como el nivel de afectación que presenta un tipo celular determinado perteneciente a un organismo que ha sido expuesto a radiación ionizante (Vázquez-Vázquez, 2011).

La ley de la radiosensibilidad, postulada por Bergonié y Tribondeau en 1906 (Vogin y Foray, 2013), establece que el nivel de radiosensibilidad depende del índice mitótico y de la tasa metabólica del tipo celular irradiado (Bergonié y Tribondeau, 2003).

Los postulados principales de ésta ley son los siguientes (Alcaraz-Baños, 2003):

- Las células con una alta actividad mitótica y una alta tasa metabólica son radiosensibles.
- Las células con un mayor porvenir filogenético, *i. e.* que requieran más divisiones para alcanzar su diferenciación, son radiosensibles.
- Los tejidos con un menor grado de diferenciación son radiosensibles.

Tomando en consideración estas aseveraciones, los órganos como la médula ósea roja, el timo o el bazo son considerados órganos radiosensibles, mientras que el corazón y el cerebro se consideran como radiorresistentes (Suciu, 1983). Los linfocitos son una excepción a esta ley, pues son células muy radiosensibles a pesar de no contar con las características que se enuncian (Alcaraz-Baños, 2003).

Además de las características señaladas por Bergonié y Tribondeau (2003), se ha demostrado que la radiosensibilidad también puede estar determinada por la tasa de consumo de oxígeno, pues se ha observado que en condiciones hiperbáricas la radiosensibilidad de los tejidos se incrementa (Withers, 1967).

1.3. Especies Reactivas de Oxígeno y Estrés oxidante.

Como se mencionó previamente, la principal vía a través de la cual la radiación ionizante daña a los organismos es la generación de ERO's debido al efecto indirecto. Todos los organismos aerobios requieren oxígeno para producir energía en sus mitocondrias (Halliwell, 2006), no obstante es considerado como una molécula tóxica para todos los seres vivos debido a su capacidad de producir radicales libres responsables de provocar daño en los sistemas biológicos (Revisado por Halliwell, 1994, 2006; Kohen y Nyska, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2007).

Halliwell y Gutteridge (2007) definen un radical libre como “cualquier especie química capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones no apareados”. En los seres vivos, los radicales se pueden formar por diversos mecanismos: al añadir un solo electrón a un no-radical, como consecuencia de la ruptura de un enlace covalente, o como consecuencia de la exposición a radiación (Revisado por Halliwell, 2006).

Por otro lado, en química, cualquier compuesto que puede aceptar electrones se conoce como agente oxidante, contrario a esto, una sustancia capaz de donar electrones es un agente reductor (Lodish *et al.*, 2008). En biología un agente reductor suele actuar donando hidrógenos o donando oxígenos y los agentes oxidantes ganan oxígenos o electrones, en ambientes biológicos estos agentes se denominan como antioxidantes y pro-oxidantes, respectivamente (Kohen y Nyska, 2002). El balance entre pro-oxidantes y antioxidantes se conoce como potencial redox y es específico para cada organelo y sitio biológico (Kohen y Nyska, 2002). Con base en lo anterior, el término estrés oxidante se refiere al “desbalance entre agentes oxidantes y antioxidantes, en

favor de los primeros, conllevando a un riesgo potencial de daño oxidante” (Sies, 1997; Halliwell, 2006, 2011).

En este sentido, los agentes pro-oxidantes están representados por las EROs (Kohen y Nyska, 2002), el cual es un “término colectivo que incluye tanto a los radicales basados en oxígeno (como el radical superóxido $O_2^{\bullet-}$ o el radical hidroxilo OH^{\bullet}) como a los derivados no radicales del oxígeno que pueden generar fácilmente radicales libres y/o causar daño oxidante (como el peróxido de hidrógeno H_2O_2)” (Tabla 1) (Halliwell, 2001, 2006; Halliwell y Gutteridge, 2007). Una definición similar se emplea para las ERNs (Halliwell, 2006).

El radical OH^{\bullet} es considerado como la ERO más reactiva de todas, aunque para ejercer daño debe de producirse en un sitio cercano a sus objetivos biológicos, pues tiene poca capacidad de difusión, mientras que los radicales $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 son menos reactivos pero tienen una alta capacidad de difusión, por lo que pueden generar daños en sitios alejados de su origen (Revisado por Sies, 1997; Kohen y Nyska, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2007). Mucho del daño generado por el H_2O_2 se debe a que es capaz de participar en la reacción de Fenton que resulta en la producción del radical OH^{\bullet} (Halliwell, 1994; Kohen y Nyska, 2002). Por otro lado, se estima que la mayor parte del daño originado como consecuencia de la exposición a radiación ionizante se debe al radical OH^{\bullet} , derivado de la radiólisis del agua (Halliwell, 1994, 2001).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (EROs). Se muestran tanto los radicales de oxígeno como los no-radicales que pueden convertirse fácilmente en radicales (Modificado de Halliwell, 2006).

Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)	
<i>Radicales</i>	<i>No Radicales</i>
Anión Superóxido, $O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^{\bullet}	Ácido hipocloroso, HOCl
Peroxilo, RO_2^{\bullet}	Ácido hipobromoso, HOBr
Alcoxilo, RO^{\bullet}	Ozono, O_3
Hidroperoxilo, HO_2^{\bullet}	Oxígeno singulete, 1O_2
	Peroxinitrito, $ONOO^-$

Las ERO's se forman de manera constante en los seres vivos a través de fuentes endógenas y fuentes exógenas (Halliwell, 2001). La mitocondria es la fuente endógena más importante, pues a

través de la cadena de transporte de electrones es que se pueden transferir algunos electrones a las moléculas de O_2 , generando de esta manera el radical $O_2^{\bullet-}$ (Halliwell, 2006). Por su parte, el sistema inmune, a través de los mecanismos de combate a patógenos, también aporta una cantidad importante de ERO's a los organismos (Halliwell, 2011).

En lo que a las fuentes exógenas se refiere, la exposición a radiación, tanto ionizante como no-ionizante, es una de las fuentes exógenas más importantes. En particular, la exposición a rayos X y radiación γ deriva en la producción de radicales OH^{\bullet} y H_2O_2 , mientras que la exposición a rayos UV produce la ruptura hemolítica del H_2O_2 , lo que resulta en la formación de radicales OH^{\bullet} (Halliwell, 1994, 2001). Los contaminantes ambientales, entre los que se engloba a los contaminantes del aire (humo de cigarro, contaminantes industriales, productos de la combustión de combustibles fósiles), xenobióticos (*e. g.* toxinas, pesticidas o herbicidas) y productos químicos (*e. g.* el gas mostaza o el alcohol) también son fuentes importantes de ERO's. Sin embargo, se considera que la principal fuente de ERO's proviene de la dieta, puesto que gran parte de los alimentos son metabolizados a través de oxidaciones, además de que pueden contener una gran cantidad de agentes oxidantes (Revisado por Kohen y Nyska, 2002).

12

Los radicales son capaces de producir diferentes reacciones (Halliwell, 2006; Halliwell y Gutteridge, 2007):

1. Pueden unir sus electrones no apareados a través de un enlace covalente;
2. Se agregan como aductos en no-radicales, éstos últimos conservarán el electrón no apareado del radical original;
3. Actúan como agentes reductores, al donar un solo electrón a un no-radical, como consecuencia la molécula receptora tendrá un electrón no apareado;
4. Actúan como agentes oxidantes, tomando un solo electrón de un no-radical, éste último tendrá como consecuencia un electrón no apareado;
5. Pueden abstraer un átomo de hidrógeno de un enlace C-H, debido a que los hidrógenos tienen un solo electrón, el carbono se quedará con un electrón no apareado. En este caso, se puede presentar una reacción en cadena, pues los radicales con base en carbono reaccionan fácilmente con el oxígeno para formar radicales peróxido.

1.3.1. Daño oxidante en los seres vivos.

Los blanco más vulnerables al daño por estrés oxidante son las proteínas, los lípidos y el DNA. A continuación se presenta un resumen del daño producido en cada una de las estructuras mencionadas anteriormente.

Lípidos. El daño en lípidos se conoce como peroxidación lipídica y ocurre en tres etapas (Revisado por Kohen y Nyska, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2007):

1. **Iniciación.** Una ERO sustrae un átomo de hidrógeno de un enlace C-H presente en un grupo metileno del lípido. Este evento deja al carbono con un electrón no apareado, mismo que se estabiliza a través del reacomodo estructural de la molécula, lo que resulta en la formación de un dieno conjugado.
2. **Propagación.** El dieno (un radical con base de C) puede reaccionar fácilmente con el O₂ del medio para formar un radical RO₂[•], éste último es capaz de sustraer más H de otros enlaces C-H en la molécula, por lo tanto se produce una reacción en cadena.
3. **Terminación.** La última etapa se presenta después de la interacción del radical RO₂[•] con otro radical o con un antioxidante.

La peroxidación lipídica disminuye la fluidez de la membrana, incrementa la permeabilidad de la misma y daña proteínas membranales, lo que resulta en la inactivación de receptores, enzimas y canales iónicos, y eventualmente se induce la pérdida de la integridad membranal, *i. e.* ruptura de las membranas (Halliwell, 2006).

Proteínas. Los radicales OH[•] y RO[•] son los principales causantes del daño a proteínas, *e. g.* el radical OH[•] puede atacar los enlaces peptídicos al sustraer el H (Halliwell y Gutteridge; 2007). Por otro lado, los radicales O₂^{•-} y H₂O₂ casi no tienen efectos en las proteínas, aunque pueden reaccionar con los grupos -SH de las proteínas y oxidarlos (Kohen y Nyska, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2007), así como con el hierro de la hemoglobina, lo que deriva en la formación de metahemoglobina (Revisado por Vázquez-Vázquez, 2011). Como consecuencia se pueden dañar aminoácidos específicos, puede haber cambios en la estructura terciaria, degradación y fragmentación de las proteínas (Kohen y Nyska, 2002). El daño en las proteínas puede resultar en la generación de mecanismos de respuesta al estrés que derivan en la pérdida de la actividad enzimática, funciones celulares alteradas (como la producción de energía), interferencia con la

creación de potenciales de membrana y cambios en el tipo y nivel de proteínas celulares (Kohen y Nyska, 2002).

DNA. Aunque el DNA es una molécula altamente estable, las ERO's pueden causar distintos tipos de daño en ella: modificación de bases nitrogenadas, rompimientos de cadena sencilla y de cadena doble, pérdida de purinas, daño a la desoxirribosa y daño a los mecanismos de reparación del DNA (Revisado por Kohen y Nyska, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2007). La mayoría del daño generado en el DNA es consecuencia del radical OH^\bullet (Kohen y Nyska, 2002), que es capaz de formar aductos en las bases nitrogenadas (Revisado por Halliwell y Gutteridge, 2007). Uno de los aductos más importantes es la 8-hidroxi guanina, que se forma cuando el radical OH^\bullet reacciona con las guaninas del DNA (Halliwell, 2001, 2006).

Finalmente, el daño por estrés oxidante se ha asociado con la generación y propagación del cáncer, la generación de una gran cantidad de enfermedades neurodegenerativas, *e. g.* Parkinson y Alzheimer, así como con la diabetes, aterosclerosis, insuficiencia renal e hipertensión arterial entre otras (Revisado por Elejalde-Guerra, 2001; Halliwell, 2011).

14

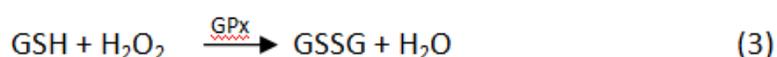
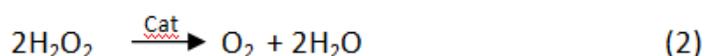
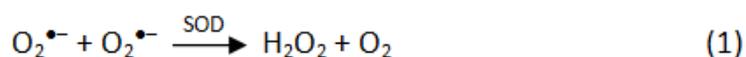
1.3.2. Antioxidantes.

Halliwell (2001) define a un antioxidante como “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparadas con la de un sustrato oxidable, previene o retrasa de manera significativa la oxidación de dicho sustrato”.

Los sistemas biológicos cuentan con tres tipos principales de antioxidantes: i) enzimas antioxidantes, ii) proteínas antioxidantes no catalíticas y iii) antioxidantes de bajo peso molecular (LMWA por sus siglas en inglés) (Kohen y Nyska, 2002; Ma, 2013).

En el caso de los primeros, Sies (1997) considera que las tres clases principales de enzimas antioxidantes son las superóxido dismutasas (SOD), las catalasas (CAT) y las glutatión peroxidasas (GPx). La SOD se encarga de catalizar la conversión del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 (Ecuación 1) (Halliwell, 2001; Kohen y Nyska, 2002). Un tipo específico de SOD que cuenta con manganeso en su sitio activo (MnSOD) está presente en la mitocondria, mientras que la enzima que tiene cobre y zinc en su sitio activo (CuZnSOD) está presente en gran medida en el citoplasma (Halliwell, 2001). Por su parte, la CAT lleva a cabo la conversión de 2 moléculas de H_2O_2 en agua y O_2 (Ecuación 2), se considera que esta enzima es responsable de remover el H_2O_2 cuando se encuentra en altas

concentraciones (Kohen y Nyska, 2002). Empero, el sistema de remoción de H₂O₂ más importante en las células humanas es la GPx (Halliwell, 2001), pues tiene una mayor afinidad por su substrato y puede removerlo cuando se encuentra en bajas concentraciones (Kohen y Nyska, 2002). La GPx emplea al glutatión reducido (GSH) como donador de electrones para remover el H₂O₂, lo que resulta en la producción de glutatión oxidado (GSSG) (Ecuación 3) (Halliwell, 2001; Kohen y Nyska, 2002).



El grupo de antioxidantes no catalíticos está representado por las tiorredoxinas (Trx) y las glutarredoxinas (Grx) (Ma, 2013). Ambas proteínas pueden fungir como sensores del potencial redox celular y también pueden actuar como donadores de electrones para reducir los puentes disulfuro oxidados de las proteínas (Ahsan *et al.*, 2009).

El grupo de LMWA puede actuar directa o indirectamente con las ERO's. La acción indirecta involucra la quelación de metales de transición y de esta manera se previene su participación en la reacción de Fenton, mientras que el mecanismo directo implica la donación de electrones a los radicales de oxígeno para que de ésta manera se reduzcan las posibilidades de que ataquen a sus blancos biológicos (Kohen y Nyska, 2002). Dentro de este grupo, el GSH es considerado como el principal antioxidante intracelular, se puede encontrar en concentraciones de hasta 10 mM (Limón-Pacheco, 2007). En su forma oxidada GSSG, dos moléculas de GSH se encuentran unidas a través de un puente disulfuro debido a la oxidación de los grupos -SH de la forma reducida (GSH) (Kohen y Nyska, 2002). El cociente 2GSH/GSSG funge como un estimador del potencial redox o potencial reductor, que representa una medida de la energía potencial de reducción u oxidación dentro de las células (Dalton *et al.*, 2004). El GSH puede reducir de manera directa varios tipos de ERO's (*e. g.* OH[•], RO₂[•], RO[•], HOCl y ONOO⁻) a través de la donación de electrones, o bien como cofactor de la GPx (Kohen y Nyska, 2002; Halliwell, 2001), también puede actuar como quelante y participa en otros procesos como el plegamiento de las proteínas y su degradación (Kohen y Nyska, 2002).

Las células cuentan con mecanismos específicos para detectar cambios en el estado redox celular e iniciar la vía de señalización antioxidante. Los residuos reactivos de cisteína, por ejemplo, son un pequeño grupo de proteínas que a pH fisiológico se encuentran en forma de iones tiolato (S^-) y reaccionan fácilmente con las ERO's y las ERN's, estas reacciones generan productos de oxidación de la cisteína que a su vez funcionan como mecanismos de detección de moléculas electrofílicas o presencia de metales (Ma, 2013).

La expresión de la mayoría de las enzimas antioxidantes se encuentra regulada por los elementos de respuesta a antioxidantes (ARE por sus siglas en inglés), que son secuencias potenciadoras presentes en los promotores de los genes de dichas enzimas (Nguyen *et al.*, 2009). En esta vía también está involucrado el factor nuclear 2 (relacionado al factor eritroide 2) (Nrf2), un factor de transcripción que al formar heterodímeros con proteínas Maf pequeñas puede unirse a las regiones ARE y así iniciar la transcripción de genes involucrados en la respuesta antioxidante (Ma, 2013). A su vez, la actividad de Nrf2 se encuentra controlada por Keap1. En condiciones fisiológicas, Keap1 está unido a Nrf2, ésta unión impide la interacción de Nrf2 con las proteínas Maf pequeñas y promueve su ubiquitinación (Ma, 2013). En condiciones de estrés oxidante, los residuos de cisteína de Keap1 pueden ser modificados por la acción de ERO's o ERN's y de esta manera se inhibe la ubiquitinación de Nrf2 y se promueve la disociación del complejo Nrf2/Keap1, lo que deriva en la transcripción de genes antioxidantes (Nguyen *et al.*, 2009; Ma, 2013).

Aunado a estos mecanismos de activación, existen evidencias que indican que a través de la vía de señalización de las MAP cinasas, se puede iniciar la respuesta antioxidante en las células a través de Nrf2. Por ejemplo, se ha demostrado que la activación de la vía Nrf2 por etil piruvato es dependiente de la fosforilación de la cinasa p38 MAPK en un modelo *in vitro* de células RAW 264.7 (Jang *et al.*, 2012). De manera más específica, en células HepG2 se ha demostrado que la administración capsaicina puede incrementar la actividad de Nrf2, misma que es modulada a su vez por la activación de la cascada de señalización PI3k/Akt (Joung *et al.*, 2007).

De esta manera, los antioxidantes proveen de mecanismos a las células para remover y prevenir la formación de ERO's, no obstante este mecanismo no es 100% efectivo (Halliwell, 2001), es por ello que los mecanismos involucrados en la reparación de DNA, daño lipolítico y enzimas proteolíticas juegan un papel importante para restituir las funciones de estas biomoléculas (Sies, 1997).

1.4. Neurotrofinas.

Las neurotrofinas (NT) son un grupo de factores de crecimiento involucrados en casi todos los aspectos del funcionamiento y desarrollo del sistema nervioso. Se ha demostrado que las NT pueden modular la proliferación, sobrevivencia, diferenciación y regeneración neuronales. Asimismo, se ha observado que están involucradas en la regulación y la plasticidad sinápticas, son capaces de modular los eventos de potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD) y participan en la diferenciación glial (Revisado por Thoenen, 1995; McAllister *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2005; Reichardt, 2006).

En todos los grupos de vertebrados se ha reportado la presencia de 4 tipos de NT principales: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (Davies, 1994; Lewin y Barde, 1996; Lu *et al.*, 2005). Todas las NT son sintetizadas en forma de pro-neurotrofinas, precursores de mayor tamaño (30-35 kDa) que las proteínas maduras, mismas que deben de ser procesadas para dar origen a la NT madura de aproximadamente 13 kDa (Siedah *et al.*, 1995; revisado por Lu *et al.*, 2005; Friedman y Greene, 1999). Se considera que las pro-neurotrofinas llevan a cabo funciones opuestas a las de las NT maduras (Lu *et al.*, 2005).

Lu *et al.* (2005) mencionan que las pro-neurotrofinas pueden cumplir uno de tres destinos:

1. Las pro-neurotrofinas son procesadas en el interior de la célula y consecuentemente secretadas como NT maduras (las proteasas involucradas en la maduración son la furina y la proteína-convertasa 1)
2. Las pro-neurotrofinas son secretadas y la maduración se lleva a cabo en el exterior de la célula (las proteínas son maduras por metaloproteasas o por plasmina).
3. Las pro-neurotrofinas son secretadas y no hay una maduración subsecuente.

En su forma activa, las NT se encuentran en forma de homodímeros constituidos de dos monómeros orientados de manera paralela, *i. e.* los extremos C y N se orientan en el mismo lado del dímero (Wiesmann y de Vos, 2001, Soforniew *et al.*, 2001), aunque BDNF es capaz de formar heterodímeros con NT-3 y NT-4/5 (Figura 1.6) (Wiesmann y de Vos, 2001). Todas las NT cuentan con un patrón de plegamiento similar y mantienen un 50% de identidad en sus secuencias (Wiesmann y de Vos, 2001).

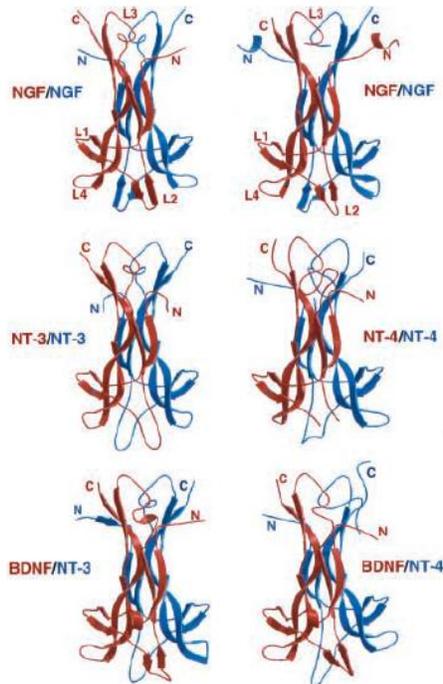


Figura 1.6. Diagramas de la estructura de los dímeros de NT determinados experimentalmente. Los monómeros dimerizan de forma paralela, posicionando al C y N terminales hacia el mismo lado. En la parte superior se muestran los homodímeros de NGF, en el centro los de NT-3 y NT-4/5 y en la parte inferior se muestran los heterodímeros formados por BDNF y NT-3 y BDNF y NT-4/5 (Tomado de Wiesmann y de Vos, 2001).

1.4.1. Receptores neurotróficos.

Las NT son capaces de unirse a dos tipos de receptores transmembranales. Los primeros, receptores de tipo $p75^{\text{NTR}}$, pertenecen a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y son considerados como los receptores de baja afinidad (Revisado por Friedman y Greene, 1999; Chao, 2003; Lu *et al.*, 2005). Están formados por un dominio extracelular que contiene cuatro motivos ricos en cisteína, un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico en el que se encuentra un dominio de “muerte” (Wiesmann y de Vos, 2001; Reichardt, 2006). El segundo tipo, receptores de tipo Trk, son receptores tirosina-cinasa y se consideran como los receptores de alta afinidad de las NT (Barbacid, 1994; Huang y Reichardt, 2003; Reichardt, 2006). Están formados por cinco dominios en su porción extracelular unidos por una hélice transmembranal al dominio tirosina-cinasa interno, de todos los dominios externos, el número 5 es el más conservado (Wiesmann y de Vos, 2001)

La señalización a través de los receptores de tipo Trk involucra las respuestas de supervivencia, desarrollo y diferenciación de las NT mientras que la activación de $p75^{\text{NTR}}$ está asociada con respuestas de muerte celular (Revisado por Friedman y Greene, 1999; Chao, 2003; Lu *et al.*, 2005; Reichardt, 2006).

Cada NT se une a un tipo específico de receptor Trk, de esta manera, NGF se une a receptores de tipo TrkA, BDNF y NT4/5 se unen a receptores de tipo TrkB y NT3 a receptores de tipo TrkC (Revisado por Thoenen, 1995; Lu *et al.*, 2005; Reichardt, 2006). No obstante, se ha demostrado que NT3 también es capaz de unirse a TrkA y con TrkB, aunque con una afinidad menor (Ivanisevic *et al.*, 2007; revisado por Barbacid, 1994). Por otro lado, $p75^{\text{NTR}}$ se conoce como el receptor pan-neurotrófico dado que todas las NT son capaces de unirse a él de manera indistinta aunque con una afinidad hasta 1000 veces menor en comparación con los receptores de tipo Trk (Reichardt, 2006). Sin embargo, existen evidencias que prueban que tanto pro-NGF como pro-BDNF son capaces de unirse a $p75^{\text{NTR}}$ con mayor afinidad que sus formas maduras y que la señalización que inducen puede ser al menos 10 veces más potente (Figura 1.7) (Lee *et al.*, 2001, Teng *et al.*, 2005).

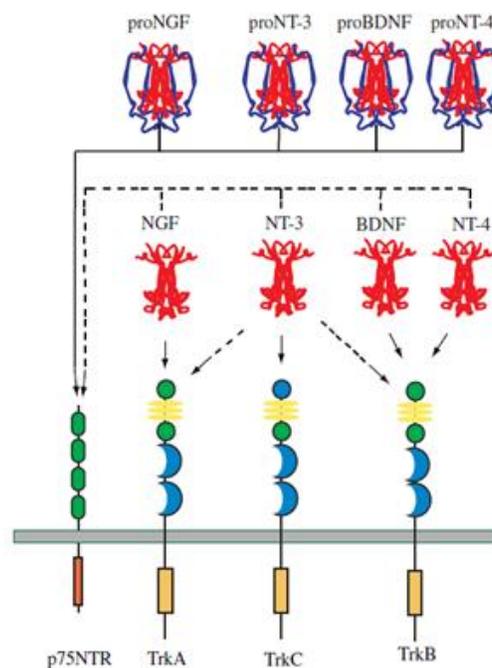


Figura 1.7. Representación de las principales interacciones de las NT con los receptores de tipo Trk y $p75^{\text{NTR}}$. Todas las pro-neurotrofinas son capaces de unirse a $p75^{\text{NTR}}$ e iniciar su vía de señalización. Las NT maduras también pueden interactuar con $p75^{\text{NTR}}$, aunque tienen una mayor afinidad por los receptores de tipo Trk. De manera específica, NGF se une a TrkA, BDNF y NT-4/5 se une a TrkB y NT-3 se une a TrkC. Para fines de simplicidad, las interacciones entre NT-3 con TrkA y TrkB no se muestran (Modificado de Reichardt, 2006).

Los receptores Trk se dimerizan en el momento en que se unen con su ligando neurotrófico, el proceso de dimerización es necesario para que se lleve a cabo la transfosforilación de los residuos de tirosina en el dominio citoplásmico del receptor y por ende se inicie la cascada de señalización mediada por este receptor (Friedman y Greene, 1999; Wiesmann y de Vos, 2001). Por otro lado, los receptores p75^{NTR} también se organizan en dímeros en su forma activa, este es un hecho interesante debido a que la mayoría de los receptores de muerte se deben de organizar en trímeros para poder llevar a cabo su función (Wiesmann y de Vos, 2001).

A pesar de lo anterior, las NT también son capaces de unirse a ambos tipos de receptores al mismo tiempo (Revisado por Lu *et al.*, 2005; Reichardt, 2006) debido a que se pueden formar heterodímeros de sus receptores. Este hecho puede derivar en distintas respuestas, *e. g.* se puede incrementar la afinidad por las NT y potenciar la respuesta de sobrevivencia o inducir la internalización de los Trk's unidos a su ligando, entre otras (Wiesmann y de Vos, 2001; Chao, 2003; Reichardt, 2006). Finalmente, se ha demostrado que la cascada de señalización activada por la unión de BDNF a p75^{NTR} es capaz de aumentar los niveles de ceramida lo que, en consecuencia, regula de manera negativa la fosforilación de TrkA (McPhee y Barker, 1997).

1.5. Factor de Crecimiento Nervioso (NGF)

El factor de crecimiento nervioso (NGF por sus siglas en inglés) fue aislado por primera vez de glándulas submaxilares de ratón y fue descrito inicialmente como “nerve growth-promoting factor” por Rita Levi-Montalcini y Stanley Cohen en 1954, convirtiéndose así en la primera neurotrofina en ser descubierta (Cowan, 2001).

De acuerdo con Levi-Montalcini (1987) existen tres funciones principales que lleva a cabo el Factor de Crecimiento Nervioso en las neuronas simpáticas y sensoriales:

- i. El rol trófico vital durante las etapas tempranas del desarrollo
- ii. La propiedad con que cuenta para intensificar procesos de diferenciación como la extensión de neuritas
- iii. La capacidad de guiar el crecimiento o regeneración de neuritas a través de su propio gradiente de concentración.

Dentro del sistema nervioso central (SNC), NGF es sintetizado principalmente en neuronas, en regiones como el hipocampo (Levi-Montalcini, 1984; Aloe *et al.*, 1994) y en el estriado (Revisado por Sofroniew *et al.*, 2001). No obstante, existen reportes que indican que NGF también es capaz de expresarse en la microglia y los astrocitos (Sofroniew *et al.*, 2001). Por otro lado, p75^{NTR} se encuentra expresado en el prosencéfalo y en algunas regiones dentro del tallo cerebral (Revisado por Sofroniew *et al.*, 2001) y en hipocampo (Chakravarthy *et al.*, 2010). TrkA se expresa dentro de las neuronas del estriado y, en menor medida, en el hipocampo (Holtzman *et al.*, 1995); ambos receptores se pueden encontrar en las células horizontales y amácrinas de la retina (Revisado por Sofroniew *et al.*, 2001).

NGF se expresa mayormente en órganos que son blanco de nervios sensoriales y simpáticos (Reichardt, 2006) por lo cual debe transportarse de manera retrógrada desde los órganos que los sintetizan hasta el soma de las neuronas para ejercer su función biológica (Johnson *et al.*, 1987; Revisado por Bartlet *et al.*, 1998). Se ha demostrado que estos tejidos sólo sintetizan NGF una vez que han sido innervados (Thoenen y Barde, 1980) y que los nervios expresan los receptores específicos de esta NT una vez que alcanzan a sus tejidos diana (Davies, 1994). En la fase inicial del desarrollo, la sobrevivencia de las neuronas se encuentra regulada por BDNF o NT-3, y en fases posteriores requieren únicamente NGF y no otras NT (Davies, 1994). Independientemente de la función que NGF lleva a cabo en los tejidos nerviosos, se ha reportado en modelos murinos la presencia de NGF y su receptor TrkA en una amplia variedad de tejidos periféricos, por ejemplo: el iris, el corazón, el vaso deferente, el riñón, los intestinos, los pulmones, el hígado, el timo, la vejiga, los músculos y el bazo (Yamamoto *et al.*, 1996; Lommatzsch *et al.*, 2005), aunque los niveles más altos se han registrado en la glándula sub-maxilar (Thoenen y Barde, 1980).

La expresión de NGF puede modularse a través de diferentes estímulos, *e. g.* condiciones de estrés producida por el nado (Aloe, 1994), la exposición a estrógeno y progesterona (Bjorling, 2002) y a compuestos volátiles orgánicos (VOC's) (Wang *et al.*, 2013), eventos inflamatorios y autoinmunes (Govoni *et al.* 2011; Revisado por Sofroniew *et al.*, 2001) y la administración de ciertos fármacos como el ácido carnósico (Kosaka y Yokoi, 2003) o la rilmenidina (Vyas *et al.*, 2006).

Asimismo, en nuestro grupo de trabajo se cuenta con evidencias que prueban que la transcripción de NGF se ve inducida como consecuencia de la exposición a diversos promotores de estrés oxidante tales como el arsenito de sodio (iAs), el acetaminofén (APAP) o la L-butionina-S-R-sulfoximina (BSO) (Valdovinos-Flores y Gonsebatt, 2013).

1.5.1. NGF 7S

El monómero de NGF es una molécula de forma alargada, la parte central se forma de dos pares de láminas β torcidas que se encuentran acomodadas de manera antiparalela. En uno de los extremos se encuentran tres asas de horquilla, mientras que el otro extremo lleva un nudo de cisteína que estabiliza el plegamiento y la conformación de la proteína (Revisado por Wiesmann y de Vos, 2001; Sofroniew *et al.*, 2001). Al igual que las demás NT, la forma biológicamente activa de NGF se forma por dos monómeros organizados de manera paralela para formar un homodímero (Wiesmann y de Vos, 2001).

En las glándulas submaxilares, NGF se encuentra formando un complejo que, debido a su coeficiente de sedimentación, se denomina NGF 7S (Thoenen y Barde, 1980). Dicho complejo está formado por tres sub-unidades: dos de ellas son proteasas llamadas α -NGF y γ -NGF, mientras que NGF neurotrófico forma a la tercera sub-unidad y adquiere el nombre de β -NGF (Thoenen y Barde, 1980; Wiesmann y de Vos, 2001). En este trabajo, la sub-unidad β será referida en todo momento como NGF. La sub-unidad γ es una proteasa activa, altamente específica, que participa en el procesamiento de pro-NGF, en cambio, la sub-unidad α no cuenta con actividad biológica y es reconocida como un zimógeno bloqueado (Thoenen y Barde, 1980; Wiesmann y de Vos, 2001).

NGF 7S contiene dos copias de cada sub-unidad, las seis moléculas resultantes se encuentran arregladas alrededor de un eje simétrico formado por el dímero de NGF, que está en contacto con las sub-unidades α y γ . El complejo está estabilizado por dos iones de Zn que unen las interfaces entre NGF y γ -NGF, por otro lado, la sub-unidad α se encuentra unida a la porción central del dímero de NGF (Figura 1.8) (Wiesmann y de Vos, 2001).

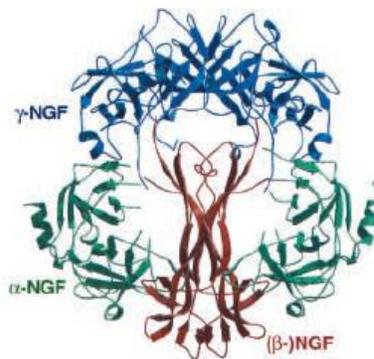


Figura 1.8. Representación del complejo NGF 7S. El dímero de NGF se muestra al centro, en color rojo, las dos copias de α -NGF se muestran en verde y las dos copias de γ -NGF en azul (Tomado de Wiesmann y de Vos).

1.5.2. *Vías de señalización de NGF* (Revisado por Segal y Greenberg, 1996; Friedman y Greene, 1999; Sofroniew *et al.*, 2001; Huang y Reichardt, 2003; Reichardt, 2006).

Ya se ha mencionado que las respuestas celulares producidas por las NT dependen del tipo de receptor con que estas interactúen. En el caso específico de NGF, Sofroniew *et al.* (2001) mencionan que la señalización de este factor de crecimiento es amplia, se encuentra regulada de manera dinámica y depende del contexto en que se lleve a cabo.

Después de unirse con su ligando, TrkA sigue el mecanismo de activación típico de los receptores tirosina cinasa (Friedman y Greene, 1999):

1. El receptor se dimeriza, consecuencia de la interacción con el ligando,
2. Se inicia la actividad de las cinasas y se fosforilan las tirosinas del asa de activación del receptor,
3. Actividad completa de las cinasas, se inicia la autofosforilación de los residuos de tirosina, fuera del asa de activación,
4. Diferentes moléculas señalizadoras se unen a los residuos de tirosina fosforilados,
5. Las moléculas señalizadoras también se fosforilan y, en consecuencia, se activan,
6. Las moléculas activadas inician cascadas de señalización independientes del receptor.

En el caso particular de TrkA, se han identificado dos residuos de tirosina que se autofosforilan inmediatamente después de la interacción con el ligando y que desempeñan roles fundamentales en la señalización de este receptor, dichos residuos son: Y490 e Y785 (Revisado por Friedman y Greene, 1999; Sofroniew *et al.*, 2001; Huang y Reichardt, 2003). De manera general, la fosfotirosina -490 (pY490) está relacionada con la activación de las vías Ras-Raf-Erk y PI3K-Akt, mientras que la fosfotirosina-785 (pY785) se requiere para la fosforilación y la activación de la vía PLC- γ -Ca²⁺-PKC δ (Revisado por Friedman y Greene, 1999; Sofroniew *et al.*, 2001; Huang y Reichardt, 2003; Reichardt, 2006).

Vía Ras. En esta vía, el residuo pY490 es capaz de reclutar y fosforilar a Shc, una proteína adaptadora. En su forma activa, Shc recluta a Grb2, otra proteína adaptadora que se encuentra formando un complejo con SOS, un factor intercambiador de guanina que promueve la transición de Ras-GDP (Ras inactivo) hacia Ras-GTP (Ras en su forma activa). Una vez activo, Ras promueve una cascada de señalización que involucra la activación de la proteína cinasa Raf misma que, a su vez, puede fosforilar a las MAP cinasas MEK1 o MEK2 y éstas finalmente fosforilan y activan a las

cinasas Erk1 y Erk2. En su forma activa, Erk1/2 son capaces de viajar al núcleo en donde pueden fosforilar a Elk-1, esta última fosforilación permite la transcripción de *c-fos* un gen de respuesta temprana involucrado en la iniciación y el mantenimiento de la diferenciación. También se puede lograr una activación constitutiva de Ras por una vía diferente. En esta vía, Frs2 es reclutado en pY490, Frs2 genera sitios de unión para Grb2 en complejo con Crk, esta asociación promueve la activación del factor de intercambio C3G para Rap1. Rap1 activo es capaz de estimular a la proteína cinasa B-Raf, misma que también puede activar la vía Erk. Finalmente, Erk1/2 es capaz de fosforilar a Rsk que a su vez fosforila a CREB, un factor de transcripción que a través de *c-fos* también está involucrado en respuestas de sobrevivencia y diferenciación de las neuronas. Tanto Rsk como las distintas Erk's proveen de un mecanismo de retroalimentación para atenuar o terminar la cascada de señalización mediante la fosforilación de SOS, este evento resulta en la disociación del complejo Grb2-SOS y por tanto, en la inactivación de Ras.

Vía PI3K. La fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) es un heterodímero compuesto por una unidad reguladora y una unidad catalítica cuya activación depende de la unión de la sub-unidad reguladora a TrkA y la posterior unión de la sub-unidad catalítica al mismo complejo. Este reclutamiento involucra la unión de Grb2 a pY490, Grb2 a su vez recluta a la proteína de unión asociada a Grb2 (Gab1) y es este último el encargado de reclutar y activar a PI3K. Además de Gab1, TrkA tiene la capacidad de fosforilar a los substratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS1 e IRS2), que también permiten la unión y activación de PI3K. La activación de PI3K resulta en la formación de 3-fosfoinositol que se une a la cinasa dependiente de 3-fosfoinositol (PDK1). Esta unión se requiere para que PDK1 fosforile y active a la proteína cinasa B (PKB, también conocida como Akt). Akt promueve la sobrevivencia celular al fosforilar a Bad, una proteína que promueve la apoptosis al unirse a Bcl-XI, que a su vez inhibe a Bax, una proteína pro-apoptótica. Bad fosforilado es secuestrado por las proteínas 14-3-3, esta interacción evita que Bad lleve a cabo su función pro-apoptótica. No obstante, Akt también es capaz de fosforilar e inactivar a otras proteínas pro-apoptóticas como GSK3 β y el factor de transcripción forkhead (FKHRL1). Finalmente, Akt también inhibe a I κ B, el inhibidor del factor de transcripción NF- κ B, ampliamente relacionado con respuestas de sobrevivencia celular.

Vía PLC- γ . Cuando se fosforila, Y785 recluta a la fosfolipasa C- γ (PLC- γ), misma que es activada por la actividad de cinasa de TrkA. PLC- γ se encarga de fosforilar e hidrolizar al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns (4,5)P₂) para generar inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). IP3 promueve

la liberación de Ca^{2+} de almacenes citoplásmicos como el retículo endoplásmico, mientras que DAG estimula la activación de isoformas de la proteína cinasa C (PKC). El Ca^{2+} liberado puede activar a su vez a otras proteínas cinasas dependientes de calcio y calmodulina. Una de las isoformas de PKC que se activan como consecuencia de esta vía es PKC δ , capaz de activar la vía Erk. Finalmente, la disminución en los niveles de PtdIns (4,5)P₂ también resulta en la modulación de la sensibilidad de canales iónicos de tipo TRP a estímulos mecánicos o de temperatura.

Señalización a través de p75^{NTR}. La señalización de NGF a través de este receptor puede derivar en diferentes vías. La primera de ellas involucra a la cascada de señalización de la cinasa Jun, a través de la cual se puede activar una respuesta pro-apoptótica por medio de p53. Asimismo, Jun también es capaz de inducir la expresión del ligando Fas y promover la apoptosis mediante la activación del receptor Fas. Por otro lado, p75^{NTR} también puede activar a la esfingomielinasa ácida, que hidroliza a la esfingomielina para dar origen a la ceramida, otra proteína pro-apoptótica. Finalmente, p75^{NTR} puede unirse a la proteína adaptadora Traf6 que, en complejo con la cinasa asociada al receptor de interleucina 1 (IRAK), puede promover la actividad de NF- κ B. No obstante, las consecuencias de la activación de NF- κ B no están bien definidas, pues se ha observado que dicho factor de crecimiento puede activar tanto vías de sobrevivencia como vías de muerte.

1.5.2. NGF y su relación con la respuesta antioxidante.

Además de las funciones que NGF puede llevar a cabo en las neuronas, existen numerosas evidencias en las que se ha demostrado que esta NT también es capaz de participar en la generación de la respuesta antioxidante.

En modelos *in vitro*, existen trabajos llevados a cabo en la línea celular de feocromocitoma de ratón (PC12) en los que se ha demostrado que la adición de NGF protege a las células del daño por H₂O₂ a través de la inducción de la actividad de la CAT (Jackson *et al.*, 1990). Del mismo modo existen evidencias que indican que NGF incrementa los niveles de expresión de mRNA de GPx y CAT de manera dosis-dependiente, mientras que la actividad de ambas enzimas aumenta de manera tiempo-dependiente (Sampath *et al.* 1994). Asimismo, se ha probado que el tratamiento con NGF es capaz de restaurar los niveles de estas mismas enzimas cuando los cultivos se exponen a agentes tóxicos como la actinomicina D y la cicloheximida, además de incrementar la viabilidad celular ante el daño producido por la exposición a la actinomicina (Sampath y Pérez-Polo, 1997).

Finalmente Pan y Pérez-Polo (1993) demostraron que la adición de NGF puede modular de manera positiva la actividad de GSH y de enzimas tales como la γ -glutamylcisteinil sintetasa (γ -GCS) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6P-D) de manera dosis-dependiente, lo que sugiere que esta NT está involucrada en los procesos de síntesis *de novo* de GSH.

Por otro lado, con respecto a los modelos *in vivo*, se ha demostrado que NGF es capaz de restaurar los niveles de la enzimas SOD, GPx y CAT (mismos que decrecen en edades avanzadas) en diferentes regiones del cerebro de ratas envejecidas, dónde el puente y la médula son las regiones más beneficiadas (Nistico *et al.*, 1992). De igual forma, en diferentes modelos murinos de enfermedades neurodegenerativas se ha demostrado que NGF puede regular el potencial redox celular y los niveles de enzimas antioxidantes en el SNC. En particular, en un modelo de parkinsonismo en el tálamo, se demostró que la adición de NGF puede restaurar los niveles de la SOD y la GPx una vez que éstos han decrecido como consecuencia de la adición de la neurotoxina MPTP (Ninković *et al.*, 2000), mientras que en un modelo de Alzheimer en el que se dañó la vía fimbria-fórnix del hipocampo el tratamiento con NGF pudo restaurar al nivel de los controles la concentración intracelular de glutatión reductasa (GSR) y GPx (Cruz-Aguado *et al.*, 1999). Del mismo modo, en un modelo murino de enfermedad de Huntington por ácido quinólico, se demostró que NGF puede mantener el cociente 2GSH/GSSG en el cuerpo estriado e hipocampo (Maksimović *et al.*, 2001), en el mismo modelo de estudio también se demostró que NGF es capaz de reducir los niveles de ERN's, expresados como nitritos, tanto en el estriado como en el prosencéfalo de ratas (Maksimović *et al.*, 2002). Tomados en conjunto, todos estos estudios sugieren que NGF puede ejercer una función neuroprotectora en enfermedades neurodegenerativas a través de la regulación de la capacidad antioxidante en el SNC.

Aunado a las evidencias citadas en los párrafos anteriores, existen estudios que prueban que NGF puede llevar a cabo su capacidad antioxidante en otros tejidos además del SNC. Por ejemplo, Arsenijevic *et al.*, (2007) observaron que ratones transgénicos que sobre-expresan NGF cuentan con niveles más altos de GSH reducido tanto en hígado como en plasma y cerebro y asociaron dichos incrementos con la protección ante eventos de anorexia inducida por lipopolisacáridos. En este contexto, en nuestro grupo de trabajo se demostró que diversos promotores de estrés oxidante (iAS, BSO y APAP) modulan de manera positiva la transcripción de NGF en el hígado y que esta NT induce incrementos en los niveles de mRNA de proteínas antioxidantes tales como la Trx a

través de un mecanismo autócrino que involucra a la vía de señalización NGF/TrkA/PI3k/Akt (Valdovinos-Flores y Gonsebatt, 2013).

No se cuenta con evidencias que demuestren que NGF puede regular la capacidad antioxidante en todos los órganos, sin embargo, existen estudios en los que se prueba que esta NT está involucrada en distintas vías de protección en distintos tejidos. De manera específica, en un modelo *in vitro* e *in vivo* se demostró que eventos de hipoxia-reoxigenación en el corazón pueden inducir vías anti-apoptóticas mediadas por un mecanismo de activación autócrino de la vía de señalización NGF/TrkA/PI3k/Akt (Caporali *et al.*, 2008) además de promover la reparación cardíaca al promover la sobrevivencia de cardiomiocitos y células endoteliales e inducir eventos de angiogénesis y después de un evento de infarto en el miocardio (Meloni *et al.*, 2010). La vía de señalización NGF/TrkA también puede inducir incrementos en la viabilidad celular en células plasmáticas de pulmón en un modelo murino de asma (Abram, 2009). NGF también puede regular la sobrevivencia de células β pancreáticas tratadas con glucosa a través de un mecanismo autócrino (Navarro-Tableros *et al.*, 2004). Asimismo, existen evidencias que señalan que ratones transgénicos que expresan anticuerpos contra NGF presentan un mayor número de células apoptóticas en comparación con los controles en la zona de la pulpa roja del bazo (Ruberti *et al.*, 2000), mientras que en un modelo *in vitro* se demostró que NGF es capaz de inducir la proliferación de células mononucleares del bazo de manera tiempo-dependiente y dosis-dependiente además de potenciar el efecto de mitógenos en linfocitos T y B (Thorpe y Pérez-Polo, 1987).

Por último, en modelos *in vitro* en los que se emplean células PC12, se ha evidenciado que Nrf2 es capaz de modular la expresión de *ngfb* cuando las células son tratadas con ácido carnósico (Mimura *et al.*, 2011) y que, a su vez NGF también participa en la regulación de la actividad de Nrf2 a través de la vía TrkA (Kosaka *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

La radiación ionizante es una fuente conocida de ERO's, especialmente de radicales hidroxilo. Existen evidencias que prueban que en condiciones de estrés oxidante la transcripción de *ngfb* se incrementa tanto en el SNC como en el hígado. Existen evidencias que prueban que el grado de daño producido por este tipo de radiación es tejido específico, puesto que depende de manera importante de la tasa de proliferación celular, la tasa metabólica, el grado de diferenciación y la tasa de consumo de oxígeno del tejido irradiado. Es por ello que resulta de interés estudiar si la exposición a radiación γ es capaz de incrementar la transcripción de *ngfb*, así como saber si activa la vía de señalización de su receptor TrkA en órganos con distinto grado de radiosensibilidad.

3. HIPÓTESIS

Puesto que NGF es capaz de modular una respuesta antioxidante y su transcripción se ve inducida ante cambios en el estado redox celular, se espera que la radiación ionizante sea capaz de modular de manera positiva la transcripción de *ngfb*, así como la cascada de señalización mediada por este factor de crecimiento. Así mismo, si se toma en cuenta que el daño producido es dependiente del tipo de tejido irradiado, se espera que la respuesta observada presente un comportamiento órgano-dependiente.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar si la exposición a radiación γ es capaz de modular los niveles mRNA de *ngfb*, así como la activación de la cascada de señalización mediada por la unión de este factor de crecimiento con TrkA, su receptor de alta afinidad, en tres órganos de ratón con radiosensibilidades distintas.

4.2 Objetivos Particulares

- Evaluar los niveles de expresión de mRNA de *ngfb* en cerebro, bazo y corazón de ratones Balb/c expuestos a 0.5, 2.5 y 4 Gy en un irradiador de radiación γ .
- Evaluar el estado de fosforilación de TrkA, así como la translocación de Akt a núcleo en cerebro, bazo y corazón de ratones Balb/c expuestos a distintas dosis de radiación γ (0.5, 2.5 y 4 Gy).
- Determinar si existe una relación entre los niveles de expresión del mRNA de NGF y de la activación de la vía TrkA/Akt con el tipo de tejido irradiado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Irradiación de los animales

El protocolo de irradiación, así como la determinación de la tasa de dosis, fueron llevados a cabo por la física Rosa Fajardo como parte de su trabajo de maestría en 2013. En breve, se emplearon ratones machos de la cepa Balb/c de entre cinco y seis semanas de edad y de $24 \pm 1.3_{SD}$ g de peso, proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, fueron expuestos en el irradiador Gammacell 1000 del propio instituto, que tiene ^{137}Cs (vida media de 30.17 años con emisiones γ de 1.33 y 1.17 MeV) como fuente de radiación γ . La tasa de radiación a la cual los ratones fueron irradiados se calculó con ayuda de un dosímetro absoluto (solución Fricke), ésta fue de 2.78 ± 0.10 Gy/min (Fajardo-Miranda, 2013).

Antes de ser irradiados, los ratones fueron sedados con pentobarbital (90 mg/kg i. p.). Una vez anestesiados, los ratones se introdujeron en un cilindro de cartón colocado sobre una base de madera para mantener a los organismos erguidos e inmobilizados y así permitir que la irradiación fuese lo más uniforme posible. Posteriormente, se colocaron dentro del irradiador, el cual fue programado con tiempos determinados de irradiación para exponer a los animales a: 0.5, 2.5 o 4 Gy. Se irradiaron 5 animales por tratamiento. Los organismos empleados como controles fueron sometidos al mismo estrés que involucra la administración del sedante y la manipulación que implica el tratamiento, sin embargo no se introdujeron en el irradiador. Todos los animales fueron sedados y tratados en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, siguiendo los protocolos establecidos en el laboratorio.

5.2 Sacrificio de los animales y extracción de tejidos.

En nuestro grupo de trabajo se demostró previamente que la radiación γ puede producir cambios en la expresión de enzimas antioxidantes 1 hora después que se llevó a cabo la irradiación (Vázquez-Vázquez, 2011). Por ello, en este estudio los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical una hora después del tratamiento con radiación y se extrajeron el cerebro, el corazón y el bazo, puesto que son órganos con radiosensibilidades distintas. Cada órgano fue lavado con solución salina (0.9 %, 4° C). Se obtuvo una fracción fresca de tejido con el cual se hizo la extracción de proteínas y el resto se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C para su manejo posterior.

5.3 Extracción de RNA.

La extracción de RNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo general de TRIzol® Reagent de Invitrogen (CA, USA; no. de cat. 15596026). Brevemente:

1. **Homogenización.** Se tomó una pequeña porción del tejido y se homogenizó en 1 ml de TRIzol dentro de un tubo de 1.5 ml. Una vez homogenizado el tejido, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 15,000 x g por 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo.
2. **Separación de Fases.** Se añadieron 200 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante, al menos, 15 segundos. Se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C.
3. **Precipitación de RNA.** La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo; la interfase ni siquiera debe de ser tocada con la punta al realizar este paso. Se agregaron 0.5 ml de isopropanol e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a cabo una centrifugación a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C.
4. **Lavado de RNA.** El sobrenadante fue removido. Se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 75% y se mezcló agitando o por medio de vórtex. De nuevo se centrifugó a 7,500 x g por 5 minutos a 4°C.
5. **Redisolución de RNA.** Se retiró el sobrenadante y el RNA se dejó secando al aire (el pellet nunca debe cambiar de color blanco a transparente). Se añadieron 200 µL de agua a 50°C y posteriormente se homogenizaron con ayuda de una micropipeta.
6. **Almacenamiento.** Los tubos se almacenaron a -70 °C

5.4 Determinación de pureza e integridad de RNA

Se requirió conocer la pureza y la integridad de las muestras obtenidas dado que éstas habrían de usarse posteriormente para la elaboración de cDNA a través de la técnica de RT-PCR. Para conocer la pureza del RNA extraído, se midió la absorbancia de 2 µL de cada muestra en el espectrofotómetro ND-1000 de Nanodrop® a dos longitudes de onda distintas: A_{260} y A_{280} . Al hacer el cociente de ambas absorbancias (A_{260}/A_{280}) se obtiene un valor que indica la pureza de las muestras. Una muestra con un cociente entre 1.7 y 2 se considera como pura (Wieczorek, *et al.*, 2012).

Para determinar la integridad, las muestras se corrieron en una electroforesis horizontal llevada a cabo en un gel de agarosa a una concentración de 2% disuelto en buffer TAE 1X (Tris 2M, acetato 1 M, EDTA 100nM pH 8.0), la electroforesis se corrió a 80 V durante 40 minutos. Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio al 0.01%. El gel se colocó en un transiluminador de luz UV para observar las bandas de RNA y se obtuvo la imagen con el fotodocumentador Gel Logic 200, Imaging System® (Kodak®, NY, USA). Una muestra íntegra es aquella en la que se observan claramente las bandas 18S y 28S de rRNA, de no ser así, se considera que el material genético está degradado (Wieczorek, *et al.*, 2012).

5.5 Síntesis de cDNA (Retrotranscripción)

Las muestras de RNA obtenidas se usaron para sintetizar DNA complementario (cDNA) por la técnica de RT-PCR. La síntesis se hizo con base en el protocolo de M-MLV RT de Promega® (WI, USA; no. de cat. 9PIM170). En breve:

1. 2 µg de RNA fueron colocados en un tubo de microcentrífuga estéril.
2. Se añadieron 0.5 µg de oligo dT (Promega® no. de cat. C1101) por cada microgramo de RNA empleado (1 µL de oligo dT).
3. Se añadió agua estéril libre de RNasas hasta completar un volumen de 18 µL.
4. La mezcla fue calentada a 70 °C por 5 minutos en termociclador. Una vez transcurrido este tiempo los tubos se colocaron inmediatamente en hielo
5. Se agregó 1 µL de dNTP's (10 mM), 5 µL de Buffer 5X M-MLV RT y 1µL de la retrotranscriptasa M-MLV.
6. Todos los componentes se mezclaron, posteriormente se calentaron a 37 °C por 60 minutos.
7. Las muestras fueron almacenadas a -20°C

5.6 PCR Tiempo Real (qPCR)

Para determinar los niveles de expresión de NGF se utilizó la técnica de PCR tiempo real. Los experimentos se llevaron a cabo en un termociclador Rotor-Gene Q de QIAGEN® (Hilden, Alemania) y se usó la mezcla de reacción SYBR® FAST Universal 2X qPCR Master Mix (KAPA Biosystems, MA, USA; no. de cat. KK4600).

Para poder hacer comparaciones válidas entre muestras diferentes es necesario determinar la eficiencia de la amplificación de los oligonucleótidos empleados (Fraga *et al.*, 2008). Es por ello

que antes de llevar a cabo un ensayo de qPCR, se requiere determinar la eficiencia de los primers para el gen problema como para los del gen que fungirá como control endógeno.

Para determinar la eficiencia de la reacción, se prepararon 6 diluciones logarítmicas con base 5 a partir de una mezcla de las muestras de cDNA obtenido (Bio-Rad, 2006). En cada ensayo se deben cargar 8 μ L de muestra (en este caso cDNA diluido), 1 μ L de cada oligonucleótido (5 μ M) (Tabla 5.2) y 10 μ L de la mezcla de reacción.

Tabla 5.1. Secuencia de oligonucleótidos empleados en la determinación de los niveles de expresión de mRNA.

Gen	Secuencia	GenBank ID	Tamaño del producto (pb)
NGF	F: CAG TGA GGT GCA TAG CG	NM_001112698	171
	R: CAT TGC TAT CTG TGT ACG GTT		
GAPDH	F: ACC ACC AAC TGC TTA GCC CC	NM_008084	216
	R: CAG CTC TGG GAT GAC CTT GC		

El momento en el que se amplifica una cantidad suficiente de copias como para generar una señal detectable por el equipo, es conocido como ciclo umbral (C_T). Para cada una de las diluciones se obtiene un C_T distinto, estos valores son graficados contra el logaritmo de la dilución correspondiente para obtener una curva estándar. A partir de esta curva se calcula el valor de R^2 , que idealmente debe arrojar un valor de $R^2 > 0.990$. La eficiencia de la reacción se obtiene a partir de la pendiente de la curva estándar usando la siguiente ecuación:

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}} - 1$$

En una reacción de PCR, el producto obtenido en cada ciclo es, teóricamente, el doble del producto obtenido en el ciclo anterior. Este hecho se refleja en el valor de eficiencia obtenida. Una eficiencia del 100% implica que se está obteniendo el doble de copias por ciclo. Con base en el hecho anterior, los valores ideales que se deben de obtener de E deben oscilar entre 0.9 y 1.05 (Fragga *et al.*, 2008).

Al final de cada ensayo es necesario correr una curva de fusión que se emplea para corroborar que sólo se está amplificando un producto, *i. e.* que la muestra es pura. Se utilizaron las siguientes condiciones para cada curva de diluciones:

1. **Hold.** 94°C por 3'
2. **Cycling.** 94°C por 3"; 60°C por 20"; 35 ciclos
3. **Melt.** 55-95°C

Una vez comprobada la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos empleados, se procedió a evaluar los cambios de expresión de la proteína problema entre los diferentes tratamientos.

Los ensayos de qPCR se llevaron a cabo por triplicado empleando 8 µL de cDNA (en dilución 1:125), 1 µL de cada oligonucleótido (Tabla 5.1) y 10 µL de la mezcla de reacción, para completar un volumen de reacción de 20 µL. Para cada ensayo se hicieron análisis de curvas de fusión para confirmar la especificidad de la amplificación y la ausencia de dímeros de oligonucleótidos. Las condiciones empleadas para cada ensayo fueron:

1. **Hold.** 94°C por 3'
2. **Cycling.** 94°C por 3"; 60°C por 20"; 32 ciclos
3. **Melt.** 75–90°C

34

Las diferencias en la expresión de NGF de los diferentes tratamientos con respecto al control fueron evaluados por el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ o método de Livak (Livak & Schmittgen, 2001). Primero es necesario normalizar el C_T del gen problema con el C_T del gen de expresión constitutiva, esto se hace para las muestras tratadas y para muestras que se usan como calibradores:

$$\Delta C_{T(\text{tratado})} = C_{T(\text{gen problema, tratado})} - C_{T(\text{gen constitutivo, tratado})}$$

$$\Delta C_{T(\text{calibrador})} = C_{T(\text{gen problema, calibrador})} - C_{T(\text{gen constitutivo, calibrador})}$$

Después se normaliza el ΔC_T de la muestra tratada con el ΔC_T del calibrador:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{tratado})} - \Delta C_{T(\text{calibrador})}$$

Una vez que se cuenta con ese valor se calcula la tasa de expresión:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{Tasa de expresión normalizada}$$

El resultado obtenido es el número de veces que se cambia la expresión del gen problema en la muestra tratada en relación con la muestra calibradora, que a su vez está normalizado con el gen constitutivo (Livak & Schmittgen, 2001).

5.7 Extracción y determinación de proteínas

La extracción de proteínas se llevó a cabo conforme a Valdovinos-Flores y Gonsebatt (2013). En breve, se homogenizó tejido fresco en Buffer A (Hepes 10 mM , pH 7.9, KCl 10 mM, DTT 1 mM, IGEPAL 0.4 v/v, Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 1 mM y 10 mg/ml de aprotinina y leupeptina), se incubaron en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron a 4000 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante (en donde se encuentra la fracción citoplásmica) fue colectado y almacenado a -70°C. El pellet nuclear fue lavado con Buffer A y lisado con Buffer C (Hepes 20 mM, pH 7.9, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, glicerol 5% v/v, DTT 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, PMSF y 10 mg/ml de aprotinina y leupeptina). Los homogenizados se incubaron en hielo durante 2 horas y centrifugados a máxima velocidad por 15 minutos. Se tomó el sobrenadante (fracción nuclear) y se almacenó a -70°C.

Se determinó la concentración de proteínas de cada muestra por medio del método de microplaca de Bradford (Bio-Rad, CA). Para obtener la concentración, se empleó una curva patrón de albúmina de suero bovino, la absorbancia de las muestras fue leída a 595 nm y los valores obtenidos se interpolaron en la ecuación obtenida por la curva patrón. Las curvas se consideraron útiles si presentaban un coeficiente de correlación superior ($R^2 \geq 0.98$).

5.8 Ensayo de Western Blot

Para determinar los niveles de expresión de proteínas cascada abajo de NGF se empleó la técnica de Western Blot. Se llevaron a cabo ensayos para muestras citoplásmicas y muestras nucleares. En citoplasma se hizo la evaluación de: TrkA total, TrkA fosforilado y Akt citoplásmico. Para determinar el estado de activación de Akt se evaluó su translocación nuclear, por lo que en extractos nucleares se determinó Akt y se usó NPM o β -tubulina como control de carga.

Se usaron cantidades diferentes de proteína dependiendo de las muestras que serían empleadas en cada ensayo. Las proteínas se cargaron en un gel de acrilamida al 10% y se corrieron en una electroforesis a 100 V en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Al concluir, las proteínas se electro-transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad®, CA, USA; no. de cat. 162-0115). Posteriormente, las membranas se incubaron durante una hora con solución bloqueadora en una concentración al 5% preparada con TBS-Tween 1X (Tris pH 7.6, NaCl y Tween 20 al 0.1%). La solución bloqueadora se preparó dependiendo el tipo de anticuerpo que sería empleado posteriormente, usando Albúmina de Suero Bovino (BSA) (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA; no. cat. sc-2323) o Leche Blotto (BM) (Santa Cruz Biotechnology, sc-2325) con Agente Bloqueador (BA)

(GE Life Sciences, UK; no. cat. CPK1075). Después, las membranas se incubaron con anticuerpo primario en agitación constante diluido en solución bloqueadora (Tabla 5.2). Al concluir la incubación, se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween 1X a cada membrana. Posteriormente, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Cell Signaling Technology, MA, USA), diluido en TBS-Tween 1X con leche Blotto al 5%, durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante. El anticuerpo secundario usado se usó dependiendo del animal en que fue cultivado el anticuerpo primario. Al terminar la incubación las membranas se sometieron a 3 lavados de 15 minutos con TBS-Tween 1X y 1 lavado de 15 minutos con TBS 1X.

Tabla 5.2. Solución bloqueadora y anticuerpos primarios con el factor de dilución empleados para la determinación de P-TrkA, TrkA, Akt, GAPDH, NPM y β -Tubulina.

Proteína	Solución Bloqueadora	Fuente	Anticuerpo	Factor Dilución
P-TrkA	BSA 5%	Conejo	Phospho-TrkA (Tyr 490) Antibody (Cell Signaling Technology #9141)	1:2000
TrkA	BM 5% + BA 5%	Conejo	Anti-TrkA antibody [EP1058Y] (Abcam ab76291)	1:2000
Akt	BSA 5%	Conejo	Akt Antibody (Cell Signaling Technology #9272)	1:2000
GAPDH	BM 5% + BA 5%	Ratón	GAPDH Antibody (Santa Cruz Biotechnology sc-20357)	1:8000
NPM	BSA 5%	Conejo	NPM Antibody (Cell Signaling Technology #3542)	1:3000
β -Tubulina	BM 5% + BA 5%	Ratón	β -Tubulin (Sigma-Aldrich #T4026)	1:4000

La detección de las proteínas se llevó a cabo por medio de una reacción quimioluminiscente, dicha reacción se logró mediante la incubación de las membranas con el kit Amersham™ ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit (GE Life Sciences, RPN2232). Una vez presente la reacción, se

emplearon placas fotográficas Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Life Sciences, 28-9068-40) expuestas a las membranas para captar la señal de las proteínas. Una vez obtenidas las placas con la marca, las membranas se sometieron a un “stripping” o despegado de los anticuerpos a través del lavado con NaOH 0.2 M durante 15 minutos y 3 lavados posteriores de 10 minutos con agua destilada, de esta manera las membranas pueden incubarse con nuevos anticuerpos y se permite así la inmunodetección de otras proteínas. Las proteínas fueron identificadas en las placas a través de su peso molecular. Para lograr dicha identificación, se empleó un marcador de peso molecular biotinilado (Biotinylated Protein Ladder Detection Pack #7727, Cell Signaling Technology), que fue detectado en las membranas mediante el anticuerpo Anti-biotina acoplado a peróxidasa de Rábano (#7075, Cell Signaling Technology), éste fue añadido en una dilución 1:4000 junto con los anticuerpos secundarios.

5.9 Análisis Densitométrico de los Western Blots

Para llevar a cabo la cuantificación de las proteínas estudiadas, se hizo una digitalización de las placas fotográficas obtenidas en la reacción de quimioluminiscencia por medio de la cámara Kodak Gel Logic 200 Imaging System. Las imágenes fueron guardadas en un formato TIFF de 16 bits sin escalar.

El análisis densitométrico de las imágenes se hizo con el software Image J 1.47 (W. Rasband, NIH, USA), con el cual se midió la densidad integrada de cada banda en las placas. Con estos datos, se determinó la expresión normalizada con respecto al control de carga de las proteínas de interés. La determinación se hizo mediante la obtención del cociente de las proteínas de interés y sus controles de carga.

5.10 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software Sigma Plot 11 (Systat Software, Inc., IL, USA). La evaluación se llevó a cabo para una $n=20$. Para los ensayos de qPCR, se usaron muestras por triplicado, los ensayos de WB se corrieron por duplicado. En todos los casos, los datos están expresados como media \pm error estándar (E. E.). Para determinar las diferencias en los niveles de expresión, tanto de las proteínas evaluadas como de NGF entre los grupos experimentales con respecto al control, se hizo un análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Holm-Sidak. Se consideraron significativas las diferencias en donde $p \leq 0.05$.

5.11 Ética

Los experimentos descritos en este trabajo se realizaron siguiendo las normas descritas en *“Principles of Laboratory Animal Care”* (NIH publicación No. 85-23, revisado en 1985) y la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) titulada *“Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”* (Clave NOM-062-ZOO-1999, publicado en agosto 2001).

6. RESULTADOS

6.1 Pureza e integridad de RNA.

Una vez que los ratones fueron expuestos a la radiación, se disecaron los tejidos y con ellos se llevó a cabo una extracción de RNA por medio del método de Trizol, la cual permitió obtener RNA en condiciones óptimas y con bajos índices de contaminación de DNA. Se analizó la pureza y la integridad de las muestras de RNA extraídas para así determinar la viabilidad de las mismas. Para evaluar la integridad, las muestras se corrieron en una electroforesis horizontal en geles de agarosa. En los geles corridos para cada uno de los órganos pueden observarse con claridad las bandas correspondientes a las fracciones de rRNA 28S y 18S (Figura 6.1), cuya presencia denota la integridad del RNA.

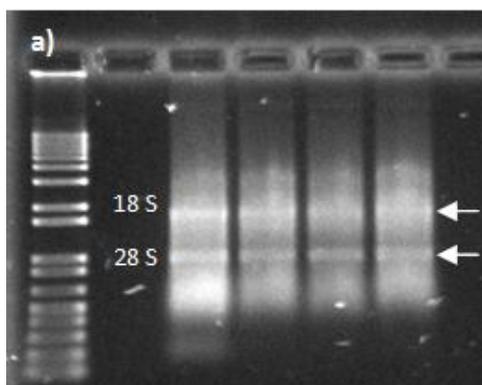


Figura 6.1. Imagen representativa de muestras de RNA corridas en un gel de agarosa al 2%. Se muestra la integridad del RNA de los tres órganos evaluados.

Las muestras se analizaron con un espectrofotómetro Nanodrop® para llevar a cabo la determinación de la concentración de RNA en éstas. Por medio de éste análisis también se pudo precisar la pureza de las muestras a través de la obtención del cociente de absorbancia a 260 y 280 nm. Los valores arrojados por dicho cociente fueron en promedio: 1.89 ± 0.05 para las muestras de cerebro. Todas las muestras se consideraron puras.

6.2 Curvas de eficiencia de amplificación para ngfb y GAPDH.

Se determinó la eficiencia de la reacción para cada par de primers específicos para cada gen evaluado por medio de qPCR. Esta determinación se hizo a través de la curva estándar que se obtiene a partir de la corrida de diluciones seriales de cDNA.

Para el caso de las muestras de cerebro, la eficiencia obtenida fue de uno y el valor de $R^2 = 0.98$, mientras que para la curva de GAPDH se obtuvo una $E = 0.97$ y una $R^2 = 0.99$ (Figura 6.2).

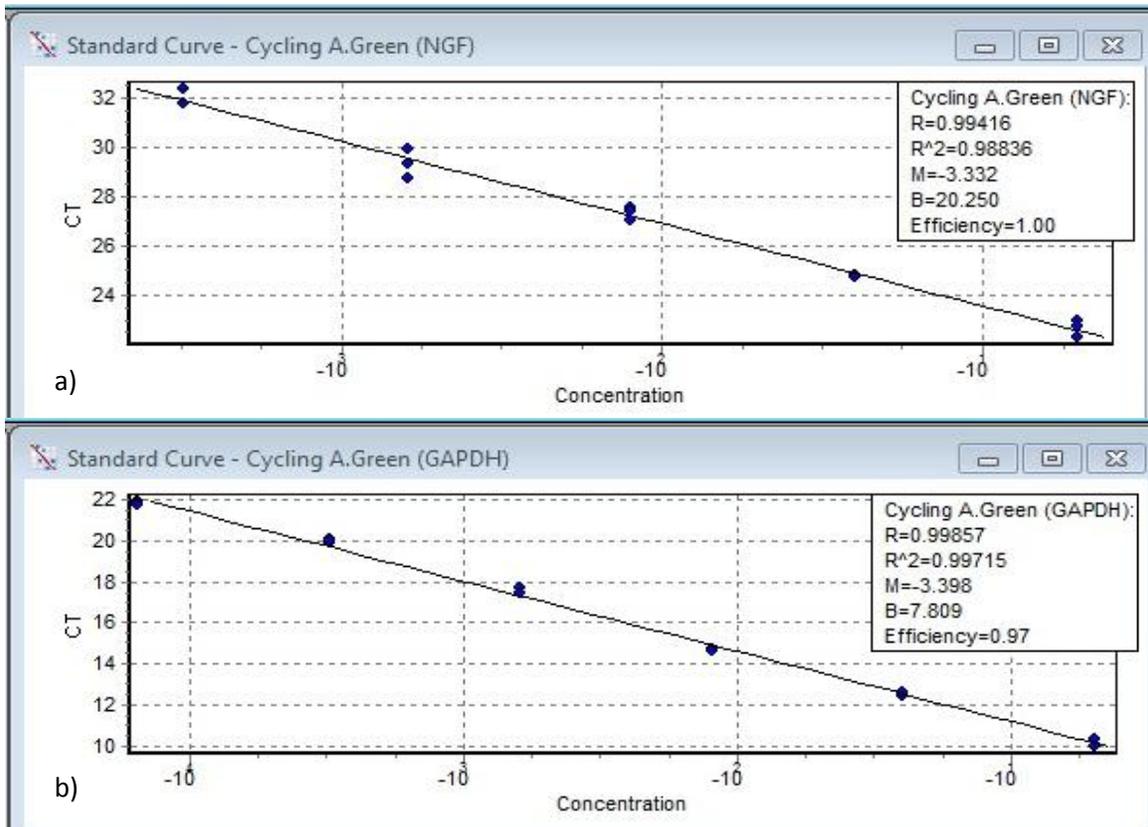


Figura 6.2. Curvas estándar de diluciones para *ngfb* (a) y GAPDH (b). La eficiencia de la reacción y la R^2 se observan. En ambos casos, se obtuvieron valores satisfactorios para la reacción.

40

La determinación de la curva de eficiencia de NGF no pudo llevarse a cabo ni en el bazo ni en el corazón debido a que los niveles basales de esta NT son muy bajos en estos órganos (bazo: Consulta en Biogps: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=18049> consultado el 5 de febrero de 2014; corazón: Consulta en Biogps: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=18049> consultado el 5 de febrero de 2014) y por lo tanto, no se realizaron los ensayos de qPCR en dichos tejidos.

6.3 Expresión de los niveles de mRNA de *ngfb* en cerebro.

Los niveles de mensajero de *ngfb* en el cerebro de los ratones expuestos a 0.5 Gy de radiación y se incrementaron en comparación con el grupo control, sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo. No obstante, los niveles de mRNA de *ngfb* mostraron un

incremento significativo en los grupos tratados con 2.5 y 4 Gy, en las que se observó un incremento de más del doble con respecto al control ($p < 0.05$) (Figura 6.3).

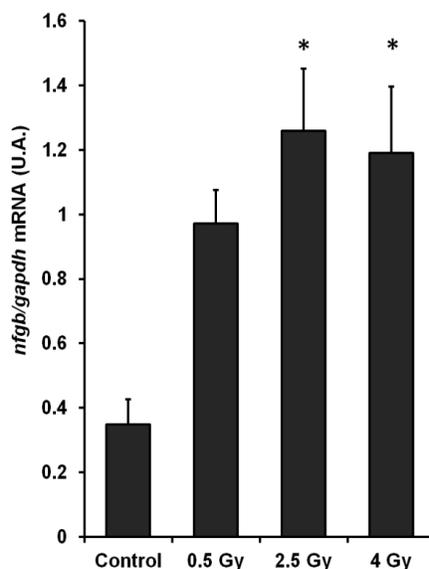


Figura 6.3. Niveles de expresión de mRNA de *ngfb* en cerebro de ratones Balb/c tratados con radiación γ a 0.5, 2.5 y 4 Gy. Se representa la media \pm E.E. de los valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$ obtenidos para cada tratamiento. El análisis de los datos se hizo mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Holm-Sidak. * $p \leq 0.05$ con respecto al control.

6.4. Modulación de la Fosforilación de TrkA en cerebro, bazo y corazón

Además de la estimación de la expresión de *ngfb*, se llevó a cabo la determinación de la fosforilación relativa de TrkA. Este análisis tiene dos finalidades: i) La evaluación del estado de activación de la cascada de señalización mediada por esta NT y ii) puesto que NGF cumple con una función autócrina, la evaluación de la fosforilación de su receptor permite inferir si los niveles de mRNA NGF evaluados por qPCR se están traduciendo en proteínas que lleven a cabo su función.

En el cerebro, el grupo expuesto a 4 Gy fue el único en el que se registró un incremento estadísticamente significativo en la fosforilación del receptor con respecto al grupo control, sin embargo, la diferencia también fue significativa al comparar con los grupos expuestos a 0.5 y 2.5 Gy ($P < 0.05$) (Figura 6.4).

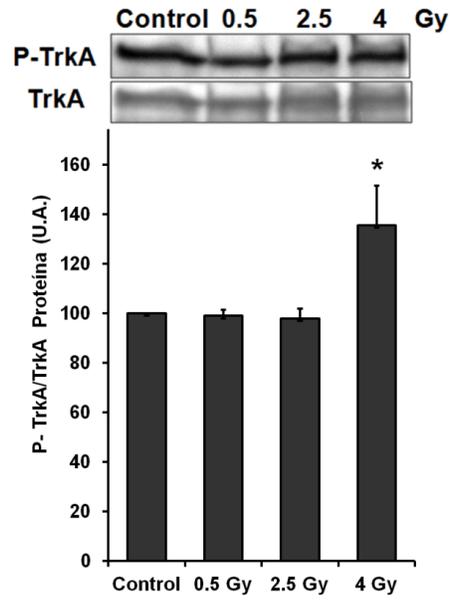


Figura 6.4. Estado de fosforilación de TrkA en cerebro de ratones Balb/c tratados con radiación γ a 0.5, 2.5 y 4 Gy. En el panel superior se observa una imagen representativa del WB de la fosforilación del receptor. Los valores representan la media \pm E. E. El análisis de los datos se hizo mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Holm-Sidak. * $p \leq 0.05$ con respecto a los demás grupos.

42

La fosforilación de TrkA en el bazo mostró un comportamiento diferente al observado en el cerebro. En este caso, se registró una disminución estadísticamente significativa en la fosforilación del receptor al comparar el grupo tratado a 0.5 Gy con el grupo control ($p < 0.05$). En los grupos expuestos a 2.5 y 4 Gy no se observaron cambios en los niveles de fosforilación al compararlos con el control (Figura 6.5).

De los tres órganos evaluados, el corazón fue el único en el que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la fosforilación de TrkA en ninguno de los grupos expuestos a radiación γ (Figura 6.6).

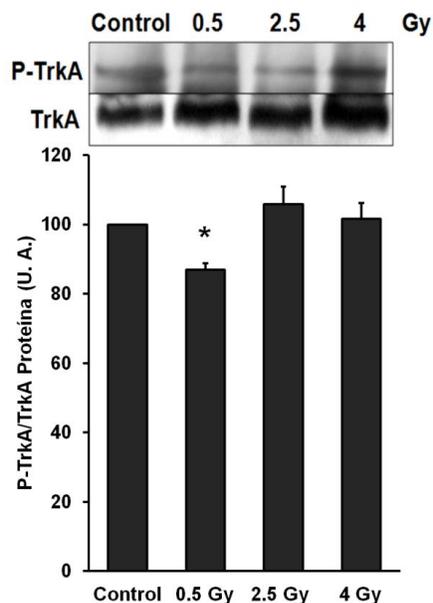


Figura 6.5. Estado de fosforilación de TrkA en bazo de ratones Balb/c tratados con radiación γ a 0.5, 2.5 y 4 Gy. En el panel superior se observa una imagen representativa del WB de la fosforilación del receptor. Los valores representan la media \pm E. E. El análisis de los datos se hizo mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Holm-Sidak. * $p \leq 0.05$ con respecto a los demás grupos.

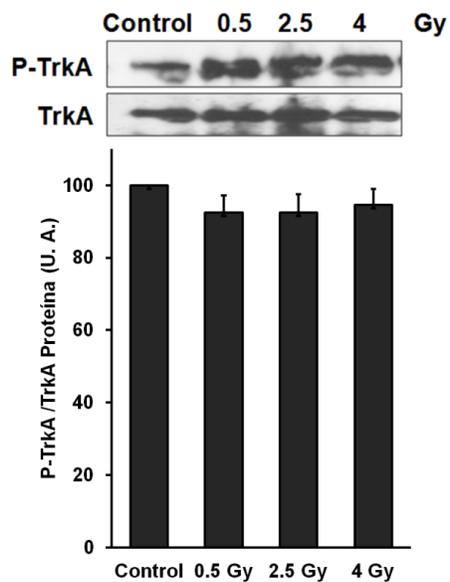


Figura 6.6. Estado de fosforilación de TrkA en corazón de ratones Balb/c tratados con radiación γ a 0.5, 2.5 y 4 Gy. En el panel superior se observa una imagen representativa del WB de la fosforilación del receptor. Los valores representan la media \pm E. E. El análisis de los datos se hizo mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Holm-Sidak.

6.5. Translocación nuclear de Akt en cerebro, bazo y corazón.

Como una manera de definir si los cambios observados en los niveles de fosforilación de TrkA impactaban en la actividad de la cascada de señalización mediada por NGF (NGF/TrkA/Akt), se evaluó la translocación de Akt a núcleo como un método para evaluar la actividad de esta proteína-kinasa.

La translocación de Akt a núcleo en el cerebro, no mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos con radiación γ y el grupo control. No obstante, se puede apreciar una tendencia hacia una respuesta de tipo dosis-dependiente. Esta aseveración se respalda en el hecho de que la cantidad de Akt en núcleo parece aumentar de manera directamente proporcional a la dosis de radiación empleada (Figura 6.7).

En el caso del bazo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la translocación de Akt para ninguno de los grupos expuestos a radiación ionizante (Figura 6.8).

Finalmente, para el corazón tampoco se registraron diferencias significativas en la translocación de Akt en ninguno de los grupos expuestos a radiación γ , no obstante, el comportamiento de esta proteína es similar al observado en bazo (Figura 6.9).

44

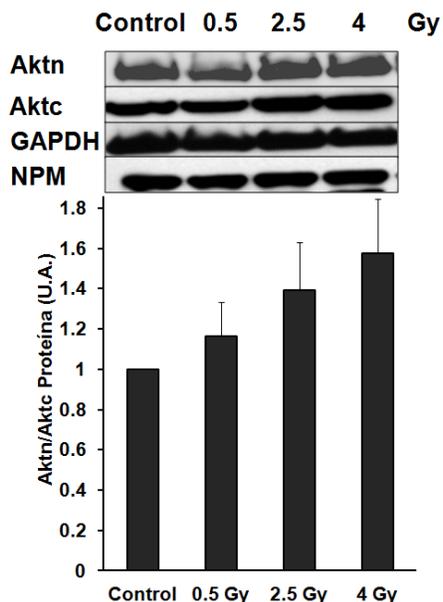


Figura 6.7. Translocación nuclear de Akt en cerebro de ratones Balb/c tratados con radiación γ a 0.5, 2.5 y 4 Gy. En el panel superior se observa una imagen representativa de los niveles de Akt en núcleo (Aktn) y en citoplasma (Aktc). Los valores representan la media \pm E. E. El análisis de los datos se hizo mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Holm-Sidak.

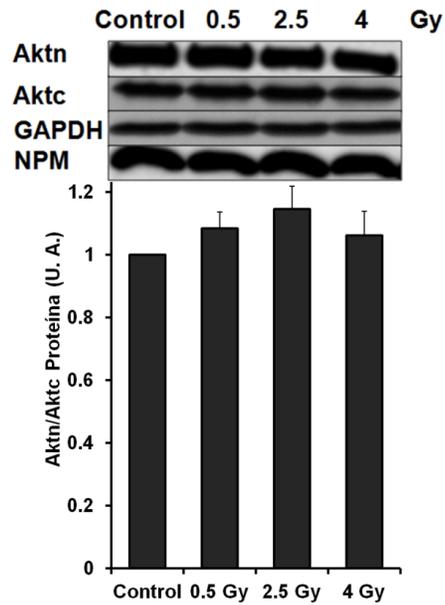


Figura 6.8. Translocación nuclear de Akt en bazo de ratones Balb/c tratados con radiación γ a 0.5, 2.5 y 4 Gy. En el panel superior se observa una imagen representativa de los niveles de Akt en el núcleo (Aktn) y en el citoplasma (Aktc). Los valores representan la media \pm E. E. El análisis de los datos se hizo mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Holm-Sidak.

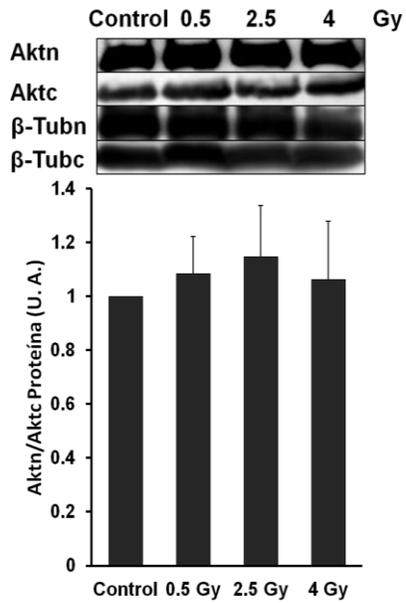


Figura 6.9. Translocación nuclear de Akt en corazón de ratones Balb/c tratados con radiación γ a 0.5, 2.5 y 4 Gy. En el panel superior se observa una imagen representativa de los niveles de Akt en el núcleo (Aktn) y en el citoplasma (Aktc). Los valores representan la media \pm E. E. El análisis de los datos se hizo mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Holm-Sidak.

Finalmente, en la tabla 6.1 se muestra un resumen que compara los resultados obtenidos en este trabajo para cada uno de los órganos evaluados.

Tabla 6.1. Resumen de las respuestas observadas en cada uno de los órganos evaluados. (ND= No determinado).

	Cerebro	Bazo	Corazón
Expresión de NGF	Incremento a 2.5 Gy (≈ 2.6 veces) y a 4 Gy (≈ 2.4 veces)	ND	ND
Fosforilación de TrkA	Incremento a 4 Gy (≈ 0.3 veces)	Decreció a 0.5 Gy (≈ 0.15 veces)	Sin diferencias significativas
Translocación de Akt	Sin diferencias significativas pero con una tendencia dosis-respuesta	Sin diferencias significativas	Sin diferencias significativas.

7. DISCUSIÓN

La radiación ionizante es capaz de dañar a las células a través de dos vías: la vía directa (disrupción de las macromoléculas debido a la ionización de sus átomos) y la vía indirecta (el daño a las macromoléculas es consecuencia del estrés oxidante producido por la radiólisis del agua) (Revisado por Riley, 1994; Azzam, 2012; Hall, 2012). El componente principal de las células es agua (Riley, 1994; Hall 2012), por tanto la acción indirecta de la radiación adquiere una mayor relevancia. Aunado a esto, se ha reportado que aproximadamente 2/3 del daño al DNA se genera debido al efecto indirecto de la radiación (Azzam, 2012).

Por otro lado, NGF es una proteína perteneciente a la familia de las NT: factores de crecimiento encargados de la regulación de casi todos los aspectos del desarrollo y función del sistema nervioso, entre los que destacan: la proliferación, sobrevivencia, diferenciación, plasticidad y regulación sináptica (Revisado por Huang y Reichardt, 2001; Lu *et al.*, 2005; Reichardt, 2006). Además de dichas funciones, existen evidencias que indican que NGF es capaz de modular la respuesta antioxidante en modelos *in vitro* (Pan y Pérez-Polo, 1993; Sampath *et al.* 1994; Sampath y Pérez-Polo, 1997) y en modelos *in vivo*, tanto en sistema nervioso central (Nistico *et al.*, 1992; Cruz-Aguado *et al.*, 1999; Maksimović, *et al.*, 2002) como en el hígado (Arsenijevic *et al.*, 2007; Valdovinos-Flores y Gonsebatt, 2013). Además, NGF también puede regular la sobrevivencia de células β pancreáticas de manera autócrina (Navarro-Tableros *et al.*, 2004), así como la sobrevivencia de cardiomiocitos (Caporali *et al.*, 2008), células plasmáticas del pulmón (Abram, 2009) y promueve la reparación cardíaca después de eventos de infarto al miocardio (Meloni *et al.*, 2010), además de que previene la apoptosis en linfocitos B (Kronfeld *et al.*, 2002).

En los sistemas biológicos, los efectos producidos por la exposición a radiación ionizante pueden variar dependiendo de la radiosensibilidad del tejido irradiado, misma que es su capacidad de proliferación, grado de diferenciación y tasa metabólica propios del tejido (Alcaraz-Baños, 2003; Bergonié y Tribondeau, 2003), además de otros factores como la tasa de consumo de oxígeno de cada órgano (Whiters, 1967). Es por ello que en este trabajo se investigó la relación dosis-efecto de la exposición a cuerpo entero de radiación γ en tres órganos de ratón con diferentes grados de radiosensibilidad (Suciu, 1982): el cerebro, el bazo y el corazón. Dado que en este estudio se emplearon dosis de radiación correspondientes a efectos somáticos tempranos en humanos, se espera que en los órganos de ratón se manifieste una respuesta contra la irradiación.

En este estudio, se pudo observar que la transcripción de *ngfb* en el cerebro de ratones tratados con radiación γ se incrementa a las dosis de 2.5 y 4 Gy (Figura 6.3). El incremento en los niveles de mRNA de NGF como consecuencia de la exposición a radiación ionizante podría considerarse como una respuesta para combatir el estrés oxidante generado por la radiólisis del agua. Dado que el cerebro es considerado como un órgano más radiorresistente que otros por su baja tasa de proliferación y alta diferenciación celular (Suciu, 1983), se podría esperar que la respuesta a radiación ionizante sólo fuese observable en la dosis más alta empleada en este trabajo, *i. e.* 4 Gy. Sin embargo, la transcripción de *ngfb* se induce tanto en dosis altas (4 Gy) como en dosis más bajas (2.5 Gy). Además, cabe resaltar que, si bien las diferencias no son significativas, pareciera haber un incremento en los niveles de NGF en el grupo expuesto a 0.5 Gy. El hecho de que se observe un cambio en la expresión de NGF independientemente de la dosis de radiación empleada, podría apoyar las observaciones hechas en tejidos diferenciados como el cerebro, pues a través de esta NT el cerebro podría estar combatiendo el daño creado por la exposición a la radiación ya sea a través de la generación de una respuesta antioxidante o bien de una respuesta de sobrevivencia.

Ya se ha mencionado que las funciones protectoras de este factor de crecimiento son consecuencia de la activación de su vía de señalización mediada por la unión de esta NT con TrkA (Wiesmann y de Vos, 2001; Lu *et al.*, 2005; Reichardt, 2006). En particular, se ha demostrado que la actividad antioxidante de NGF podría alcanzarse a través de la vía NGF/TrkA/Akt (Valdovinos-Flores y Gonsebatt, 2013). Es por ello que también se decidió evaluar la activación tanto del receptor TrkA como de la proteína Akt.

Se observó que, en el cerebro, la fosforilación de TrkA se presentó sólo en el grupo de ratones expuestos a 4 Gy de radiación γ (Figura 6.4). Por otro lado, en la actividad de Akt únicamente se aprecia una tendencia a un incremento de tipo dosis-dependiente (Figura 6.7). Ambos eventos muestran poca relación entre el incremento en los niveles de expresión de *ngfb* y la actividad de su cascada de señalización. Cabe resaltar que los niveles de proteína de NGF no fueron evaluados en este estudio, este hecho se debe de tomar en consideración puesto que la respuesta observada de TrkA y Akt podría estar determinada por los niveles de proteína presentes en el tejido en el momento de la irradiación.

En nuestro grupo de trabajo, se demostró que NGF puede actuar de manera autócrina para incrementar los niveles de tiorredixina-1 (Trx-1) en condiciones de estrés oxidante en el hígado de

ratones (Valdovinos-Flores y Gonsebatt, 2013). Además se ha reportado que NGF es incapaz de cruzar la barrera hematoencefálica (Mimura *et al.*, 2011), por lo que un mecanismo de acción autócrino es muy posible en el cerebro. Estos hechos insinúan un mecanismo de acción autócrino para NGF en el modelo de estudio planteado en este trabajo, no obstante, todas las NT son sintetizadas como pro-neurotrofinas que requieren ser maduras por medio de modificaciones post-traduccionales antes de poder llevar a cabo sus funciones biológicas (Siedah *et al.*, 1995; Govoni *et al.*, 2011). En nuestro estudio, el sacrificio de los animales y la disección de los tejidos se realizaron 1 hora después de la exposición a radiación γ y, dado que los cambios registrados en los niveles de mRNA de NGF no corresponden con lo observado en los niveles de activación de TrkA y Akt. Es probable que al realizar una evaluación en periodos de tiempo más extensos, así como realizar evaluaciones de los niveles de proteína de NGF permitan determinar con mayor claridad el estado de la vía de señalización activada por NGF. Los hechos expuestos anteriormente podrían explicar entonces el por qué de la poca actividad observada en la cascada de señalización de NGF a pesar del incremento en la expresión de ésta NT.

Finalmente, se considera que la dosis de exposición también es importante en la generación del daño por radiación ionizante (Úndeđer *et al.*, 2004), entonces, puede ser que sólo la dosis más alta genere una cantidad suficientemente alta de ERO's como para iniciar una respuesta antioxidante de manera más rápida y completa en comparación con las dosis menores, al menos en los tiempos evaluados en el presente trabajo.

Por otro lado, el factor de transcripción Nrf2 puede regular el potencial redox celular a través de diferentes mecanismos que incluyen: i) la transcripción de enzimas antioxidantes como la SOD y la GPx; ii) la modulación de los niveles de factores reductores como el GSH al inducir la transcripción de enzimas que participan en la síntesis de dicho péptido; iii) la inducción de manera directa de la expresión de Trx; iv) la inducción de la expresión de enzimas que regeneran algunos de los factores reductores, *e. g.* GSR y TrxR (Revisado por Köningsberg-Fainstein, 2007; Ma, 2013). Además, existen evidencias que demuestran que Nrf2 puede modular la expresión de *ngfb* (Mimura *et al.*, 2011) y que NGF también participa en la regulación de la actividad de Nrf2 (Kosaka *et al.*, 2009). Las muestras usadas en este trabajo también se emplearon para llevar a cabo un estudio sobre el efecto que ejerce la radiación ionizante en proteínas relacionadas con la respuesta antioxidante tales como glutarredoxina-1 (Grx-1), tiorredoxina-1 (Trx-1) y Nrf2. En dicho estudio se observó que no existe modulación de ninguna de las proteínas evaluadas en el cerebro

(Fajardo-Miranda, 2013). Tomadas en conjunto, las evidencias parecen corroborar que en estas muestras, tanto NGF como Nrf2 son incapaces de inducir la activación de una respuesta antioxidante para combatir el daño producido por la exposición a radiación γ .

En el caso del bazo, la evaluación de la expresión de NGF no pudo llevarse a cabo debido a que en éste órgano los niveles basales de NGF son demasiado bajos (Consulta en Biogps: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=18049> consultado el 5 de febrero de 2014), empero los ensayos para la determinación del estado de activación de TrkA y Akt sí pudieron llevarse a cabo.

En este tejido, se observó una disminución en la fosforilación de TrkA en el grupo expuesto a 0.5 Gy de radiación γ . MacPhee y Barker (1997) demostraron que el aumento en los niveles de ceramida intracelular derivado de la unión de BDNF a p75^{NTR} produce un decremento en la fosforilación de TrkA mediada por su unión con NGF. De igual forma, se ha demostrado que la exposición a radiación ionizante induce incrementos en los niveles de ceramida en las células (Vit y Rosselli, 2003; Kolesnick y Fuks, 2003). Por lo tanto, es probable que la baja en la fosforilación de TrkA observada en el presente trabajo sea producto de un aumento en los niveles de ceramida intracelular causados por la irradiación γ .

50

Aunado a los hechos mencionados anteriormente, el bazo juega un papel importante en el almacén y la maduración de los linfocitos (De Porto *et al.*, 2010) un tipo celular altamente sensible a la radiación ionizante (Alcaraz-Baños, 2003; Johnson *et al.*, 2013). En un modelo de irradiación de cuerpo completo, se sugirió que los linfocitos dañados en el torrente sanguíneo podrían viajar hasta órganos linfáticos importantes (*e. g.* el timo) y potenciar el daño en ellos (Johnson *et al.*, 2013). En este sentido, diversas evidencias indican que las células irradiadas liberan factores clastogénicos capaces de difundir en el organismo y generar daño en las células espectadoras, en un fenómeno conocido como efecto espectador de la radiación ionizante (Mazorik *et al.*, 2007; Rzeszowska-Wolny *et al.*, 2009). Es probable que en nuestro estudio los linfocitos irradiados en el torrente sanguíneo también puedan potenciar el daño en el bazo a través de la liberación de factores clastogénicos en el tejido, por medio de fenómeno similar al observado en el efecto espectador. Esta hipótesis también se ve respaldada por el hecho de que a dosis de radiación ≤ 0.5 Gy (mismas en las que se observó una disminución en la fosforilación de TrkA en nuestro trabajo) el daño producido como consecuencia del efecto espectador es mayor en comparación con el daño producido por una exposición directa a radiación ionizante (Mothersill y Seymour, 2004).

Además, se ha descrito un posible rol para el bazo en la generación de dicho efecto (Koturbash *et al.*, 2006).

Por su parte, la respuesta observada para la activación de Akt en el bazo muestra un comportamiento más parecido al registrado para ésta proteína en el cerebro. A pesar de que no existen diferencias significativas para ninguno de los grupos expuestos, en el bazo se observa un ligero incremento lineal en la translocación de Akt a las dosis de 0.5 y 2.5 Gy mientras que a 4 Gy parece bajar de nuevo. Es probable que al hacer evaluaciones en un periodo de tiempo más extenso la baja de actividad de Akt pudiera hacerse más evidente. De ser el caso, se ha reportado que en ratones la exposición a radiación ionizante en un rango de dosis de 3 a 10 Gy es capaz de eliminar a los precursores sanguíneos dentro de la médula ósea roja y que las células sobrevivientes pueden migrar al bazo para que éste lleve a cabo la hematopoyesis, éste fenómeno se conoce como síndrome hematopoyético (Plett *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013). En el presente trabajo, los ratones fueron expuestos a radiación ionizante de cuerpo completo, ello implica que las células hematopoyéticas de la médula ósea también fueron irradiadas y es probable que el daño causado como consecuencia de una exposición a 4 Gy sea suficiente como para iniciar el síndrome hematopoyético en este grupo, esta suposición podría corroborarse al realizar una evaluación a tiempos post-irradiación más largos.

A pesar de que en nuestro trabajo no encontramos evidencias que indiquen que la cascada de señalización de NGF que podría iniciar una respuesta antioxidante se encuentre activa en el bazo, Fajardo-Miranda (2013) reportó una modulación positiva de la expresión de Trx-1 en el bazo a las tres dosis de radiación empleadas, así como un aumento en la expresión de Nrf2 a la dosis de 2.5 Gy, por lo que la respuesta antioxidante estaría activa, al menos en parte, en este órgano. Se ha reportado que la vía de señalización de Nrf2 podría estar involucrada en la modulación de la transcripción de Trx (Im *et al.*, 2012), por lo tanto en el bazo la respuesta al estrés oxidante generado por la exposición a radiación ionizante podría ser modulada por Nrf2 y no por NGF, al menos para el tiempo en que se hizo la evaluación (1 hora).

Como se mencionó previamente, Nrf2 tiene la capacidad de inducir la transcripción de *ngfb* (Mimura *et al.*, 2011), desde esta perspectiva, es probable que en un periodo de tiempo post-irradiación más largo, la respuesta iniciada por Nrf2 pueda verse potenciada por la activación de la vía NGF/TrkA/PI3K/Akt.

Por otro lado, la evaluación de la expresión de *ngfb* no se pudo llevar a cabo en el corazón debido a que en este órgano los niveles basales de dicha NT también son muy bajos (Consulta en Biogps: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=18049> consultado el 5 de febrero de 2014). No obstante, la evaluación de la fosforilación de TrkA y de Akt sí se llevó a cabo.

Se ha demostrado que NGF es capaz de mediar la regeneración del tejido cardíaco después de eventos de isquemia-reperfusión a través de la vía PI3K/Akt y que la activación de éstas funciones se produce como consecuencia de eventos pro-inflamatorios (Revisado por Govoni *et al.*, 2011). También se ha observado que la exposición a radiación ionizante puede generar inflamación y fibrosis en el corazón (Krüse *et al.*, 2001). Estas evidencias sugieren que, en nuestro estudio, la vía de señalización NGF/TrkA/PI3K/Akt podría haberse activado en el corazón no sólo para combatir al estrés oxidante generado por la radiación, sino también como una manera de contender con los daños producidos por los procesos inflamatorios originados por la misma exposición a radiación y.

Contrario a lo que se esperaba, en este órgano, no se observaron cambios ni en la fosforilación de TrkA, ni en la activación de Akt (Figuras 6.6 y 6.9). Al igual que el cerebro, el corazón es considerado como un órgano radiorresistente debido a su bajo índice mitótico y su alto grado de diferenciación celular (Suciu, 1982), además de ser un órgano que cuenta con una alta capacidad antioxidante en comparación con otros tejidos, *e. g.* el cerebro (Halliwell y Gutteridge, 1999; Limón-Pacheco, 2007), por lo que podría contender fácilmente con la generación de estrés oxidante producido por la exposición a radiación ionizante. También se ha demostrado que a dosis más altas de radiación ionizante (15 Gy), no se registran daños en el corazón en un intervalo de 72 horas posteriores a la exposición (Johnson *et al.*, 2013) mientras que a dosis más bajas (2 Gy) se ha observado que la respuesta a radiación ionizante en corazón se presenta de manera retrasada, cuatro semanas después de la exposición (Barjaktarovic *et al.*, 2011). Krüse *et al.* (2001), demostraron que se requieren dosis muy altas de radiación ionizante (>20 Gy) y una amplia ventana de tiempo para que los efectos adversos en el corazón sean evidentes. Todos estos hechos probablemente estén relacionados con la ausencia en la actividad en la cascada de señalización de NGF en el corazón de los ratones irradiados, pues en nuestro estudio el sacrificio y la extracción de tejidos se hizo en un tiempo post-irradiación muy corto en comparación con las evidencias mencionadas anteriormente. Por otro lado, es posible que las dosis de radiación empleadas en nuestro trabajo sean demasiado bajas como para que una respuesta que involucre la cascada de señalización de NGF pueda observarse.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes con lo reportado en el trabajo realizado por Fajardo-Miranda (2013) en el que no se observan cambios en la transcripción de las enzimas Trx y Grx. Por lo tanto, es probable que este tejido no esté respondiendo ante el insulto tóxico que representa la exposición a radiación ionizante, al menos hablando en términos de la defensa antioxidante.

Al hacer un análisis integral de nuestros resultados, se puede observar que la respuesta ante la exposición a radiación ionizante es dependiente del tipo de tejido que es irradiado y que dicha respuesta concuerda con lo esperado con base en la ley de la radiosensibilidad postulada por Bergonié y Tribondeau (2003) y las radiosensibilidades reportadas por Suciú (1982) para cada tejido empleado en el presente trabajo, *i. e.* tanto el cerebro como el corazón se comportan como órganos radorresistentes mientras que el bazo se comporta como un órgano radiosensible. A pesar de que las respuestas en cerebro y corazón son distintas, el primero parece estar activando una vía de señalización para contender con el insulto tóxico, mientras que el corazón no responde porque es capaz de soportar dosis más altas de radiación y se requiere un mayor tiempo para dañarlo. El bazo en cambio, parece mostrar una respuesta más asociada con el daño y por tanto se considera radiosensible.

De manera específica, el cerebro fue el único órgano en el que se hallaron evidencias de la actividad de la cascada de señalización NGF/TrkA/PI3K/Akt, misma que podría estar protegiendo al cerebro a través de la activación de vías de sobrevivencia o la activación de una vía antioxidante.

En el caso del bazo, se observó una respuesta que podría estar relacionada con los reportes que señalan que este tejido podría estar involucrado en la aparición del efecto espectador de la radiación ionizante (Koturbash *et al.*, 2006), pues en este órgano sólo se hallaron cambios en el grupo expuesto a 0.5 Gy. Tomando en cuenta que el efecto espectador adquiere mayor relevancia en un rango de dosis menores a 0.5 Gy, mientras que a dosis mayores los daños por ionizaciones directas son más comunes (Mothersill y Seymour, 2004), sugerimos que la respuesta hallada en el cerebro esté más relacionada con ionizaciones directas que con el efecto espectador, puesto que en este órgano sólo se observaron cambios en los grupos expuestos a dosis mayores a 0.5 Gy, además de que la barrera hematoencefálica protege al cerebro de la acción de los factores clastogénicos. Un estudio en el que se empleen rangos de dosis menores y mayores a 0.5 Gy podría ser de ayuda para determinar la importancia que tienen las ionizaciones directas y el efecto espectador en cada tejido.

Asimismo, una evaluación que incluya una ventana de tiempo más amplia también permitiría hacer una mejor determinación de los efectos ocasionados por la radiación en los tejidos evaluados ya que el corazón parece requerir de tiempos más largos para que se observe una respuesta (Barjaktarovic *et al.*, 2011). Además de que se ha visto que los efectos biológicos producidos por la exposición a radiación ionizante tienen un comportamiento de tipo ondulatorio, *i. e.* se presentan picos de actividad seguidos por bajas en la misma dependiendo del tiempo en que sean observados (Michael Hitchler, com. pers.).

Finalmente, el hecho de que la evaluación de TrkA y Akt haya podido llevarse a cabo tanto en bazo como en corazón a pesar de que la determinación de NGF no pudiera realizarse debido a que los niveles de mRNA de esta NT son muy bajos en ambos tejidos, podría indicar que NGF se está sintetizando en otros tejidos y puede llevar a cabo una función parácrina tanto en el bazo como en el corazón, así como ha sido reportado tanto *in vitro* como *in vivo* (Yaar *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2004).

8. CONCLUSIONES

La evaluación de la expresión de NGF únicamente pudo llevarse a cabo en el cerebro, la determinación en el bazo y el corazón no pudo realizarse debido a que los niveles basales de ésta NT son demasiado bajos en estos órganos.

La determinación de la fosforilación de TrkA y de la translocación de Akt a núcleo pudo realizarse en todos los órganos evaluados, y podrían fungir como indicadores del estado de activación de la vía de NGF/TrkA/Akt.

El cerebro fue el único órgano en que se observaron indicios de la activación de la vía NGF/TrkA/Akt, posiblemente en respuesta al estrés oxidante producido como consecuencia de la radiólisis del agua o como mecanismo de protección a través de la activación de vías de sobrevivencia.

En el bazo, las evidencias sugieren una baja en la señalización a través de la vía NGF/TrkA/Akt al menos en el grupo expuesto a 0.5 Gy. Asimismo, nuestros resultados insinúan que los efectos en este tejido podrían estar relacionados con el efecto espectador de la radiación ionizante.

Los efectos de la exposición a radiación γ mostraron un comportamiento de tipo órgano-dependiente, este tipo de respuesta está asociada con el grado de radiosensibilidad de cada tejido y con la capacidad de cada órgano para contender con el insulto a través de la vía NGF/TrkA/Akt.

Con respecto al punto anterior y de acuerdo a lo esperado, los resultados hallados sugieren que el cerebro y el corazón se comportan como tejidos radiorresistentes, mientras que el bazo se comporta como un tejido radiosensible.

9. PERSPECTIVAS

Para estudios futuros, se sugiere realizar la evaluación de la respuesta por la exposición a radiación ionizante a diferentes tiempos post-irradiación para que de esta manera se pueda generar un mejor entendimiento de la respuesta en cada órgano, independientemente del tiempo en que cada uno de éstos tarde en responder.

Asimismo, una evaluación en la que se empleen dosis de radiación tanto bajas (< 0.5 Gy) como altas (>0.5 Gy) podría resaltar la relevancia del efecto espectador y las ionizaciones directas en los tejidos.

También se podrían buscar evidencias de la generación del efecto espectador, *e. g.* presencia de factores clastogénicos, como complemento para determinar la importancia de dicho efecto en exposiciones a bajas dosis de radiación ionizante.

Finalmente, la evaluación de marcadores de daño o apoptóticos arrojarían luz sobre el tipo de respuesta de cada tejido, así como el rol de NGF en el mismo.

APÉNDICE I. Lista de abreviaturas

$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Método de Livak para calcular diferencias de expresión en qPCR
Akt (PKB)	Proteína cinasa B
APAP	N-acetil-p-aminofenol
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
Bad	Promotor de muerte asociado a Bcl-2
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcq	Becquerel.
BDNF	Factor de crecimiento derivado del cerebro.
BSO	L-butionina-S-R-sulfoximina
C_T	Ciclo umbral
cDNA	DNA complementario
<i>c-fos</i>	Homólogo del oncogen de osteosarcoma viral murino FBJ
C3G (RAPGEF1)	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) 1 para Rap
CAT	Catalasa
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Elk1	Proteína Elk1 contenedora del dominio ETS
Erk	Cinasas reguladas por señales extracelulares (Familia de proteínas)
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
eV	Electrón-voltio
FKHRL1	Forkhead parecido a Rhabdomiosarcoma 1
Frs2	Substrato 2 del receptor del factor de crecimiento fibroblástico 2
γ-GCS	γ -glutamylcisteína sintetasa
G6P-D	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Gab1	Proteína de unión asociada a Grb2
GPx	Glutación peroxidasa
Grb2	Proteína 2 unida al receptor de factor de crecimiento
Grx	Glutarredoxina
GSK3β	Cinasa 3 beta de la glucógeno sintetasa

GSH	Glutación reducido
GSR	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
GTP	Guanina tri-fosfato
Gy	Gray
iAs	Arsénico inorgánico
IP3	Inositol 3-fosfato
IRAK	Cinasa asociada al receptor de interleucina 1
IRS1 e IRS2	Substrato de receptor de insulina 1 y 2
Keap1	Proteína 1 parecida a kelch asociada a ECH
LET	Energía lineal de transferencia
LMWA	Antioxidantes de bajo peso molecular
Small Maf	Homólogo del oncogen de fibrosarcoma músculo-aponeurotico v-maf de ave (Familia de proteínas)
Mapk	Proteína cinasa activada por mitógenos (Familia de proteínas)
MEK (MP2K)	Proteína cinasa cinasa activada por mitógenos
NGF	Factor de crecimiento nervioso (Proteína)
<i>ngfb</i>	Factor de crecimiento nervioso (Gen)
NGF 7S	Complejo proteico formado por tres sub-unidades: α -NGF, β -NGF y γ -NGF.
Nrf2	Factor nuclear 2 (asociado al factor eritroide 2)
NT	Neurotrofina
NT-3	Neurotrofina-3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5
p53 (TP53)	Proteína tumoral p53
p75^{NTR}	Receptor neurotrófico de baja afinidad p75
qPCR	Ensayo de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real
PDK1	Cinasa dependiente de 3-fosfoinositol
PI3k	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PKCδ	Proteína cinasa c (isoforma δ)
PLC-γ	Fosfolipasa C- γ
PtdIns (4,5)P₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
pY490	fosfotirosina-490

pY785	fosfotirosina-785
Ras	Familia de proteínas con actividad GTPasa.
Raf	Familia de proteínas con actividad serina/treonina cinasa.
Rap1	Proteína 1 asociada a Ras.
RNA	Ácido ribonucleico
Shc	Proteína transformante SHC (Contenedor de dominio 2 con homología a Src) (Familia de proteínas)
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SOS	“Son of Sevenless”
TNF	Factor de necrosis tumoral
Traf6	Factor 6 asociado al receptor TNF
Trk	Receptor asociado a tropmiosina cinasa (Familia de receptores)
Trx	Tiorredoxina

APÉNDICE II. Efectos somáticos y genéticos de la radiación ionizante

De manera general se han descrito dos tipos de efectos de la radiación ionizante relacionados con la dosis en los humanos: los efectos somáticos y los efectos genéticos. Los primeros son observables en las células no reproductoras del individuo irradiado y por lo tanto no son hererables. Los efectos estocásticos también pueden subdividirse en tempranos, intermedios y tardíos, los tempranos se manifiestan dentro de los primeros 60 días posteriores a la irradiación y generalmente son aparentes únicamente a dosis mayores a los 50 cGy (Fajardo, 2001). Por otro lado, no son directamente observables en los individuos irradiados, sino que se presentan en la progenie de dichos individuos como consecuencia de la irradiación de los gametos de éstos (Tabla AI) (Angelo, 2004).

Tabla AI. Caracterización de los efectos somáticos y genéticos de la radiación ionizante dependientes de la dosis (Modificado de Coss-Rojas, 2014).

Efectos	Exposición (R)	Característica	Efectos en humanos
Somáticos	5000	Cuerpo Entero (exposición letal)	Muerte Instantánea
	<1000	Cuerpo entero (Exposición Letal)	Muerte no instantánea (3-6 meses), riesgo de infecciones letales
	500	Exposición letal media	Muerte en el 50% de los casos
	20 - 100	Tratamientos médicos (exposición puntual)	Tratamientos de radioterapia
	10	Dosificada (accidental)	Efectos Inmediatos
Efectos	Exposición (R/año)	Característica	Efectos en humanos
Genéticos	5	Límite para personal ocupacionalmente expuesto (POE) I	Sin evidencia directa de daños a la salud
	3	Límite para POE II	
	0.5	Límite no POE	
	0.3	Límite para público en general	
	0.2-0.25	Radiación ambiental	

10. REFERENCIAS

- Abram, M. Wegmann, M., Fokuhl, V., Sonar, S., Luger, E. O., Kerzel, S., Radbruch, A., Renz, H. y Zemlin, M. 2009. En: *The Journal of Immunology*. DOI: www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0802814
- Ahsan, K., Lekli, I., Ray, D., Yodoi, J. y Das, D. K. 2009. Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: and implication of redox gene therapy in the heart. En: *Antioxidants and redox signaling* 11(11): 2741-2758.
- Alcaraz-Baños, M. 2003. Bases físicas y biológicas del radiodiagnóstico médico. EDITUM. 272 pp.
- Aloe, L., Tirassa, P. y Alleva, E. 1994. Cold Water Swimming Stress Alters NGF and Low-Affinity NGF Receptor Distribution in Developing Brain. En: *Brain Research Bulletin* 33: 173-178.
- Angelo, J. A. 2004. Nuclear Technology. Greenwood Publishing Group. 638 pp.
- Arsenijevic, D., Hernadfalvi, N., von Meyenburg, C., Onteniente, B., Richard, D. y Langhans, W. 2007. Role for nerve growth factor in the *in vivo* regulation of glutathione in response to LPS in mice. En: *European Cytokine Network* 18(2): 47-55.
- Attix, F. H. 1986. Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry. John Wiley & Sons. 628 pp.
- Azzam, E. I., Jay-Gerin, J. P. y Pain, D. 2012. Ionizing radiation induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. En: *Cancer Letters*. DOI: [10.1016/j.canlet.2011.12.012](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012).
- Barbacid, M. 1994. The Trk family of neurotrophin receptors. En: *Journal of Neurobiology* 25(11): 1386-1403.
- Barjaktarovic, Z., Schmaltz, D., Shyla, A., Azimzadeh, O., Schulz, S., Haagen, J., Dörr, W., Sarioglu, H., Schäfer, A., Atkinson, M. J., Zischka, H. y Tapio, S. 2011. Radiation-induced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to X-rays. En: *PLoS ONE* 6(12): 1-15. DOI: [10.1371/journal.pone.0027811](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027811).
- Bartlet, S. E., Reynolds, A. J., Hendry, I. A. 1998. Retrograde axonal transport of neurotrophins: Differences between neuronal populations and implications for motor neuron disease. En: *Immunology and Cell Biology* 76: 419-423.

Bergonié, J. y Tribondeau, L. 2003. Interpretation of Some Results from Radiotherapy and an Attempt to Determine a Rational Treatment Technique. En: *Yale Journal of Biology and Medicine* 76: 181-182

Berry, R. J., Hall, E. J. y Cavanagh, J. 1970. Radiosensitivity and the oxygen effect for mammalian cells cultured *In vitro* in stationary phase. En: *The British Journal of Radiology* 43: 81-90.

Blyth, B. J. y Sykes, P. J. 2011. Radiation-Induced Bystander Effects: What Are They, and How Relevant Are They to Human Radiation Exposures? En: *Radiation Research* 176: 139-157.

Bjorling, D. E., Beckman, M., Clayton, M. K. y Wang, Z.-Y. 2002. Modulation of Nerve Growth Factor in Peripheral Organs by Estrogen and Progesterone. En: *Neuroscience* 110(1): 155-167.

Bryan, J. C. 2013. Introduction to Nuclear Science. CRC Press Taylor & Francis Group. 420 pp.

Bushong, S. C. 2013. Manual de radiología para técnicos: Física, biología y protección radiológica. Elsevier España. 664 pp.

62 Caporali, A., Sala-Newby, G. B., Meloni, M., Graiani, G., Pani, E., Cristofaro, B., Newby, A. C., Madeddu, P. y Emanuelli, C. 2008. Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. En: *Cell Death and Differentiation* 15: 299-311.

Chakravarthy, B., Gaudet, C., Ménard, M., Atkinson, T., Chiarini, A., Dal Prà, I. y Whitfield, J. 2010. The p75 neurotrophin receptor is localized to primary cilia in adult murine hippocampal dentate gyrus granule cells. En: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 401(3): 459-462

Chao, M. V. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergent point for many signaling pathways. En: *Nature Reviews. Neuroscience* 4: 299-309.

Cruz-Aguado, R., Francis-Turner, L., Díaz-Suárez, C. M. y Bergado, J. 1999. NGF prevents changes in rat brain glutathione-related enzymes following transection of the septohippocampal pathway. En: *Neurochemistry International* 34: 125-130.

Coss-Rojas, A. C. 2014. Hormesis, una revolución en biología y toxicología. . Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 65 pp.

Cowan, W. M. 2001. Viktor Hamburguer and Rita Levi-Montalcini: The Path to the Discovery of the Nerve Growth Factor. *Annual Review of Neuroscience* 24: 551-600.

- Dalton, T. P., Chen, Y., Schneider, S. N., Nebert, D. W. y Shertzer, H. G. 2004. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. En: *Free Radical Biology and Medicine* 37(10): 1511-1526.
- De Porto, A. P. N. A., Lammers, A. J. J., Bennink, R. J., ten Berge, I. J. M., Speelman, P. y Hoekstra, J. B. L. 2010. Assessment of splenic function. En: *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*. 29: 1465-1473.
- Elejalde-Guerra, J. J. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. En: *Anales de Medicina Interna* 18(6): 326-335.
- Fajardo, L. P. 2001. Radiation Pathology. Oxford University Press. 472 pp.
- Fajardo-Miranda, R. M. 2013. Modulación de la respuesta antioxidante debido a radiación ionizante en un modelo murino. Tesis Profesional. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 88 pp.
- Friedman, W. J. y Greene, L. A. 1999. Neurotrophin signaling via Trks and p75. En: *Experimental Cell Research* 253: 131-142.
- Govoni, S., Pascale, A., Amadio, M., Calvillo, L., D'Elia, E., Cereda, C., Fantucci, P., Ceroni, M. y Vanoli, E. 2011. NGF and heart: is there a role in heart disease? En: *Pharmacological Research* 63: 266-277.
- Hall, E. J. y Giaccia, A. J. 2012. Radiobiology for the radiologist. Lippincott Williams & Wilkins. 576 pp.
- Halliwell, B. 1994. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. En: *Nutrition Reviews* 52(8): 253-265.
- Halliwell, B. 2001. Free radicals and other reactive species in disease. En: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/npg.els.0002269
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. En: *Plant Physiology* 141: 312-322.
- Halliwell, B. 2011. Free radicals and antioxidants - *quo vadis?* En: *Trends in Pharmacological Sciences* 32 (3): 125-130.

- Halliwell, B. y Gutteridge, J. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. 851 pp.
- Holtzman, D. M., Kilbridge, J., Li, Y., Cunningham, E. T., Lenn, N. J., Clary, D. O. Reichardt, L. F. y Mobley, W. C. 1995. TrkA Expression in the CNS: Evidence for the Existence of Several Novel NGF-Responsive CNS Neurons. En: *The Journal of Neurosciencie* 15(2): 1567-1576
- Huang, E. J. y Reichardt, L. F. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. En: *Annual Review of Neuroscience* 24: 677-736.
- Im, J-Y., Lee, K-W., Woo, J-M, Junn E. y Mouradian M. M. 2012. DJ-1 induces thioredoxin 1 expression through the Nrf2 pathway. En: *Human Molecular Genetics* 21(13): 3013-3024.
- Ivanisevic, L., Zheng, W-H., Woo, S. B., Neet, K. E. y Saragovi, H. U. 2007. TrkA receptor "hot spots" for binding of NT-3 as a heterologous ligand. En: *The Journal of Biological Chemistry* 282(23): 16754-16763.
- Jay-Gerin, J. P. y Ferradini, C. 2000. Are there protective enzymatic pathways to regulate high local nitric oxide (NO) concentrations in cells under stress conditions? En: *Biochimie* 82(2): 161-166.
- Jena, N. R. y Mishra, P. C. 2013. Is FapyG mutagenic?: Evidence from the DFT study. En: *ChemPhysChem* 14(14): 3263-3270.
- Jackson, G. R., Apffel, L., Werrbach-Pérez, K y Pérez-Polo, J. R. 1990. Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balance and neuronal injury. I. Stimulation of hydrogen peroxide resistance. En: *Journal of Neuroscience Research* 25(3): 360-368.
- Jang, H. J., Kim, Y. M., Tsoyi, K., Park, E. J., Lee, Y. S., Kim, H. J., Lee, J. H., Joe, J. H., Chung, H. T. y Chang, K. C. 2012. Ethyl pyruvate induces heme oxygenase-1 through p38 mitogen-activated protein kinase activation by depletion of glutathione in RAW 264.7 cells and improves survival in septic animals. En: *Antioxidants & Redox Signaling* 17(6): 878-889.
- Johnson, E. M., Taniuchi, M., Clark, H. B., Springer, J. E., Koh, S., TAYrien, M. W. y Loy, R. 1987. Demonstration of the retrograde transport of nerve growth factor in the peripheral and central nervous sytem. En: *Journal of Neuroscience* 7(3): 923-929.

- Johnson, E., Li, Z., Liu, Y., Moulder, J. E. y Zhao, M. 2013. Whole-body imaging of high-dose ionizing irradiation-induced tissue injuries using ^{99m}Tc -Duramycin. En: *The Journal of Nuclear Medicine* 54(8): 1397-1403.
- Joung, E.-J., Li, M.-H., Lee, H. E., Somparn, N., Jung, Y. S., Na, H.-K., Kim, S.-H., Cha, Y.-N. y Surh, Y.-J. 2007. Capsaicin induces heme oxygenase-1 expression in HepG2 cells via activation of PI3K-Nrf2 Signaling: NAD(P)H:Quinone oxidoreductase as a potential target. En: *Antioxidants & Redox Signaling* 9(12): 2087-2098.
- Kohen, R. y Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. En: *Toxicologic Pathology* 30(6): 620-650.
- Kolesnick, R y Fuks, Z. 2003. Radiation and ceramide-induced apoptosis. En: *Oncogene* 22: 5897-5906.
- Köningberg-Fainstein, M. 2007. Nrf2: la historia de un Nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. En: *Revista de Educación Bioquímica* 26(1): 18-25.
- Kosaka, K. y Yokoi, T. 2003. Carnosic acid, a component of rosemary (*Rosmarinus officinales* L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. En: *Biological Pharmaceutical Bulletin* 26(11): 1620-1622.
- Kosaka, K., Mimura, J., Itoh, K., Satoh, T., Shimojo, Y., Kitajama, C., Maruyama, A., Yamamoto, M. y Shirasawa, T. 2009. Role of Nrf2 and p62/ZIP in the neurite outgrowth by carnosic acid in PC12h cells. En: *The Journal of Biochemistry* 147(1): 73-81.
- Koturbash, I., Rugo, R. E., Hendricks, C. A., Loree, J., Thibault, B., Pogribny, I., Yanch, J. C., Engleward, B. P. y Kovalchuk, O. 2006. Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue *in vivo*. En: *Oncogene* 25: 4267-4275.
- Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Gelfand, E. W. y Brodie, C. 2002. NGF rescues human B lymphocytes from anti-IgM induced apoptosis by activation of PKC ζ . En: *European Journal of Immunology* 32: 136-143.
- Krüse, J. J.C.M., Zurcher, C., Strootman, E. G., Bart, C. I., Schlagwein, N., Leer, J. W. H. y Wondergem, J. 2001. Structural Changes in the auricles of the rat heart after local ionizing radiation. En: *Radiotherapy and Oncology* 58: 303-311.

- Kudryashov, Y. B. 2008. Radiation Biophysics (Ionizing Radiations). Nova Publishers. 327 pp.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The Nerve Growth Factor: thirty-five years later. En: *The EMBO Journal*. 6(5): 1145-1154.
- Limón-Pacheco, J. 2007. El glutati6n (GSH) intracelular como modulador de la actividad de MAP cinasas en diferentes 6rganos de rat6n. Tesis profesional. Instituto de Investigaciones Biom6dicas. Universidad Nacional Aut6noma de M6xico. M6xico, D. F. 73 pp.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky y Darnell, J. 2008. Molecular Cell Biology. W. H. Freeman. 1150 pp.
- Lommatzsch, M., Quarcoo, D., Schulte-Herbrüggen, O., Weber, H., Virchow, J. C., Renz, H. y Braun, A. 2005. Neurotrophins in murine viscera: a dynamic pattern from birth to adulthood. En: *international Journal of Developmental Neuroscience* 23: 495-500.
- Lu, B., Pang, P. T. y Woo, N. H. 2005. The yin and yang of neurotrophin action. En: *Nature Reviews. Neuroscience* 6: 603-614.
- Ma, Q. 2013. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. En: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 53: 401-426.
- MacPhee, I. J. y Barker, P. A. 1997. Brain-derived Neurotrophic Factor Binding to the p75 Neurotrophin Receptor Reduces TrkA Signaling While Increasing Serine Phosphorylation in the TrkA Intracellular Domain. En: *The Journal of Biological Chemistry* 272 (38): 23547-23551.
- Maksimović, I. D., Jovanović, M. D., Colić, M., Mihajlović, R., Mićić, D., Selaković, V., Ninković, M., Malicević, Z., Rusić-Stojiljković, M. y Jovčić, A. 2001. Oxidative damage and metabolic dysfunction in experimental Huntington's disease: selective vulnerability of the striatum and hippocampus. En: *Vojnosanitetski preglad* 58(3): 237-242.
- Maksimović, I. D., Jovanović, M. D., Maličević, Ž., Čolić, M. y Ninković, M. 2002. Effects of nerve and fibroblast growth factors on the production of nitric oxide in experimental model of Huntington's disease. En: *Vojnosanitetski preglad* 59(2): 119 – 123.
- Marozik, P., Mothersill, C., Seymour, C. B., Mosse, I. y Melnov, S. 2007. Bystander effects induced by serum from survivors of the Chernobyl accident. En: *Experimental Hematology* 35: 55-63.

- Meloni, M., Caporali, A., Graiani, G., Lagrasta, C., Katare, R., Van Linthout, S., Sillma, F., Campesi, I., Madeddu, P., Quaini, F. y Emanuelli, C. 2010. Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. En: *Integrative Physiology*. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.210088.
- Mimura, J., Kosaka, K., Maruyama, A., Satoh, T., Harada, N., Yoshida, H., Satoh, K., Yamamoto, M. e Itoh, K. 2011. Nrf2 regulates NGF mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes. En: *The Journal of Biochemistry*. 150(2): 209-217.
- Morgan, W. F. 2003. Non-targeted and Delayed Effects of Exposure to Ionizing Radiation: I. Radiation-Induced Genomic Instability and Bystander Effects *In Vitro*. En: *Radiation Research* 159: 567-580.
- Morgan, W. F. y Sowa, M. B. 2005. Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. En: *PNAS* 102(40)
- Mothersill, C. y Seymour, C. B. 2004. Radiation-induced bystander effects – implications for cancer. En: *Nature Reviews. Cancer* 4: 158-164.
- Mothersill, C., Bucking, C., Smith, R. W., Agnihotri, N., O'Neill, A., Kilemade, M. y Seymour, C. B. 2006. Communication of Radiation-Induced Stress or Bystander Signals between Fish *In Vivo*. En: *Environmental Science & Technology* 41(21): 6859-6864.
- Navarro-Tableros, V., Sánchez-Soto, M. C., García, S., Hiriart, M. 2004. Autocrine regulation of single pancreatic β -cell survival. En: *Diabetes* 53: 2018-2023.
- NCRP. 2009. NCRP Report No. 160. Ionizing radiation exposure of the population of the United States.
- Ninković, M. B., Jovanović, M. D., Malicević, Z., Dukić, M., Jelenović, A. Mihajlović, R., Vasiljević, I y Jovicić A. 2000. Effects of nerve growth factor on antioxidative system in the thalamus of MPTP treated Wistar rats. En: *Vojnosanitetski pregled*. 57(3): 257-63.
- Nistico, G., Ciriolo, M. R., Fiskin, K., Iannone, M., de Martino, A. y Rotilio, G. 1992. NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rats. En: *Free Radical Biology & Medicine* 12: 177-181.
- Nguyen, T., Nioi, P. y Pickett, C. B. 2009. The Nrf2-antioxidan response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. En: *The Journal of Biological Chemistry* 284(20): 13291-13295.

- Pan, Z. y Pérez-Polo, R. 1993. Role of Nerve Growth Factor in Oxidant Homeostasis: Glutathione Metabolism. En: *Journal of Neurochemistry* 61(5): 1713-1721.
- Park H-R., Jo S-K., Jung U., Yee S-T., Kim S-H. 2013. Protective Effects of HemoHIM on Immune and Hematopoietic Systems Against γ -Irradiation. En: *Phytotherapy Research*. DOI: 10.1002/ptr.4982.
- Platzman, R. 1958. The physical and chemical basis of mechanisms in radiation biology. Pp.: 15-72 En: *Radiation Biology and Medicine. Selected Reviews in the Life Sciences*. Adison-Wesley.
- Plett, P. A., Sampson, C. H., Chua, H. L., Joshi, M., Booth, C., Gough, A., Johnson, C. S., Katz, B. P., Farese, A. M., Parker, J., MacVittie, T. J., Orschell, C. M. 2012. Establishing a murine model of the hematopoietic syndrome of the acute radiation syndrome. En: *Health Physics* 103(4): 343-355.
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. En: *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 361: 1545-1564
- Riley, P. A. 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. En: *International Journal of Radiation Biology* 65(1): 27-33.
- Robert, S. M., Ogunrinu-Babarinde, T., Holt, K. T. y Sontheimer, H. 2014. Role of glutamate transporters in redox homeostasis of the brain. En: *Neurochemistry International*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2014.01.001>
- Ruberti, F., Capsoni, S., Comparini, A., Di Daniel, E., Franzot, J., Gonfloni, S., Rossi, G., Berardi, N. y Cattaneo, A. 2000. Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. En: *The Journal of Neuroscience* 20(7): 2589-2601.
- Rzeszowska-Wolny, J., Przybyszewski, W. M. y Widel, M. 2009. Ionizing radiation-induced bystander effects, potential targets for modulation or radiotherapy. En: *European Journal of Pharmacology* 625: 156-164.
- Sampath, D. Jackson, G. R., Werrbach-Perez, K. y Perez-Polo, J. R. 1994. Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 Cells. En: *Journal of Neurochemistry* 62(6): 2476-2479.

- Sampath, D. y Pérez-Polo, R. 1997. Regulation of Antioxidant Enzyme Expression by NGF. En: *Neurochemical Research* 22(4): 351-362.
- Siedah, N. G., Bejannet, S., Pareek, S., Chrétien, M. y Murphy R. A. 1995. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian protein convertases. En: *FEBS Letters* 379: 247-250.
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. En: *Experimental Physiology* 82: 291-295.
- Sofroniew, M. V., Howe, C. L. y Mobley, W. C. 2001. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. En: *Annual Review of Neuroscience* 24: 1217-1281.
- Suciu, D. 1983. Cellular Death by Apoptosis in some radiosensitive and radioresistant mammalian tissues. En: *Journal of theoretical Biology* 105: 391-401.
- Thoenen, H. y Barde, Y.-A. 1980. Physiology of nerve growth factor. En: *Physiological Reviews* 60(4): 1284-1335
- Thorpe, L. W. y Pérez-Polo, J. R. 1987. The influence of nerve growth factor on the *in vitro* proliferative response of rat spleen lymphocytes. En: *Journal of Neuroscience Resesarch* 18: 134-139.
- Ündeğer, Ü, Giray, B. Zorlu, A. F., Öge, K. y Baçaran, N. 2004. Protective effects of melatonin on the ionizing radiation induced DNA damage in the rat brain. En: *Experimental and Toxicologic Pathology* 55(5): 379-384.
- UNSCEAR. 2008. Exposures of the public and workers from various sources of radiation (Annex B). En: *Sources and effects of ionizing radiation. Volume I.* United Nations Publication. 243 pp.
- Valdovinos-Flores, C. y Gonsebatt, M. E. 2013. Nerve growth factor exhibits an antioxidant and an autocrine activity in mouse liver that is modulated by buthionine sulfoximine, arsenic and acetaminophen. En: *Free Radical Research* 47(5): 404-412.
- Vázquez-Vázquez, M. A. 2011. Modulación de proteínas antioxidantes por radiación ionizante en distintos órganos de ratón. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D. F. 89 pp.
- Vega, J. A., García-Suárez, O., Hannstad, J., Pérez-Pérez, M. y Germanà, A. 2003. Neurotrophins and the immune system. En: *Journal of Anatomy* 203: 1-19.

- Vit, J-P y Rosselli, F. 2003. Role of the ceramide signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. En: *Oncogene* 22: 8645-8652.
- Vogin, G. y Foray, N. The law of Bergonié and Tribondeau: a nice formula for a first approximation. En: *International Journal of Radiation Biology* 89(1): 2-8.
- Vyas, S., Molinaro, C. A., Perez, S. D., Millar, B., Carter, J., Wood, C. y Bellinger D. L. 2006. Effects of ageing and the antihypertensive drug rilmenidine on nerve growth factor (NGF). En: *Abstracts / Brain, Behavior and Immunity* 20: e74.
- Wang, F., Li, C., Jin, Y. y Guo, L. 2013. Effectos of subchronic exposure to low-dose volatile organic compounds on lung inflammation in mice. En: *Environmental Toxicology*. DOI: 10.1002/tox.21844.
- Wiesmann, C. y de Vos A. M. 2001. Nerve growth factor: structure and function. En: *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 748-759.
- Withers, H. R. 1967. The effect of oxygen and anaesthesia on radiosensitivity *in vivo* of epithelial cells in mouse skin. En: *British Journal of Radiology*.40: 335—343.
- Yamamoto, M., Sobue, G., Yamamoto, K., Terao, S. y Mitsuma, T. 1996. Expression of mRNAs for Neurotrophic Factors (NGF, BDNF, NT-3 and GDNF) and Their Receptors (p75^{NGFR}, TrkA, TrkB and TrkC) in the Adult Human Peripheral Nervous System and Nonneural Tissues. En: *Neurochemical Research* 21(8): 929-938.
- Zhou, H., Suzuki, M., Gerard, C. R. y Hei, T. K. 2002. Effects of irradiated médium with or without cells on bystander cell response. En: *Mutation Research* 499(2): 135-141.