



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MODULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR Nrf2 ANTE LA INTENSIDAD
DE UN RETO REDOX INDUCIDO CON ÁCIDO QUINOLÍNICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Q.F.B. CARLOS ALFREDO SILVA ISLAS

TUTOR PRINCIPAL
DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D. F. SEPTIMBRE, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

I. RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.	3
1.1. Enfermedades neurodegenerativas.	3
1.2. Excitotoxicidad.	5
1.3. Estrés oxidante.	13
1.4. Defensas en el cerebro ante el estrés oxidante.	21
1.5. Factor de transcripción Nrf2 y la vía Keap1/Nrf2/ARE.	26
1.6. Modelo del ácido quinolínico (QUIN).	38
2. JUSTIFICACIÓN.	42
3. HIPÓTESIS.	43
4. OBJETIVOS.	43
4.1. Objetivo general.	43
4.2. Objetivos particulares.	43
5. METODOLOGÍA.	44
5.1. Animales.	44
5.2. Reactivos.	44
5.3. Diseño experimental.	44
5.4. Administración del QUIN	45
5.5. Extractos nucleares.	46
5.6. Conducta de rotación.	47
5.7. Histología (H&E).	47
5.8. Neurodegeneración.	48
5.9. Activación del factor Nrf2.	48
5.10. Cuantificación de ERO.	50
5.11. Ensayo de lipoperoxidación.	51
5.12. Actividad enzimática.	51
5.12.1. Preparación de homogenados.	51
5.12.2. Actividad de la CAT.	52
5.12.3. Actividad de la GPx.	52

5.12.4.	Actividad de la GR.	53
5.12.5.	Actividad de la GST.	53
5.12.6.	Actividad de la G6PDH.	54
5.13.	Análisis estadístico.	54
6.	RESULTADOS.	55
6.1.	Conducta de rotación.	55
6.2.	Histología.	55
6.3.	Neurodegeneración.	60
6.4.	Activación del factor Nrf2.	63
6.5.	Cuantificación de ERO inducidas por la administración de QUIN.	67
6.6.	Lipoperoxidación.	68
6.7.	Actividad de enzimas antioxidantes	69
7.	DISCUSIÓN.	71
8.	CONCLUSIÓN.	83
9.	BIBLIOGRAFÍA.	84

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (No. de becario 276541) otorgada al alumno durante los estudios de posgrado.

Se agradece al Programa de Apoyo a los estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado al alumno para la asistencia al congreso internacional de la sociedad de neurociencias (Society for Neuroscience)

Este trabajo fue apoyado parcialmente por un proyecto del ICyTDF/229/2012.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Lucia y Valentín, y mis hermanos Pepe, Moy, Isrrael, Mariela y Angélica por su apoyo brindado para realizar mis estudios de Maestría.

A Jorge Alvarado por su paciencia, apoyo, compañía y comprensión en todo momento.

A la Dra. Perla Maldonado y a los miembros del comité tutor Dra. Ma. Elena Ibarra y Alejandro Zentella por los consejos y asesorías para poder desarrollar este proyecto.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Ricardo, Nara, Pepe, Ceci, Gus, Tania, Tere, Yesica, Jorge, Iván y a la Dra. Ma. Elena Chánez y Dra. Penélope por hacer muy agradable mi estadía en el laboratorio.

A mis Amigos Analí, Lalo, Piña y Agla por todo su apoyo.

I. RESUMEN.

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo de padecimientos que se caracterizan por una disfunción progresiva de la actividad cerebral, así como la pérdida lenta de células en distintas regiones del cerebro. A pesar de tener diferente etiología, comparten ciertos aspectos fisiopatológicos como: 1) la disfunción glutamatérgica, 2) la excitotoxicidad, 3) problemas para mantener la homeostasis del calcio, y 4) el estrés oxidante, los cuales promueven la muerte celular y con ello la neurodegeneración.

Para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas existen diversos modelos como el del ácido quinolínico (QUIN), una neurotoxina endógena análoga al glutamato, que al ser administrada en el estriado del cerebro, reproduce ciertas características bioquímicas y morfológicas de estos padecimientos, ya que sobreactiva los receptores NMDA (excitotoxicidad), produce un aumento del Ca^{2+} intracelular y estrés oxidante.

El estrés oxidante es un factor clave en la degeneración del tejido nervioso y la muerte neuronal y para contrarrestarlo, el cerebro cuenta con diversos mecanismos. Uno de ellos es la vía Keap1/Nrf2/ARE, que involucra la expresión de un conjunto de proteínas y enzimas de fase 2, así como enzimas antioxidantes, que juegan un papel importante en la detoxificación celular de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ERO/ERN) y especies electrofílicas.

La administración estriatal de 240 nmol de QUIN promueve un estado excitotóxico, aumenta la producción de ERO/ERN, aumenta la lipoperoxidación y disminuye la cantidad de Nrf2 en el núcleo; por lo tanto, en este trabajo se evaluó si la activación del factor Nrf2 depende de la intensidad del estímulo redox. Para ello, se caracterizó el daño inducido por la administración de dosis crecientes de QUIN (15, 30, 60, 120 y 240 nmol) mediante la evaluación de la conducta de rotación a los 6 días, el daño morfológico y la neurodegeneración a los 7 días post lesión con QUIN. Además, se midió la activación del factor Nrf2 a los 15 y 30 min, y a la 1, 3 y 24 h; los niveles de ERO/ERN y la lipoperoxidación a los 30 min; y la actividad

de enzimas antioxidantes catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST) y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) a las 6 h post lesión.

Al aumentar la dosis de QUIN los animales presentaron un mayor número de giros ipsilaterales a la lesión, lo cual fue secundario al daño histológico y el aumento en la neurodegeneración que se observó en los grupos con QUIN. En la activación de Nrf2 se observó que solo existe un incremento dosis-dependiente parcial a los 30 min, ya que a tiempos más largos se observa una disminución (1 y 3 h), regresando a niveles basales a las 24 h con cualquier dosis estudiada. Por otra parte, el tratamiento con QUIN incrementó el nivel de ERO a dosis bajas (15, 30 y 60 nmol) comparado con el control, mientras que dosis mayores (120 y 240 nmol) no mostraron cambios. En la lipoperoxidación se observó una disminución respecto al control con cualquier dosis de QUIN. Finalmente, la actividad de las enzimas antioxidantes mostró un ligero incremento para la CAT y la GST (QUIN 120 y 240 nmol) y un decremento para la GPx (QUIN 240 nmol).

En conclusión el daño morfológico, la neurodegeneración y la conducta de rotación inducidos por el QUIN muestra un efecto dosis-dependiente. Sin embargo, el insulto provocado por el QUIN solo aumenta la activación de Nrf2 a los 30 min a partir de la dosis de 30 nmol de QUIN, pero no responde de forma proporcional a los niveles de estrés y este incremento en la activación del factor no afecta de forma importante la actividad de las enzimas antioxidantes a las 6 h.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Enfermedades neurodegenerativas.

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo de padecimientos que se caracterizan por una disfunción progresiva de la actividad cerebral, así como la pérdida lenta de células en distintas regiones del cerebro. En estas enfermedades el tipo de células muertas y la localización depende del tipo de padecimiento, lo cual se ve reflejado en las características de la enfermedad. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer se ve comprometida la memoria, mientras que en la enfermedad de Parkinson es el movimiento [Double et al., 2010]. Estas enfermedades tienen diferente etiología; ya que, varias regiones del cerebro presentan una degeneración progresiva y diferentes tipos celulares van muriendo. Sin embargo, comparten mecanismos de daño como: disfunción glutamatérgica, excitotoxicidad, problemas para mantener la homeostasis de Ca^{2+} , activación de la sintasa de óxido nítrico (SON) ó generación de radicales libres que provocan daño al DNA, proteínas y lípidos, promoviendo la muerte celular y conduciendo así a la neurodegeneración progresiva del tejido cerebral [Mehta et al., 2013].

El estudio de las enfermedades neurodegenerativas y las alternativas farmacológicas para estos padecimientos son de suma importancia, ya que uno de los principales factores de riesgo en estas enfermedades es la edad. Actualmente, un incremento en la esperanza de vida ha propiciado un incremento en las enfermedades neurodegenerativas; ya que estas enfermedades son más comunes en personas de edad avanzada [Peden & Ironside, 2012].

En México las muertes ocasionadas por las enfermedades neurodegenerativas van en aumento. El INEGI en el 2011 reportó que las enfermedades del sistema nervioso representaron la doceava causa de muerte, con un total de 10,194 muertes (Figura 1A). Dentro de esta categoría se encuentran las enfermedades neurodegenerativas, que en ese mismo año representaron aproximadamente el 27.6% de las muertes (con un total de 2814 muertes). Es importante observar como las muertes asociadas a las enfermedades neurodegenerativas van

incrementando con los años (Figura 1B) y es de esperarse, ya que al envejecer la población mexicana, se irán incrementando el número de casos.

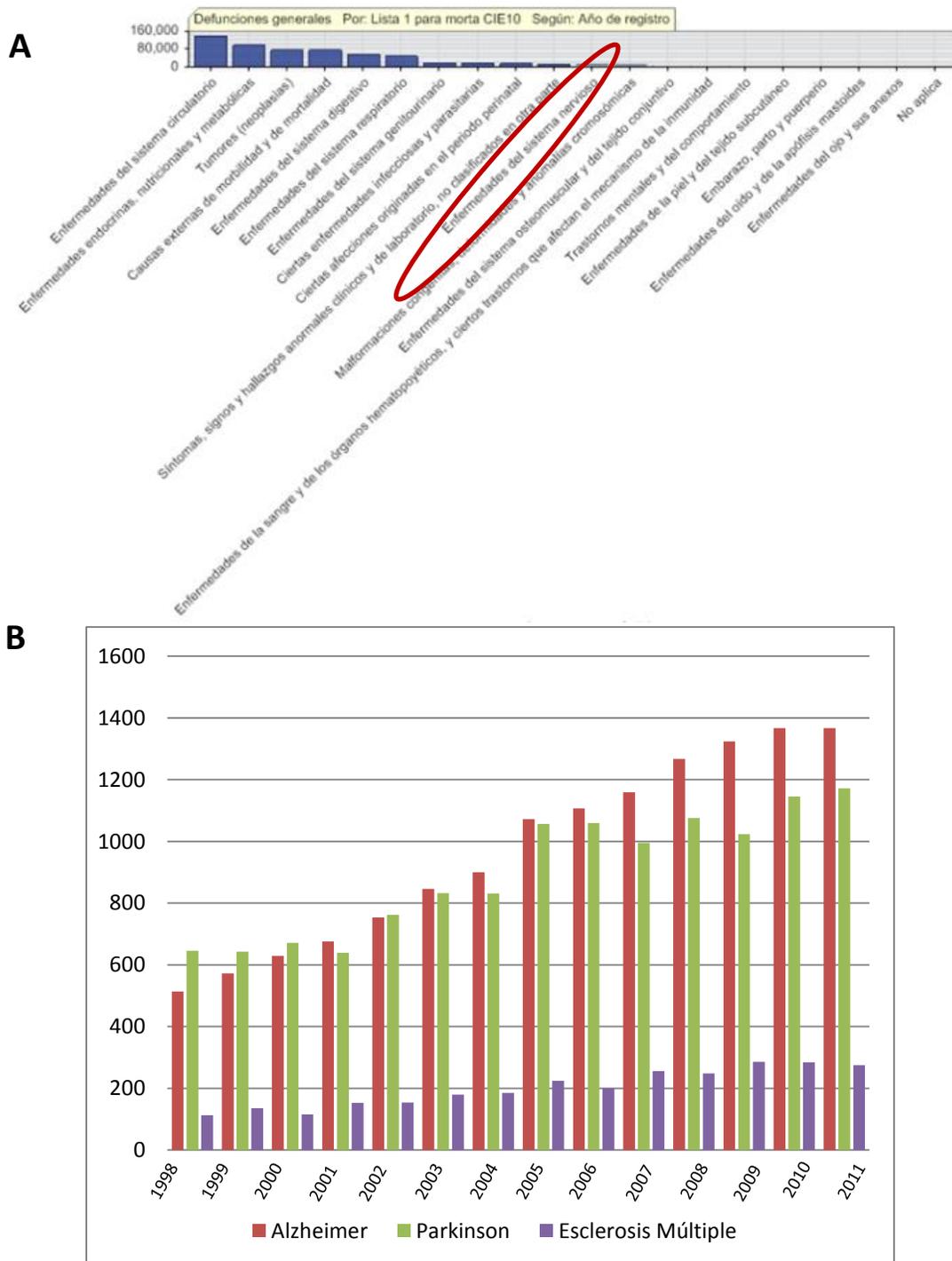


Figura 1. Causas de mortalidad en México. En **A** se observan las principales causas de muerte, siendo la doceava causa las enfermedades del sistema nervioso. En **B** se muestra la mortalidad asociada a las principales enfermedades neurodegenerativas en el periodo comprendido de 1998 a 2011 [INEGI, 2011].

1.2. Excitotoxicidad.

El glutamato es el aminoácido neurotransmisor excitatorio mayoritario en mamíferos, que en condiciones fisiológicas su concentración en el espacio extracelular se mantiene en un rango de 2 μM [Mehta et al., 2007]. Este aminoácido es responsable de la señalización postsináptica mediante la activación de los receptores ionotrópicos [Tapia et al., 1999] y metabotrópicos [Chiechio & Nicoletti, 2011; Gerber et al., 2007].

Los receptores a glutamato ionotrópicos se dividen en tres tipos de acuerdo a su agonista farmacológico selectivo: los NMDA, tienen como agonista al N-metil-D-aspartato (NMDA); los AMPA, al ácido α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA); y los kainato, al ácido kaínico. Estos dos últimos receptores también se clasifican como receptores no NMDA [Nakanishi, 1992]. Los receptores NMDA al ser activados permiten el flujo de Ca^{2+} y Na^+ hacia el citoplasma, mientras que los receptores no NMDA provocan un aumento intracelular de Na^+ y provocan la despolarización de la membrana plasmática [Estrada-Sánchez et al., 2008]. Por otra parte, los receptores a glutamato metabotrópicos están acoplados a proteínas G. Se han identificado 8 receptores, mGluR1s al mGluR8s y se dividen en 3 grupos de acuerdo a las vías de señalización que activan (Tabla 1) [Chiechio & Nicoletti, 2011].

Tabla 1. Clasificación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato.

Receptores a Glutamato				
Receptores Ionotrópicos		Receptores Metabotrópicos		
Nombre	Efecto	Nombre	Tipo	Efecto
NMDA	Aumento de Ca^{2+} y Na^+ .	mGluR1s	Tipo I	Activan la fosfolipasa C (PKC)/aumentan el Ca^{2+} .
AMPA	Aumento de Ca^{2+} y Na^+ .	mGluR5s		
Kainato	Aumento de Na^+ .	mGluR2s	Tipo II	Inhiben la adenilato ciclasa/ disminuyen el AMPc
		mGluR3s		
		mGluR4s	Tipo III	Inhiben la adenilato ciclasa/ disminuyen el AMPc
		mGluR6s		
		mGluR7s		
		mGluR8s		

El receptor NMDA constituye la mayor clase de receptores a glutamato en el cerebro de mamíferos y se localiza en la membrana postsináptica de las sinapsis excitatorias [Hynd et al., 2004]. Los receptores NMDA son estructuras heterotetraméricas formadas por 7 subunidades: NR1, NR2A-D y NR3A y B. La subunidad NR1 es codificada por un gen que puede producir 8 proteínas diferentes por splicing alternativo; mientras que las demás subunidades, son codificadas por genes diferentes. Para que sean funcionales estos receptores, deben tener en su estructura dos subunidades NR1 y dos subunidades NR2 (NR2A-D) o dos subunidades NR3 (NR3A o B). En la subunidad NR1 se encuentra un residuo de asparagina (N598), que interacciona con un átomo de Mg^{2+} lo que bloquea el canal de Ca^{2+} y controla así la permeabilidad de este ion a través del receptor. La interacción del Mg^{2+} con la asparagina es dependiente de voltaje. También este receptor es bloqueado por Zn^{2+} de forma dependiente de voltaje, aunque este bloqueo es más débil que el producido por el Mg^{2+} . Por otra parte, este receptor es inhibido por H^+ . En la subunidad NR1 existe un residuo de lisina (K 211) que es responsable de la modulación del receptor NMDA por efecto del pH. Además, este receptor tiene un sitio de unión a poliaminas como putresina, espermidina y espermina. La unión con poliaminas puede activar o inhibir al

receptor, y esto depende del tipo de subunidad NR1 que se encuentre formando al receptor. Finalmente, el receptor NMDA tiene un sitio de unión a glicina, que funciona como coactivador. De hecho, para que el receptor se active, necesita de la unión de glicina y glutamato (Figura 2) [Arundine & Tymianski, 2003; Hynd et al., 2004; Nakanishi, 1992].

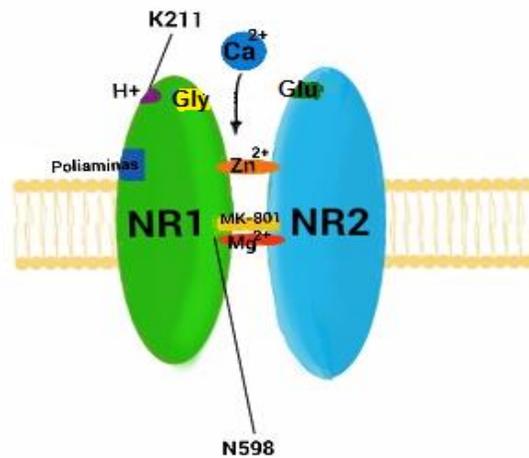


Figura 2. Receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). El receptor NMDA es un canal de Ca^{2+} activado por glutamato (Glu). La subunidad NR1 y NR2 son requeridas para que el receptor sea funcional. En la subunidad NR1 se encuentra 1) el sitio de unión a poliaminas; 2) la lisina 211 (K211), que es importante en la modulación del receptor por efecto del pH; 3) el sitio de unión a glicina (Gly), que es el co-activador del receptor; y 4) la arginina 598 (R598), que es el sitio de interacción con el Mg^{2+} , molécula que bloquea al receptor, de forma voltaje dependiente. En la subunidad NR2 se localiza: 1) el sitio de unión a glutamato, un agonista del receptor NMDA; 2) el sitio de unión al Zn^{2+} que al igual que el Mg^{2+} bloquea el canal de Ca^{2+} ; y 3) el sitio de unión al MK-801, una molécula sintética que es un antagonista farmacológico del receptor NMDA y bloquea el receptor.

Los receptores AMPA son estructuras heterotetraméricas compuestas por las subunidades GluR1-4. En el sistema nervioso central (SNC) las subunidades GluR1-3 están ampliamente distribuidas y el RNAm que codifica para estas proteínas presenta procesos de splicing alternativo, produciendo una gran variedad de subtipos de receptores. Estos receptores presentan gran afinidad por el glutamato y el AMPA. La mayoría de los recetores AMPA son permeables a Na^+ y algunas isoformas son permeables a Ca^{2+} , debido al proceso de splicing alternativo en la subunidad GluR2. El RNAm de la subunidad GluR2 codifica para

una glutamina, mientras que, si el RNAm es editado (splicing alternativo), la subunidad GluR2 tendrá una arginina, y la presencia de este aminoácido vuelve al receptor impermeable a Ca^{2+} [Arundine & Tymianski, 2003; Higuchi et al., 1993; Sommer et al., 1991].

El glutamato es responsable de la neurotransmisión sináptica rápida, participa en procesos de memoria, aprendizaje, plasticidad y muerte neuronal [Shigeri et al., 2004]. Este neurotransmisor es liberado de las vesículas, de forma Ca^{2+} dependiente, hacia el espacio sináptico por la neurona presináptica. Una vez en el espacio sináptico, el glutamato activa tres tipos de receptores, los NMDA, los no-NMDA y los metabotrópicos. La activación de los receptores no-NMDA (AMPA) produce un flujo de Na^+ hacia el citoplasma de la neurona postsináptica, despolarizando la membrana y activando los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, produciendo un flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula, ayudando a la despolarización de la membrana. La despolarización de la membrana plasmática provoca la remoción del Mg^{2+} que bloquea al receptor NMDA. Una vez que el Mg^{2+} ha salido del canal, el glutamato y la glicina se unen al receptor y lo activan, permitiendo el flujo de Ca^{2+} y Na^+ al citoplasma de la neurona. Por otra parte, la activación de los receptores metabotrópicos, mediada por el glutamato, provoca la producción de inositol-3-fosfato (IP_3), que libera Ca^{2+} del retículo endoplásmico (Figura 3) [Estrada-Sánchez et al., 2008].

El Ca^{2+} es un importante mensajero intracelular que controla diversas funciones celulares como la diferenciación y el crecimiento, la excitabilidad de la membrana, la exocitosis y la actividad sináptica, por lo tanto, su concentración intracelular, debe estar regulada finalmente. En condiciones normales, la concentración de Ca^{2+} libre es alrededor de 100 nM [Arundine & Tymianski, 2003]. Las neuronas tienen mecanismos para mantener la concentración de Ca^{2+} intracelular, este ion está regulado por la apertura de canales permeables a Ca^{2+} presentes en la membrana celular y la membrana de algunos organelos [Zündorf & Reiser, 2011]; sin embargo, cuando alguno de los procesos de regulación llega a fallar, el aumento de Ca^{2+} lleva a la célula a una activación inapropiada de los procesos

dependientes de Ca^{2+} , causando trastornos metabólicos y eventualmente llevando a la muerte celular (Figura3) [Arundine & Tymianski, 2003].

Al incrementar el Ca^{2+} intracelular, las neuronas lo remueven a través de bombas e intercambiadores de Ca^{2+} . La ATPasa de Ca^{2+} presente en la membrana celular juega un papel importante en la homeostasis de Ca^{2+} , del mismo modo el antiportador de Ca^{2+} /cationes y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ tienen gran importancia en la regulación de la concentración de Ca^{2+} . Por otra parte, la mitocondria y el retículo endoplásmico son dos organelos importantes en la regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular. En la mitocondria el intercambiador de $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ y en el retículo endoplásmico la ATPasa de Ca^{2+} son clave en la regulación de los niveles intracelulares de este catión (Figura 3) [Zündorf & Reiser, 2011].

La regulación de la concentración del glutamato en el espacio sináptico debe estar regulada; ya que este neurotransmisor, provoca un incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular. La regulación de este neurotransmisor es llevada a cabo en gran parte por transportadores dependientes de Na^+ dentro de los cuales se encuentran el EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 y EAAT5. Estos transportadores se expresan en neuronas (EAAT3, 4 y 5) y en astrocitos (EAAT 1 y 2) [Camacho & Massieu, 2006; Hazel, 2007]; sin embargo, los que se localizan en astrocitos (células del sistema nervioso central encargadas de dar sostén a las neuronas) son lo que tienen la mayor función de aclaramiento de glutamato del espacio sináptico. El transporte de glutamato hacia el citoplasma del astrocito se lleva a cabo junto con 2 moléculas de Na^+ al interior del astrocito, mientras que es transportada una molécula de K^+ al exterior. La actividad de este transportador depende del gradiente de concentración de Na^+ , el cual es generado por la ATPasa Na^+/K^+ [Camacho & Massieu, 2006] por lo tanto es un proceso dependiente de ATP (Figura 3) [Anderson & Swanson, 2000].

Posterior a la recaptura de glutamato por el astrocito, este neurotransmisor es metabolizado a glutamina por la glutamina sintetasa de astrocitos, en un proceso dependiente de ATP. Los astrocitos liberan la glutamina al espacio extracelular

mediante un simporte de Na^+ -glutamina y un antiporte de H^+ , llamado sistema N. La glutamina es capturada por las neuronas glutamatérgicas mediante un simporte de Na^+ -glutamina llamado sistema A. Estas neuronas transforman la glutamina en glutamato mediante la enzima glutaminasa activada por fosfato y posteriormente el glutamato es almacenando en vesículas para su uso como neurotransmisor (Figura 3) [Bak et al., 2006].

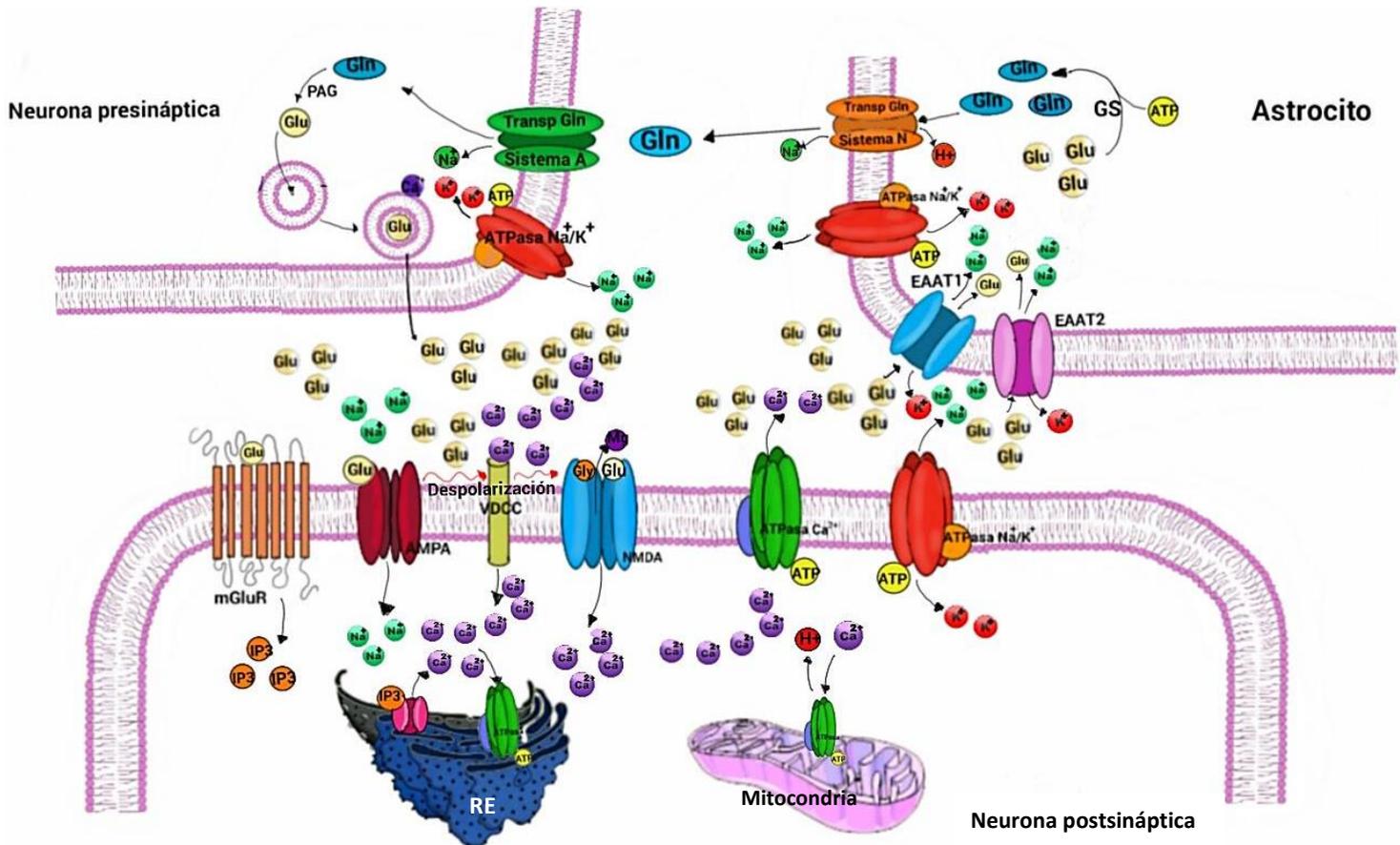


Figura 3. Sinapsis glutamatérgica. El glutamato (Glu) es liberado de la neurona presináptica en un proceso dependiente de Ca^{2+} , una vez liberado al espacio sináptico se une a los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), a los receptores de α -ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) y a los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), provocando la activación del receptor mGluR, favoreciendo la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y con ello la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE). También provoca la activación del receptor AMPA que produce un flujo de Na^+ hacia el interior de la neurona postsináptica, despolarizando la membrana y consecuentemente activando los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC). Esto aumenta la despolarización de la membrana de la neurona postsináptica y remueve al magnesio (Mg^{2+}) del receptor NMDA, activándolo, previa unión de la glicina (Gly) al receptor y permitiendo el flujo de Ca^{2+} hacia el citoplasma. El aumento intracelular de Ca^{2+} es regulado por el RE, la mitocondria y la ATPasa de Ca^{2+} membranar. La ATPasa de Na^+/K^+ restablece los niveles de Na^+ y potasio (K^+) y con ello el potencial de membrana. Los astrocitos remueven el glutamato del espacio sináptico, en un proceso dependiente de Na^+ y K^+ , mediante los transportadores de aminoácidos excitatorios 1 (EAAT1) y 2 (EAAT2). El astrocito metaboliza el glutamato a glutamina (Gln) con la glutamina sintetasa (GS), en un proceso dependiente de adenosin trifosfato (ATP), y libera la glutamina al espacio extracelular donde la neurona presináptica la captura y la metaboliza a glutamato con la enzima glutaminasa activada por fosfato. Finalmente, el glutamato es empaquetado en vesículas.

Como se mencionó anteriormente, la regulación de la concentración de glutamato en el espacio sináptico es de suma importancia, ya que un aumento de este neurotransmisor en el espacio sináptico, puede llevar a las neuronas a un proceso excitotóxico. La excitotoxicidad se define como el mecanismo que lleva a la muerte celular, debido a la sobreestimulación de los receptores a glutamato, principalmente el subtipo NMDA. Al activarse estos receptores, permiten la entrada de Ca^{2+} a las células, activando diversas enzimas, como lipasas, proteasas, fosfatasas y nucleasas, que en conjunto provocan la muerte neuronal, [Camacho & Massieu, 2006]. Por otra parte, los receptores no NMDA (AMPA y kainato), también están implicados en el proceso excitotóxico, ya que aumentan la permeabilidad del Na^+ , aunque se ha demostrado que algunas isoformas, también permiten la entrada de Ca^{2+} [Tapia et al., 1999].

Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer la producción de ATP disminuye y por lo tanto, todos los procesos que dependen de esta molécula se ven comprometidos. Al disminuir la producción de ATP, no se pueden mantener los gradientes iónicos de las células provocando una despolarización de las neuronas, aumentando la liberación de glutamato al espacio sináptico y favoreciendo así la activación de los receptores a glutamato. Por otra parte, en los astrocitos al disminuir la producción de ATP, disminuye la actividad de la bomba Na^+/K^+ y aumenta la entrada de Na^+ al astrocito, provocando que se revierta el transporte de glutamato, es decir, los astrocitos en vez de capturar el glutamato del espacio sináptico, lo liberan al mismo aumentando la concentración del glutamato y sobreactivando los receptores NMDA (Figura 4) [Anderson & Swanson, 2000; Hazel, 2007; Mattson & Chan, 2003; Nedergaard & Dirnagl, 2005].

La excitotoxicidad es uno de los principales mecanismos que conllevan a la generación de estrés oxidante y una disfunción en la homeostasis del Ca^{2+} y con ello a la neurodegeneración y muerte del tejido neuronal [Mehta et al., 2013]; por ello, el uso de moléculas análogas al glutamato como mecanismo excitotóxico para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas y la evaluación de

moléculas con posibles efectos terapéuticos en estos padecimientos, ha sido muy utilizada.

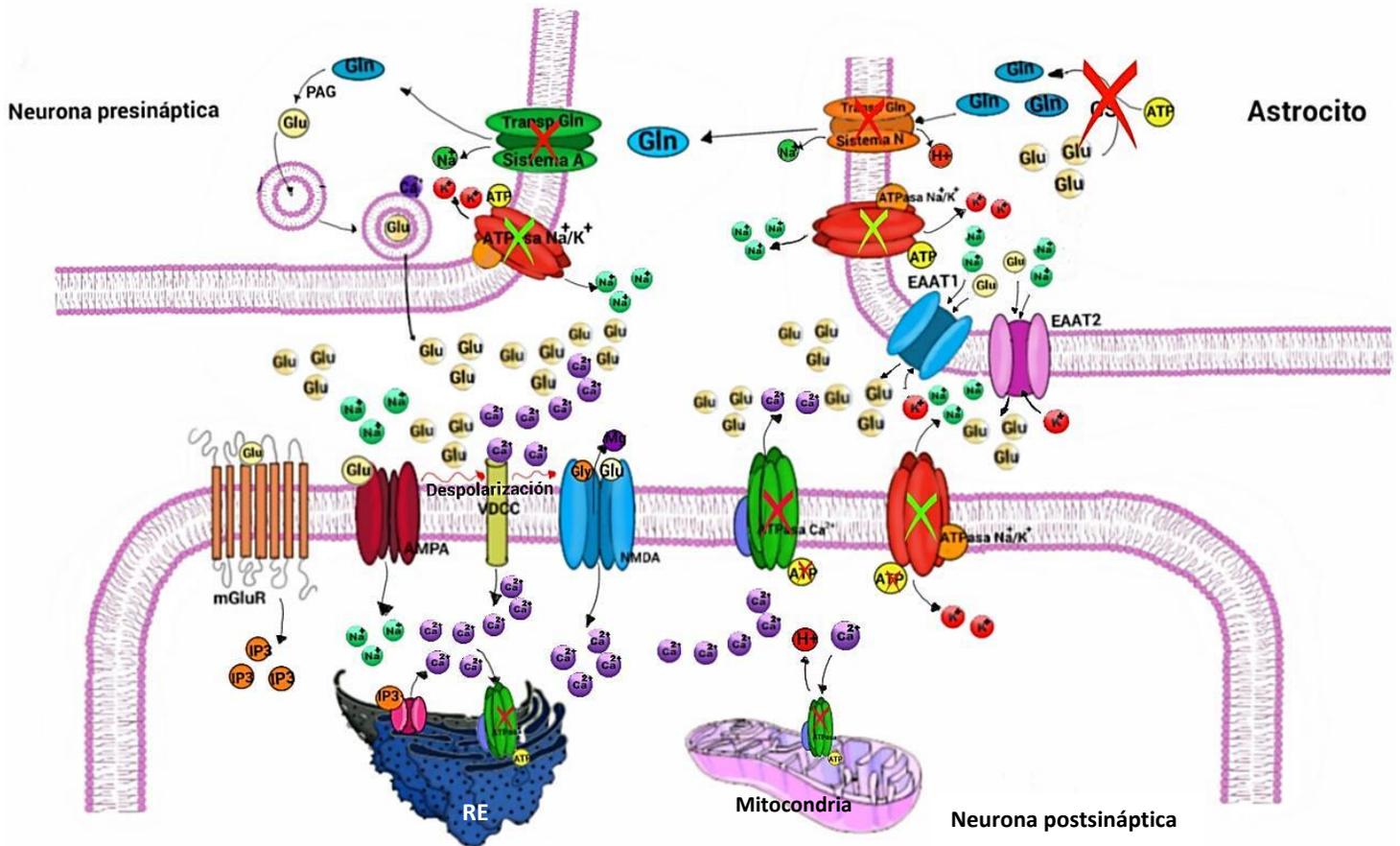


Figura 4. Proceso excitotóxico. En el proceso excitotóxico hay una liberación excesiva de glutamato (Glu), lo cual produce una sobreactivación de los receptores a glutamato. La activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) produce un aumento de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), provocando un aumento en la liberación de calcio (Ca²⁺) del retículo endoplásmico. Por otra parte, la activación de los receptores de ácido α-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) provoca una despolarización de la membrana, activando los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (VDCC), lo que favorece la despolarización de la membrana y un aumento del Ca²⁺ intracelular. La despolarización de la membrana provoca que el magnesio (Mg²⁺) que bloquea al receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), salga del canal permitiendo la entrada masiva de Ca²⁺. Un aumento intracelular de Ca²⁺ provoca un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN), así como la disminución del adenosin trifosfato (ATP), debido a la disrupción de la cadena transportadora de electrones. Estas condiciones provocan que los sistemas que remueven el Ca²⁺ intracelular fallen (marcados con cruces), provocando una acumulación de Ca²⁺ en el citoplasma. Por otra parte, durante el proceso excitotóxico, la producción de ATP se ve comprometida en los astrocitos, provocando que los transportadores de aminoácidos excitadores 1 (EAAT1) y 2 (EAAT2) no remuevan al glutamato del espacio sináptico, debido a que se necesita un gradiente de sodio (Na⁺). Este gradiente está dado por la bomba de Na⁺/K⁺, pero al disminuir el ATP, esta ATPasa no funciona adecuadamente (marcado con cruces) provocando un transporte reverso de los transportadores EAAT1 y EAAT2, es decir liberan Glu al espacio sináptico, debido a que la concentración de Na⁺ es mayor en el espacio extracelular. Finalmente el metabolismo de Glu a glutamina (Gln) en el astrocito también se encuentra comprometido debido a que es un proceso dependiente de ATP. Glutaminasa activada por fosfato (PAG), Glutamina sintetasa (GS).

1.3. Estrés oxidante

El oxígeno (O_2) es requerido en el metabolismo energético, para la supervivencia celular y para las funciones normales de la mayoría de los organismos eucariontes. Durante el metabolismo energético, el O_2 puede ser parcialmente reducido en una baja proporción a anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), un radical libre que puede convertirse en otras especies oxidantes llamadas especies reactivas de oxígeno (ERO). Por otra parte, durante el metabolismo celular también se pueden generar otras especies oxidantes derivadas de nitrógeno, llamadas especies reactivas de nitrógeno (ERN). Algunas ERO y ERN a bajas concentraciones, juegan un papel importante en la célula a nivel fisiológico, ya que están involucradas en diversas vías de señalización que controlan la supervivencia, la migración y la proliferación celular. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) está involucrado en la activación de Akt, una cinasa que participa en la supervivencia celular al inhibir proteínas pro-apoptóticas. Las ERO también pueden activar proteínas cinasas activadas por mitógeno, las cuales están involucradas en la proliferación celular. Sin embargo, un aumento descontrolado en estas especies oxidantes puede llevar a la célula a un estado de estrés oxidante [Li et al., 2013].

El estrés oxidante se define como la condición en la cual ocurre un desbalance entre los eventos oxidativos y las defensas antioxidantes, ya sea por la pérdida de los agentes reductores y/o enzimas antioxidantes o por un incremento en la producción de especies oxidantes, provocando un daño potencial al organismo [Bains & Shaw, 1997; Lakhan et al., 2009].

Las ERO y ERN pueden ser clasificadas en especies radicales y no radicales. Un radical libre es un átomo o grupos de átomos que contiene uno o más electrones desapareados y es capaz de existir de forma independiente [Kohen & Nyska, 2002; Miranda, 2008]; mientras que los no radicales, son moléculas que no tienen electrones desapareados, sin embargo, son especies que no están reducidas completamente y por lo tanto son extremadamente reactivas [Kohen & Nyska, 2002].

En condiciones normales, las células están expuestas a una gran variedad de ERO/ERN de forma endógena y exógena (Tabla 2). Entre las fuentes exógenas se encuentran la radiación ultravioleta, algunos alimentos, medicamentos, etc. [Kohen & Nyska, 2002]; mientras que dentro de las fuentes endógenas, se encuentran algunos organelos y oxidasas (Tabla 2) [Dasuri et al., 2013].

Tabla 2. Principales fuentes exógenas y endógenas de ERO y ERN.

Exógenas	Endógenas
Quimioterapia	Mitocondria
Medicamentos	Retículo endoplásmico
Agentes infecciosos	NADPH oxidasa
Radiación (UV)	Sintasa de óxido nítrico
Estrés	Xantina oxidasa
Elementos tóxicos	Peroxisomas
Xenobioticos	Ciclooxigenasa
Radiación ionizante	Lipooxigenasa
	Membrana plasmática
	Citocromo P450

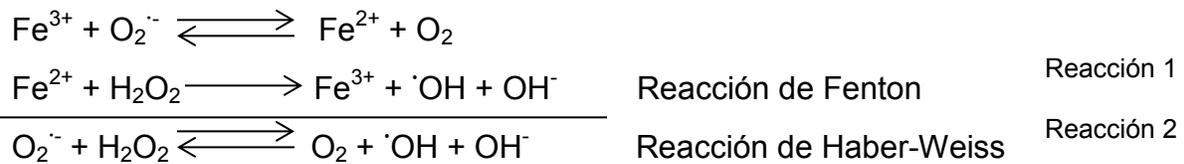
Las principales ERO que participan activamente en el estrés oxidante son (Tabla 3): el ozono (O_3), oxígeno singulete (1O_2) que se produce por la excitación de uno de los electrones desapareados del O_2 , el $O_2^{\cdot-}$ y las especies parcialmente reducidas como el H_2O_2 y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Por otra parte, el O_2 también puede formar compuestos con nitrógeno que son más reactivos que el O_2 en su estado basal. Dentro de estas especies se encuentran el óxido nítrico ($\cdot NO$), el radical dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}) y el peroxinitrito ($ONOO^-$), estas últimas son conocidas como ERN [Hansberg-Torres, 2008].

Tabla 3. Principales ERO y ERN que se producen activamente durante un estado de estrés oxidante.

Nombre	Símbolo
Anión superóxido	$O_2^{\cdot-}$
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	$\cdot OH$
Radical peroxilo	$\cdot OOR$
Oxígeno singulete	1O_2
Ozono	O_3
Óxido nítrico	$\cdot NO$
Radical dióxido de nitrógeno	$NO_2\cdot$
Peroxinitrito	$ONOO\cdot$
Nitroxilo	HNO
Radical nitrato	$NO_3\cdot$
S-nitrosotiol	RSNO
Monóxido de carbono	CO

La principal fuente endógena de ERO es la mitocondria debido a la fuga de electrones durante su transporte en la cadena respiratoria. La producción de ERO en la mitocondria ocurre por la reducción parcial del O_2 formando $O_2^{\cdot-}$. En condiciones fisiológicas del 1 al 5% del O_2 es convertido en $O_2^{\cdot-}$ y se calcula que la mitocondria produce del 60 al 90% de las ERO totales producidas en las células. La producción de ERO en la mitocondria ocurre en el complejo I y III, siendo este último la mayor fuente de ERO [Dasuri et al., 2013; Guo et al., 2013; Konigsberg, 2008a]. El $O_2^{\cdot-}$ es precursor de ERO como el H_2O_2 , el $\cdot OH$, el HClO y el radical peroxilo ($\cdot OOH$). En la mitocondria, el $O_2^{\cdot-}$ es sustrato de la superóxido dismutasa (SOD), produciendo H_2O_2 . El H_2O_2 puede ser convertido rápidamente en $\cdot OH$ en presencia de Fe^{2+} o Cu^{2+} , a través de la reacción de Fenton (Reacción 1). Por otra parte, el $\cdot OH$ también se puede formar a partir de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 mediante la reacción de Haber-Weiss (Reacción 2) [Jomova et al., 2010]. La producción de ERO en la

mitocondria no solo está asociada a la cadena transportadora de electrones, también existen enzimas en la matriz mitocondrial que participan en la producción de ERO, como son la α -lipoamida deshidrogenasa, la fracción del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa y las flavoproteínas que transfieren electrones en la β -oxidación [Dasuri et al., 2013; Zsurka & Kunz, 2013].



Los peroxisomas son otra fuente endógena de ERO, los cuales producen H_2O_2 a partir de O_2 . La NADPH oxidasa (NOX) es un complejo enzimático y es la única vía enzimática en el cerebro que se encarga de producir ERO. La NOX genera $\text{O}_2^{\cdot-}$ a través de la transferencia catalítica de electrones del NADPH al O_2 . La xantina oxidasa es una enzima importante en el catabolismo de las purinas y es otra fuente importante de ERO, ya que durante el metabolismo de la xantina a ácido úrico produce como metabolito secundario al $\text{O}_2^{\cdot-}$. Por otra parte el sistema redox de la membrana plasmática (PMSR) participa en la producción de ERO, es una cadena transportadora de electrones que transfiere electrones de donadores intra o extracelulares a receptores extracelulares y está involucrado en el estrés oxidante asociado a la membrana. También el citocromo P450 está involucrado en la producción de ERO [Dasuri et al., 2013; Konigsberg, 2008b,c,d].

La producción de ERN está asociada a la actividad enzimática de la sintasa de óxido nítrico (SON). Esta enzima cataliza la oxidación de la L-arginina produciendo L-citrulina y $\cdot\text{NO}$. El $\cdot\text{NO}$ es una molécula señalizadora que juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmune, modula el flujo sanguíneo a través de la vasculatura y actúa como neurotransmisor. Esta molécula tiene un tiempo de vida media muy corto y forma rápidamente especies más reactivas

como el $\cdot\text{NO}_3$ y el $\cdot\text{NO}_2$. También el $\cdot\text{NO}$ puede reaccionar con el $\text{O}_2\cdot^-$ y formar una especie reactiva más tóxica, el ONOO^- la cual a pH fisiológico se descompone a $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ (Reacción 3) [Dasuri et al., 2013]



La producción de ERO/ERN provoca daño a las células en los diversos componentes celulares y altera muchas funciones. Dentro de los principales blancos se encuentran las proteínas, los lípidos y el ADN. Por ejemplo, el daño a proteínas por acción de las ERO/ERN incluye: peroxidación; oxidación de residuos de cisteínas, provocando la interacción entre proteínas que normalmente no se llevan a cabo y produciendo una disfunción protéica; cambios en la estructura terciaria; degradación; y fragmentación, lo cual produce pérdida de la actividad enzimática, alteración de las funciones celulares como la producción de energía, interferencia con la generación de los potenciales de membrana, etc. [Kohen & Nyska, 2002]. Por otra parte, las ERO/ERN pueden dañar el ADN produciendo modificaciones en las bases nitrogenadas y produciendo moléculas como la 8-hidroxiadenina, la 8-hidroxideoxiguanosina, la 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotiamina y lesiones que provocan la apertura de los anillos de las bases nitrogenadas formando moléculas como la 4,6-diamino-5-formamidopirimidina y la 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina. El daño al ADN provoca mutaciones, inestabilidad de microsátélites, problemas en la unión de factores de transcripción, transformaciones carcinogénicas, envejecimiento celular e incluso, si no es reparado, puede llevar a la muerte celular. Por otro lado, el ARN también es vulnerable a la oxidación por ERO/ERN produciendo errores en la traducción de proteínas y una desregulación en la expresión génica [Li et al., 2013; Medeiros, 2008]. Finalmente, el daño ocasionado a los lípidos de las membranas (lipoperoxidación) genera diversos compuestos tóxicos para la célula y altera la fluidez y la permeabilidad membranal. Además, las ERO/ERN pueden modificar la

actividad de las proteínas, enzimas, receptores y canales iónicos asociados a las membranas, situación que compromete la estructura y la función celular [Zenteno-Savin & Saldaña-Balmori, 2008]. Por ejemplo, el $\cdot\text{OH}$ favorece la formación de malondialdehído y 4-hidroxineonanal, esta última molécula puede modificar covalentemente a cisteínas, lisinas e histidinas mediante la adición de Michael, provocando modificaciones y pérdida de la función de enzimas como la ATPasa, el transportador de glucosa GLUT3 y en el caso de los astrocitos, pérdida de la función del transportador GLT1 [Li et al., 2013].

El cerebro es particularmente susceptible al estrés oxidante ya que representa el 2.5% del peso del organismo, es responsable del 25% del metabolismo basal [Lee et al., 2000] y utiliza el 20% del O_2 total consumido por el cuerpo. Además, existen regiones del cerebro con altas concentraciones de hierro, lo cual favorece la producción de ERO; tiene gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, lo que favorece la lipoperoxidación; y tiene un bajo contenido de defensas antioxidantes comparado con otros órganos como el hígado o riñón [Margaill et al., 2005].

El aumento intracelular de Ca^{2+} por la sobrestimulación de los receptores NMDA provoca un flujo excesivo de Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial, provocando disfunción mitocondrial y la activación de señales de muerte celular. Durante el proceso de disfunción mitocondrial ocurren los siguientes eventos: 1) el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones, favoreciendo así la producción de ERO a través de los complejos I y III; 2) activación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, lo que provoca la pérdida del potencial de membrana mitocondrial; 3) hinchamiento de la matriz mitocondrial; y 4) ruptura de la membrana externa mitocondrial, seguido de la liberación del Ca^{2+} mitocondrial hacia el citoplasma y la liberación de proteínas pro-apoptóticas (citocromo c). La pérdida del potencial de membrana favorece la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ que a su vez es metabolizado a H_2O_2 por la SOD. El H_2O_2 puede atravesar la membrana mitocondrial y actuar en el citoplasma, oxidando diferentes moléculas [Pivovarova & Andrews, 2010]; además como ya se mencionó en presencia de Fe^{2+} o Cu^{2+} se favorece la producción de $\cdot\text{OH}$, el cual oxida lípidos de membrana

favoreciendo la producción de 4-hidroxi-neonenoal, un producto tóxico de la lipoperoxidación [Dalleau et al., 2013].

En el citoplasma, el aumento de Ca^{2+} provoca la estimulación de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) promoviendo la cascada del ácido araquidónico. La PLA_2 cataliza la hidrólisis de glicerofosfolípidos de la membrana promoviendo la formación de ácido araquidónico, que es metabolizado a prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos por la acción de la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa, estas dos enzimas ocupan directamente el O_2 y producen $\text{O}_2^{\cdot-}$. La ciclooxigenasa cataliza la adición de dos moléculas de O_2 al ácido araquidónico produciendo prostaglandina PGG_2 que a su vez, es peroxidada rápidamente a prostaglandina PGH_2 con la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ [Bondy & LeBel, 1993; Coyle & Puttfarcken, 1993; Hsieh & Yang, 2013; Moro et al., 2005]. Por otra parte, en condiciones normales, la xantina deshidrogenasa oxida a la xantina e hipoxantina a ácido úrico con el uso de NAD^+ como aceptor de electrones; sin embargo, al aumentar la concentración de Ca^{2+} intracelular, la xantina deshidrogenasa es metabolizada en xantina oxidasa mediante la calpaína en un proceso dependiente de Ca^{2+} , provocando que la xantina oxidasa metabolice a la hipoxantina en ácido úrico con la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Figura 5) [Coyle & Puttfarcken, 1993; Love, 1999; Moro et al., 2005].

Durante el proceso excitotóxico, la producción de $\cdot\text{NO}$ ocurre a través de la SON. Actualmente se conocen tres isoformas de esta enzima, dos de las cuales son dependientes de la unión de Ca^{2+} /calmodulina, la neuronal (nSON) y la endotelial (eSON), que se activan por un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} tal como ocurre durante la excitotoxicidad [Rodrigo et al., 2005] y la inducible (iSON) independiente de Ca^{2+} .

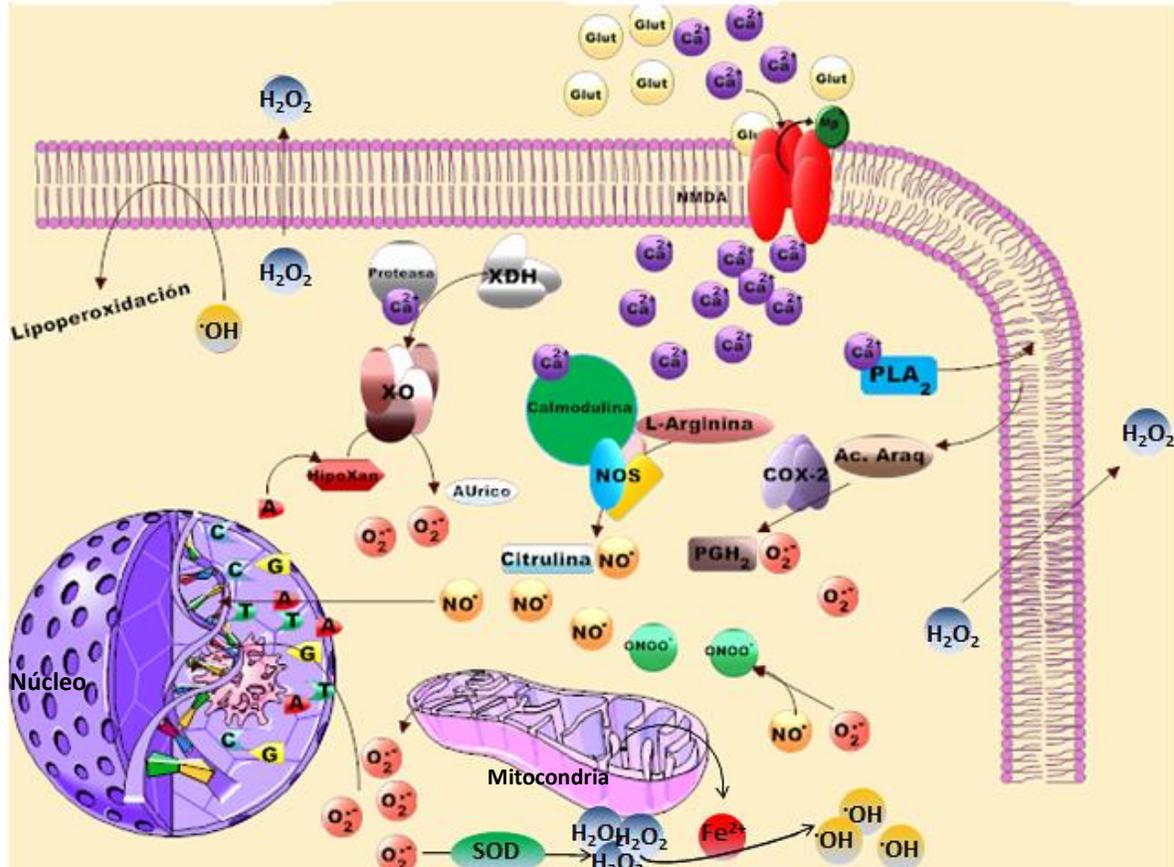


Figura 5. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) como consecuencia del proceso excitotóxico. La sobreactivación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) produce un incremento intracelular de calcio (Ca^{2+}), provocando la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} que producen ERO y ERN. La activación de la sintasa de óxido nítrico neuronal (nSON) depende de la unión de Ca^{2+} -Calmodulina, provocando el metabolismo de la L-arginina a L-citrulina con la producción de radical óxido nítrico (NO^{\bullet}). Por otra parte, la fosfolipasa A_2 (PLA_2) depende de la unión de Ca^{2+} para metabolizar glicerofosfolípidos de membrana, produciendo ácido araquidónico (AA), el cual es sustrato de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), enzima que produce prostaglandina H_2 (PGH_2) y radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Además, el aumento de Ca^{2+} intracelular provoca que la xantina deshidrogenasa (XDH) sea metabolizada por la calpaína produciendo xantina oxidasa (XO), que metaboliza la hipoxantina a ácido úrico con la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Por otra parte, el aumento de Ca^{2+} intracelular provoca que la mitocondria, para mantener la homeostasis de Ca^{2+} , aumente el almacenamiento de este ion, provocando una disrupción en la cadena transportadora de electrones, favoreciendo así un aumento de la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$, el cual es metabolizado por la superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que en presencia del ion ferroso (Fe^{2+}) se transforma en radical hidroxilo (OH^{\bullet}). El aumento en la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y NO^{\bullet} favorece la formación de peroxinitrito (ONOO^-). El aumento de las ERO y ERN provoca oxidación y consecuentemente daño a los lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos, provocando la muerte celular.

1.4. Defensas en el cerebro ante el estrés oxidante

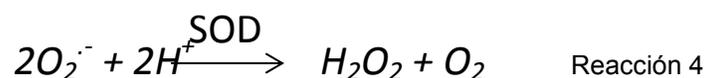
Durante el metabolismo basal en el SNC se generan ERO/ERN. Por otro parte, durante el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas, se produce una gran cantidad de estrés oxidante y a pesar de que el cerebro es susceptible al daño oxidante, éste cuenta con defensas antioxidantes para contrarrestar dicho daño [Warner et al., 2004].

Los antioxidantes son compuestos que pueden prevenir el proceso pro-oxidante y/o el daño oxidativo biológico [Halliwell, 2011; Kohen & Nyska, 2002]. Estas moléculas pueden ser complejas, tal es el caso de las enzimas antioxidantes o moléculas simples [Gutteridge & Halliwell, 2010]. Dentro de las moléculas simples se encuentran la vitamina C, la vitamina E, el ácido lipoíco, la ubiquinona y el glutatión (GSH), mientras que dentro de los complejos tenemos a la SOD, la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión-S-transferasa (GST) y la glutatión reductasa (GR).

La vitamina C o ascorbato es un compuesto soluble en agua capaz de reducir a la vitamina E, así como a peróxidos y $O_2^{\cdot-}$, previniendo así la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares. *La vitamina E o α -tocoferol*, es una vitamina liposoluble presente en las membranas biológicas que contiene un grupo hidroxilo que reacciona con moléculas que tienen electrones desapareados. *El ácido lipóico* es el grupo prostético esencial de la dihidrolipoil transacetilasa (E_2) un componente del complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa en la mitocondria. El ácido lipóico existe en forma reducida como ácido dihidrolipóico que tiene propiedades antioxidantes ya que puede quelar metales, disminuir la producción de radicales libres y regenerar otros antioxidantes como el GSH, el ascorbato y la vitamina E. *La ubiquinona* (coenzima Q/Q10) es parte de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, pero se encuentra en baja concentración en las membranas celulares, en donde ejerce una función antioxidante previniendo la lipoperoxidación [Nordberg & Arnér, 2001].

El GSH es un tripéptido que se sintetiza a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Entre sus funciones se encuentra: 1) la detoxificación de diferentes xenobióticos y sus metabolitos; 2) el metabolismo de diversos metales (Hg, Ag, Cd, As, Pb, Au, Zn, Cu) ya sea uniéndose a ellos o participando en su movilización; 3) el mantenimiento del equilibrio redox intracelular y el estatus de los tioles protéicos esenciales; y 4) el reaccionar con el H₂O₂ a través de la GPx, oxidándose a disulfuro de glutatión (GSSG). La reducción del GSSG a GSH lo lleva a cabo la (GR) [Fernández-Checa & García-Ruíz, 2008]. La síntesis de glutatión en el SNC es llevada a cabo en el citoplasma de neuronas y astrocitos y esta mediada por dos enzimas, la primera, es la γ -glutamyl-L-cisteín ligasa (γ -GCL), que cataliza la unión covalente del glutamato (Glu) con la cisteína (Cys), en un proceso dependiente de ATP. Esta enzima es el paso limitante en la vía y está regulada por los niveles de GSH y la disponibilidad de cisteína. La glutatión sintetasa (GS), es la segunda enzima en esta vía de síntesis y cataliza la unión de la glicina con el dipéptido Glu-Cys, en un proceso dependiente de ATP [Aoyama et al., 2008].

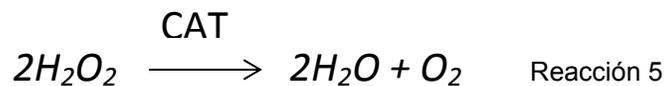
La SOD es una familia de enzimas que catalizan la dismutación del O₂⁻ en O₂ y H₂O₂ (Reacción 4).



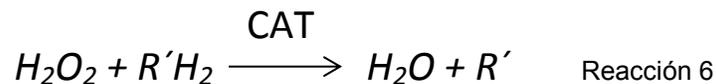
En los mamíferos existen tres tipos de SOD, las cuales se encuentran en lugares específicos. La SOD 1 se ubica en el citoplasma, el núcleo y la membrana externa de la mitocondria. Es una enzima dimérica que pesa 32 KDa con un centro catalítico de Cu/Zn. La SOD 2 se ubica cerca de la membrana interna de la mitocondria, es una enzima tetramérica con un peso de 100 KDa y tiene un centro catalítico de Mn. Finalmente, la SOD 3, se localiza en el espacio extracelular y al igual que SOD 1, su centro catalítico es de Cu/Zn. La actividad de la SOD 2 en la mitocondria es muy importante, debido a que en este organelo, la cantidad de O₂⁻

que se produce es relativamente alta por la fuga de electrones (1 al 5%) de la cadena respiratoria [Gómez-Quiroz & Cuevas-Bahia, 2008; Nordberg & Arnér, 2001].

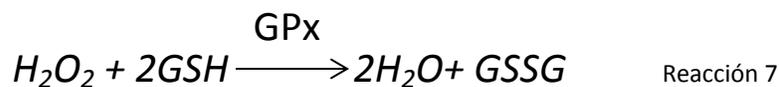
Las CAT son un grupo de enzimas que descomponen el H_2O_2 directamente en O_2 y H_2O (Reacción 5). En su centro catalítico se localiza un grupo hemo y la unión de NADPH aumenta su actividad debido a que protege a la enzima de su inactivación.



La CAT emplea dos moléculas de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como agente oxidante para la producción de H_2O y O_2 . La localización predominante en mamíferos de esta enzima es en los peroxisomas. Esta enzima también participa en la detoxificación de diferentes sustratos como fenoles y alcoholes ($R'H_2$) en una reacción acoplada a la reducción de H_2O_2 (Reacción 6) [Nordberg & Arnér, 2001; Peraza-Reyes, 2008].



La GPx es una selenoproteína que en su centro catalítico tiene una selenocisteína. Este aminoácido es un análogo de la cisteína, pero en vez de contener un grupo tiol (azufre) posee un grupo selenol (selenio). La función catalítica de esta enzima consiste en la conversión de H_2O_2 en H_2O , usando al GSH (Reacción 7) [Cárdenas-Rodríguez et al., 2008].



Esta familia de enzimas contiene una triada catalítica compuesta por selenocisteína, glutamina y triptófano en su centro catalítico. Existen cuatro isoenzimas de GPx, que son dependientes de Se. La GPx citosólica (GPx-1 o cGPx), la GPx gastrointestinal (GPX-2 o GPx-GI), la GPx plasmática (GPx-3 o pGPx) y la GPx de fosfolípidos (GPx-4 o PHGPx). GPx 1 y 2 reducen rápidamente el H₂O₂ (reacción 7) y los hidroperóxidos (Reacción 8). La GPx-3 posee una débil actividad para reducir hidroperóxidos de colesterol; sin embargo, la GPx-4 puede reducir eficazmente los hidroperóxidos de fosfolípidos, pero de manera ineficaz el H₂O₂ [Cárdenas-Rodríguez et al., 2008; Nordberg & Arnér, 2001].



El mecanismo catalítico propuesto para la reducción del H₂O₂ por la GPx involucra la oxidación del sitio activo selenolato a ácido selénico (SeOH). Mediante la adición de una molécula de GSH, el ácido selénico es transformado a un aducto con GSH llamado selenilsulfuro (Se-SG), el cual es un selenolato y mediante la adición de otra molécula de GSH se forma GSSG y reestructura selenolato [Nordberg & Arnér, 2001].

La GR es una flavoproteína que se encuentra en el citoplasma y posee en un sitio activo FAD. Se encarga de restablecer el nivel de GSH debido a que cataliza la reducción del GSSG empleando al NADPH como fuente de electrones (Figura 6) [Jones, 2002].

La GST es una familia de enzimas que catalizan reacciones intracelulares de detoxificación, incluyendo la inactivación de electrófilos mediante su conjugación con el GSH (Figura 6). Las GSTs tienen diversos sustratos como lípidos peroxidados y alquenes [Kohen & Nyska, 2002]. Hasta ahora se han descrito 8 isoenzimas identificadas como alfa, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta y zeta. Se localizan en el citosol y tienen una estructura dimérica con un peso de 45-55 KDa [Sherratt & Hayes, 2001].

Para llevar a cabo su función, la GST y la GPx, necesitan GSH. La GR es responsable de restablecer los niveles de GSH empleando NADPH como fuente de electrones, por lo tanto el NADPH es una molécula importante en el mantenimiento del estado redox celular. Una enzima importante en la producción de NADPH es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Esta enzima cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato proveniente de la glucólisis a 6-fosfo- δ -gluconolactona y reduce al NADP^+ a NADPH (Figura 6) [Stincone et al., 2014]

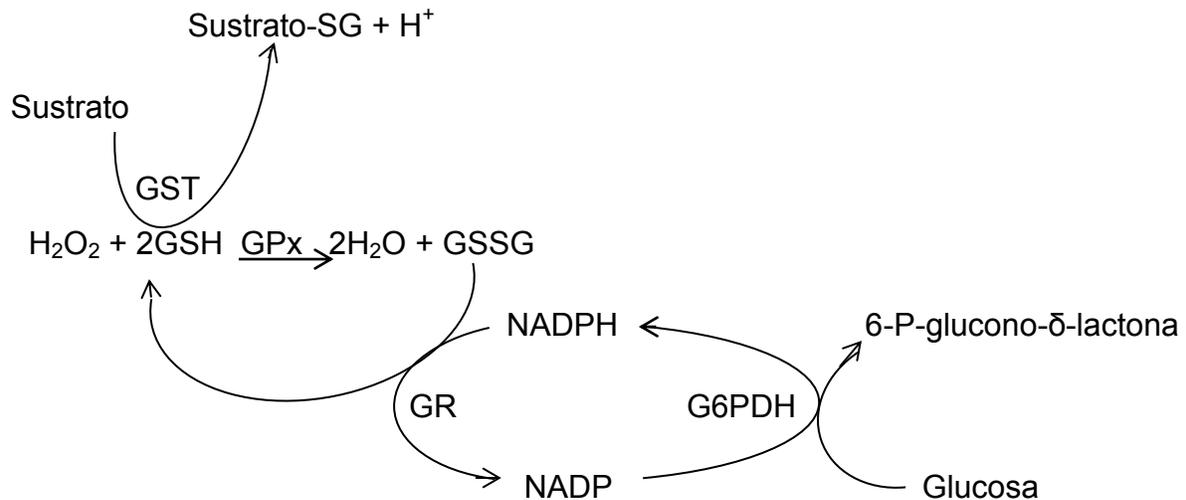


Figura 6. Uso y regeneración del GSH. El glutatión (GSH) es usado por la enzima glutatión-S-transferasa (GST) para conjugarlo con moléculas tóxicas para la célula. Por otra parte, el GSH es oxidado para transformar el peróxido de hidrogeno, a agua (H₂O) mediante una reacción catalizada por la enzima glutatión peróxidasa (GPx). El glutatión oxidado (GSSG) tiene que ser reducido para poder ser usado nuevamente. La reducción del GSH es llevada a cabo por la enzima glutatión reductasa (GR) en un proceso dependiente de NADPH. Finalmente el NADPH es producido por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), en la vía de las pentosas fosfato, mediante la oxidación de la glucosa a 6-fosfoglucono- δ -lactona.

1.5. Factor de transcripción Nrf2 y la vía Keap1/Nrf2/ARE.

Las células con metabolismo aerobio han desarrollado un mecanismo para protegerse contra el daño oxidante. Este mecanismo se conoce como respuesta de fase 2 e involucra la expresión de un conjunto de proteínas y enzimas de fase 2 y enzimas antioxidantes, que juegan un papel importante en la detoxificación celular de las ERO/ERN y las especies electrofilicas. Esta respuesta es regulada por el factor Nrf2, un factor de transcripción que regula el estado redox de las células y que es clave en la respuesta celular ante el estrés oxidante [Bryan et al., 2013; Dinkova-Kostova et al., 2005; Hayes & Dinkova-Kostova, 2014; Pi et al., 2007].

La inducción de la respuesta de fase 2, requiere de por lo menos tres componentes esenciales: 1) el elemento de respuesta antioxidante (ARE), que es una secuencia reguladora río arriba presente en cada gen de enzimas y proteínas de fase 2, tanto en una como en diversas copias; 2) el factor nuclear eritroide-2-relacionado al factor 2 (Nrf2), que es un factor de transcripción que se heterodimeriza con miembros de la familia pequeña Maf y se une a ARE para reclutar la maquinaria general de transcripción y de esta forma permitir la expresión de los genes regulados por ARE; y 3) la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1), que es una proteína represora citosólica que se une a Nrf2, reteniéndolo en el citoplasma y promoviendo su degradación proteosomal [Dinkova-Kostova et al., 2005].

La región ARE es un elemento de respuesta transcripcional que actúa en *cis* y se localiza en la región promotora de genes que codifican para enzimas y proteínas de fase 2, así como enzimas antioxidantes [Nguyen et al., 2009]. La secuencia definida para esta región es 5'-gagTcACaGTgAGtCggCAaaatt-3' [Coople et al., 2008].

El factor Nrf2 es miembro de la subfamilia de factores de transcripción cap 'n' collar (CNC) con una región básica de cierre de leucina (bZip). Es una proteína de 605 aminoácidos, con un peso molecular de 66 KDa [Pi et al., 2007] y cuenta con

7 dominios con homología ECH (Neh) [Hayes & Dinkova-Kostova, 2014]. El dominio Neh1 contiene la región CNC-bZIP, importante en la unión al DNA y la heterodimerización con proteínas pequeñas Maf. El dominio Neh2 contiene los motivos ETGE y DLG, importantes en la unión con Keap1, que es la proteína encargada de regular la degradación de Nrf2, debido a que es un sustrato adaptador del complejo Culina 3 ubiquitin E3 ligasa. El dominio Neh3 se localiza en el extremo C-terminal y es importante en el reclutamiento de la proteína cromosoma/ATPasa/helicasa 6 de unión al DNA (CHD6). Los dominios Neh4 y Neh5 son dominios de transactivación que reclutan a la proteína CREB (proteína de unión a los elementos de respuesta a AMPc) y al receptor asociado coactivador 3 (RAC3). El dominio Neh6 controla negativamente a Nrf2 ya que recluta, a través de los motivos DSGIS y DSAPGS, a la proteína β -TrCP, un sustrato adaptador del complejo Skp1-Culina1 E3 ligasa. Finalmente, el dominio Neh7 es un mediador de la represión de Nrf2 a través del receptor retinoide α (RXR α) [Hayes & Dinkova-Kostova, 2014]. Su función la lleva a cabo uniéndose a la secuencia de elementos de respuesta antioxidante (ARE) [Silva-Islas et al., 2012].

La proteína Keap1 ha emergido como el mayor sensor ante el estrés oxidante y moléculas electrofílicas. Es una proteína Bric-a-Brac (BTB)-Kelch que funciona como un sustrato adaptador para el complejo ubiquitin E3 ligasa dependiente de Culina 3, cuya función es retener al factor de transcripción Nrf2 en el citoplasma [Cullinan et al., 2004]. La proteína Keap1 se puede dividir en 5 dominios, el dominio amino terminal (NTR), el dominio BTB/POZ (Bric-a-brac, tramtrac, complejo broad/dedos de zinc proxvirus), el dominio intermedio rico en cisteínas (IVR), el dominio de repetidos dobles de glicina (DGR) o también llamado dominio Kelch y el dominio carboxilo terminal (CTR) [Tian et al., 2012]. El dominio BTB/POZ es importante en la homodimerización de Keap1, si se pierde esta dimerización, se pierde la capacidad de Keap1 para retener a Nrf2 en el citoplasma. Además es el sitio de unión con el complejo Culina 3/Rbx1 ubiquitin E3 ligasa [Zipper & Mulcahy, 2002]. El dominio Kelch se requiere para la unión con Nrf2 a través del dominio Neh2, también este dominio es importante para la interacción con la actina del citoesqueleto, anclando así a Keap1 en el citoplasma

[Tong et al., 2006]. El dominio IVR es una región flexible que une al dominio Kelch con el dominio BTB/POZ [Tian et al., 2012].

Esta proteína contiene 27 residuos de cisteínas flanqueados por aminoácidos básicos, lo que provoca una disminución del pKa de las cisteínas y aumenta su reactividad [Snyder et al., 1981; Holland & Fishbein, 2010]. Se ha propuesto que la capacidad de Keap1 para censar el estrés oxidante y los compuestos electrofílicos está relacionada con estos residuos de cisteína [Holland & Fishbein, 2010]. En presencia de estrés oxidante, los residuos de cisteína se oxidan provocando un incremento del factor Nrf2 libre, favoreciendo así su translocación al núcleo e induciendo la expresión de genes citoprotectores contra el estrés oxidante [Fourquet et al., 2010].

En condiciones normales, el Nrf2 se mantiene en el citoplasma formando un complejo inactivo unido a un dímero de Keap1, que a su vez se une con la actina del citoesqueleto para retenerlo con mayor fuerza en el citoplasma. La interacción de Keap1-Nrf2 se lleva a cabo a través del dominio Neh2 en Nrf2 y el dominio Kelch en Keap1. Se ha propuesto un modelo de interacción entre Keap1 y Nrf2 llamado bisagra y pestillo (hinge and latch) mediante los motivos ²⁹DLG³¹ y ⁷⁹ETGE⁸² presentes en el dominio Neh2 de Nrf2 y la triada de argininas (R380, R415 y R483) en el dominio Kelch de Keap1. El modelo sugiere que la unión de gran afinidad se lleva a cabo a través de los aminoácidos glutámico-treonina-glicina-glutámico presentes en el motivo ETGE de Nrf2 con la triada de argininas en el dominio Kelch de un monómero de Keap1, formando la bisagra, a través de la cual, Nrf2 puede moverse relativamente libre en el espacio. Por otra parte, la unión de baja afinidad, se da entre los aminoácidos aspártico-leucina-glicina presentes en el motivo DLG en Nrf2 con la triada de argininas en el dominio Kelch del segundo monómero de Keap1, proporcionando el pestillo, que restringe la movilidad de Nrf2, manteniéndolo en la posición adecuada para la ubiquitinación de los residuos de lisina que se localizan entre los motivos DLG y ETGE, por el complejo culina3/Rbx1 E3 ligasa. La ubiquitinación de Nrf2 proporciona la señal para su degradación vía proteasoma 26S (Figura 7A). En condiciones basales, el

tiempo de vida media de Nrf2 es de 10 a 30 min; sin embargo, al aumentar el estrés oxidante su tiempo de vida media se incrementa a 51 min [Kaspar et al., 2009; Lau et al., 2008; McMahon et al., 2006; Surh et al., 2008; Watai et al., 2007].

Se ha reportado un segundo mecanismo de regulación de los niveles de Nrf2, en el cual la proteína β -TrCP1 actúa como sustrato adaptador de complejo Skp1-Culina1 E3 ligasa, cuya función es ubiquitinar a Nrf2 en los residuos de lisina presentes en el dominio Neh1. La proteína β -TrCP interacciona con los aminoácidos aspártico-serina-glicina-isoleucina-serina presentes en el motivo ³⁴³DSGIS³⁴⁷ en el dominio Neh6 de Nrf2, previa fosforilación de los residuos de serina 344 y 347 por la cinasa GSK-3 (Figura 7B). Por otra parte, β -TrCP1 también interacciona con los aminoácidos aspártico-serina-alanina-prolina-glicina-serina presentes en el motivo ³⁸²DSAPGS³⁸⁷ en el dominio Neh6 de Nrf2 (Figura 7C). Ambas interacciones provocan la ubiquitinación de Nrf2 y su posterior degradación vía proteasoma 26S [Hayes & Dinkova-Kostova, 2014].

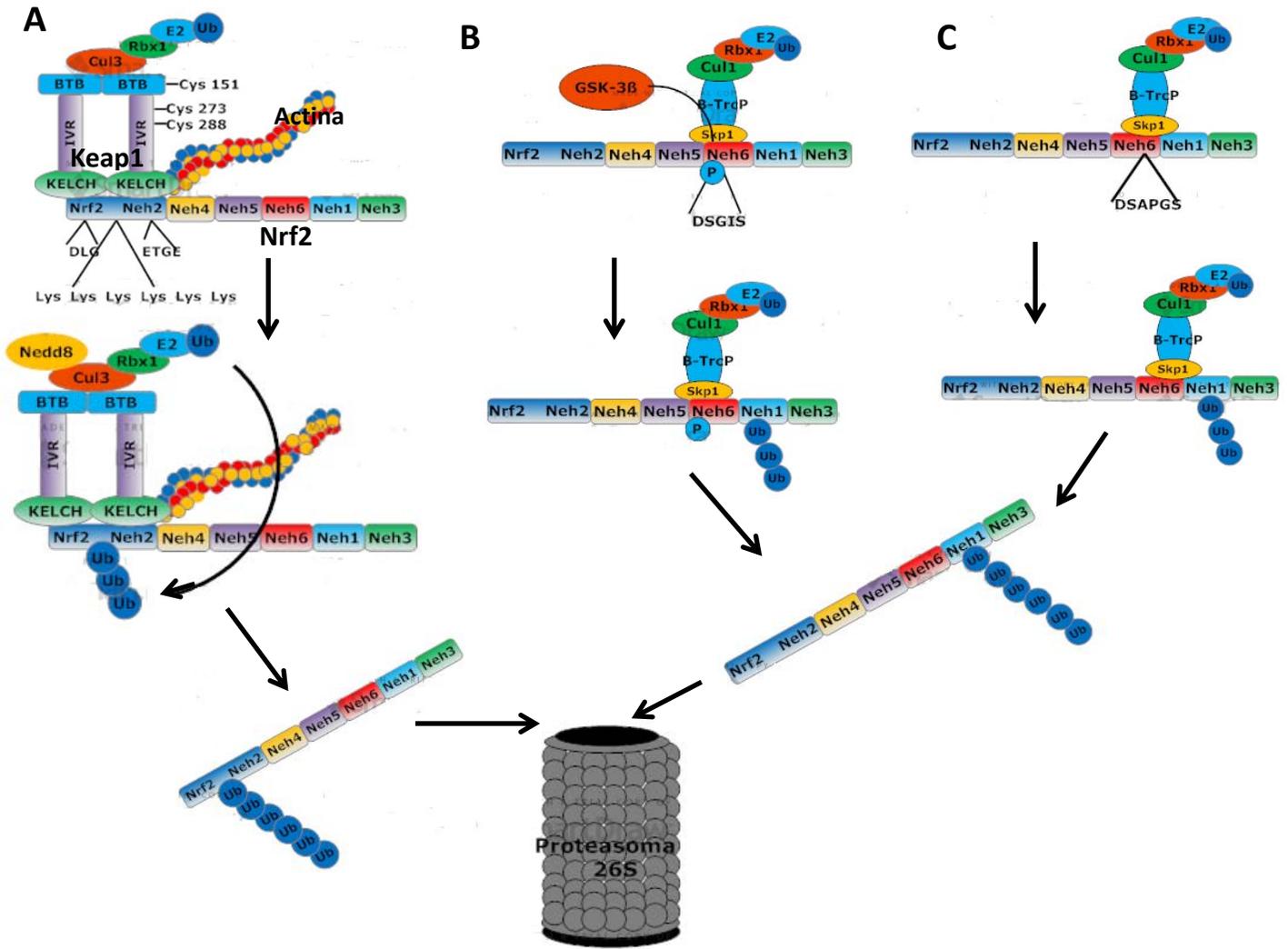


Figura 7. Degradación del factor Nrf2. A. El factor Nrf2 es retenido en el citoplasma por Keap1, una proteína adaptadora del complejo Culina E3/Rbx1 con actividad de E3 ligasa, cuya función es ubiquitinar al factor Nrf2 para su degradación. En condiciones fisiológicas, un dímero de Keap1 se une a 1 molécula de Nrf2 a través de los motivos ETGE y DLG presentes en el dominio Neh2 de Nrf2 y la triada de argininas presentes en el dominio Kelch de Keap1. También, a través de este dominio, Keap1 se une a la actina del citoesqueleto, para retener a Nrf2 con mayor fuerza en el citoplasma. Por otra parte, Keap1 se une a Culina 3 a través del dominio BTB. Culina 3 se une a la proteína Rbx1 y está a la proteína E2, la cual transfiere la ubiquitina, cuando Culina 3 es neddilada, a las lisinas de Nrf2 presentes en el dominio Neh2. Nrf2 es poliubiquitinizado y posteriormente es reconocido por el proteasoma 26S y degradado. B. Además de la degradación de Nrf2 dependiente de Keap1, existe una degradación dependiente de la proteína β -TrcP. La proteína β -TrcP se une a Nrf2 a través del motivo DSGIS presente en el dominio Neh6, previa fosforilación de los residuos de serina 344 y 347 presente en este dominio por la cinasa GSK-3. La proteína β -TrcP se une a la proteína Culina 1 y esta a su vez se une a la proteína Rbx1, Rbx1 se encuentra unida a la proteína E2 y esta última proteína transfiere la ubiquitina a los residuos de lisina, presentes en el dominio Neh1. Una vez que Nrf2 es ubiquitinizado es degradado vía proteasoma 26S. C. La proteína β -TrcP puede unirse a Nrf2 a través del motivo DSAPGS en el dominio Neh6, en un proceso independiente de la fosforilación por GSK-3. La proteína E2 transfiere la ubiquitina a Nrf2 en las lisinas del dominio Neh1 y manda a Nrf2 a la degradación mediada por el proteasoma 26S.

Como se mencionó anteriormente, la proteína Keap1 es rica en residuos de cisteínas que sirven como un sensor del estado redox y electrofílico. Dentro de las cisteínas más importantes se encuentran la Cys151 (ubicada en el dominio BTB), la Cys272 y la Cys288 (ubicadas éstas dos en el dominio IVR) [Watai et al., 2007]. Ya se sabe que la modificación química de la Cys151 mediante ERO, prooxidantes, electrófilos o agentes inductores de Nrf2 (como el sulforafano) promueve la disociación del complejo Keap1-Nrf2; mientras que las Cys272 y 288 son esenciales para la actividad represora de Keap1 en condiciones basales. Por otra parte, la modificación de la Cys151 provoca un cambio conformacional en Keap1 favoreciendo la liberación de Nrf2 [Kaspar et al., 2009; Surh et al., 2008], y se ha propuesto que esta modificación induce la ubiquitinación de Keap1 por el complejo Culina3/Rbx1 E3 ligasa, promoviendo su degradación por una vía independiente del proteasoma 26S [Zhang et al., 2005]. Al liberarse Nrf2 de Keap1, éste se transloca al núcleo donde se heterodimeriza con proteínas bZIP como la proteína Jun y las proteínas Maf pequeñas (MafG, MafK y MafF) y posteriormente se une a la región ARE, para finalmente inducir la expresión de las enzimas de fase 2 y antioxidantes (Figura 8A) [Lau et al., 2008].

Recientemente se ha propuesto un nuevo modelo referente a la activación de Nrf2. En el modelo se postula que cuando incrementa el estrés oxidante o hay presencia de compuestos electrofílicos, los residuos de cisteínas se oxidan produciendo un cambio conformacional en Keap1. Esto favorece la disociación parcial de Nrf2, es decir, se rompe la interacción en el motivo DLG, impidiendo la ubiquitinación de Nrf2 y por consiguiente la degradación vía proteasoma 26S; sin embargo, Nrf2 se mantiene unido a Keap1 a través del motivo ETGE, lo que provoca que no exista Keap1 disponible para unir y retener a Nrf2 que es sintetizado *de novo*, favoreciendo así, la traslocación al núcleo del Nrf2 recién sintetizado (Figura 8B) [Baird et al., 2013; Bryan et al., 2013].

Otro evento importante en la activación del factor Nrf2 es la fosforilación mediada por PKC de la serina 40 para la disociación del complejo Nrf2-Keap1, pero no así

para su estabilización y translocación al núcleo [Bloom & Jaiswal, 2003]. Niture et al. (2009) sugieren que la fosforilación de Nrf2 en la Ser40 por PKC δ es indispensable para la disociación del complejo Nrf2/Keap 1, pero no basta para que Nrf2 se transloque al núcleo; así mismo la modificación de la Cys151 tampoco es suficiente. Se necesita la modificación de la Cys151 y la fosforilación de la Ser40. Por otra parte se ha visto que la inhibición de MEK anula la translocación de Nrf2 al núcleo, sugiriendo una importante participación de la vía PKC/MEK en la activación de Nrf2 [Jin et al., 2012]. Por otra parte Wu et al. (2013) reportaron que la curcumina incrementa los niveles de p-Akt, Nrf2 y NQO1 y que el uso de un inhibidor de PI3K (activador de Akt) bloquea el incremento de Nrf2 y NQO1; del mismo modo, el uso del inhibidor de PI3K disminuye la protección observada por la curcumina en un modelo de deprivación de glucosa y oxígeno, sugiriendo que la inhibición de la fosforilación de Akt inhibe el efecto protector de la curcumina vía Nrf2 (Figura 8).

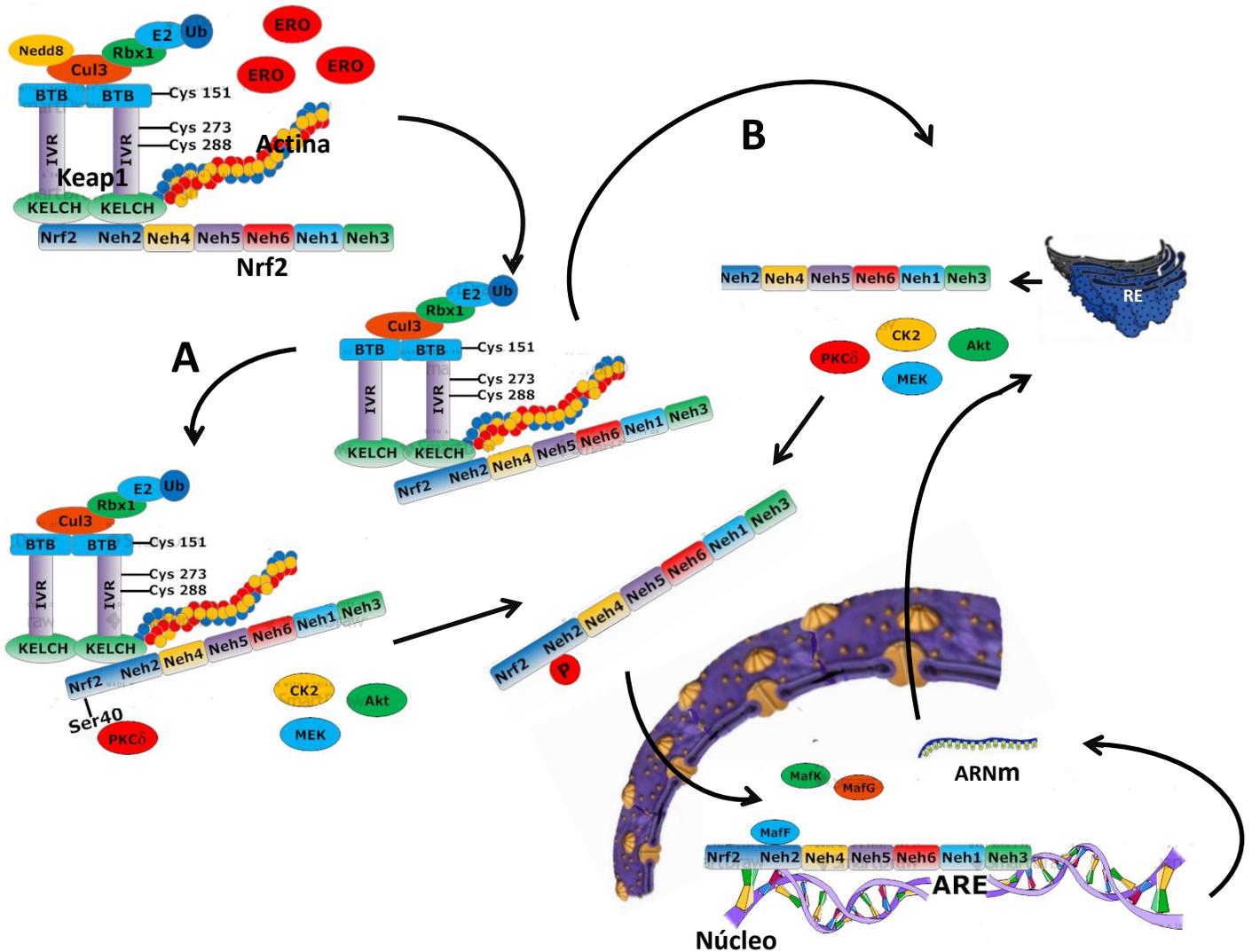


Figura 8. Activación del factor Nrf2. En presencia de estrés oxidante o compuestos que activan a Nrf2 (antioxidantes indirectos), las cisteínas de Keap1, principalmente la cisteína 151, son oxidadas. Esto provoca un cambio conformacional en Keap1 y se pierde la unión de baja afinidad de Nrf2 con Keap1, la cual está dada por el motivo DLG en el dominio Neh2 de Nrf2 y la triada de argininas en el dominio Kelch de Keap1. La pérdida de esta unión entre Keap1 y Nrf2, libera parcialmente a Nrf2 y el complejo Culina 3/Rbx1 con actividad de E3 ligasa no puede ubiquitinar a Nrf2. Por lo tanto, se bloquea su degradación vía proteasoma 26S. La liberación parcial de Nrf2 puede provocar que (A) diversas cinasas como PKC δ , Akt, MEK y CK2 fosforilen a Nrf2. La fosforilación de Nrf2 provoca que se libere completamente Nrf2 de Keap1 y se trasloque al núcleo, donde se dimeriza con proteínas pequeñas Maf y se une a la secuencia ARE, para llevar a cabo su función como factor de transcripción. Por otra parte, (B) también se ha descrito que la pérdida de la interacción del motivo DLG en Nrf2 con el dominio Kelch de Keap1, provoca que Nrf2 no pueda ser ubiquitinado y por lo tanto tampoco puede ser degradado; pero no es liberado de Keap1, debido a la interacción del motivo ETGE. Por lo tanto el Nrf2 que es traslocado al núcleo, previa fosforilación de las cinasas PKC δ , Akt, MEK y/o CK2, es el sintetizado de novo, ya que al no liberarse Nrf2 de Keap1, no hay Keap1 disponible para la unión con Nrf2 de novo y su posterior degradación.

Hasta el año 2008, se sabía que la actividad basal del factor Nrf2, así como su activación en respuesta al estrés oxidante se encontraba finamente regulada [Hayes & Dinkova-Kostova, 2014] por la proteína Keap1 que controla su degradación [Devling et al., 2005; Wakabayashi et al., 2003]. Sin embargo, recientemente se describió que los niveles de este factor también están regulados a nivel transcripcional [Kwak et al., 2002], traduccional [Narasimhan et al., 2012; Singh et al., 2013; Yang et al., 2011] y postraduccional lo cual afecta directamente su activación. En este sentido, se ha identificado que las proteínas DPP3, PALB2, PGAM5, IKK β , WTX y p62 interaccionan con Keap1 a través del dominio BTB-Kelch impidiendo así su unión con Nrf2 y disminuyendo su degradación [Camp et al., 2012; Hast et al., 2013; Lau et al., 2010; Lee et al., 2009; Lo & Hannink, 2008; Ma et al., 2012] Por otra parte, también se ha identificado que las proteínas p21 y BRCA1 se unen al dominio Neh2 de Nrf2 impidiendo así su degradación vía proteasoma 26S mediada por Keap1 (Figura 9) [Chen et al., 2009; Gorrini et al., 2013].

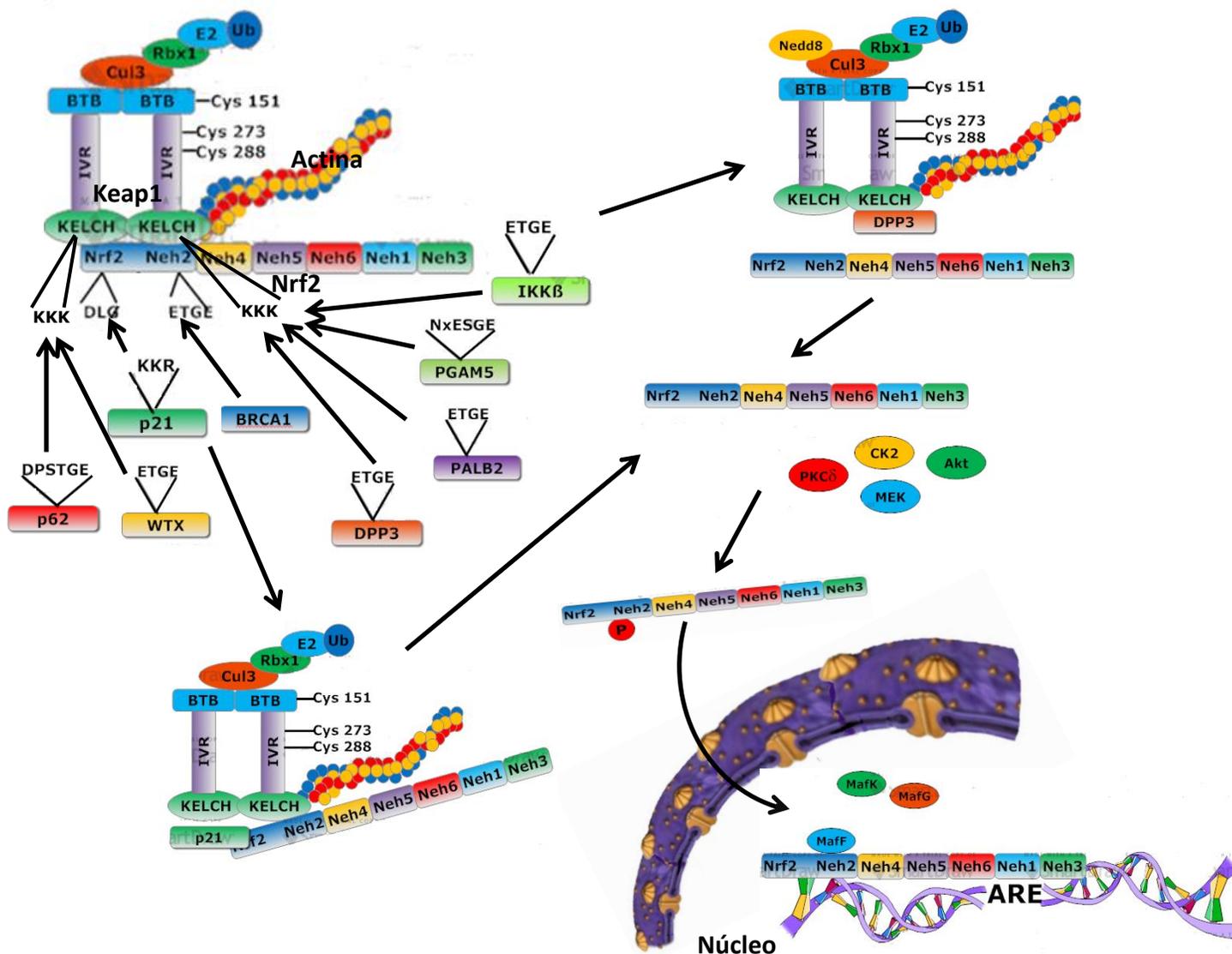


Figura 9. Proteínas de unión a Keap1 o a Nrf2 que favorecen la activación del factor Nrf2. La activación del factor Nrf2 no solo se da por la oxidación de los residuos de cisteínas presentes en Keap1, también se da por la pérdida de la interacción entre Nrf2 y Keap1 debido a la interacción de Keap1 con las proteínas DPP3, PALB2, WTX, PGAM5, IKK β , y p62 o la interacción de Nrf2 con las proteínas BRCA1 y p21. Las proteínas DPP3, PALB2, WTX e IKK β tienen en su estructura un motivo ETGE, mientras que la proteína PGAM5 tiene un motivo NxESGE y la proteína p62 un motivo DPSTGE, estos motivos son iguales o similares al motivo ETGE de Nrf2. Mediante estos motivos estas proteínas interactúan con la triada de argininas del dominio Kelch en Keap1 impidiendo la unión de Nrf2 con Keap1 y promoviendo su fosforilación, traslocación a núcleo y su activación. Por otra parte, la proteína p21 tiene tres aminoácidos cargados positivamente (lisina, arginina, arginina), al igual que las tres argininas en Keap1, mediante estos tres aminoácidos interactúa con Nrf2 impidiendo su degradación, aumentando su traslocación al núcleo y su activación. La proteína BRCA1, también interactúa con Nrf2 y aumenta su activación, aunque no se sabe exactamente como lo hace.

Como se mencionó anteriormente la activación de Nrf2 promueve un aumento en la respuesta de fase 2. Esta respuesta involucra un grupo de genes que son regulados por una molécula común en una vía de señalización que depende del factor de transcripción Nrf2 [Dinkova-Kostova et al., 2005]. Las enzimas de fase 2 catalizan diversas reacciones que en conjunto producen una amplia protección en contra del daño provocado por ERO/ERN, así como electrófilos [Silva-Islas et al., 2012]. A pesar de que el factor de transcripción Nrf2 produce un aumento en la respuesta de fase 2, también se ha visto que induce un aumento en la expresión de otras moléculas como: factores de crecimiento, proteínas de señalización, entre otras (Tabla 4) [Lee et al., 2003].

Tabla 4. Genes dependientes de Nrf2 inducidos por *tert*-butilhidroquinona en astrocitos corticales primarios. Modificado de Lee et al., 2003.

Genes relacionados con la detoxificación	Genes relacionados con la defensa antioxidante y la reducción del potencial	Genes relacionados con la transcripción
<ul style="list-style-type: none"> ○ NAD(P)H: quinona oxidoreductasa (NQO1) ○ Glutatión S-transferasa (GST) A4 ○ GST Pi2 ○ GST Mu1 ○ GST Mu3 ○ GST Omega1 ○ GST microsomal-1 ○ UDP glucosiltransferasa 1A6 ○ Epóxido hidrolasa-1 ○ Aldehído deshidrogenasa-2 ○ Aldehído deshidrogenasa-9 ○ Aldehído oxidasa-1 ○ Citocromo P450 1B1 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Γ-glutamato cisteína ligasa subunidad modificadora (GCLM) ○ Γ-glutamato cisteína ligasa subunidad catalítica (GCLC) ○ Hemo oxigenasa-1 (HO-1) ○ Tiorredoxina reductasa-1 (TXNRD-1) ○ Tiorredoxina (Trx) ○ Cadena-1 ligera de la ferritina ○ Subunidad H de la Ferritina ○ Peroxiredoxina tipo 1 (PRx) ○ 1-CysPRx proteína-2 ○ Receptor de transferrina ○ Súperoxido dismutasa (Cu/Zn CuZnSOD) ○ Catalasa-1 (CAT) ○ Glutatión peroxidasa-4 (GPx) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ CCAAT/potenciador de la proteína de unión-β ○ Proteína de dedos de zinc de cerebelo-2 ○ Factor de interacción TG ○ MafG ○ Factor de transcripción-4 activado
<p data-bbox="211 1192 561 1262">Genes relacionados con la señalización</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Protein cinasa dependiente de la regulación de AMPc, tipo Iβ ○ AW125016 4 1.9 0.07 NR ○ Protein cinasa-10 activada por mitogeno 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Glutatión reductasa-1 (GR) ○ Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) ○ G6PD-2 ○ Tansaldolasa-1 ○ Transcetolasa ○ Acarreador de soluto familia-1/4 ○ Transportador de glicina ○ Enzima málica soluble 	<p data-bbox="1050 716 1425 785">Genes relacionados con el crecimiento</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Proliferina ○ Proliferina-2 ○ Factor del crecimiento del nervio-β ○ Factor de crecimiento derivado de plaquetas-α <p data-bbox="1050 1052 1425 1157">Genes relacionados con la defensa/inmunidad/inflamación</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Lectina tipo-C de macrófago ○ EST, similar a ditioleona inducible-1 ○ PAF acetilhidrolasa ○ Lisozima estructural P ○ Lisozima M ○ Prostaglandina-endoperoxido sintetasa-2 ○ Metaloproteinas de matriz-12

1.6. Modelo de ácido quinolínico (QUIN).

El ácido quinolínico (ácido 2,3 piridin dicarboxílico) es una endotoxina que normalmente se encuentra en el cerebro humano [Wolfensberger et al., 1983]. El QUIN se ha asociado con la neuropatogenesis de diferentes enfermedades como Alzheimer, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, entre otras; además, los niveles de QUIN se ven incrementados con la edad. Esta endotoxina se produce a través de la vía de la kinurenina, que es la principal ruta del catabolismo del L-triptofano. En esta vía metabólica se produce NAD^+ y NADP^+ [Braidy et al., 2009] y dentro de los metabolitos intermediarios se encuentra el QUIN, que es la molécula de mayor importancia en términos biológicos (Figura 10) [Zádori et al., 2009].

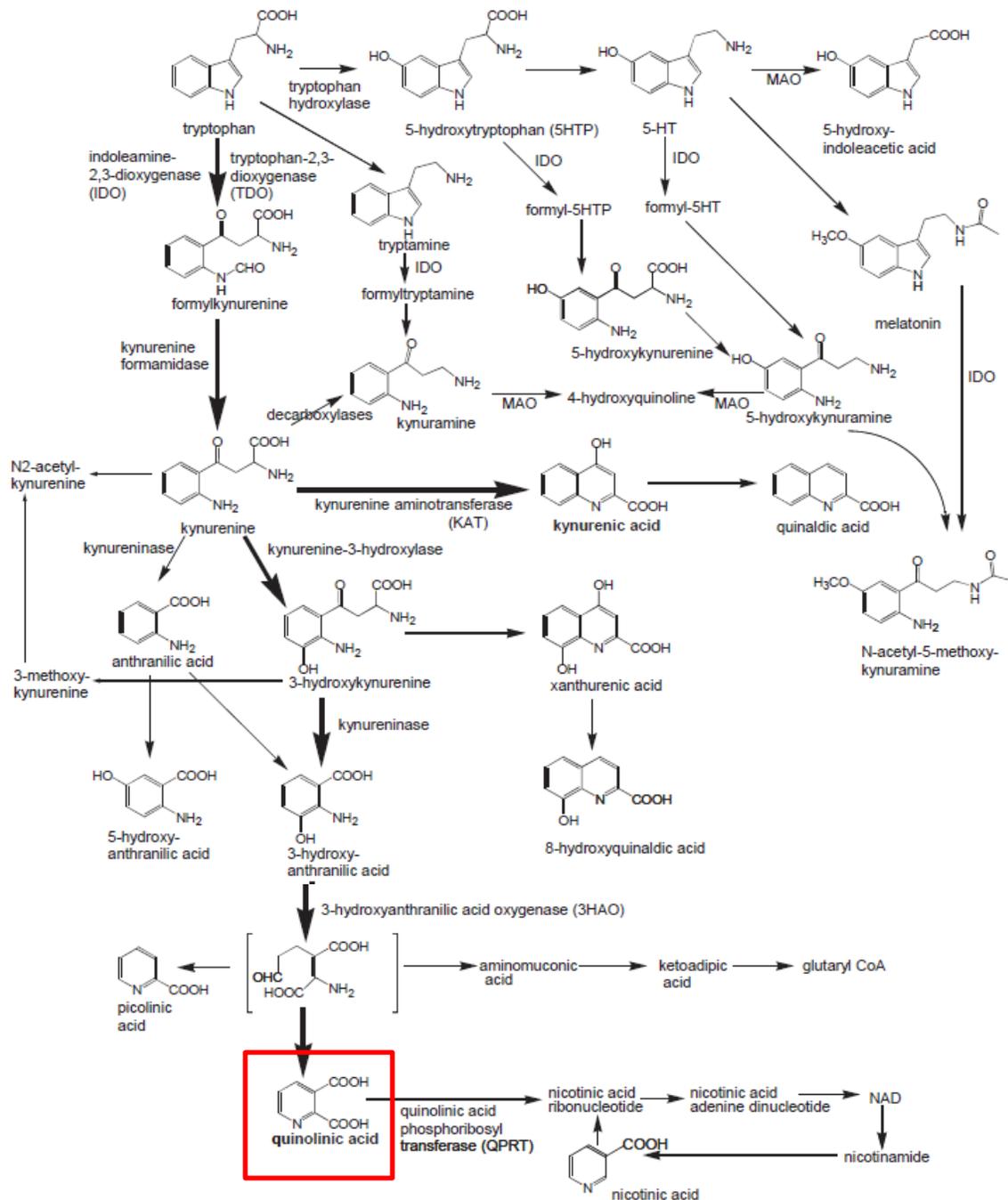


Figura 10. Vía de la kinurenina. Diagrama donde se resumen los principales componentes de la vía del metabolismo del triptófano (vía de la kinurenina) y dentro de la cual se produce el ácido quinolínico. Tomada de [Stone et al. \(2012\)](#).

El QUIN es una molécula con gran similitud estructural con el glutamato y el NMDA (Figura 11). Su acción tóxica se lleva a cabo a través de la sobreactivación

de los receptores NMDA, produciendo un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , activando numerosas enzimas asociadas a la producción de ERO y enzimas relacionadas con el daño celular como proteasas, lipasas y endonucleasas, llevando así a la muerte celular [Aguilera et al., 2007; Maldonado et al., 2010; Pérez-Severiano et al., 2004; Santamaría et al., 2001]. El QUIN actúa específicamente sobre los receptores NMDA que contienen las subunidades NR2A y NR2B [Ting et al., 2009] y es la región estriatal donde se encuentra un mayor número de neuronas con esta conformación de subunidades en el receptor NMDA [Li et al., 2003]. Por ello su administración estriatal se ha usado como modelo para estudiar los eventos asociados con la excitotoxicidad y el estrés oxidante [Schwarcz et al., 2010].

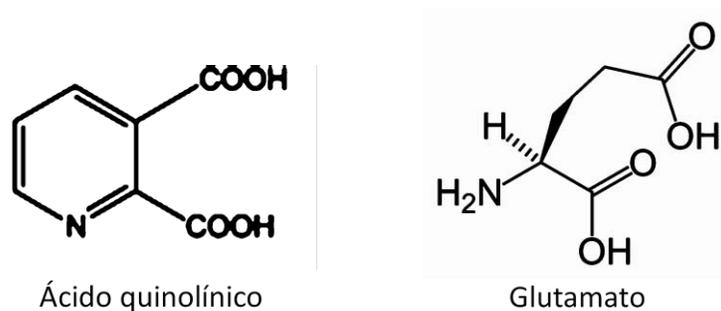


Figura 11. Estructura química del ácido quinolínico y el glutamato.

Se ha descrito que la administración intraestriatal de 240 nmol de QUIN incrementa el nivel de $\cdot\text{OH}$ a los 60 min [Santamaría et al., 2001]; la lipoperoxidación a las 2 h [Santamaría & Rios, 1993]; la oxidación de proteínas desde las 6 h [Carmona-Ramírez et al., 2013; Colín-González et al., 2013; Santana-Martínez et al., 2014] y la actividad de la SON dependiente y la NOX desde los 30 min [Aguilera et al., 2007; Maldonado et al., 2010;] posteriores a la lesión. Además, disminuye los niveles de GSH, el principal antioxidante endógeno en el SNC, desde las 4 h [Cruz-Aguado et al., 2000; Santamaría et al., 2001; Santana-Martínez et al., 2014] y la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y

GR a las 24 h [Santana-Martínez et al., 2014]. Toda esta evidencia demuestra que el QUIN aumenta el estrés oxidante en el estriado de rata a tiempos superiores a 2 h; mientras que a tiempos menores, el efecto del QUIN no ha sido reportado.

Por otra parte, como se menciona anteriormente, el factor Nrf2 responde ante el estrés oxidante, pero en el modelo con QUIN se ha reportado que a los 30 min, la cantidad nuclear de Nrf2 disminuye por efecto de la administración de 240 nmol de QUIN [Carmona-Ramírez et al., 2013; Santana-Martínez et al., 2014], mientras que a los 120 min la disminución es mayor [Carmona-Ramírez et al., 2013]; sin embargo, en otros modelos se ha reportado que la mayor acumulación de Nrf2 en el núcleo se presenta a los 30 min posteriores al reto con tert-butilhidroquinona [Jain & Jaiswal, 2006; Kaspar et al., 2012]; por tal motivo, estos resultados nos hacen suponer que la acumulación nuclear y activación del factor Nrf2 depende de la intensidad del estímulo redox.

Debido a esto, proponemos el uso del modelo con QUIN para estudiar el comportamiento del factor Nrf2 ante el estado de estrés oxidante que se genera tras la administración de esta neurotoxina.

2. JUSTIFICACIÓN.

Actualmente un incremento en la esperanza de vida propicia un incremento en las enfermedades neurodegenerativas, en muchos países desarrollados y en vías de desarrollo [Peden & Ironside, 2012]. En México, el incremento de las enfermedades neurodegenerativas es evidente de 1998 al 2011 y se espera que conforme la población mexicana envejezca exista un incremento proporcional en estos padecimientos [INEGI, 2011]. Por ello, el estudio de los mecanismos involucrados en la muerte neuronal en estas enfermedades es muy importante. En este sentido, la administración de QUIN genera un modelo experimental que permite estudiar los eventos asociados a la excitotoxicidad y el estrés oxidante que se observa en las enfermedades neurodegenerativas, ambos eventos implicados en la muerte neuronal.

Por otra parte, las células cuentan con mecanismos para mantener los niveles basales de producción de especies oxidantes. Uno de ellos es la vía Keap1/Nrf2/ARE y dentro de la cual, el factor Nrf2 juega un papel fundamental para que la célula responda ante el incremento del estrés oxidante.

Resultados obtenidos en el laboratorio mostraron que la administración de 240 nmol de QUIN en el estriado de rata disminuye la cantidad de Nrf2 en el núcleo, contrario a lo que se esperaba; ya que se ha descrito que el factor Nrf2 responde ante el incremento de estrés oxidante, el cual se ha reportado que incrementa a partir de los 60 min posteriores a la administración de 240 nmol de QUIN. Estos datos sugieren que es probable que la respuesta del factor Nrf2 dependa de la intensidad del estímulo, y debido a que la administración de QUIN por debajo de 240 nmol ha sido poco estudiada; en este trabajo se evaluó el efecto de la administración del QUIN a diferentes dosis y se caracterizó el efecto de esta toxina sobre las alteraciones histológicas y conductuales, así como la activación del factor Nrf2, el estrés oxidante y las enzimas reguladas por Nrf2. Los resultados nos permitirán entender mejor el comportamiento de este factor de transcripción ante la intensidad de estrés en el estriado.

3. HIPÓTESIS.

Si la administración de QUIN en el estriado del cerebro promueve la excitotoxicidad y con ello un aumento en los niveles de estrés oxidante; entonces dosis crecientes de esta toxina, provocarán un aumento dosis dependiente en el daño al tejido estriatal, la activación del factor Nrf2 y la actividad de las enzimas antioxidantes.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.

- Evaluar el efecto de la administración de dosis crecientes de QUIN en el estriado de rata sobre las alteraciones conductuales, el daño al tejido, los niveles de estrés oxidante, la activación del factor Nrf2 y la actividad de algunas enzimas antioxidantes reguladas por Nrf2.

4.2. Objetivos particulares.

- Evaluar la conducta de rotación 6 días posteriores a la infusión de QUIN (30, 60, 120 y 240 nmol).
- Evaluar el daño histológico y la neurodegeneración 7 días posteriores a la infusión de QUIN (30, 60, 120 y 240 nmol).
- Evaluar la activación del factor Nrf2 en extractos nucleares a los 15, 30 min, 1, 3 y 24 h posterior a la infusión de QUIN (15, 30, 60, 120 y 240 nmol).
- Evaluar los niveles de ERO y lipoperoxidación a los 30 min posteriores a la infusión con QUIN (15, 30, 60, 120 y 240 nmol).
- Evaluar la actividad de las enzimas CAT, GPx, GR, GST y G6PDH, 6 h posteriores a la infusión de QUIN (15, 30, 60, 120 y 240 nmol).

5. METODOLOGÍA.

5.1. Animales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 280 a 320 g de peso, obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Los animales se colocaron en cajas de acrílico, cada una con 6 ratas y se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) e iluminación (ciclos de 12 h luz/oscuridad). Los animales tuvieron libre acceso al alimento (Laboratory Rodent Diet 5001; PMI Feed Inc., Richmon, IN, USA) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. Durante el desarrollo experimental, se realizó el máximo esfuerzo para minimizar el sufrimiento de los animales.

5.2. Reactivos.

El QUIN se obtuvo de Spectrum Chemical Mfg Corp (Gardena, CA, USA), la apomorfina, el Nonidet P40, el tritón X-100, los inhibidores de proteasas y fosfatasas, el folin, el ácido tiobarbitúrico, el tetrametoxipropano, la 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, la 2',7'-diclorofluoresceína, la tripsina, el peróxido de hidrógeno 30%, el GSH, el GSSG, el NADPH, el NADP, la glucosa 6-fosfato, la albúmina sérica bovina y la GR se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA). El Fluoro jade B se obtuvo Millipore (Bedford, MA, USA). El kit de ELISA TransAM para detectar la activación del factor Nrf2 se obtuvo de Active Motif (Carlsband, CA, USA).

Todos los demás reactivos que se usaron fueron grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas.

5.3. Diseño experimental.

Los animales se dividieron en 6 grupos al azar ($n=4$), como se muestra a continuación:

- Control (CT).
- Ácido quinolínico 15 nmol (QUIN 15).
- Ácido quinolínico 30 nmol (QUIN 30).
- Ácido quinolínico 60 nmol (QUIN 60).
- Ácido quinolínico 120 nmol (QUIN 120).
- Ácido quinolínico 240 nmol (QUIN 240).

Los animales del grupo control recibieron 1 μ L de SSI intraestriatal (i.e.). Los animales de los grupos con QUIN, recibieron 1 μ L de este compuesto i.e. equivalente a 15, 30, 60, 120 y 240 nmol, como se menciona posteriormente.

Se caracterizó el daño inducido por el QUIN evaluando la conducta de rotación 6 días posteriores a la lesión, mediante la administración de apomorfina; así como el daño histológico, mediante la tinción de H&E y la neurodegeneración con la tinción de fluoro jade B, 7 días posteriores a la lesión. Después se evaluó la activación del factor Nrf2 en extractos nucleares mediante un ensayo de ELISA a los 15, 30 min, 1, 3 y 24 h. Posteriormente se evaluaron a los 30 min los niveles de ERO, mediante el fluoróforo 2',7'-diclorofluoresceína y la lipoperoxidación como marcador de estrés oxidante mediante la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Finalmente se evaluó la actividad de las enzimas CAT, GPx, GR, GST y G6PDH, 6 h posteriores a la lesión con QUIN.

5.4. Administración del QUIN.

Los animales se anestesiaron con pentobarbital (0.2 mL/250 g i.p.), se montaron en un equipo estereotáxico (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) y con ayuda de una jeringa Hamilton (Hamilton Co., Reno, NV, USA) se administró 1 μ L de SSI para los animales control y 1 μ L de QUIN (disuelto en SSI) equivalente a 15, 30, 60, 120 y 240 nmol, de acuerdo a cada grupo. La administración i.e. se realizó en las siguientes coordenadas: +0.5 mm anterior al bregma, -2.6 mm lateral al bregma y +4.5 mm ventral a la dura [Paxinos & Watson, 1998].

La inyección del QUIN o la SSI se realizó durante 2 min (0.25 μ L cada 30 segundos) y se dejó 2 min más para permitir la difusión del compuesto en el estriado, transcurridos 15 y 30 min, 1, 3 y 24 h después de la lesión, se extrajo de un grupo de animales el cerebro perfundido y de otro grupo de animales se aisló el estriado lesionado para posteriormente realizar la extracción de núcleos celulares.

5.5. Extractos nucleares.

Los estriados se homogenizaron a 4°C con 500 μ L de amortiguador hipotónico (HB) pH 7.5 (HEPES 20 mM y EDTA 1 mM suplementado con DTT 1 mM, Nonidet P40 0.5% e inhibidores de proteasas y fosfatasa 1X) y se incubaron en hielo durante 15 min. Las muestras se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5417R, Hauppauge, NY, USA) a 850 x g a 4°C durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante (fracción citoplasmática) a un tubo de microcentrífuga frío y se almacenó a 4°C hasta su uso. El pellet se resuspendió en 500 μ L de HB y se incubó en hielo durante 15 min.

Posteriormente, se adicionaron 25 μ L de Nonidet P40 al 10% a los pellets resuspendidos y se incubaron 5 min más en hielo. Se agitó en vortex durante 10 seg a la máxima intensidad y se centrifugó a 14,000 x g a 4°C durante 30 seg. El sobrenadante se almacenó como la fracción citoplasmática, mientras que el pellet (núcleos) se resuspendió en 75 μ L de amortiguador de lisis (TransAM Nrf2), se agitó en vortex por 10 seg a máxima intensidad y se incubó 30 min en hielo con agitación orbital a 150 rpm.

Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se agitaron en vortex 30 seg a máxima intensidad y se centrifugaron 10 min a 14,000 x g a 4°C. Del sobrenadante (extracto nuclear) se obtuvo una alícuota (10 μ L) para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry y el resto se almacenó a -70°C hasta su uso.

5.6. Conducta de rotación.

La conducta de rotación se realizó mediante el método descrito por Maldonado et al. (2010) en el modelo *in vivo* para determinar la relación que existe entre el daño en el tejido cerebral y el comportamiento de rotación inducido por la apomorfina.

Seis días posteriores a la lesión con QUIN (30, 60, 120 y 240 nmol), los animales fueron administrados con apomorfina *s.c.* (1 mg/Kg) y separados de forma individual en cajas de acrílico. Cinco minutos después, se contaron el número de giros ipsilaterales a la lesión durante 1 h. Un giro fue definido como una vuelta completa de 360°. Los resultados se expresan como número de giros ipsilaterales/hora.

5.7. Histología (H&E).

Se evaluó el daño morfológico producido 7 días después de la administración de QUIN (30, 60, 120 y 240 nmol). Las ratas fueron anestesiadas con 500 µL de pentobarbital sódico, se perfundieron vía transcardíaca con SSI+Heparina (500 mL/2 mL), seguido de una solución de paraformaldehído 4% en PBS. Se extrajo el cerebro y se almacenó 7 días en paraformaldehído 4%. Posteriormente los cerebros se colocaron en cassetts de inclusión de forma individual y se deshidrataron en soluciones de etanol y xilol para finalmente ser embebidos en parafina. Se realizaron cortes coronales de 5 µm de grosor en un micrótopo 820 Histo-Star (American Instrument Exchange, Inc., Haverville, MA, USA) cada 100 µm. Los cortes se adquirieron a partir de los 100 µm del inicio del estriado y cubriendo una distancia de 300 µm.

Los cortes se tiñeron con hematoxilina & eosina y se visualizaron en un microscopio (Leica, Cambridge, UK) con el objetivo de 40X. Se obtuvieron imágenes de 5 campos por corte, mediante una cámara Leica DFC-300FX (Leica Microsystem Digital Imaging, Coldhams, Lane, UK) a nivel del ventrículo y avanzando hacia el centro del estriado.

El análisis lo realizó una persona en ciego, tomando como criterio de daño núcleos picnóticos, vacuolización citoplasmática, daño en la integridad del neuropilo y edema citotóxico. Los resultados se expresan como porcentaje de células dañadas por campo.

5.8. Neurodegeneración.

Para la evaluación de la neurodegeneración, se obtuvieron cortes de 5 μm de grosor, tal como se describe en la histología y se realizó una tinción con fluoro jade B.

Los cortes fueron desparafinados en xilol durante 15 min y posteriormente en etanol absoluto 3 seg. Se sumergieron en una solución de etanol 80% y NaOH 1% durante 5 min, se transfirieron a una solución de etanol 70% durante 2 min, seguido de agua destilada por 2 min. Posteriormente, se transfirieron en una solución de KMnO_4 0.06% durante 10 min, seguido de agua destilada por 2 min y después se transfirieron a una solución de fluoro jade B 0.0004% durante 20 min. Se enjuagaron 3 veces en agua destilada durante 1 min y se secaron a 50°C durante 15 min. Finalmente se sumergieron en xilol durante 3 min y se montaron con resina.

Los cortes se visualizaron en un microscopio (Leica, Cambridge, UK) con una lámpara de fluorescencia, con filtro que excita en color azul y emite en color verde usando el objetivo de 40X. Se obtuvieron imágenes de 5 campos por corte, mediante una cámara Leica DFC-300FX (Leica Microsystem Digital Imaging, Coldhams, Lane, UK), a nivel del ventrículo y avanzando hacia el centro del estriado. El análisis lo realizó una persona en ciego, tomando como positivas las células que fluorescen en color verde. Los resultados se expresan como número de células positivas a fluoro jade B por campo.

5.9. Activación del factor Nrf2.

La cuantificación de la activación del factor Nrf2 se realizó en extractos nucleares, empleando el kit de ELISA TransAM Nrf2 de Active Motif. Para ello, el Nrf2 activo y

presente en la fracción nuclear se une a un oligonucleótido inmovilizado que contiene la secuencia ARE en la placa de ELISA. Posteriormente, el factor es reconocido mediante el uso de un anticuerpo primario (anti-Nrf2) y este último por un secundario, el cual está acoplado a peroxidasa de rábano, que produce una reacción colorimétrica fácilmente cuantificable por espectrofotometría.

A cada pozo se le adicionaron 40 μL de amortiguador de unión, seguido de 10 μL del extracto nuclear (20 μg de proteína) diluido en amortiguador de lisis. Para los controles positivos, se adicionaron 1.25 μg de proteína del extracto nuclear provisto en el kit, diluido en 9.5 μL de amortiguador de lisis. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h a 100 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron los pozos tres veces con 200 μL de amortiguador de lavado 1X.

Se adicionaron 100 μL del anticuerpo primario contra Nrf2, diluido 1:1000 en amortiguador de unión de anticuerpo 1X. La placa se cubrió, se incubó a temperatura ambiente durante 1 h sin agitación y al final se lavó 3 veces con 200 μL de amortiguador de lavado 1X.

El anticuerpo secundario HRP-conjugado se diluyó 1:1000 en amortiguador de unión de anticuerpo y se adicionaron 100 μL a cada pozo, se cubrió la placa y se incubó 1 h a temperatura ambiente sin agitación. Se lavaron los pozos 4 veces con 200 μL de amortiguador de lavado 1X.

Finalmente, se adicionaron 100 μL de la solución de desarrollo a todos los pozos y se incubó a temperatura ambiente por 15 min protegido de la luz directa. Se adicionaron 100 μL de solución de paro y se leyó la absorbancia en un lector de placas de ELISA (Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA) a 450 nm dentro de los primeros 5 min.

Durante el ensayo se utilizaron 2 pozos como blanco, 2 pozos como control positivo y 1 pozo por muestra.

5.10. Cuantificación de ERO.

La evaluación de la producción de ERO posterior a la lesión con QUIN se realizó usando el fluoróforo 2',7'-diclorofluoresceína. Para ello, las muestras (tejido disgregado) se incubaron con 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, capaz de difundir a través de la membrana plasmática e ingresar al citoplasma. Una vez en el citosol, las esterasas rompen la molécula formando 2',7'-diclorodihidrofluoresceína la cual es oxidada por la presencia de ERO como H_2O_2 , $HO\cdot$, $NO\cdot$ y $ONOO^-$.

Los animales se sacrificaron 30 min posteriores a la lesión con QUIN o SSI, se extrajeron los estriados lesionados y se cortaron en trozos pequeños. Posteriormente se incubaron a $37^\circ C$ durante 15 min en 5 mL de solución de disección (NaCl 136.7 mM, KCl 5 mM, Na_2HPO_4 0.1 mM, KH_2PO_4 0.2 mM, HEPES 9.84 mM, D-glucosa 16.6 mM y sacarosa 21.9 mM, pH 7.3) adicionada con tripsina 0.25%. Después, los estriados se hicieron pasar a través de jeringas con aguja de diferente calibre (20G, 21G, 22G y 25G) para la disgregación del tejido y se centrifugaron a $1000 \times g$ durante 3 min a $4^\circ C$. Los pellets se lavaron con 1 mL de solución de disección fría 3 veces y se resuspendieron en 500 μL de solución de disección fría. Se les adicionó 500 μL de una solución de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato 20 μM y se incubaron en oscuridad durante 30 min a $37^\circ C$. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron a $1000 \times g$ durante 3 min a $4^\circ C$ y los pellets se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS pH 7.4. Los pellets se resuspendieron en 400 μL de amortiguador de lisis (KH_2PO_4 19.62 mM, K_2HPO_4 30.38 mM y tritón X-100 1%, pH 7.4), se sonicaron y se centrifugaron a $12\ 000 \times g$ por 20 min a $4^\circ C$. Se midió la fluorescencia en el sobrenadante a $\lambda 488$ nm de excitación y $\lambda 515$ nm de emisión, en un lector de placas de ELISA (Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA). Al mismo tiempo se realizó una curva patrón con 2',7'-diclorofluoresceína. A los sobrenadantes se les midió la cantidad de proteína por el método de Lowry. Los resultados se expresan como nanomoles de 2',7'-diclorofluoresceína por microgramo de proteína (nmol de DCF/ μg de proteína).

5.11. Ensayo de lipoperoxidación.

Los niveles de lipoperoxidación se evaluaron mediante la estimación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acuerdo al método descrito por Pérez-de la Cruz et al. (2010).

Los animales se sacrificaron 30 min posteriores a la lesión con QUIN o SSI, se aislaron los estriados lesionados y se homogenizaron con 500 μ L de amortiguador de lisis (Tris base 10 mM, NaCl 15 mM, sacarosa 0.25 mM, tritón X-100 al 1% pH 7.9). Se tomaron 250 μ L del homogenado y se mezclaron con 500 μ L de TBA (TBA 0.75 g, ácido tricloroacético 15 g, HCl 2.54 mL), se incubaron 20 min a 100°C en baño maría. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5417R, Hauppauge, NY, USA) 15 min a 10600 x g. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm en un lector de placas de ELISA (Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA). Al mismo tiempo se realizó una curva patrón usando tetrametoxipropano, tratando los estándares igual que las muestras. A los homogenados se les midió la cantidad de proteína por el método de Lowry. Los resultados se expresan como nanomoles de TBARS por miligramo de proteína (nmol/mg de proteína).

5.12. Actividad enzimática.

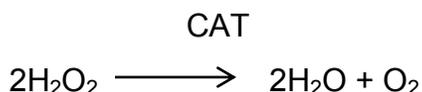
Se midió la actividad enzimática de la CAT, la GPx, la GR, la GST y la G6PDH 6 h posteriores a la lesión con QUIN en homogenados totales.

5.12.1. Preparación de homogenados.

Se extrajeron los estriados 6 h posteriores a la lesión con SSI o QUIN (15, 30, 60 120 y 240 nmol) y se homogenizaron con 500 μ L de amortiguador de lisis (tris base 10 mM, NaCl 15 mM, sacarosa 0.25 mM, tritón X 100 1%, PMSF 1 mM, leupeptina 1 μ g/mL, pepstatina 1 μ g/mL y aprotinina 1 μ g/mL). Los homogenados se centrifugaron a 10,621 x g durante 20 min a 4°C. La actividad enzimática se evaluó en el sobrenadante.

5.12.2. Actividad de la CAT.

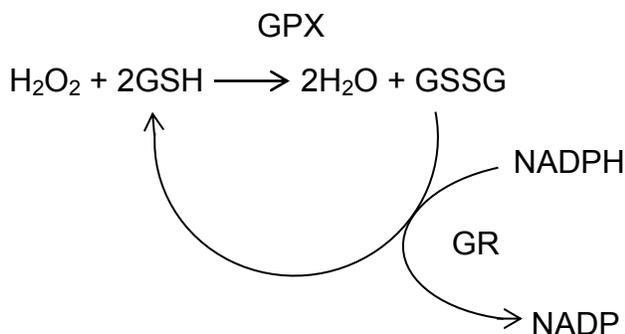
Se basa en la medición espectrofotométrica de la desaparición del H₂O₂, el cual absorbe a 240 nm.



Se adicionaron 25 µL de la muestra a 725 µL de mezcla de reacción (KH₂PO₄ 6 mM, Na₂HPO₄ 4 mM, H₂O₂ 30 mM, pH 7.0) y se midió la absorbancia a 240 nm cada 30 seg durante 3 min. Se usó como blanco amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0 (KH₂PO₄ 6 mM, Na₂HPO₄ 4 mM). La actividad se calculó tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ (40 M⁻¹cm⁻¹) y se corrigió por la cantidad de proteína presente en cada muestra. La actividad se expresa como U/mg proteína.

5.12.3. Actividad de la GPx.

Se basa en la medición espectrofotométrica de la desaparición del NADPH a 340 nm, como se muestra en la siguiente reacción.

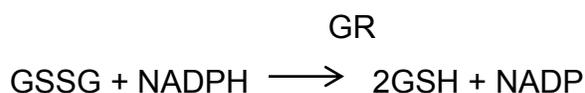


Se adicionaron 100 µL de la muestra a 800 µL de la mezcla de reacción (KH₂PO₄ 30 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, EDTA 1 mM, NaN₃ 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y GR 1 U/mL, pH 7.0). La reacción inició adicionando 100 µL del H₂O₂ 30 mM (en KH₂PO₄ 30 mM, Na₂HPO₄ 20 mM) y se midió la absorbancia a 340 nm cada 30 seg durante 3 min.

Se incluyó un tubo inespecífico al cual se le adiciono 100 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 (KH_2PO_4 30 mM, Na_2HPO_4 20 mM), 800 μL de la mezcla de reacción y 100 μL del H_2O_2 30 mM. El valor de este tubo se restó a cada muestra. La actividad se calculó tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del NADPH ($6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y se corrigió por la cantidad de proteína presente en la muestra. La actividad se expresa como U/mg proteína.

5.12.4. Actividad de la GR.

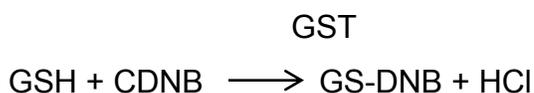
Se basa en la medición espectrofotométrica a 340 nm de la desaparición del NADPH, como se muestra en la siguiente reacción.



Se adicionaron 50 μL de la muestra a 950 μL de la mezcla de reacción (KH_2PO_4 62 mM, Na_2HPO_4 38 mM, EDTA 0.5, GSSG 1.1 mM y NADPH 1 mM) y se midió la absorbancia a 340 nm cada 30 seg durante 3 min. Se usó como blanco amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.6 (KH_2PO_4 62 mM, Na_2HPO_4 38 mM). La actividad se calculó tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del NADPH ($6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y se corrigió por la cantidad de proteína presente en la muestra. La actividad se expresa como U/mg proteína.

5.12.5. Actividad de la GST.

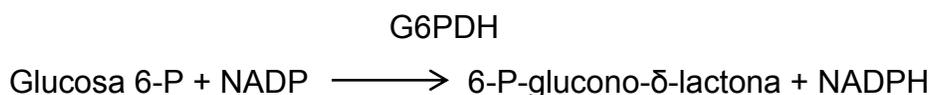
Se basa en la medición espectrofotométrica a 340 nm de la formación del compuesto conjugado entre el glutatión y el 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB), GS-DNB, como muestra la reacción siguiente.



Se adicionaron 80 μL de la muestra a 850 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 (KH_2PO_4 41.8 mM y Na_2HPO_4 8.2 mM) y 20 μL de GSH 50 mM (en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5). La reacción se inició adicionando 50 μL de CDNB 20 mM (en DMSO), se midió la absorbancia a 340 nm cada 30 seg durante 3 min. Se usó como blanco un tubo que contenía 850 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5, 80 μL de agua, 20 μL de GSH 50 mM y 50 μL de CDNB 20 mM. La actividad se calculó tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del conjugado GS-DNB ($9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y se corrigió por la cantidad de proteína presente en la muestra. La actividad se expresa como U/mg proteína.

5.12.6. Actividad de la G6PDH.

Se basa en la medición espectrofotométrica a 340 nm de la formación de NADPH, como muestra la siguiente reacción.



Se adicionaron 90 μL de la muestra a 470 μL del amortiguador tris-HCl adicionado con MgCl_2 (Tris-HCl 55mM, MgCl_2 33 mM, pH 7.8), 20 μL de NADP 6 mM disuelto en el amortiguador Tris-HCl con MgCl_2 y 20 μL de glucosa 6-P 100 mM disuelta en el amortiguador Tris-HCl con MgCl_2 . Se midió la absorbancia a 340 nm cada 30 seg durante 6 min. Se usó como blanco el amortiguador Tris-HCl adicionado con MgCl_2 . La actividad se calculó tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del NADPH ($6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y se corrigió por la cantidad de proteína presente en la muestra. La actividad se expresa como U/mg proteína.

5.13. Análisis estadístico.

Los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Los datos se analizaron mediante ANOVA, seguido de una prueba de Dunnet, usando el software Prism 5.2 (Graph Pad, San Diego, CA, USA). Un valor de $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS.

6.1. Conducta de Rotación

Para observar la magnitud del daño inducido por el QUIN se evaluó el número de giros ipsilaterales a la lesión durante 1 h (Figura 12) inducidos por la administración de apomorfina (1 mg/Kg), 6 días después de la lesión con SSI o QUIN a diferentes dosis (30, 60, 120 y 240 nmol). Se observa un incremento en el número de giros solo con las dosis de 120 y 240 nmol (120 y 271 giros, respectivamente (Figura 12).

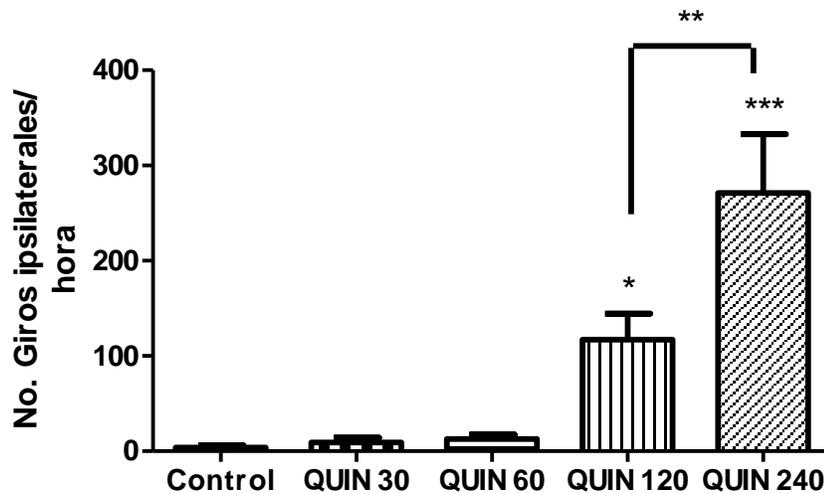


Figura 12. Conducta de rotación inducida por la administración de apomorfina (1 mg/Kg) s.c. 6 días posteriores a la lesión con SSI (control) o ácido quinolínico (QUIN) 30, 60, 120 y 240 nmol. Los animales se separaron en cajas individuales y 5 min después de la administración de apomorfina se contaron los giros ipsilaterales durante 1 h. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $P < 0.05$ vs. Control y *** $P < 0.001$ vs. Control.

6.2. Histología

Para correlacionar lo observado en la evaluación conductual y el daño que se presenta en el tejido, se cuantificó el daño histológico mediante una tinción de H&E a los 7 días posterior a la lesión con SSI para los controles y con QUIN a las diferentes dosis utilizadas.

En la figura 13 se observan imágenes representativas de cada grupo teñidas con H&E a 10X. Se puede apreciar que con las dosis de 30 y 60 nmol, el tejido muestra poco daño, ya que se ve integro el neuropilo (triángulos negros), que es la región comprendida entre varios cuerpos celulares. Por otro lado al aumentar la dosis, el tejido va perdiendo esta integridad, siendo mayor el daño al neuropilo con la dosis de 240 nmol, lo cual podemos apreciar con una mayor cantidad de espacios entre los cuerpos celulares (marcado con flechas negras).

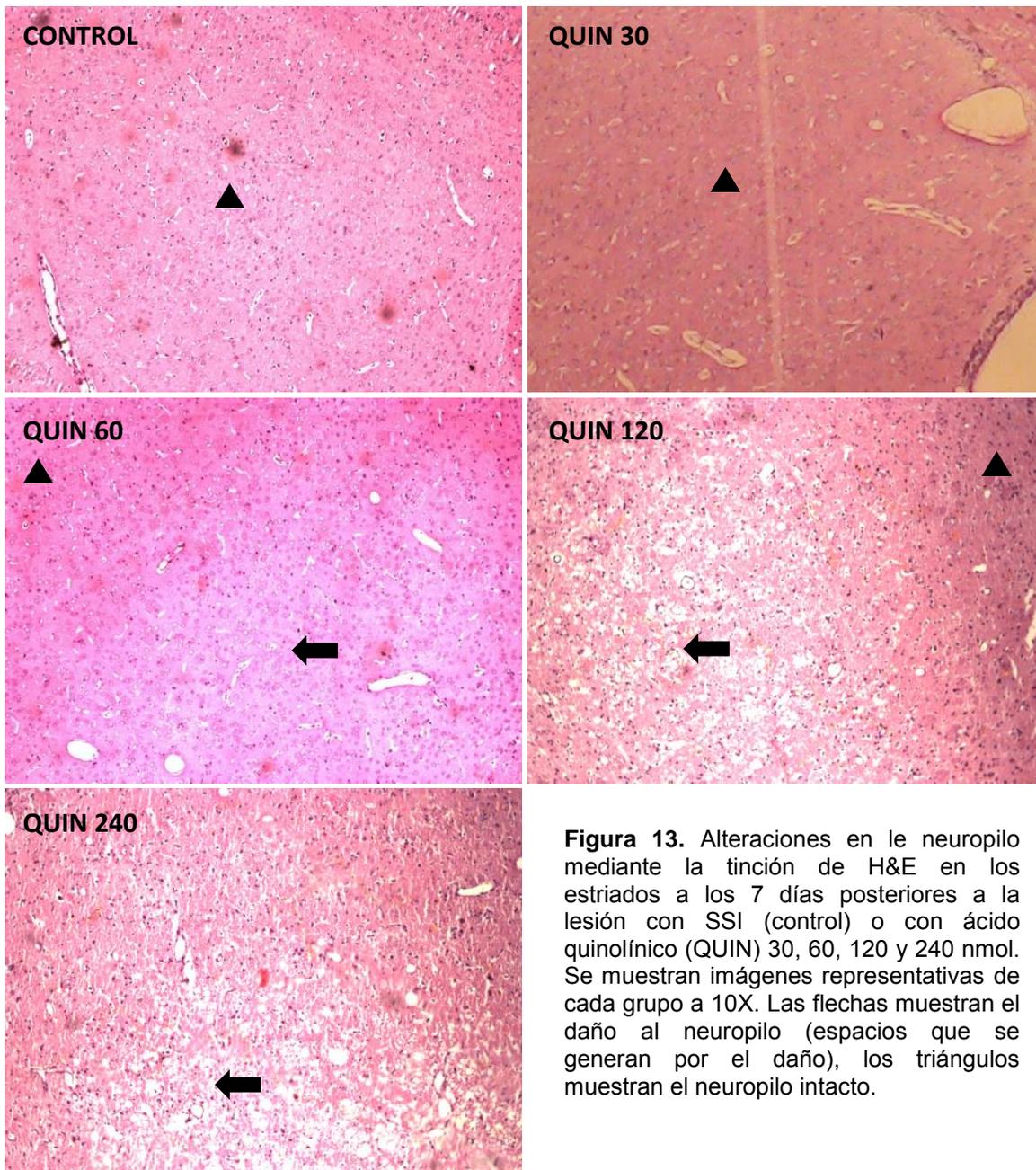


Figura 13. Alteraciones en el neuropilo mediante la tinción de H&E en los estriados a los 7 días posteriores a la lesión con SSI (control) o con ácido quinolínico (QUIN) 30, 60, 120 y 240 nmol. Se muestran imágenes representativas de cada grupo a 10X. Las flechas muestran el daño al neuropilo (espacios que se generan por el daño), los triángulos muestran el neuropilo intacto.

En la figura 14 A se observan las imágenes representativas de cada grupo a 40X y en la 14 B los criterios para las células sin daño y en C los criterios utilizados para la evaluación del daño a las células. Se puede apreciar que el daño histológico va incrementando conforme la dosis de QUIN aumenta; así mismo se observa un

ligero daño en el tejido de los grupos controles, asociado a la lesión mecánica generada en el tejido por la inyección con la jeringa; pero a pesar de esto, una gran cantidad de células sin daño son observadas (Figura 14 A). En los grupos QUIN 30 y 60 se puede apreciar que el neuropilo se encuentra integro, pero las células empiezan a presentar daño como pérdida de la integridad de la membrana y edema citotóxico, siendo mayor en la dosis de 60 nmol. Por otro lado, en el grupo QUIN 120 se puede observar un aumento en el número de células picnóticas y comienza el daño al neuropilo, mientras que con 240 nmol, el número de células picnóticas se incrementa considerablemente y es evidente la pérdida en la integridad del neuropilo (Figura 14 A).

En la figura 15 se muestra la gráfica de la cuantificación de células dañadas por campo, se puede observar que el porcentaje de células dañadas (siguiendo los criterios mencionados) aumenta de forma dosis dependiente, tal como se observa en la figura 14. El grupo control presenta un 23.23% de células dañadas, mientras que en los grupos con QUIN se observa un daño de 35.81%, 48.94%, 68.845% y 86.56% para los grupos QUIN 30, 60, 120 y 240 nmol, respectivamente.

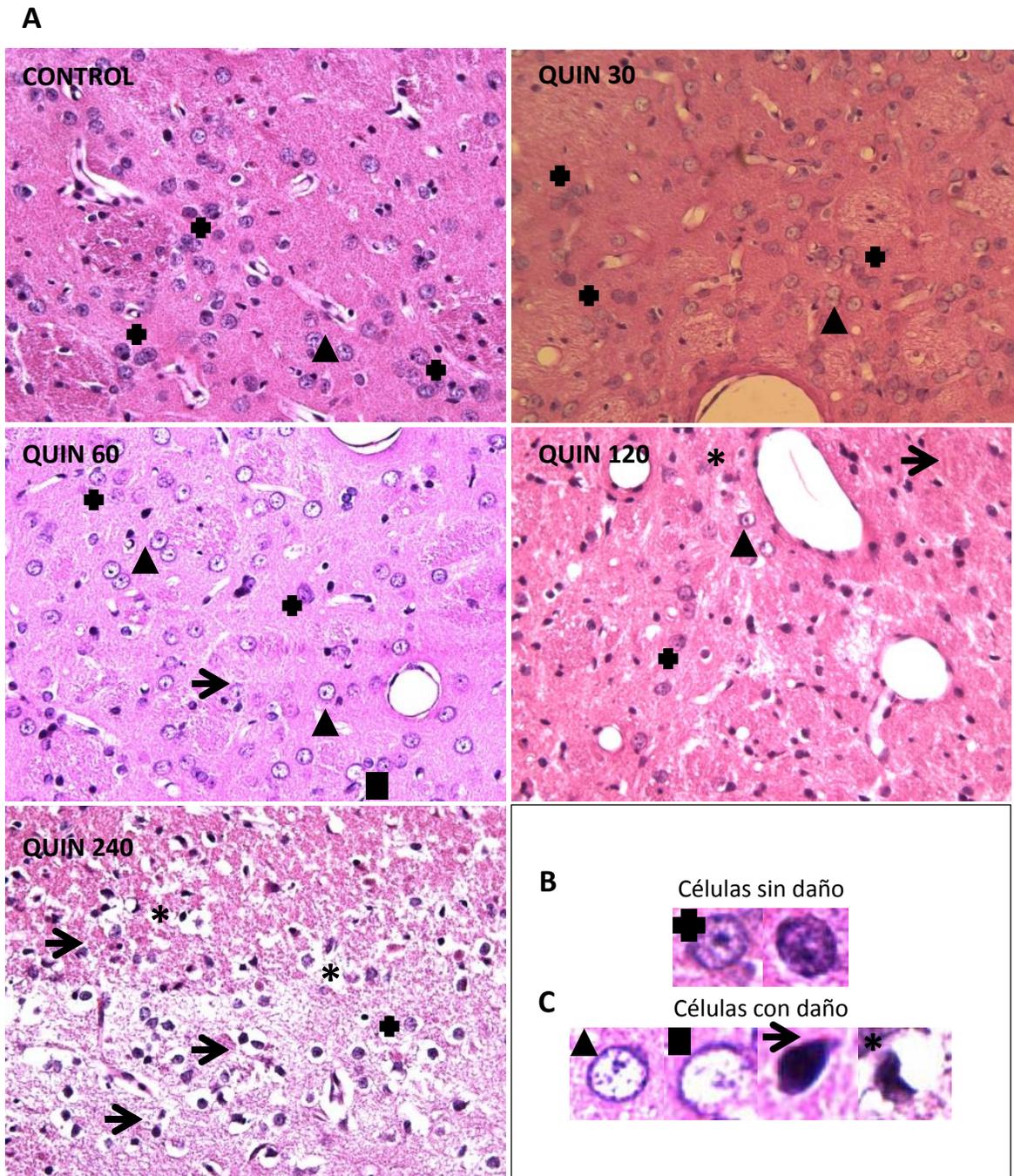


Figura 14. Alteraciones histológicas mediante la tinción de H&E en los estriados a los 7 días posteriores a la lesión con SSI (control) o con ácido quinolínico (QUIN) 30, 60, 120 y 240 nmol. Se muestran imágenes representativas de cada grupo a 40X (panel A). En el panel B y C se muestran los criterios utilizados para el análisis histológico, se consideraron células sin daño aquellas que tenían una integridad de su membrana, se distinguía el núcleo y se observa integridad del citoplasma (cruces) (panel B). Los criterios de daño fueron, pérdida de la integridad del citoplasma y edema (triángulos), pérdida de la integridad de la membrana plasmática (cuadrados), picnosis (flechas) y retracción del cuerpo celular (asteriscos) (Panel C).

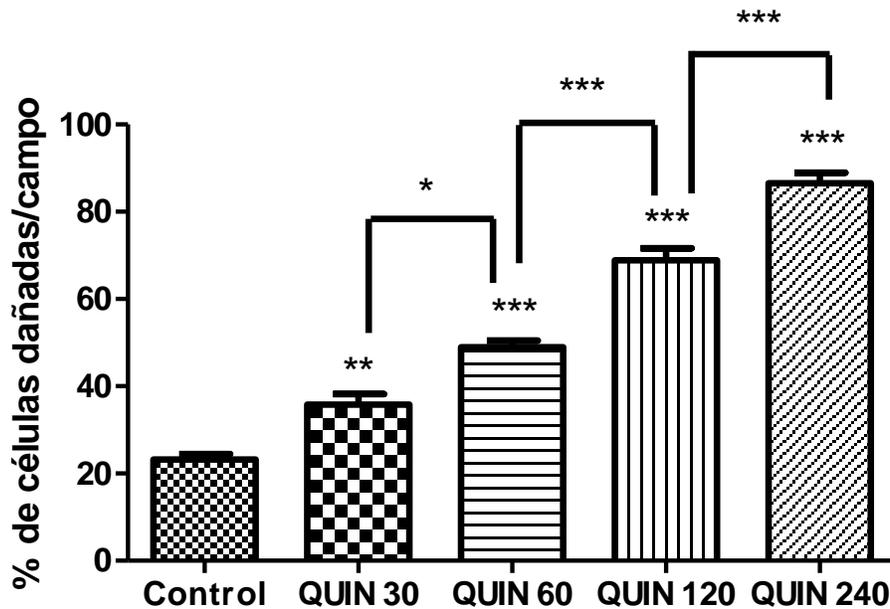


Figura 15. Porcentaje de células dañadas en el estriado a los 7 días posteriores a la lesión con SSI (control) o con ácido quinolínico (QUIN) 30, 60, 120 y 240 nmol. Se realizó el conteo de las células dañadas y las células totales en el tejido teñido con H&E y se expresó como porcentaje de células dañadas por campo, contando 5 campos por rata. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ** $P < 0.01$ vs. Control y *** $P < 0.001$ vs. Control.

6.3. Neurodegeneración.

Adicionalmente, para caracterizar el daño producido por el QUIN, se cuantificó el número de células positivas a fluoro jade B como marcador de neurodegeneración del tejido estriatal, 7 días después de la lesión con SSI o QUIN (60, 120 y 240 nmol).

En la figura 16 se muestran imágenes representativas a 40X de los cortes teñidos con fluoro jade B, tanto del lado ipsilateral como el contralateral a la lesión, este último como control de cada corte. Las imágenes contralaterales no muestran ninguna célula positiva a fluoro jade, indicando que no existen células en neurodegeneración debido a la extracción y tratamiento del tejido. Sin embargo,

en el grupo control se observan en promedio 8 células positivas a fluorojade B/campo debido a la lesión mecánica de la jeringa y al volumen inyectado en el estriado. Por otra parte, se observa que al aumentar la dosis de QUIN, el número de células en proceso de neurodegeneración se incrementa. El tratamiento con QUIN (60 120 y 240 nmol) incrementó en 2.1, 4.5 y 5.2 veces el número de células positivas a fluorojade B por campo, respectivamente con respecto al control (Figura 17).

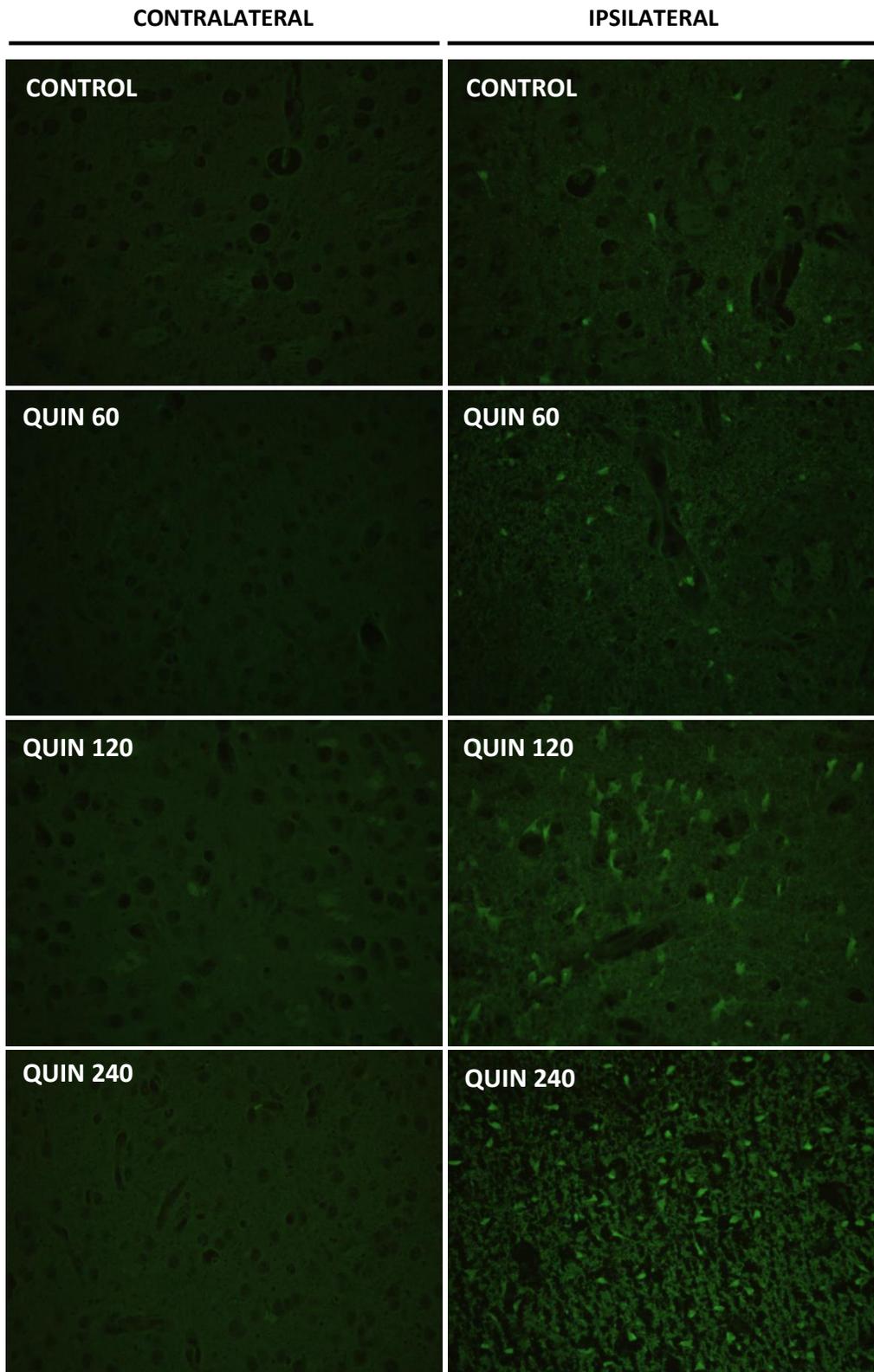


Figura 16. Análisis de la neurodegeneración mediante la tinción con fluoro jade B a los 7 días posteriores a la lesión con SSI (control) o con ácido quinolínico (QUIN) 60, 120 y 240 nmol. Se muestran imágenes representativas del tejido a 40X, del lado ipsilateral a la lesión y como control de cada corte el lado contralateral a la lesión. Las células en neurodegeneración se observan en color verde.

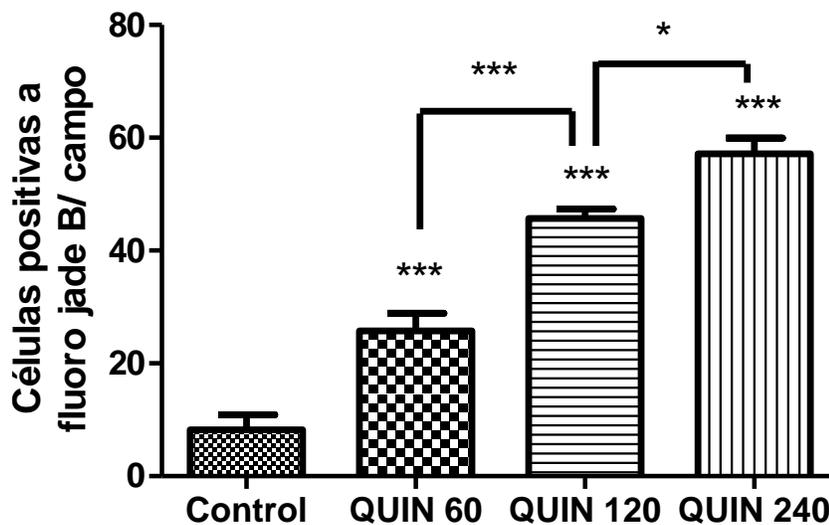


Figura 17. Número de células en neurodegeneración en el estriado a los 7 días posteriores a la lesión con SSI (control) o con ácido quinolínico (QUIN) 60, 120 y 240 nmol. Los cortes de estriado fueron teñidos con fluoro jade B y observados al microscopio con una lámpara de fluorescencia. Se cuantificaron el número de células positivas a fluoro jade B por campo, contando 5 campos por rata. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $P < 0.01$ vs. QUIN 120 y *** $P < 0.001$ vs. Control.

6.4. Activación del factor Nrf2.

Posterior a la caracterización del daño inducido por el QUIN a tiempos largos (6 y 7 días), se evaluó el efecto de esta toxina sobre la respuesta temprana ante el insulto generado, mediante la activación del factor Nrf2. Para ello, se cuantificó la activación de este factor mediante un ensayo de ELISA (TransAM Nrf2) en extractos nucleares tras la administración de SSI o dosis crecientes de QUIN (15, 30, 60, 120 y 240 nmol) para determinar cuánto Nrf2 es traslocado al núcleo y es capaz de unirse a su secuencia diana (ARE), a diferentes tiempos (15 y 30 min, 1, 3 y 24 h).

En la figura 16 se muestra la gráfica de la activación del factor Nrf2 a los 15 min posteriores a la lesión con QUIN. Se puede apreciar que en este tiempo, los

niveles de este factor con las diferentes dosis de QUIN no muestran cambios respecto al control (Figura 18). A los 30 min se observó un efecto dosis respuesta hasta 60 nmol de QUIN; ya que 15 nmol de QUIN no inducen cambios en la actividad de Nrf2 con respecto al control, mientras que 30 nmol de QUIN muestra el doble de la activación de Nrf2 con respecto al control y las dosis de 60, 120 y 240 nmol presentaron un incremento de 3.3, 3.4 y 3.7 veces, respectivamente, con respecto al control (Figura 19). No se observaron cambios en la activación de Nrf2, excepto por un ligero incremento en el grupo QUIN 240, 1 h posterior a la lesión con la toxina (Figura 20). A las 3 h posteriores a la lesión con QUIN se observó una disminución de la activación de Nrf2 (Figura 21), a las 24 h (Figura 22) la activación de Nrf2 no mostró cambios significativos con respecto al control.

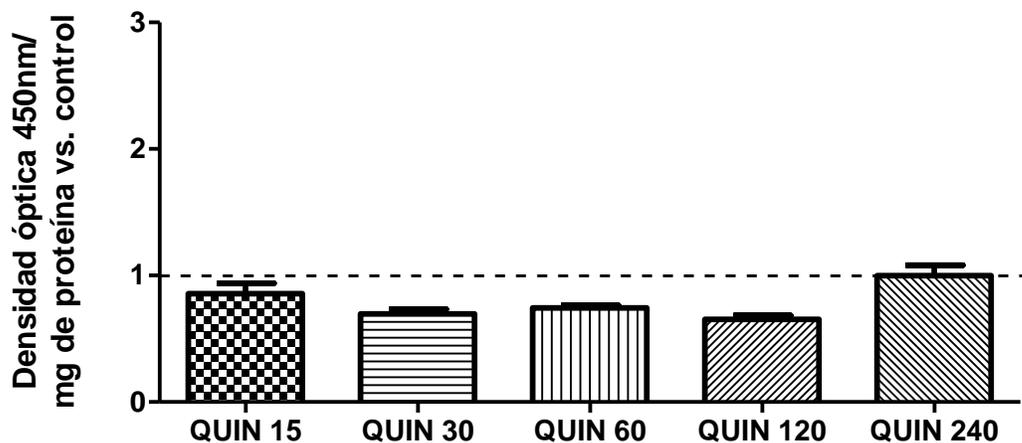


Figura 18. Activación del factor Nrf2 en extractos nucleares. Se cuantificó la activación de Nrf2 mediante un ensayo de ELISA a los 15 min posteriores a la lesión con SSI para los controles (línea punteada) o con ácido quinolínico (QUIN) 15, 30, 60, 120 y 240 nmol. Los resultados se expresan como la media \pm EEM.

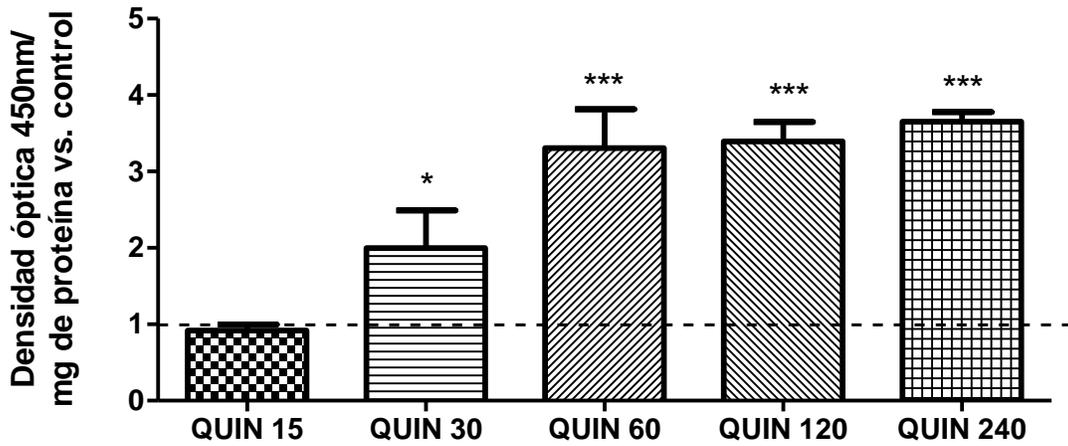


Figura 19. Activación del factor Nrf2 en extractos nucleares. Se cuantificó la activación de Nrf2 mediante un ensayo de ELISA a los 30 min posteriores a la lesión con SSI para los controles (línea punteada) o con ácido quinolínico (QUIN) 15, 30, 60, 120 y 240 nmol. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $P < 0.05$ vs. Control, *** $P < 0.001$ vs. Control

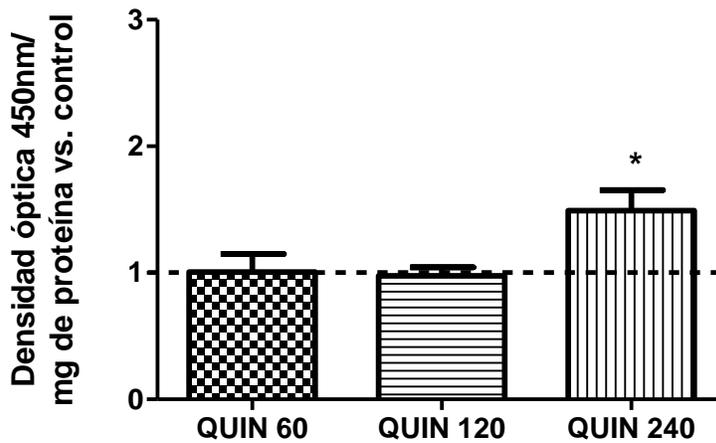


Figura 20. Activación del factor Nrf2 en extractos nucleares. Se cuantificó la activación de Nrf2 mediante un ensayo de ELISA a 1 h posterior a la lesión con SSI para los controles (línea punteada) o con ácido quinolínico (QUIN) 60, 120 y 240 nmol. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $P < 0.05$ vs. Control.

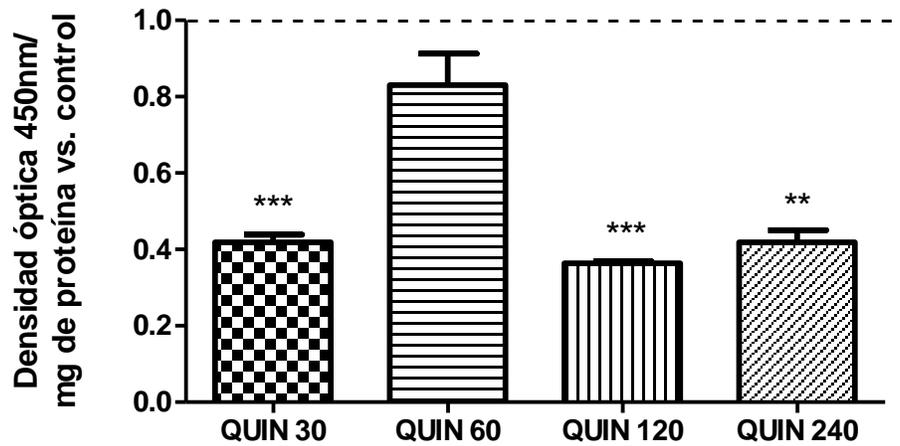


Figura 21. Activación del factor Nrf2 en extractos nucleares. Se cuantificó la activación de Nrf2 mediante un ensayo de ELISA a 3 h posteriores a la lesión con SSI para los controles (línea punteada) o con ácido quinolínico (QUIN) 30, 60, 120 y 240 nmol. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ** $P < 0.01$ vs. Control, *** $P < 0.001$ vs. Control

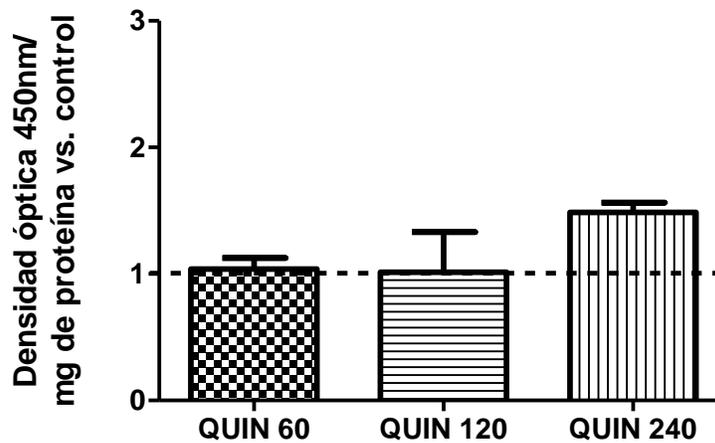


Figura 22. Activación del factor Nrf2 en extractos nucleares. Se cuantificó la activación de Nrf2 mediante un ensayo de ELISA a 24 h posteriores a la lesión con SSI para los controles (línea punteada) o con ácido quinolínico (QUIN) 60, 120 y 240 nmol. Los resultados se expresan como la media \pm EEM.

6.5. Cuantificación de ERO inducidas por la administración de QUIN.

Debido a que la mayor activación del factor Nrf2 se observó a los 30 min (Figura 19) y el comportamiento que presentó fue parcialmente dosis dependiente; se cuantificó el nivel de producción de ERO a los 30 min posteriores a la lesión con QUIN, con el fin de establecer si se observa un comportamiento similar al observado con la activación de Nrf2. Ya que este factor se considera el regulador maestro de la respuesta antioxidante y su inducción responde al estado redox celular [Sandberg et al., 2014].

La producción de ERO muestra que a dosis bajas de QUIN (15, 30 y 60 nmol) se observa una mayor producción de ERO (1.34×10^{-5} , 1.21×10^{-5} y 1.29×10^{-5} nmol/ μ g proteína, respectivamente); mientras que, a dosis altas de QUIN (120 y 240 nmol) la producción de ERO disminuye (7.87×10^{-5} y 5.25×10^{-5} nmol/ μ g proteína, respectivamente) (Figura 23).

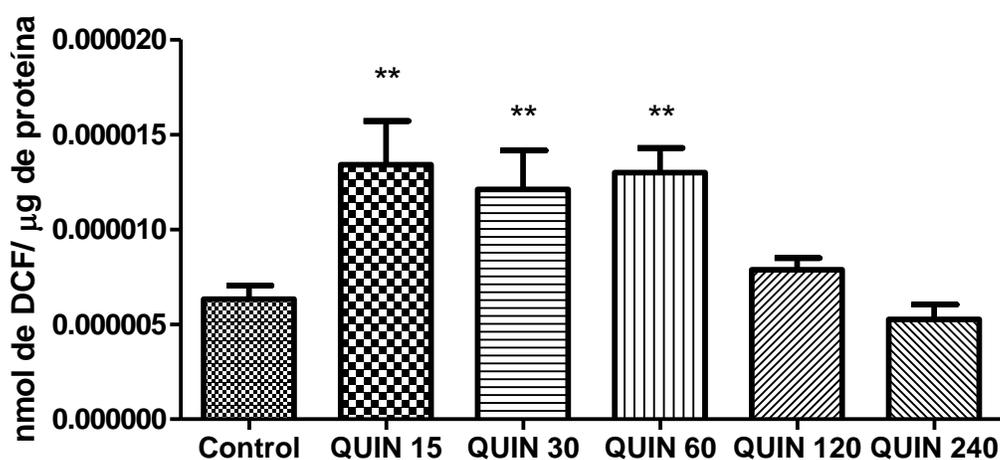


Figura 23. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Se cuantificó usando un ensayo de fluorescencia con 2',7'-diclorofluoresceína a los 30 min posteriores a la lesión con SSI (control) o con ácido quinolínico (QUIN) 15, 30, 60, 120 y 240 nmol. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. **P<0.01 vs. Control.

6.6. Lipoperoxidación.

El nivel de las ERO inducidas por el QUIN mostró un comportamiento diferente a lo esperado; por ello y para corroborar estos resultados, se evaluó de forma indirecta el estrés oxidante en el tejido midiendo el daño oxidativo a los lípidos (lipoperoxidación).

Se empleó la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) a los 30 min posteriores a la administración de QUIN. El tratamiento con QUIN no incrementó la lipoperoxidación e incluso la disminuyó (4.18×10^{-5} , 4.32×10^{-5} , 3.65×10^{-5} , 3.78×10^{-5} y 4.31×10^{-5} nmol/mg proteína para las dosis de 15, 30, 60, 120 y 240 nmol de QUIN, respectivamente) comparado con el control (6.08×10^{-5} nmol/mg proteína) (Figura 24).

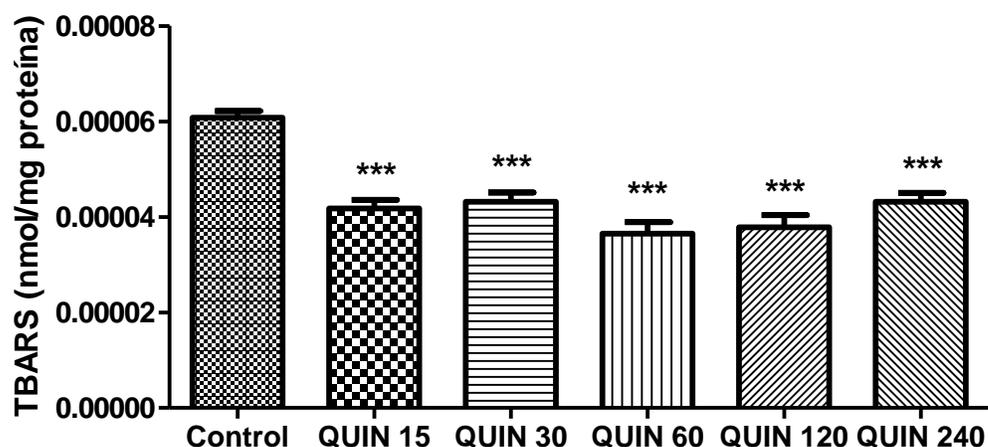


Figura 24. Niveles de lipoperoxidación. Se midió el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como marcador del daño oxidante a los lípidos a los 30 min posteriores a la lesión con SSI (control) o con ácido quinolínico (QUIN) 15, 30, 60, 120 y 240 nmol. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ***P<0.001 vs. Control.

6.7. Actividad de enzimas antioxidantes.

La activación del factor de transcripción Nrf2 promueve un incremento en la respuesta de fase 2 y enzimas antioxidantes, la cual tiene la finalidad de catalizar diversas reacciones que en conjunto producen una amplia protección en contra del daño oxidante y electrofílico [Silva-Islas et al., 2012].

Debido al aumento observado en la activación del factor Nrf2 a los 30 min, esperábamos que esta activación tuviera un efecto sobre la respuesta antioxidante, medida por la actividad de las enzimas CAT, GPx, GR, GST y G6PDH a las 6 h posteriores a la administración con QUIN. Sin embargo, en general no se observaron cambios significativos en la actividad de estas enzimas, excepto por los ligeros incrementos observados con las dosis de 120 y 240 nmol en la actividad de las enzimas CAT y GST y la disminución en la actividad de la GPx a 240 nmol (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad de las enzimas reguladas por el factor Nrf2.

Tratamiento	ERO 30 min nmol DCF/ μ g prot	Nrf2 30 min DO/mg prot vs control	Actividad CAT (U/mg prot)	Actividad GPx (U/mg prot)	Actividad GR (U/mg prot)	Actividad GST (U/mg prot)	Actividad G6PDH (U/mg prot)
Control	6.31×10^{-6}	1	0.1031 \pm 0.03098	0.01135 \pm 0.00032	0.008985 \pm 0.00150	0.007643 \pm 0.00053	0.002558 \pm 0.00065
QUIN 15	1.34×10^{-5} ↑	0.9193 NC	0.1191 \pm 0.01567	0.01156 \pm 0.00024	0.009658 \pm 0.00053	0.009361 \pm 0.00030*↑	0.002524 \pm 0.00004
QUIN 30	1.21×10^{-5} ↑	1.9960 ↑	0.1365 \pm 0.00370	0.01073 \pm 0.00063	0.009345 \pm 0.00028	0.008665 \pm 0.00017	0.002494 \pm 0.00011
QUIN 60	1.29×10^{-5} ↑	3.3044 ↑↑	0.1530 \pm 0.00253	0.01011 \pm 0.00036	0.008906 \pm 0.00051	0.008641 \pm 0.00027	0.002527 \pm 0.00005
QUIN 120	7.87×10^{-6}	3.3937 ↑↑	0.1817 \pm 0.00802*↑	0.00903 \pm 0.00093	0.009489 \pm 0.00038	0.009051 \pm 0.00025*↑	0.002675 \pm 0.00012
QUIN 240	5.25×10^{-6}	3.6535 ↑↑	0.1677 \pm 0.01097*↑	0.00756 \pm 0.00077↑	0.009599 \pm 0.00037	0.009069 \pm 0.00031↑	0.001920 \pm 0.00009

Las flechas hacia arriba ↑ indican un incremento respecto al grupo control. *P<0.05 vs control y **P<0.01 vs control. CAT: catalasa, GPx: glutatión Peroxidasa, GR: glutatión reductasa, GST: glutatión-S-transferasa y G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

7. DISCUSIÓN.

Durante la caracterización del daño inducido por el QUIN a tiempos largos, se observa que el daño en el tejido presenta un comportamiento dosis dependiente. A nivel histológico, al incrementar la dosis de QUIN incrementa el daño al neuropilo, el número de células dañadas, así como el número de células muertas. Este daño se ve reflejado a nivel conductual; ya que al aumentar la dosis de QUIN, aumenta el número de giros ipsilaterales/h y correlaciona con lo observado en pacientes a nivel clínico, ya que se ha determinado que en pacientes con alguna enfermedad neurodegenerativa, las alternaciones propias de la enfermedad (conductuales o cognitivas) se presentan cuando existe un daño histológico por arriba del 50% y, en este trabajo, observamos que las alteraciones conductuales se presentan cuando existe un daño histológico por arriba del 60%. Apoyando estos hallazgos también se observa que al aumentar la dosis de QUIN aumenta el número de células en neurodegeneración.

Se ha demostrado que la administración de 240 nmol de QUIN en el estriado del cerebro en ratas induce un aumento en la muerte celular conforme transcurre el tiempo. Colin-González et al. (2013) reportaron un aumento en el daño histológico desde los 3 (42.7%) y 5 (79.4%) días posteriores a la administración de 240 nmol de QUIN, mientras que la neurodegeneración también se vio incrementada de forma proporcional. Se ha reportado que el proceso excitotóxico puede producir dos tipos de muerte, necrosis y apoptosis, y esto dependerá de la intensidad de la sobreactivación de los receptores NMDA [Pivovarova & Andrews, 2010]. Una alta cantidad de moléculas excitotóxicas provocan muerte por necrosis, mientras que una moderada cantidad de éstas, provocará muerte por apoptosis. Se ha demostrado en modelos *in vitro* que el QUIN puede producir ambos tipos de muerte [Chiarugi et al., 2001; Braidy et al., 2009]. Sin embargo, *in vivo* esto no se ha reportado y nuestros resultados sugieren que el tipo de muerte es por necrosis dadas las características morfológicas de daño que se contaron.

Una vez caracterizado el daño se evaluó la activación del factor Nrf2 a tiempos tempranos para determinar si el insulto provocado por el QUIN a diferentes dosis modula la activación de Nrf2.

Dentro de los mecanismos que llevan a la muerte de las neuronas y a la degeneración del tejido nervioso, la disfunción glutamatérgica es uno de los principales, ya que produce un estado excitotóxico que desencadena un incremento de Ca^{2+} intracelular y un incremento en el estrés oxidante al activar enzimas dependientes de Ca^{2+} como la fosfolipasa A_2 , la SON o la xantina oxidasa. Por otra parte, provoca disfunción mitocondrial debida al incremento de Ca^{2+} , aumentando los niveles de estrés oxidante [Mehta et al., 2013]. El aumento de los niveles de estrés oxidante promueven la activación de la vía Nrf2/ARE, la cual se encarga de disminuir o mantener en niveles basales las ERO y ERN [Copple, 2012]. Se ha reportado que, en el modelo de daño con QUIN, el aumento en los niveles de estrés oxidante es consecuencia del proceso excitotóxico generado por la sobrestimulación de los receptores NMDA [Pérez-Severiano et al., 2004; Santamaría et al, 2001]. Por lo tanto, se esperaba que al aumentar los niveles de ERO y ERN, se induciría el aumento en los niveles de Nrf2 a nivel nuclear. Sin embargo, en este trabajo se observó que la activación de Nrf2, simultaneo al incremento de los niveles de ERO solo ocurre con las dosis bajas de QUIN (30 y 60 nmol), mientras que con dosis mayores (120 y 240 nmol) la activación de Nrf2 ocurre de forma independiente a la producción de ERO a los 30 min.

El factor Nrf2 es una proteína finamente regulada, debido a que un aumento en su activación, puede favorecer un incremento en la apoptosis [Strachan et al., 2005], generar resistencia a fármacos quimioterapéuticos [Kaspar et al., 2012] e inclusive, la acumulación persistente de Nrf2 en el núcleo, puede llevar a la muerte postnatal de ratones [Wakabayashi et al., 2013]. En este trabajo, la administración de las diferentes dosis de QUIN incrementaron la activación de Nrf2 solo a los 30 min, lo que correlaciona con lo observado en otros trabajos, donde se evidencia que la mayor acumulación de Nrf2 en el núcleo ocurre a los 30 min [Jain &

Jaiswal, 2006; Kaspar et al., 2012]. Sin embargo, en tiempos menores (15 min), no se observa ningún incremento en la activación de Nrf2, probablemente debido a que es un tiempo muy corto para permitir la disociación del complejo Keap1-Nrf2, la fosforilación y traslocación de Nrf2 al núcleo, así como su unión a su secuencia blanco; debido a que la proteína Bach1 se encuentra dimerizada con proteínas Maf pequeñas y unida a la secuencia ARE, impidiendo la unión de Nrf2 a la secuencia ARE (activación de Nrf2). La proteína Bach1 es fosforilada en la tirosina 486 y posteriormente es exportada fuera del núcleo, permitiendo la unión de Nrf2 a la secuencia ARE [Kaspar & Jaiswal, 2010], lo cual es probable que ocurra hasta los 30 min, ya que fue el tiempo en el cual se observa mayor activación de Nrf2. A tiempos más largos la activación de Nrf2 disminuye a niveles basales e inclusive por debajo del control debido probablemente a la exportación de Nrf2 hacia el citoplasma, debido al complejo Keap1-Culina3-Rbx1, correlacionando con lo reportado por otros autores [Kaspar et al., 2012; Jain & Jaiswal, 2006]. Además, estos resultados podrían estar asociados con la vida media de Nrf2 que es de 10 a 20 min en condiciones normales [Itoh et al., 2003] mientras que en presencia de estrés oxidante, el tiempo de vida media se incrementa a 51 min [Lau et al., 2008] y como a tiempos cortos (30 min) se observó una traslocación al núcleo, es probable que exista una disminución de los niveles citoplasmáticos de Nrf2, no habiendo cantidad suficiente de proteína para seguir siendo traslocada al núcleo y posteriormente activarse, lo que pudiera explicar la disminución observada a las 3 h.

Se sabe que Nrf2 se autorregula, debido a que en su región promotora tiene una secuencia ARE [Bryan et al., 2013]; por lo tanto, al incrementar su activación es probable que aumente la cantidad de Nrf2 (sintetizado de novo). En resultados obtenidos en el laboratorio en un modelo de isquemia cerebral/reperfusión, donde la producción de ERO y la excitotoxicidad son dos eventos importantes en la fisiopatología de este padecimiento, tal como ocurre en el modelo con QUIN, el RNAm de Nrf2 incrementó 3 h posteriores a la inducción de 1 h de isquemia cerebral, lo cual sugiere que la inducción de Nrf2 se puede llevar a cabo a tiempos superiores a las 3 h y es probable que a tiempos más largos (24 h), el incremento

a niveles basales de Nrf2 se deba a la síntesis de novo, debido a que, como cualquier proteína, su síntesis de novo implica transcripción y traducción, lo cual requiere de cierto tiempo para llevarse a cabo.

Por otra parte, la activación de Nrf2 a los 30 min muestra un comportamiento dosis dependiente parcial. A dosis bajas (15, 30 y 60 nmol) se observa un comportamiento dosis dependiente; mientras que a dosis altas (120 y 240 nmol) se observa una máxima activación de Nrf2 y no cambia con la dosis. Esto puede deberse a que todo el Nrf2 disponible en el citoplasma es traslocado al núcleo cuando las células son estimuladas con las dosis más altas de QUIN, mientras que el estímulo no es el suficiente para lograr el mismo efecto a dosis más bajas. Aparentemente la activación temprana de Nrf2 (30 min) no está asociada con la formación de ERO en las dosis más altas (120 y 240 nmol).

Se ha reportado que la administración intraestriatal de QUIN induce estrés oxidante mediante: 1) el aumento de los niveles de HO[·], el incremento en la actividad de la SON, el aumento en la lipoperoxidación y la disminución en los sistemas antioxidantes endógenos [Cruz-Aguado et al., 2000; Santamaría & Ríos, 1993; Aguilera et al., 2007, Santamaría et al., 2001]. Recientemente, Carmona-Ramirez et al. (2013) reportaron un aumento en el contenido de grupos carbonilo desde las 6 h posteriores a la administración de 240 nmol de QUIN, marcador que se mantiene elevado a los 3 (1.8 veces) y 5 (2.1 veces) días posteriores a la lesión con la misma dosis de QUIN [Colin-González et al., 2013]. Por otra parte, se considera al factor Nrf2 como el regulador maestro del estado redox celular [Dinkova-Kostova et al., 2002]. Este factor es regulado por la proteína Keap 1, que tiene un alto contenido en cisteínas (4.3% de todos sus residuos), lo cual la hace capaz de censar el estado redox celular. Estos residuos de cisteínas (27 residuos) generalmente se encuentran flanqueados por un aminoácido básico lo que incrementa su reactividad [Bryan et al., 2013]. De todos los residuos de cisteína de Keap 1, los residuos 151, 272 y 288 parecen ser los más importantes en la actividad del factor Nrf2 [Watai et al., 2007]. Estas cisteínas al servir como sensores de estrés, pueden sufrir una oxidación por el aumento de las especies

oxidantes [Coople et al., 2008; Kaspar et al., 2009], permitiendo la disociación parcial del complejo Keap1-Nrf2 y favoreciendo que Nrf2 pueda ser fosforilado por algunas cinasas (PKC, CK2, entre otras) [Sandberg et al., 2014]. Finalmente Nrf2 es liberado de la proteína represora Keap 1 y se trasloca al núcleo, donde se dimeriza con proteínas pequeñas Maf [Kaspar et al., 2009] y es capaz de unirse a su secuencia blanco, la región ARE.

Como se observó un incremento en la activación de Nrf2 a los 30 min, se midió el nivel de ERO producidas por el QUIN a este mismo tiempo y se encontró que la producción de ERO incrementa con las dosis más bajas de QUIN (15-60 nmol), mientras que, con las dosis más altas (120 y 240 nmol) se regresa a niveles basales, 30 min posteriores a la administración con QUIN. Como se mencionó anteriormente, el modelo con QUIN es un modelo excitotóxico/pro-oxidante; sin embargo, el tiempo más corto en el cual se ha cuantificado la producción de ERO es 1 h [Santamaría et al., 2001] y no existen reportes a tiempos más cortos. Por otra parte, se han realizado estudios en donde determina el tiempo en el cual empieza la producción de ERO posterior a la administración intracerebroventricular de QUIN, encontrando que a partir de las 4 h ya se detectan niveles elevados de ERO en hipocampo y a partir de las 8 h, en otras regiones del cerebro (estriado y corteza) [Ganzella et al., 2006; Vandresen-Filho et al., 2015]. Estos datos sugieren que a tiempos cortos es probable que no se esté incrementando la producción de ERO con las dosis altas de QUIN (120 y 240 nmol), ya que las células pueden estar respondiendo y adaptándose ante el daño ocasionado por el QUIN. Por lo tanto, la cuantificación de ERO a los 30 min con estas dosis, no es el mejor tiempo para observar la producción de ERO. Por otra parte, en modelos *in vitro*, se ha reportado que la producción de ERO, debido a la estimulación de los receptores NMDA con NMDA, ocurre a partir de los 30 min y esta producción de especies oxidantes es llevada a cabo en la mitocondria, debido al incremento de Ca^{2+} intracelular por parte de la estimulación de los receptores NMDA [Duan et al., 2007]. En un cultivo celular el agonista de los receptores NMDA está en la solución, por lo que todas las células pueden ser estimuladas, promoviendo así la entrada de Ca^{2+} e incrementando la producción de ERO en un

tiempo más corto; sin embargo, en tejido, al ser inyectado el QUIN, este debe difundir para poder estimular una gran cantidad de células y que éstas puedan producir ERO.

Por otra parte, el QUIN disminuye la actividad de la cinasa Fyn, [Mallozzi et al., 2007] una tirosina cinasa importante en la modulación de la activación de Nrf2. La cinasa Fyn fosforila a la tirosina 568 de Nrf2 provocando la exportación nuclear de Nrf2 y consecuentemente su degradación [Jain & Jaiswal et al., 2006]. La disminución de la actividad de Fyn debido al QUIN podría explicar en parte un incremento en la activación de Nrf2 a los 30 min sin un incremento en la producción de ERO con las dosis altas de QUIN (120 y 240 nmol).

Otro proceso que podría estar ocurriendo, por el cual no se observa un incremento en la producción de ERO, es que parte del QUIN este ingresando a las neuronas y este promoviendo la activación del factor Nrf2 sin producir un aumento en las ERO. Esto se propone debido a que, se ha reportado que la cinasa CaMKII fosforila al receptor NMDA, en la subunidad GluN2B, monómero importante en la especificidad del QUIN hacia el receptor NMDA; promoviendo la desensibilización del receptor [Sessoms-Sikes et al., 2005] y provocando una disminución en la entrada de Ca^{2+} y con ello una disminución del estrés oxidante; sin embargo, ambas teorías deben ser evaluadas.

Debido a que en este trabajo la cuantificación de ERO no correlacionó con la activación del factor Nrf2 se decidió evaluar de forma indirecta la formación de ERO en las células, midiendo los niveles de lípidos oxidados. Las diferentes dosis de QUIN no incrementaron la lipoperoxidación con respecto al control, por el contrario, se observa una disminución. Esto puede deberse a que, durante la lipoperoxidación se forman productos oxidados que son sustrato de algunas enzimas como la GST y un aumento en su actividad reflejaría una disminución de productos lipídicos oxidados. Por otra parte, también es posible que 30 min sea un tiempo corto para observar daño oxidativo a los lípidos de membrana, ya que datos obtenidos en el laboratorio en un modelo *in vitro* de incubación de rebanadas estriatales con 12.5, 25 y 50 nmol de QUIN, durante 3 h, no se observó

un aumento en la lipoperoxidación; sin embargo, a las 6 h un incremento en la lipoperoxidación de forma dosis-dependiente es observado [Colín-González et al., 2014]. Por otra parte, la administración intracerebroventricular de QUIN produce un aumento de lipoperoxidación en diferentes regiones del cerebro (estriado, corteza e hipocampo) a partir de las 8 h [Vandresen-Filho et al., 2015]; sugiriendo que 30 min, es un tiempo corto para evaluar el estrés oxidante mediante este parámetro. No se midieron otros marcadores de estrés como proteínas oxidadas, ya que se ha demostrado que este proceso es detectable a partir de las 6 h de la administración con QUIN [Carmona-Ramirez et al., 2013]. Adicionalmente, datos del laboratorio, muestran que la cantidad de glutatión reducido no disminuye a los 30 min posteriores a la administración con QUIN, mientras que el glutatión oxidado solo incrementa ligeramente con las dosis de 120 y 240 nmol; además la actividad de las enzimas GPx, GR, GCL, CAT, GST y G6PDH no muestran cambios importantes [Datos trabajo de Doctorado Carlos Silva], apoyando la observación de que no existe un estado de estrés oxidante importante.

Como se menciona anteriormente, la respuesta observada de Nrf2 a los 30 min muestra un comportamiento dual. A dosis bajas de QUIN el estrés oxidante aumenta y la activación de Nrf2 presenta un comportamiento dosis-respuesta respecto a la dosis de QUIN (15-60 nmol). En cambio, a dosis altas de QUIN (120 y 240 nmol) el nivel de ERO disminuye, mientras que el factor Nrf2 muestra su máxima activación. Estos resultados sugieren que probablemente la oxidación directa de Keap1 por las especies oxidantes no es el único mecanismo que está regulando la activación de Nrf2. Para que este factor de transcripción pueda traslocarse al núcleo y posteriormente activarse, se requiere de su fosforilación [Sandberg et al., 2014]. Además, recientemente se ha descrito que existen proteínas de unión a Keap1 como DPP3, WTX, p62, PALB2, PGAM5 e IKK β y proteínas de unión a Nrf2 como p21 y BRCA1, que favorecen la activación de Nrf2, en procesos dependientes e independientes de estrés oxidante, así como el aumento de las enzimas antioxidantes y la disminución del estrés oxidante en la célula [Camp et al., 2012; Hast et al., 2013; Lau et al., 2010; Lee et al., 2009; Lo

&Hannink, 2008; Ma et al., 2012; Chen et al., 2009; Gorrini et al., 2013]. Es decir, es probable que el QUIN desencadene vías de señalización que activen Nrf2 a los 30 min de una forma independiente del estado oxidante celular, pero esta teoría aún debe ser estudiada.

Finalmente se evaluó si el incremento de Nrf2 a los 30 min tiene un efecto sobre la actividad de las enzimas CAT, GPx, GR, GST y G6PDH, a las 6 h posteriores a la lesión con QUIN.

Como se mencionó anteriormente el gen que codifica para Nrf2 tiene en su promotor a la secuencia ARE, por lo que puede autoregularse [Bryan et al., 2013]. Además, resultados del laboratorio, muestran que en el modelo de isquemia/reperfusión cerebral, donde aumenta la producción de ERO, se incrementa el mensajero de Nrf2 a las 3 h posteriores a la reperfusión. Por ello se decidió evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes a las 6 h.

La actividad de la CAT aumenta con las dosis más altas de QUIN (120 y 240 nmol), probablemente porque a este tiempo ya existe un aumento en los niveles de ERO, ya que como se mencionó anteriormente, a las 6 h ya se observa un aumento *in vivo* en la oxidación de proteínas con 240 nmol de QUIN [Carmona-Ramírez et al., 2013] e *in vitro* en la lipoperoxidación [Colín-González et al., 2014]. Por otra parte, las enzimas involucradas en el metabolismo del glutatión (GPx, GR y GST) no mostraron grandes cambios. La GR encargada de reducir el glutatión oxidado, no muestra cambios en su actividad; la GST, encargada de conjugar productos tóxicos con el glutatión, muestra un ligero aumento con las dosis altas de QUIN (120 y 240 nmol); mientras que la GPx encargada de metabolizar el H₂O₂ e hidroperóxidos muestra una tendencia a disminuir con la dosis de 240 nmol. Finalmente la G6PDH, enzima encargada de producir el NADPH usado por las enzimas GR y GPx, no muestra cambios en su actividad.

Por otra parte, se ha descrito recientemente que la acetilación de Nrf2 en diversos residuos de lisina, en el dominio Neh1 de Nrf2 por p300/CBP, favorece la especificidad de unión de Nrf2 con la secuencia ARE de diversos genes que

regula, permitiendo una expresión génica diferencial de las enzimas reguladas por Nrf2 [Sun et al., 2009], lo cual podría explicar el hecho de no observar cambios importantes en la actividad de las enzimas cuantificadas.

Finalmente, los resultados obtenidos en el laboratorio que originaron la idea de este proyecto (la modulación del factor Nrf2 podría depender de la intensidad del estímulo redox) mostraron una disminución de la cantidad nuclear de Nrf2 a los 30 min después de la administración de 240 nmol de QUIN en el estriado cerebral de rata [Carmona-Ramírez, et al., 2013], lo cual no correlaciona con lo obtenido en este trabajo donde se encontró que la administración de 240 nmol de QUIN aumenta la actividad de Nrf2.

Una posible explicación a esta posible contradicción podría estar relacionada con el hecho de que la disminución de Nrf2 en el núcleo no necesariamente debe provocar una disminución en la cantidad de Nrf2 unido a su secuencia blanco (activación de Nrf2), ya que se sabe que Nrf2 es una proteína altamente regulada. Se ha reportado que Nrf2 puede ser regulado a nivel transcripcional por 34 factores de transcripción; a nivel postranscripcional por 85 miRNAs (micro RNA); y a nivel postraduccionales por 224 proteínas, que regulan la activación de Nrf2 debido a fosforilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones, e inclusive mediante interacción proteína-proteína, así como otros mecanismos más [Papp et al., 2012]. Por lo tanto, la unión de Nrf2 a la secuencia ARE, depende de modificaciones postraduccionales, lo cual podría explicar porque aun cuando se observa una disminución en la cantidad de proteína de Nrf2 en el núcleo [Carmona-Ramírez et al., 2013], se observa una mayor activación; ya que, a pesar de que exista poca o mucha proteína de Nrf2 en el núcleo, si no cuenta con las modificaciones postraduccionales adecuadas no podría unirse a su secuencia blanco.

En este trabajo se encontró evidencia que sugiere que la activación de Nrf2 es dependiente e independiente del estrés oxidante. En la figura 25 y 26 se proponen dos mecanismos de activación de Nrf2 basados en los resultados obtenidos a los 30 min posteriores a la lesión con QUIN.

La administración de dosis bajas de QUIN (15-60 nmol) promueve un estado excitotóxico, provocando un incremento de las ERO y ERN las cuales van a oxidar los residuos de cisteína en Keap1, favoreciendo la disociación del complejo Keap1-Nrf2 y promoviendo la traslocación nuclear y activación de Nrf2. Sin embargo, creemos que la disociación del complejo Keap1-Nrf2 no es total en las dosis de 15 y 30 nmol ya que, la actividad transcripcional de Nrf2 en estas dosis es menor a la observada con 60 nmol de QUIN, por lo tanto, parte del Nrf2 disponible en el citoplasma al momento de la administración con QUIN puede estar siendo degradado vía proteasoma 26S (Figura 25).

Por otra parte, la administración de dosis altas de QUIN (120 y 240 nmol) no incrementa los niveles de ERO; por lo tanto, mecanismos independientes al estrés oxidante podrían estar aumentando la actividad transcripcional de Nrf2. Nosotros sugerimos que las proteínas DPP3, IKK β , p62, WTX, PGAM5, PALB2 que interaccionan con Keap1, así como las proteínas p21 y BRCA1 que interaccionan con Nrf2, podrían favorecer la disociación del complejo Keap1-Nrf2 y promover la traslocación nuclear y la activación de Nrf2. En este escenario es probable que todo el Nrf2 disponible en el citoplasma se esté disociando de Keap1 y trasladándose al núcleo, disminuyendo así la degradación de Nrf2 vía proteasoma 26S (Figura 26).

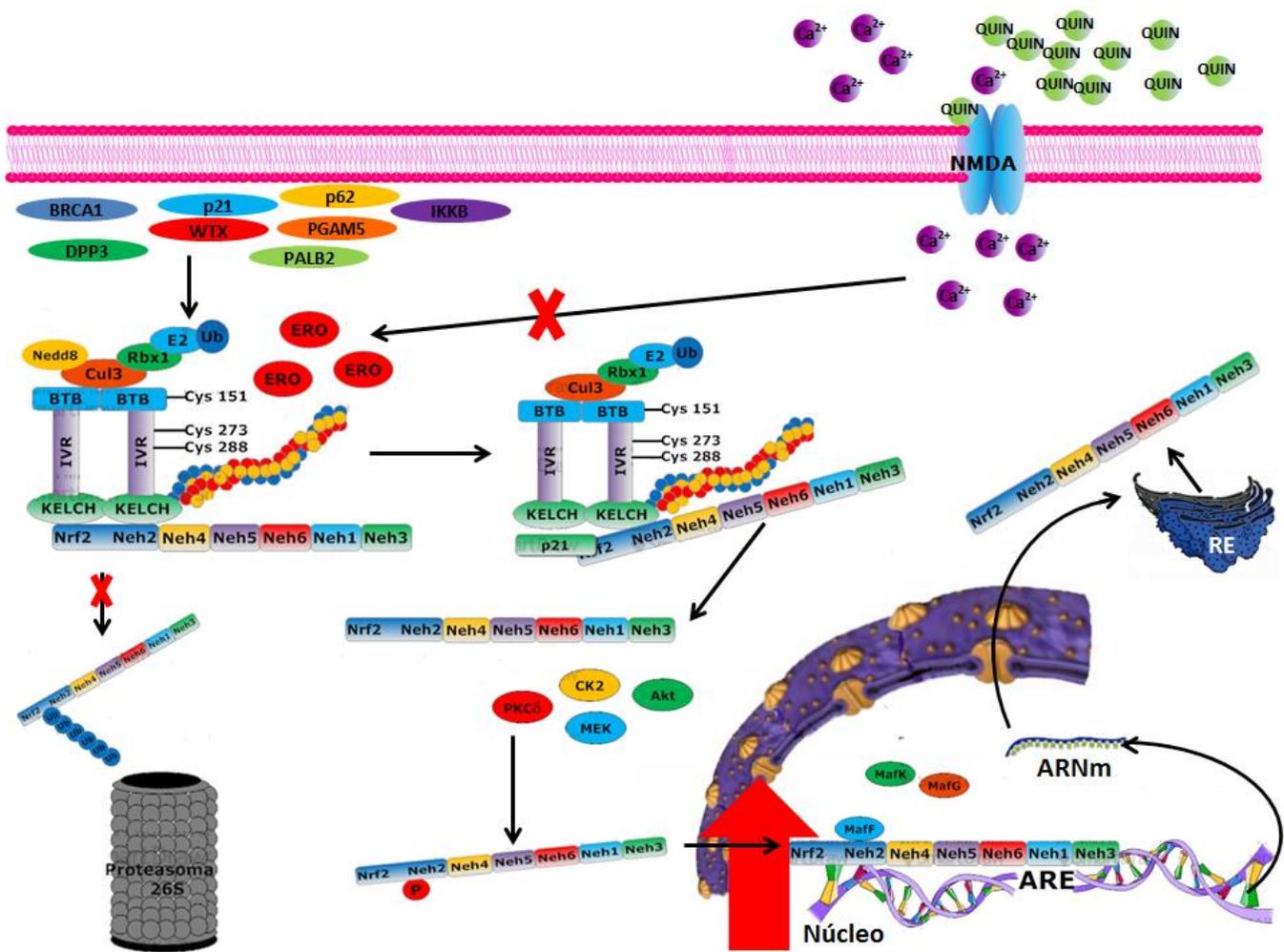


Figura 26. Posibles mecanismos de activación de Nrf2 tras la administración de dosis altas de QUIN. La administración de 120 y 240 nmol de QUIN no aumenta las ERO y ERN pero incrementa la activación de Nrf2 por lo tanto, otros mecanismos independientes del estrés pueden estar activando a Nrf2. En este sentido se sabe que las proteínas DPP3, PALB2, PGAM5, p62, IKKβ y WTX pueden interaccionar con Keap1, mientras que las proteínas p21 y BRCA1 pueden hacerlo con Nrf2 disociando el complejo Keap1-Nrf2, disminuyendo la degradación de Nrf2 vía proteasoma 26S y aumentando la actividad transcripcional de Nrf2 a los 30 min.

8. CONCLUSIÓN.

El daño morfológico, la neurodegeneración y la conducta de rotación inducidos por el QUIN mostraron un efecto dosis-dependiente.

El insulto provocado por el QUIN solo aumentó la activación de Nrf2 a los 30 min a partir de la dosis de 30 nmol, son embargo, no se observó correlación directa entre el nivel de estrés oxidante y la activación del factor.

Estos resultados sugieren que la activación del factor Nrf2 inducida por el QUIN podría ocurrir a través de mecanismos que se activan independientemente del estrés oxidante.

9. REFERENCIAS.

Aguilera P, Chánez-Cárdenas ME, Floriano-Sánchez E, Barrera D, Santamaría A, Sánchez-González DJ, Pérez-Severiano F, Pedraza-Chaverrí J & Jiménez PD. 2007. Time-related change in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the rat striatum in model of Huntington's disease. *Neurotoxicology*. 28(6):1200-1207.

Anderson CM & Swanson RA. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. 32(1):1-14.

Aoyama K, Watabe M & Nakaki T. 2008. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci*. 108(3):227-238.

Arundine M & Tymianski M. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell calcium*. 34(4-5):325-337.

Bains JS & Shaw CA. 1997. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Rev*. 25(3):335-358.

Baird L, Llères D, Swift S & Dinkova-Kostova AT. 2013. Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(38):15259-15264.

Bak LK, Schousboe A & Waagepetersen HS. 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*. 98(3):641-653.

Bloom DA & Jaiswal AK. 2003. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidant leads to release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem*. 278(45):44675-44682.

Bondy SC & LeBel CP. 1993. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous central system. *Free Radic Biol Med.* 14(6):633-642.

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

Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE & Park BK. 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and –independet mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol.* 85(6):705-717.

Camacho A & Massieu L. 2006. Role of glutamate transporter in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res.* 37(1):11-18.

Camp ND, James RG, Dawson DW, Yan F, Davison JM, Houck SA, Tang X, Zheng N, Major MB & Moon RT. 2012. Wilms tumor gene on X chromosome (WTX) inhibits degradation of NRF2 protein through competitive binding to KEAP1 protein. *J Biol Chem,* 287(9):6539-6550.

Cárdenas-Rodríguez N, Medina-Campos ON & Pedraza-Chaverrí J. 2008. Glutati3n Peroxidasas: una familia de enzimas, en: Radicales libres y estr3s oxidativo. *Aplicaciones M3dicas, Manual Moderno (ed), pp. 201-217.*

Carmona-Ram3rez I, Santamar3a A, Tob3n-Velasco JC, Orozco-Ibarra M, Gonz3lez-Herrera IG, Pedraza-Chaveer3 J & Maldonado PD. 2013. Curcumin restores Nrf2 levels and prevents quinolinic acid-induced neurotoxicity. *J Nutr Biochem.* 24(1):14-24.

Chen W, Sun Z, Wang XJ, Jiang T, Huang Z, Fang D & Zhang DD. 2009. Direct interaction between Nrf2 and p21^{Cip1/WAF1} upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell.* 34(6):663-673.

Chiarugi A, Meli E & Moroni F. 2001. Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid. *J Neurochem.* 77(5):1310-1318

Chiechio S & Nicoletti F. 2011. Metabotropic glutamate receptors and the control of chronic pain. *Curr Opin Pharmacol.* 12(1):28-34.

Colín-González AL, Luna-López A, Königsberg M, Ali SF, Pedraza-Chaverrí J & Santamaría A. 2014. Early modulation of the transcription factor Nrf2 in rodent striatal slices by quinolinic acid, a toxic metabolite of the kynurenine pathway. *Nueroscience.* 260:130-139.

Colín-González AL, Orozco-Ibarra M, Chánez-Cárdenas ME, Rangel-López E, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J, Barrera-Oviedo D & Maldonado PD. 2013. Heme oxygenase-1 (HO-1) upregulation delays morphological and oxidative induced in an excitotóxico/pro-oxidant model in the rat striatum. *Nueroscience.* 231:91-101.

Coople IM. 2012. The Keap1-Nrf2 cell defense pathway-a promising therapeutic target?. *Adv Pharmacol.* 63:43-79.

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

Coyle JT & Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 262(5134):689-695.

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

Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper W & Diehl JA. 2004. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridge Nrf2 to Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol.* 24(19):8477-8486.

Dalleau S, Baradat M, Guéraud F & Huc L. 2013. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ.* 20(12):1615-1630.

Dasuri K, Zhang L & Keller JN. 2013. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med.* 62:170-185.

Devling TW, Lindsay CD, McLellan LI, McMahon M & Hayes JD. 2005. Utility of siRNA against Keap1 as a strategy to stimulate a cancer chemopreventive phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(20):7280-7285A.

Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M & Talalay P. 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(18):11908-11913.

Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD & Kensler TW. 2005. The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem Res Toxicol.* 18(12):1779-1791.

Double KL, Reyes S, Werry EL & Hillday GM. 2010. Selective cell death in neurodegeneration: why are some neurons spared in vulnerable region?. *Prog Neurobiol.* 92(3):316-329.

Duan Y, Gross RA & Sheu SS. 2007. Ca^{2+} dependent generation of mitochondrial reactive oxygen species serves as a signal for poly(ADP-ribose)polymerase-1 activation during glutamate excitotoxicity. *J Physiol.* 585(Pt3):741-758.

Estrada-Sanchez AM, Mejía-Toiber J & Massieu L. 2008. Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch Med Res.* 39(3):265-276.

Fernández-Checa JC & García-Ruiz C. 2008. Glutathión. En: Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones Médicas.* Koningsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 253-267.

Fourquet S, Guerois B, Biard D & Toledano MB. 2010. Activation of Nrf2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves Keap1 disulfide formation. *J Biol Chem.* 285(11):8463-8471.

Ganzella M, Jardim FM, Boeck CR & Vendite D. 2006. Time course of oxidative events in the hippocampus following intracerebroventricular infusion of quinolinic acid in mice. *Neurosci Res.* 55(4):397-402.

Gerber U., Gee CE & Benquet P. 2007. Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol.* 7(1):56-61.

Gómez-Quiroz LE. & Cuevas-Bahia D. 2008. Superóxido dismutasa. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 169-182.

Guo C, Sun L, Chen X & Zhang D. 2013. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neuronal Regen Res.* 8(21):2003-2014.

Gorrini C, Baniasadi PS, Harris IS, Silvester J, Inoue S, Snow B, Joshi PA, Wakaham A, Molyneux SD, Martin B, Bowman P, Cescon DW, Elia AJ, Winterton-Perks Z, Cruickshank J, Brenner D, Tseng A, Musgrave M, Berman HK, Khokha R, Jonkers J, Mak TW & Gauthier ML. 2013. BRCA1 interacts with Nrf2 to regulate antioxidant signaling and cell survival. *J Exp Med.* 210(8):1529-1544.

Gutteridge JMC & Halliwell B. 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.* 393(4):561-564.

Halliwell B. 2011. Free radicals and antioxidants – quo vadis?. *Trends Pharmacol Sci.* 32(3):125-130.

Hansberg-Torres W. 2008. El dióxigeno y sus especies reactivas. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 25-46.

Hast BE, Goldfarb D, Mulvaney KM, Hast MA, Siesser PF, Yan F, Hayes DN & Major MB. 2013. Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination. *Cancer Res.* 73(7):2199-2210.

Hayes JD & Dinkova-Kostova AT. 2014. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci.* 39(4):199-218.

Hazel AS. 2007. Excitotoxic mechanism in stroke: An update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int.* 50(7-8):941-953.

Higuchi M, Single FN, Köhler M, Sommer B, Sprengel R & Seeburg PH. 1993. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell.* 75(7):1361-1370.

Holland R & Fishbein JC. 2010. Chemistry of the cysteine sensor in Kelch-like-ECH-associated protein 1. *Antioxid Redox Signal.* 13(11):1749-1761.

Hsieh HL & Yang CM. 2013. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Biomed Res Int.* 484613:1-18.

Hynd MR, Scott HL & Dodd PR. 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 45(5):583-595.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) 2011. Consulta de defunciones generales por lista mexicana de enfermedades, según año de registro.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T & Yamamoto M. 2003. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells.* 8(4):379-391.

Jain AK & Jaiswal AK. 2006. Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J Biol Chem.* 281(17):12132-12142

Jin M, Kumar A & Kumar S. 2012. Ethanol-mediated regulation of cytochrome P450 2A6 expression in monocytes: role of oxidative stress-mediated PKC/MEKNrf2 pathway. PLoS One. 7(4):e35505.

Jomova K, Vondrakova D, Lawson M & Valko M. 2010. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. Mol Cell Biochem. 345(1-2):91-104.

Jones DP. 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. Methods Enzymol. 348:93-112.

Kaspara JW & Jaiswal AK. 2010. Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression. J Biol Chem. 285(1):153-162.

Kaspar JW, Niture SK & Jaiswal AK. 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. Free Radic Biol Med. 47(9):1304-1309.

Kaspar JW, Niture SK & Jaiswal AK. 2012. Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2-Cul3-Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression. J Cell Sci. 125(Pt4)1027-1038.

Kohen R & Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol. 30(6):620-650.

Konigsberg M. 2008a. Cadena respiratoria mitocondrial. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 49-59.

Konigsberg M. 2008b. Sistemas microsomales de monooxigenasas, citocromo P450. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 61-71.

Konigsberg M. 2008c. NADPH Oxidasa. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 73-83.

Konigsberg M. 2008d. Xantina Oxidoreductasa. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 85-93.

Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M & Kensler TW. 2002. Enhanced expression of the transcriptional factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol.* 22(9):2883-2892.

Lakhan SE, Kirchgessner A & Hofer M. 2009. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med.* 7:97-108.

Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK & Zhang DD. 2008. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res.* 58(5-6):262-270.

Lau A, Wang XJ, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, Sun Z, White E & Zhang DD. 2010. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol.* 30(13):3275-3285.

Lee DF, Kuo HP, Liu M, Chou CK, Xia W, Du Y, Shen J, Chen CT, Hou L, Hsu MC, Li CW, Ding Q, Liao TL, Lai CC, Lin AC, Chang YH, Tsai FS, Li LY & Hung MC. 2009. KEAP1 E3 Ligase-mediated down-regulation of NF- κ B signaling by targeting IKK β . *Mol Cell.* 36(1):131-140.

Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW & Johnson JA. 2003. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem.* 278(4):12029-12038.

Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ & Choi DW. 2000. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest.* 106(6):723-731.

Li J, Wuliji O, Li W, Jiang ZG & Ghanbari HA. 2013. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci.* 14(12):24438-24475.

Li L, Fan M, Icton CD, Chen N, Leavitt BR, Hayden MR, Murphy TH & Raymond LA, 2003. Role of NR2B-type NMDA receptor in selective neurodegeneration in Huntington disease. *Neurobiol Aging.* 24(8):1113-1121.

Lo SC & Hannink M. 2008. PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp Cell Res.* 314(8):1789-1803.

Love S. 1999. Oxidative stress in cerebral ischemia. *Brain Pathol.* 9(1):119-131.

Ma J, Cai H, Wu T, Sobhian B, Huo Y, Alcivar A, Mehta M, Cheung KL, Ganesan S, Kong AN, Zhang DD & Xia B. 2012. PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function. *Mol Cell Biol.* 32(8):1506-1517.

Maldonado PD, Molina-Jijón E, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Santamaría A & Pedraza-Chaverrí J. 2010. NAD(P)H oxidase contributes to neurotoxicity in an excitotoxic/prooxidant model of Huntington's disease in rats: protective role of apocynin. *J Neurosci Res.* 88(3):620-629.

Mallozzi C, Martire A, Domeinici MR, Metere A, Popoli D and Di Stasi AM. 2007. L-NAME reverses quinolinic acid-induced toxicity in rat corticostriatal slices: involvement of src family kinases. *J Neurosci Res.* 85(12):2770-2777.

Margaill I, Plotkine M & Lerouet D. 2005. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med.* 39(4):429-443.

Mattson MP & Chan SL. 2003. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.* 34(4-5):385-397.

McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M & Hayes JD. 2006. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism. *J Biol Chem,* 28(34):24756-24768.

Medeiros MH. 2008. Daño al DNA. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno (ed). pp. 119-134.

Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R & Sharma PL. 2013. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 698(1-3):6-18.

Mehta SL, Manhas N & Raghubir R. 2007. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 54(1):34-66.

Miranda LD. 2008. Química de los radicales libres. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 13-21.

Moro MA, Almeida A, Bolaños JP & Lizasoain I. 2005. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation instroke. *Free Radic Biol Med.* 39(10):1291-1304.

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

Narasimhan M, Patel D, Vedpathak D, Rathinam M, Henderson G & Mahimainathan L. 2012. Identification of novel microRNAs in post-transcriptional control of Nrf2 expression and redox homeostasis in neuronal, SH-SY5Y cells. *PLoS One.* 7(12):e51111.

Nedergaard M & Dirnagl U. 2005. Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia.* 50(4):281-286.

Nguyen T, Nioi P & Pickett CB. 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 284(20):13291-13295.

Niture SK, Jain AK & Jaiswal AK. 2009. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci.* 122(Pt24):4452-4464.

Nordberg J & Arnér ES. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 31(11):1287-1312.

Papp D, Lenti K, Módos D, Fazekas D, Dúl Z, Türei D, Földvári-Nagy L, Nussinov R, Csermely P & Korcsmáros T. 2012. The Nrf2-related interactome and regulome contain multifunctional proteins and fine-tuned autoregulatory loops. *FEBS Letters* 586(13):1795-1802.

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

Peden AH & Ironside JW. 2012. Molecular pathology in neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets.* 13(12):1548-1559.

Peraza-Reyes L. 2008. Catalasa. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 183-200.

Pérez-de la Cruz V, Carrillo-Mora P & Santamaría A. 2010. Huntington's disease and mitochondrial alterations: emphasis on experimental methods. *J Bioenerg Biomembr* 42(3):207-215.

Pérez-Severiano F, Rodríguez-Pérez M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Ortiz-Plata A, Sánchez-García A, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Aguilera P & Santamaría A. 2004. S-allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int.* 45(8):1175-1183.

Pi J, Bai Y, Reece JM, Williams J, Liu D, Freeman ML, Fahl WE, Shugar D, Liu J, Qu W, Collins S, Walkees MP. 2007. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med.* 42(12):1797-1806.

Pivovarova NB & Andrews SB. 2010. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J.* 277(18):3622-3636.

Rodrigo J, Fernández AP, Serrano J, Peinado MA & Martínez A. 2005. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med.* 39(1):26-50.

Sandberg M, Patil J, D'Angelo B, weber SG & Mallard C. 2014. Nrf2-regulation in brain health and disease: implication of cerebral inflammation. *Neuropharmacology.* 79:298-306.

Santamaría A, Jiménez-Capdeville ME, Camacho A, Rodríguez-Martínez E, Flores A & Galván-Arzate S. 2001. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus stratum. *Neuroreport.* 12(12):2696-2696.

Santamaría A & Rios C. 1993. MK-801, an N-methyl-D-aspartato receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett.* 159(1-2):51-54.

Santana-Martínez RA, Galván-Arzáte S, Hernández-Pando R, Chánez-Cárdenas ME, Ávila-Chávez E, López-Acosta G, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A & Maldonado PD. 2014. Sulforaphane reduces the alteration induced by quinolinic acid: Modulation of glutathione levels. *Neuroscience.* 272:188-198.

Schwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar KV & Mochowski PJ. 2010. Of mice, rat and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol.* 90(2):230-245.

Sessoms-Sikes S, Honse Y, Lovinger DM & Colbran RJ. 2005. CaMKIIalpha enhances the desensitization of NR2B-containing NMDA receptors by an autophosphorylation-dependent mechanisms. *Mol Cell Neurosci.* 29(1):139-147.

Sherratt PJ & Hayes JD. 2001. Glutathione-S-transferases. In: *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics.* Ioannides C (ed). John Wiley & Sons Ltd. Pp 319-352.

Shigeri Y, Seal RP & Shimamoto K. 2004. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Rev.* 45(3):250-265.

Silva-Islas C, Santana RA, Colín-González AL & Maldonado PD. 2012. Nrf2 activation, an innovative therapeutic alternative in cerebral ischemia. In: *Advances in the preclinical study of ischemic stroke*. Balestrino M (ed). In Tech. pp. 347-378.

Singh B, Ronghe AM, Chatterjee A, Bhat NK & Bhat HK. 2013. MicroRNA-93 regulates NRF2 expression and is associated with breast carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 34(5):1165-1172.

Snyder GH, Cennerazzo MJ, Karalis AJ & Field D. 1981. Electrostatic influence of local cysteine environments on disulfide exchange kinetics. *Biochemistry*. 20(23):6509-6519.

Sommer B, Köhler M, Sprengel R & Seeburg PH. 1991. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell*. 67(1):11-19.

Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamwlink MM, Campbell K, Cheung E, Olin-Sandoval V, Gruening NM, Krueger A, Taugeer Alam M, Keller MA, Breitenbach M, Brindle KM, Rabinowitz JD & Ralser M. 2014. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc*. [Epub ahead of print].

Stone TW, Forrest CM & Darlington LG. 2012. Kynurenine pathway inhibition as a therapeutic strategy for neuroprotection. *FEBS J*. 279(8):1386-1397.

Strachan GD, Ostrow LA & Jordan-Sciutto KL. 2005. Expression of the fetal Azl-50 clone 1 protein induces apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 336(2):290-295.

Sun Z, Chin YE & Zhang DD. 2009. Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promotor-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Mol Cell Biol*. 29(10):2658-2672.

Surh YJ, Kundu JK & Na HK. 2008. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med*. 74(13):1526-1539.

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

Tian H, Zhang B, Di JH, Jiang G, Chen FF, Li HZ, Li LT & Pei DS. 2012. Keap1: One stone kills three birds Nrf2, IKK β , and Bcl-2/Bcl-xL. *Cancer Lett.* 325(1):26-34.

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

Tong KI, Kobayashi A, Katsuoka F & Yamamoto M. 2006. Two site substrate recognition model of Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem.* 387(10-11):1311-1320.

Vandresen-Filho S, Martins WC, Bertoldo DB, Mancini G, De Bem AF & Tasca CI. 2015. Cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum show differential susceptibility to quinolinic acid-induced oxidative stress. *Neurol Sci.* 36(8):1449-1456.

Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, Motohashi H, Noda S, Takahashi S, Imakado S, Kotsuji T, Otsuka F, Roop DR, Harada T, Engel JD & Yamamoto M. 2003. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet.* 35(3):238-245.

Warner DS, Sheng H & Batinic-Haberle I. 2004. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol.* 207(Pt 18):3221-3231.

Watai Y, Kobayashi A, Nagase H, Mizukami M, McEvoy J, Singer JD, Itoh K & Yamamoto M. 2007. Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. *Genes Cells.* 12(10):1163-1178.

Wolfensberger M, Amsler U, Cuénod M, Foster AC, Whetsell WO Jr & Schwarcz R. 1983. Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci Lett.* 42(3):247-252.

Wu J, Li Q, Wang X, Yu S, Li L, Wu X, Chen Y, Zhao J & Zhao Y. 2013. Neuroprotection by curcumin in ischemic brain injury involves the Akt/Nrf2 pathway. *PLoS ONE*. 8(3):e59843.

Yang M, Yao Y, Eades G, Zhang Y & Zhou Q. 2011. MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap-1 independent mechanism. *Brest Cancer Res Treat*. 129(3):983-991.

Zádori D, Klivényi P, Vámos E, Fülöp F, Toldi J & Vécsei L. 2009. Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. *J Neural Transm*. 116(11):1403-1409.

Zenteno-Savin T & Saldaña-Balmori Y. 2008. Daño a lípidos. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual moderno. pp. 135-146.

Zhang DD, Lo SC, Sun Z, Habib GM, Lieberman MW & Hannink M. 2005. Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 degradation by a proteasome-independent pathway. *J Biol Chem*. 280(34):30091-30099.

Zipper LM & Mulcahy RT. 2002. The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J Biol Chem*. 277(39):36544-33552.

Zündorf G & Reiser G. 2011. Calcium dysregulation and homeostasis of neuronal calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Res Signal*. 14(7):1275-1288.

Zsurka G & Kunz WS. 2013. Mitochondrial involvement in neurodegenerative diseases