



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**PARTICIPACIÓN DEL FACTOR NRF2, BDNF Y ERK 1/2 EN EL EFECTO
PROTECTOR INDUCIDO POR LA CURCUMINA EN EL MODELO BIOQUÍMICO CON
ÁCIDO QUINOLÍNICO**

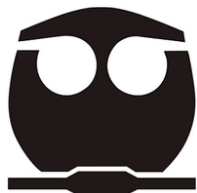
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
YESSICA YAEL FERNÁNDEZ ORIHUELA**

Cd.Mx.

2021





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
VOCAL: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
SECRETARIO: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ
1er. SUPLENTE: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
2° SUPLENTE: MARÍA DEL CONSUELO PLATA RAMOS

ESTE PROYECTO SE DESARROLLÓ EN EL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ, LABORATORIO DE PATOLOGÍA CEREBRAL VASCULAR.

SE AGRADECE AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT-241655) POR LA BECA OTORGADA A LA ALUMNA YESSICA YAEL FERNÁNDEZ ORIHUELA DURANTE EL PERIODO DE JULIO A OCTUBRE DE 2018.

ESTE TRABAJO FUE PARCIALMENTE APOYADO POR CONACYT No. 241655.

ASESOR DEL TEMA: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ
(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: RICARDO ALBERTO SANTANA MARTÍNEZ
(nombre y firma)

SUSTENTANTE: YESSICA YAEL FERNÁNDEZ ORIHUELA
(nombre y firma)

DEDICATORIA

Esta dedicatoria es para mi familia, profesores, amigos y para todas las personas que me han ayudado a crecer tanto profesional como personalmente.

Tabla de contenido

LLISTA DE ABREVIATURAS	6
II. RESUMEN	7
III. INTRODUCCIÓN	8
IV. ANTECEDENTES.....	8
1. Enfermedades neurodegenerativas.....	8
2. Excitotoxicidad	9
3. Glutamato	10
4. Receptores de glutamato.....	10
5. Aumento de Ca ²⁺ intracelular	13
6. Estrés oxidativo	15
7. Daño cerebral por EROs y ERNs	18
8. Ácido quinolínico (QUIN) como modelo excitotóxico/pro-oxidante	19
9. Antioxidante natural: Curcumina	21
10.Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF)	24
11.MAPK cinasas	27
12.Cinasa Regulada por señal extracelular 1/2 (ERK1/2)	28
13.Factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide-2(Nrf2).....	30
V. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	32
VI. HIPÓTESIS.....	32
VII. OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES.....	33
1. Objetivo general	33
2. Objetivos particulares.....	33
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Reactivos y Anticuerpos.....	33
2. Animales.....	33
3. Diseño experimental.....	34
4. Inyección estriatal	35
5. Obtención de las muestras empleadas en el análisis histológico e inmunohistoquímica.....	36
6. Tinción de Nissl.....	37
7. Inmunohistoquímicas.....	38
9. Ensayo de Western blot	39
IX. RESULTADOS	40
1. CUR incrementa los niveles de BDNF en el estriado	40
2. CUR incrementa los niveles de Nrf2 en el estriado	42
3. CUR disminuye el daño histológico inducido por el QUIN	44

X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
XI. CONCLUSIÓN	48
XII. BIBLIOGRAFÍA	49

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del glutamato	10
Figura 2. Heterodímero de NR1-NR2 que conforma un receptor funcional de glutamato NMD	12
Figura 3. Activación de los receptores ionotrópicos de glutamato.....	13
Figura 4. Apertura del PPTM	15
Figura 5. Principales componentes de la vía de la kinurenina	20
Figura 6. Rizoma de la Cúrcuma	22
Figura 7. Estructura química de la CUR	23
Figura 8. Propiedades estructurales de CUR.....	24
Figura 9. Tautomería ceto-enol de CUR	24
Figura 10. Las tres principales vías de señalización de BDNF	27
Figura 11. Vías de señalización ERK 1/2.....	30
Figura 12. Activación y respuesta de Nrf2	32
Figura 13. Diseño experimental.....	36
Figura 14. Rata montada en aparato estereotáxico.....	37
Figura 15. Perfusión por vía transcardíaca.....	38
Figura 16. Fundamento de la técnica de la inmunohistoquímica.....	39
Figura 17. Efecto del QUIN y la CUR sobre los niveles de BDNF	42
Figura 18. Efecto del QUIN y CUR sobre los niveles de BDNF por Western Blot.....	43
Figura 19. Efecto del QUIN y CUR sobre los niveles de p-ERK 1/ 2 y ERK 1/ 2	43
Figura 20. Efecto del QUIN y CUR sobre los niveles de Nrf2	44
Figura 21. Efecto del QUIN y CUR sobre los niveles de Nrf2 por Western blot	45
Figura 22. Efecto de la CUR sobre el saño histológico inducido por QUIN.....	46
Figura 23. Propuesta de mecanismo de señalización del efecto protector de CUR a daño inducido por QUIN.....	50

I. LISTA DE ABREVIATURAS

CUR Curcumina

QUIN Ácido quinolínico

Nrf2 Factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide

ERK 1/2 Cinasa regulada por señal extracelular 1/2

BDNF Factor Neurotrófico derivado de cerebro

NMDA N-metil-D-aspartato

ERO Especies reactivas de oxígeno

ERN Especies reactivas nitrógeno

TrkB Receptor B cinasa relacionados con la tropomiosina

CREB Elementos de unión a respuesta de AMPc

II. RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas presentan un mecanismo de daño celular, conocido como excitotoxicidad, que genera un estado de estrés oxidativo en la célula, definido por un desbalance entre la producción de radicales libres y los niveles de sistemas antioxidantes. En respuesta, existen vías de señalización encargadas de proteger a la célula contra el estrés oxidativo, una de ellas es la activación del factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (Nrf2). Nrf2 es un factor de transcripción encargado de regular la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la respuesta antioxidante y puede ser activado por la administración de diferentes compuestos, como la curcumina (CUR). CUR es el más abundante curcuminoide extraído de la planta del tallo o rizoma de la planta *Cúrcuma Longa*; ampliamente conocida y usada en el continente asiático por su actividad antioxidante, entre otras. En su estructura, CUR cuenta con un puente dicetónico α,β insaturado que le concede la capacidad de inhibir a los radicales anión superóxido, óxido nítrico y el peróxido de hidrogeno (Wright, 2002), además otros estudios proponen que es capaz de aumentar la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa (Reddy y Lokesh, 1993) y hemoxigenasa-1 (Jeong et al, 2006). Sin embargo, no se conoce la vía de señalización responsable de esta inducción. El objetivo de este trabajo fue estudiar un posible mecanismo de activación de Nrf2 inducido por la CUR en un modelo neurotóxico con ácido quinolínico (QUIN), evaluando si la CUR es capaz de inducir el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF-factor involucrado en la supervivencia, desarrollo y función neuronal), y éste a su vez de activar a ERK 1/2 (cinasa es la encargada de regular una gran variedad de procesos como la proliferación, diferenciación y supervivencia celular). Se inyectó una concentración de QUIN de 240 nmol/ μ L en el cuerpo estriado derecho de ratas Wistar macho. Los animales fueron administrados con CUR [400 mg/Kg, por vía intragástrica (i.g)] durante 6 días post-lesión. Al séptimo día, las ratas fueron sacrificadas para obtener el tejido cerebral y se realizaron pruebas para evaluar el daño morfológico, inmunohistoquímicas y ensayos de Western Blot de las proteínas BDNF, ERK 1/2 y Nrf2. El tratamiento con QUIN disminuyó el número de cuerpos de Nissl y los niveles de BDNF, ERK 1/2 y Nrf2, mientras que la administración con CUR evitó el daño morfológico inducido por el QUIN y aumentó los niveles de BDNF, ERK1/2 y Nrf2. Estos resultados sugieren que el efecto protector de la CUR en el modelo bioquímico con QUIN podría involucrar la acción de BDNF sobre la activación de ERK 1/2 y el aumento en los niveles de Nrf2.

III. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son padecimientos que van en aumento no solo en México sino en el mundo, afectan principalmente a la población de la tercera edad y el 64% de la población que la padece son mujeres. En el 2015 el World Alzheimer Report estimó que había un poco más de 800,000 personas con demencia en México. Se espera que para el año 2030, el número de personas con demencia aumente a un poco más de 1.5 millones. Por este motivo, la búsqueda de moléculas terapéuticas que puedan ser usadas en este tipo de enfermedades ha tomado importancia y existe ya una gran cantidad de información bibliográfica de los procesos celulares más comunes involucrados en estos padecimientos como el estrés oxidativo ligado a la excitotoxicidad y la inflamación. Debido a esto, existen numerosas especies antioxidantes que se investigan como posibles candidatos terapéuticos para las enfermedades neurodegenerativas, como la curcumina (CUR), un compuesto conocido por sus propiedades antioxidantes y neuroprotectoras; sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual lleva a cabo su efecto protector.

En este trabajo se propone estudiar el mecanismo asociado al efecto protector de la CUR en un modelo neurotóxico inducido por el ácido quinolínico (QUIN) en ratas Wistar.

IV. ANTECEDENTES

1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son aquellos trastornos en los que se presenta muerte progresiva neuronal, con diferente etiología genética y fenotipos clínicos. La neurodegeneración, conduce a que el paciente presente ataxias (falta de control muscular o coordinación de movimientos voluntarios) y/o demencias (deterioro de la memoria, intelecto, comportamiento y capacidad de realizar actividades normales). Este tipo de enfermedades representan más del 50% de las consultas en la especialidad de neurología (Martinez et al., 2011); tienen gran repercusión en el ámbito económico, social y laboral; y provocan graves problemas e incluso la muerte en la mayoría de las personas que las padecen. Algunas de las enfermedades más comunes son Alzheimer, Parkinson, Esclerosis lateral amiotrófica y Huntington.

La muerte neuronal comienza en diferentes regiones del cerebro dependiendo de la enfermedad padecida. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad neurodegenerativa más común; ocurre por la muerte de las neuronas colinérgicas del hipocampo, la amígdala y la corteza cerebral

principalmente, es por este motivo que los primeros síntomas son la pérdida de la memoria, la desubicación espacial, etc.; en cambio en la enfermedad de Huntington, las neuronas del estriado son las más afectadas. Este tipo de neuronas son las encargadas de los movimientos, es por eso que los pacientes dejan de tener el control de sus movimientos (Benes, 2016).

Existen factores de riesgo que pueden estar implicados en el padecimiento de estas enfermedades como la edad (los adultos-mayores son más susceptibles a padecer este tipo de enfermedades), la hipertensión arterial, la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, el hábito de fumar, por mencionar algunos (Borrell, 2017). Hasta ahora no existe la forma de frenar el avance progresivo de estas enfermedades, ya que los tratamientos son paliativos y se enfocan en retardar la neurodegeneración o en mejorar la calidad de vida del paciente.

Las células constantemente están produciendo especies reactivas de oxígeno (EROs) que son desechos de los procesos celulares fundamentales y las mantienen en bajos niveles gracias a los sistemas antioxidantes; sin embargo, cuando aumenta considerablemente la cantidad de EROs provocando que la célula sea incapaz de eliminarlas, a este estado celular se le conoce como estrés oxidativo, el cual está involucrado en el daño agudo y crónico del sistema nervioso central (SNC) (Corrales y Muñoz, 2012).

Los aminoácidos excitadores participan en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. A pesar de que juegan un papel crucial en el aprendizaje y la memoria, se ha demostrado que la sobre-activación de los receptores de este tipo de aminoácidos resulta en grandes alteraciones en la sinapsis neuronal. Aunque la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas tienen características específicas y causas diferentes, diversos estudios han demostrado que la excitotoxicidad está implicada en estas patologías y también hay evidencia que sugiere que la neurodegeneración tiene como uno de los principales mecanismos al estrés oxidativo (Dong et al., 2009)

2. Excitotoxicidad

La excitotoxicidad se define como un mecanismo tóxico que se caracteriza por la activación prolongada de los receptores de aminoácidos excitatorios, como el del glutamato, que es el principal de éstos. La excesiva activación de éstos receptores dispara una serie de mecanismos (aumento de Ca^{2+} citosólico y producción de EROs) que conllevan a daño y a la muerte celular (Mehta et al., 2012).

3. Glutamato

El glutamato (*Figura 1*) es uno de los principales aminoácidos no esenciales y juega un rol clave como neurotransmisor en la plasticidad sináptica, en el desarrollo del cerebro y en la potenciación a largo plazo (fenómeno esencial para el aprendizaje y la memoria). Sin embargo, las cantidades de glutamato deben de ser estrictamente reguladas para que el cerebro funcione de una manera adecuada ya que cuando se encuentra en altas cantidades puede ocurrir una activación anormal de sus receptores y generar daño celular (Mehta et al., 2012).

El glutamato se sintetiza a partir del α -cetoglutarato (derivado del ciclo de Krebs) y la glutamina (aminoácido no esencial) en una reacción catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa. Después de su síntesis, el glutamato es acumulado en vesículas pre-sinápticas hasta que en presencia de una señal eléctrica; que subsecuentemente provocará la despolarización de la célula y la entrada de Ca^{2+} ; el neurotransmisor será liberado al espacio sináptico (Beas, 2005).

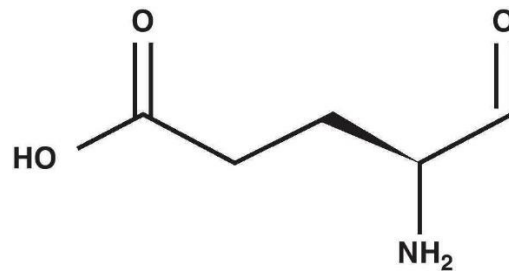


Figura 1. Estructura del glutamato

4. Receptores de glutamato

Existen dos tipos de receptores a glutamato; 1) los receptores ionotrópicos; que están acoplados a un canal iónico y su activación permite la entrada de diversos iones, principalmente Ca^{2+} y Na^+ , así como la salida de K^+ ; y 2) los receptores metabotrópicos; que promueven la activación de segundos mensajeros vía proteínas G.

Los receptores metabotrópicos (mGluR) comprenden una familia heterogénea de receptores que están vinculados a varias vías de señales de transducción vía la proteína G. La unión del glutamato a estos receptores regula la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal a través de la activación o inhibición de varios sistemas efectores acoplados a proteínas G (Fouillieux et al., 2004). La

estructura de estos receptores consta de siete dominios transmembranales separados por pequeñas asas intra y extracelulares (Bleich et al., 2003).

Se han descrito 8 subtipos que se dividen en tres grupos principalmente (Bleich et al., 2003):

Grupo I: Activación de la fosfolipasa C, resultando en la generación de segundos mensajeros como el diacilglicerol (DAG) y el inositol 3 fosfato (IP3)

Grupo II y III: Cuya activación inhibe a la adenilato ciclasa que resulta en una menor producción de AMPc.

Los receptores ionotrópicos son los más estudiados y son los que se han involucrado en la excitotoxicidad; se pueden dividir en tres tipos y su nombre se deriva de sus agonistas específicos: 1) receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), 2) receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y 3) receptores kainato. Su estructura general consiste en un dominio extracelular amino terminal, tres cruces transmembranales, un loop reentrante que forma el poro del canal iónico y un dominio intracelular C-terminal. Además generalmente se ensamblan en una estructura tetramérica formados por subunidades de proteínas integrales hetero-oligoméricas (Moreno y Zarain, 2006).

Los receptores AMPA regulan la transmisión sináptica rápida en el SNC. Estos receptores son heterotetrámeros conformados por 4 subunidades principales GluA1, GluA2 GluA3 y GluA4 que forman un canal iónico permeable a Na^+ . Los receptores AMPA son fisiológicamente impermeables a Ca^{2+} debido a la presencia de su subunidad GluA2; sin embargo, después de alguna lesión neuronal, daño por isquemia o epilepsia hay una reducción de GluA2 en los receptores provocando una alta permeabilidad a Ca^{2+} generando diversas condiciones patológicas (June y Savtchouk, 2012). Poseen 3 dominios transmembrana y un loop reentrante que forma el poro del canal iónico característico de los receptores ionotrópicos (Fouilloux et al., 2004). Estos receptores son los primeros en activarse después de la exocitosis y permiten que se lleve a cabo una despolarización parcial para activar a los receptores NMDA (Michaelis, 1998)

Los receptores kainato comparten la misma topología y estequiometría que los receptores AMPA, por lo que están compuestos de tetrámeros proteicos formados por combinaciones de 5 subunidades GluR5, GluR6 y GluR7, en combinación con KA1 y KA2 (Fouilloux et al., 2004). La combinación de KA2 con GluR5 conforma un receptor funcional permeable a Na^+ pero con baja permeabilidad a Ca^{2+} al igual que los receptores AMPA.

El receptor ionotrópico más estudiado y el que está involucrado en la potenciación a largo plazo y en la excitotoxicidad es el receptor NMDA. Existen tres diferentes subunidades NR1, NR2 y NR3, que

están altamente glicosiladas y los receptores de NMDA funcionales son tetrámeros formados por homodímeros de NR1 (componente obligado; sin embargo la expresión de canales homoméricos NR1 da como resultado canales que presentan corrientes de muy baja amplitud con respecto a los receptores neuronales) y NR2 (subunidades reguladoras o potenciadoras ya que la sola expresión de las subunidades NR2 no genera receptores funcionales) (Cull et al., 2001; Flores et al., 2012). Por el contrario, la subunidad NR3 probablemente actúa como dominante negativo de la actividad del receptor (Ciabarra et al., 1995). Los receptores NMDA poseen diferentes sitios de unión como: a) el sitio de unión a glutamato en NR2; b) el sitio de unión a la glicina en NR1, que funciona como un modulador alostérico, facilitando la acción del glutamato; c) el sitio de unión a poliaminas, que provoca efectos potenciadores o inhibidores; d) el sitio de unión a Mg^{2+} ; y e) un sitio de unión a Zn^{2+} (Figura 2) (Avila y Pérez, 2016).

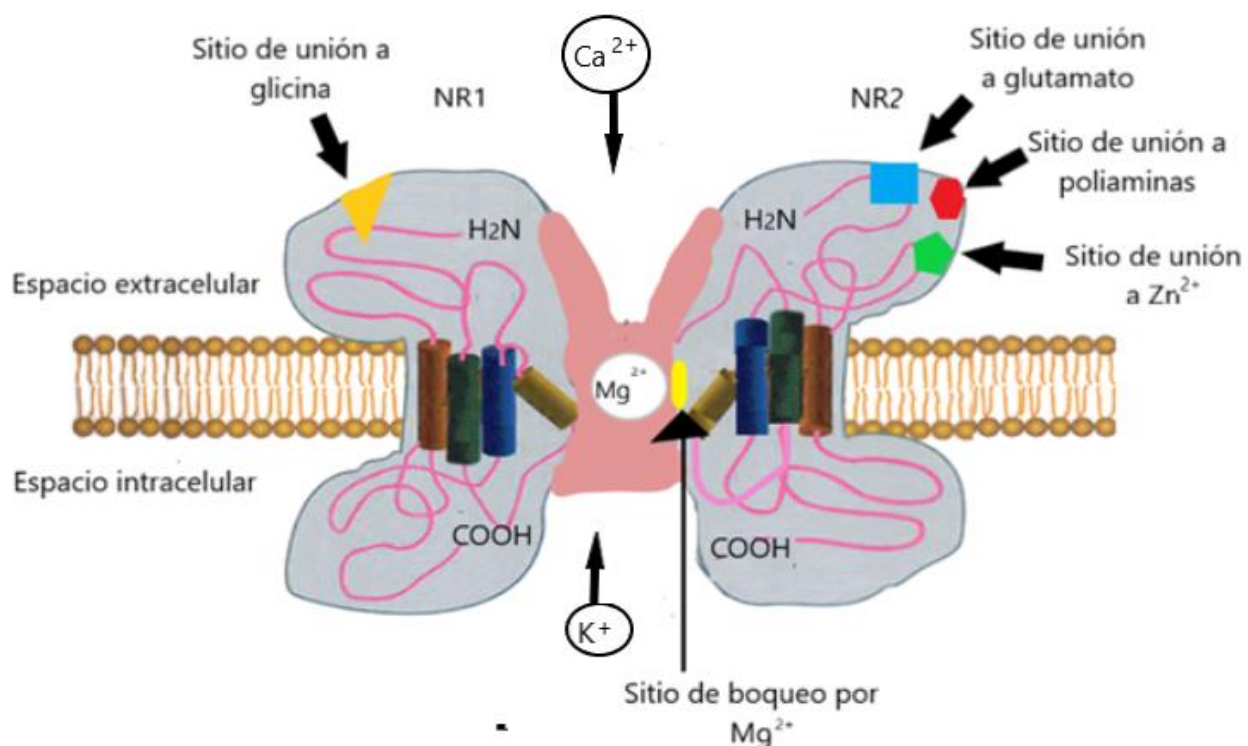


Figura 2. Heterodímero de NR1-NR2 que conforma un receptor NMDA funcional de glutamato. Los receptores NMDA funcionales se forman de heterotetrámeros integrados por heterodímeros de las subunidades NR1-NR2. Otras característica especiales de este receptor es su facilidad al bloqueo por Mg^{2+} , su sitio de unión a glicina en NR1 que actúa como coagonista y su sitio de unión a glutamato que se encuentra localizado en NR2. Su estructura general consiste en un dominio extracelular amino terminal, tres cruces transmembranales, un loop reentrante que forma el poro del canal iónico y un dominio intracelular C-terminal. Es permeable al influjo de Ca^{2+} y al flujo retrogrado de K^+

La activación del receptor NMDA requiere de una despolarización parcial, mediada por los receptores AMPA y kainato (*Figura 3A*) (son los primeros receptores que se activan con glutamato) ya que los receptores NMDA se encuentran bloqueados en el espacio sináptico con cationes Mg^{2+} , que impiden que el receptor interactúe con el glutamato. La despolarización parcial debida a la entrada de Na^+ , permite que la molécula de Mg^{2+} se libere y se favorece la unión del glutamato y su co-agonista (glicina) en sus respectivos sitios, el receptor se activa y se vuelve permeable a Ca^{2+} , K^+ y Na^+ pero mantiene una preferencia al Ca^{2+} (*Figura 3B*). Debido a la alta permeabilidad de los receptores NMDA al Ca^{2+} , cuando hay un aumento en la concentración del glutamato u otro tipo de moléculas agonistas a dichos receptores en el espacio sináptico, se produce un aumento excesivo en la concentración de Ca^{2+} celular, que a su vez activa mecanismos de daño celular ([Mehta et al., 2012](#)).

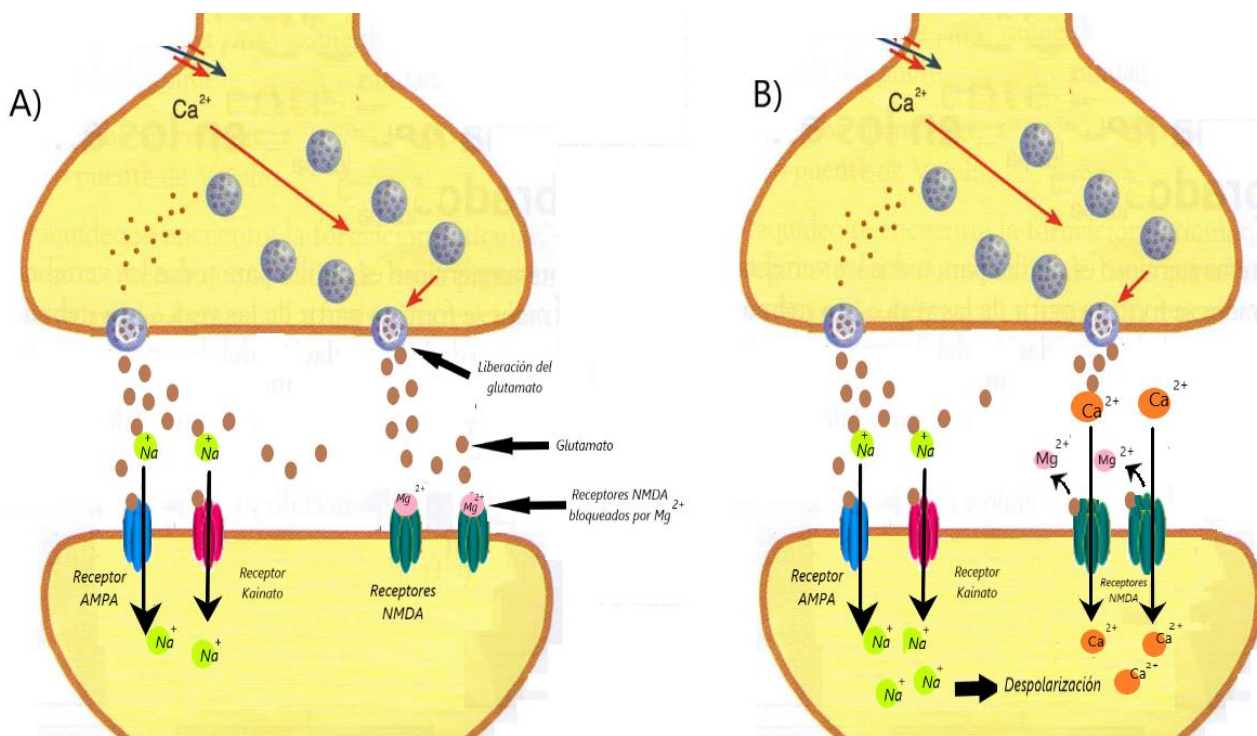


Figura 3. Activación de los receptores ionotrópicos de glutamato A) El glutamato es almacenado en las vesículas presinápticas que al despolarizarse la célula, por la entrada de Ca^{2+} debido a una señal eléctrica, el neurotransmisor es liberado al espacio sináptico. El glutamato; una vez liberado se acopla sobre los receptores AMPA y Kainato que son los primeros en activarse, una vez activos estos receptores permiten la entrada de Na^+ lo que provoca la despolarización parcial de la célula (pierde su carga negativa). B) El Mg^{2+} que se encuentra bloqueando al receptor NMDA es liberado permitiendo que se active y permita la entrada de Ca^{2+} principalmente.

5. Aumento de Ca^{2+} intracelular

Cuando los receptores de glutamato se activan, favorecen la entrada de Ca^{2+} a la célula directamente como transportadores; sin embargo, cuando hay un exceso de glutamato en el espacio sináptico ocasiona la entrada masiva de Ca^{2+} al interior de la célula provocando un aumento intracelular de este catión en el citoplasma de la célula, y consecuentemente la activación secundaria de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico mediada por los receptores de rianodina y los receptores IP3 (IP3 es producto de la activación de los receptores metabotrópicos). La concentración fisiológica de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico es de 1 mM mientras que en el citoplasma es de 100 nM esta diferencia favorece la salida de este catión hacia el citoplasma (Quintanar y Calderón, 2007) . Dicho en otras palabras, el aumento de Ca^{2+} intracelular genera la liberación de más Ca^{2+} , hasta que los mecanismos reguladores (ATPasa- Ca^{2+} , el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, entre otros) son insuficientes para mantener los niveles normales de Ca^{2+} intracelular generando daño y muerte celular (Wodja et al., 2008).

Cuando el Ca^{2+} aumenta en el citoplasma, comienza a entrar al interior de la mitocondria por medio del uniportador de Ca^{2+} . La acumulación excesiva de Ca^{2+} en la mitocondria ocasiona eventos mortales para la célula como la despolarización de la membrana que desacopla la cadena transportadora de electrones, disminuye la síntesis de ATP y aumenta la producción de EROs.

Al reducirse la síntesis de ATP, los mecanismos de liberación de Ca^{2+} de la célula se ven afectados provocando un mayor aumento de Ca^{2+} en la célula y una sucesiva apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM). El PPTM es un mecanismo de muerte celular que provoca la liberación desde la membrana mitocondrial hasta el citosol de moléculas con capacidad apoptótica como el citocromo c, Smac/DIABLO (segundo activador de caspasa derivado de mitocondrias/inhibidor directo de proteína de unión a apoptosis con pI bajo), Apaf-1 (factor-1 activador de proteasa de apoptosis), AIF (factor inductor de apoptosis) y algunos miembros de la familia de las caspasas como caspasa-2 y caspasa-9 (Figura 4). Todos estos agentes son capaces de activar diferentes rutas apoptóticas (Torneró et al., 2002).

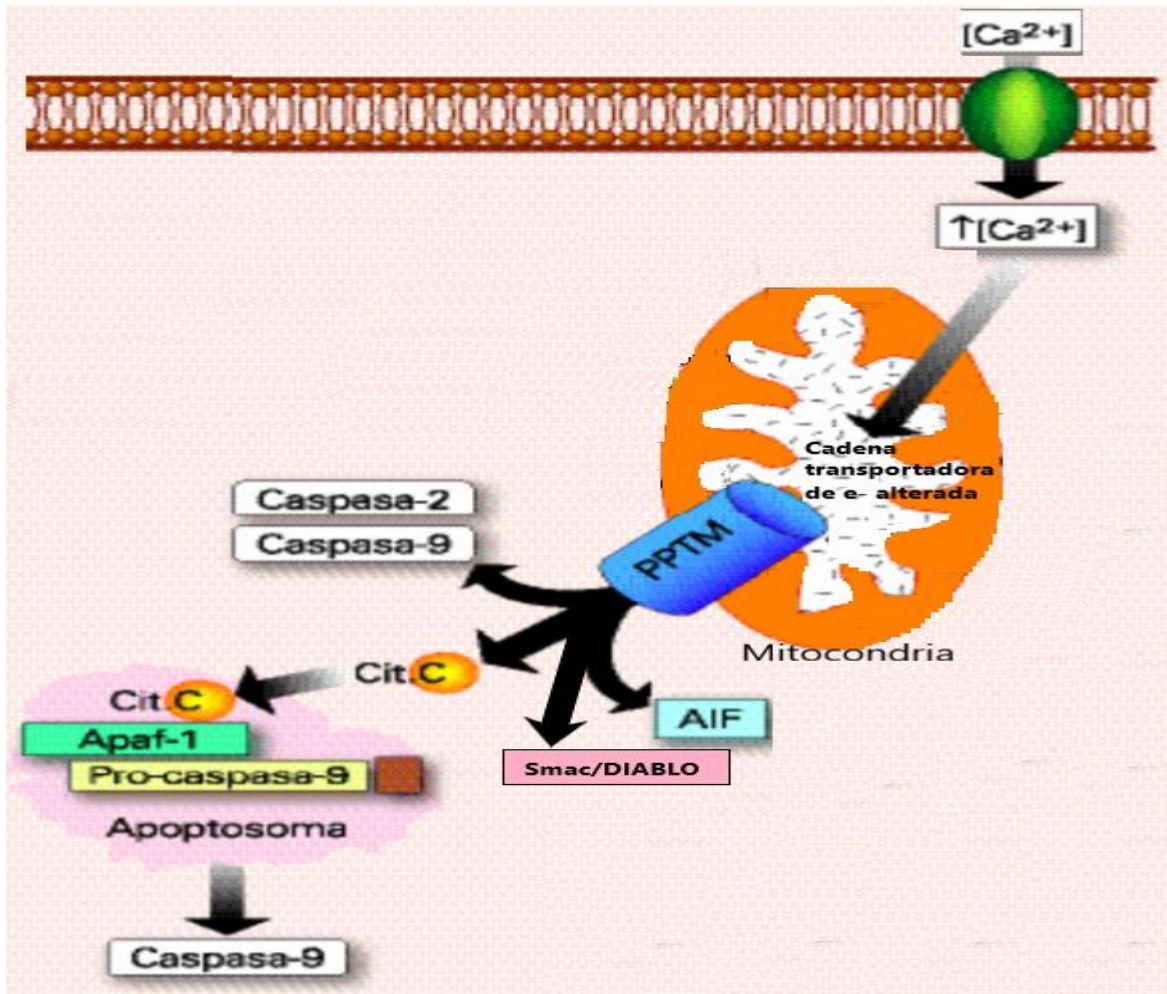


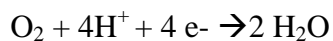
Figura 4. Apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM). La entrada de Ca^{2+} en el citoplasma y posteriormente a la mitocondria provoca el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones con la generación de EROs y la apertura del PPTM. El resultado de la apertura del PPTM provoca la liberación del citocromo C (Cit C), la formación del apoptosoma, entre otras rutas que promueven la apoptosis celular. **Imagen modificada** (Tornero et al., 2002).

6. Estrés oxidativo

En las células eucariotas se requiere un balance redox para el mantenimiento de su fisiología normal. Este equilibrio redox se da entre la producción de especies oxidantes y/o radicales libres (productos de la respiración celular) y los sistemas de defensa antioxidante. La pérdida de este balance conduce al estrés oxidativo. El estrés oxidativo se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies oxidantes (especies que son convertidas rápidamente en radicales libres) que no alcanza a ser neutralizado por los antioxidantes naturales generando daño y muerte celular. En numerosas

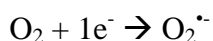
enfermedades; entre ellas las neurodegenerativas, se ha visto que el estrés oxidativo juega un papel clave para el desarrollo de la patología (Singh et al., 2019).

Las EROs son radicales libres o especies oxidantes, que se forman a partir de O_2 . En condiciones fisiológicas el O_2 se reduce a H_2O por el complejo de la citocromo oxidasa, que transfiere $4 e^-$ al O_2 (vía tetravalente de reducción del O_2) esta reducción es necesaria para la síntesis de ATP y se lleva a cabo todo el tiempo en la mitocondria de la célula (Halliwell, 2006):

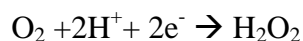


Sin embargo durante el transporte de electrones en la cadena transportadora de electrones, algunos electrones llegan a reaccionar directamente con el O_2 generando EROs como intermediarios (vía univalente de reducción del O_2). Además en condiciones patológicas en las que se desarrollan eventos excitotóxicos, existe un aumento de Ca^{2+} mitocondrial que ocasiona interrupciones en la cadena transportadora de electrones que consecutivamente generan un aumento en las EROs (Tornero et al., 2002).

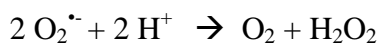
Algunas de los EROs más abundantes son el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otros. Cuando la molécula de O_2 acepta un electrón, se forma el anión superóxido (Halliwell, 2006):



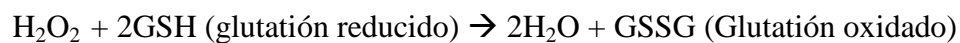
Cuando la molécula de O_2 acepta dos electrones, se forma el H_2O_2



La mitocondria cuenta con enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (MnSOD) y la glutatión peroxidasa (GPx), que trabajan conjuntamente para remover el $O_2^{\bullet -}$ y el H_2O_2 generando H_2O mediante las siguientes reacciones:



Superóxido
dismutasa



Glutatión
peroxidasa

Sin embargo; si la concentración de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en la mitocondria rebasan los límites estimados o si la concentración de las enzimas son insuficientes, el H_2O_2 puede dar pie a la generación del OH^{\cdot} mediante la **reacción de Fenton** en la que se requieren trazas de metales de transición como catalizadores (Halliwell, 2006):



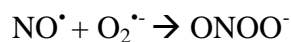
Adicionalmente, el $O_2^{\cdot-}$ también puede participar en otra reacción que da pie a la generación del OH^{\cdot} también conocida como **reacción de Haber-Weiss**:



En condiciones fisiológicas, las EROs pueden ser contrarrestadas por los sistemas antioxidantes naturales; sin embargo en condiciones patológicas las EROs producidas no alcanzan a contrarrestarse por los sistemas antioxidantes naturales (Corrales y Muñoz, 2012).

Las especies reactivas de nitrógeno (ERN); al igual que las EROs, son radicales libres que se encargan de generar estrés nitrosante que pueden dañar y comprometer la vida celular. Una de las ERN más importante es el óxido nítrico (NO^{\cdot}), molécula que modula la neurotransmisión del glutamato y que es generado por la enzima sintasa de óxido nítrico neuronal (SONn) y endotelial (SONe), dos de las tres isoformas de la NOS que se encuentran distribuidas en el cerebro y que dependen de la concentración de Ca^{2+} (que aumenta con la sobreactivación de los receptores NMDA). Existen estudios que han demostrado que los niveles altos de NO^{\cdot} ocasionan la liberación de glutamato de las neuronas, contribuyendo a la muerte neuronal por excitotoxicidad (McKenna, 2007).

Además, el NO^{\cdot} puede reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ generando peroxinitrito ($ONOO^-$), molécula altamente oxidante que puede favorecer la fragmentación del DNA, la peroxidación de lípidos, la nitración de proteínas y la reducción de la recaptura del glutamato en las células gliales, lo que conlleva a la muerte celular (Nakamura et al., 2007; Halliwell, 2006).



7. Daño cerebral causado por EROs y ERNs

El estrés oxidativo provocado por EROs y ERNs puede ocasionar oxidación de diferentes moléculas como: a) proteínas, b) DNA y c) lípidos. La oxidación de proteínas es una modificación covalente de las proteínas, todos los aminoácidos pueden servir como blancos de ataque de las especies reactivas; sin embargo, algunos son más susceptibles como la metionina, triptófano, fenilalanina, tirosina, entre otros. La modificación de las cadenas laterales de los aminoácidos puede generar alteraciones directamente en la estructura y la función de las proteínas, fragmentación química o mayor susceptibilidad a proteólisis. La cuantificación de los grupos carbonilos ha sido el biomarcador más utilizado para detectar daño a proteínas, debido a que la exposición de estos grupos se da por la ruptura de enlaces covalentes y no covalentes entre los diferentes aminoácidos que forman la proteína (Olivares et al., 2006). Las alteraciones en la estructura proteica favorecen la formación de agregados presentes en algunas enfermedades neurodegenerativas.

Por otro lado, la oxidación del DNA genera modificaciones permanentes del material genético generando mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento, la reacción más estudiada es la formación de la 8-hidroxiguanosina (8-OHdG). En el caso de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, se forman dos productos principales que son el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonal (4-HNE). El primero es un compuesto mutagénico, mientras que el segundo pese a ser un compuesto poco mutagénico es el principal producto tóxico de la lipoperoxidación, ya que puede dañar los transportadores de glutamato generando excitotoxicidad. La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares provoca su deterioro, disminuyendo su fluidez, reduciendo el potencial electroquímico y aumentando la permeabilidad, generando daño en la membrana y comprometiendo la vida celular. El cerebro es uno de los órganos más susceptibles del cuerpo humano a las EROs debido a su alto consumo de oxígeno, su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, su limitada actividad antioxidante. Es por esto que se ha señalado que la administración de compuestos antioxidantes podrían funcionar como candidatos terapéuticos en las enfermedades neurodegenerativas (González, 2015).

Se han descrito mecanismos que promueven la reducción de las ERO y ERN en dos fases iniciales. En la Fase I, participan las enzimas que metabolizan carcinógenos y xenobióticos (enzimas de la familia p450) y llevan a cabo reacciones de óxido-reducción que introducen o exponen grupos funcionales en las moléculas. Por otro lado, en las reacciones de fase II, se reduce la electrofilicidad de los metabolitos carcinógenos y xenobióticos modificados mediante su conjugación enzimática con ligandos endógenos, como pueden ser el glutatión (GSH) y el ácido glucurónico (Königsberg, 2007).

8. Ácido quinolínico (QUIN) como modelo excitotóxico/pro-oxidante

El QUIN es una neurotoxina endógena producto del metabolismo del triptófano, presente en el cerebro de rata y humano. La vía de la kinurenina (KP), es la principal ruta del metabolismo del triptófano, cuya función es la producción de NAD^+ y NADP^+ (Figura 5). La concentración fisiológica del QUIN es por debajo de 100 nM; sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas incrementa a 10-40 μM . (Kubicova, 2015).

El QUIN es un agonista competitivo de los receptores NMDA selectivo de las subunidades NR2A y NR2B (De Carvalho et al., 1995); este subtipo de receptores se expresa principalmente en el cuerpo estriado, el hipocampo y la corteza del cerebro humano y de rata adulta.

La concentración de QUIN cambia en las diferentes áreas del cerebro, siendo la corteza cerebral donde se observan los niveles más altos y el cuerpo estriado donde se observan los más bajos. Además, las neuronas espinosas medianas del estriado parecen ser las células cerebrales más susceptibles al efecto tóxico del QUIN debido a la sobreactivación de receptores NMDA con subunidades NR2B (Tepper et al., 2010).

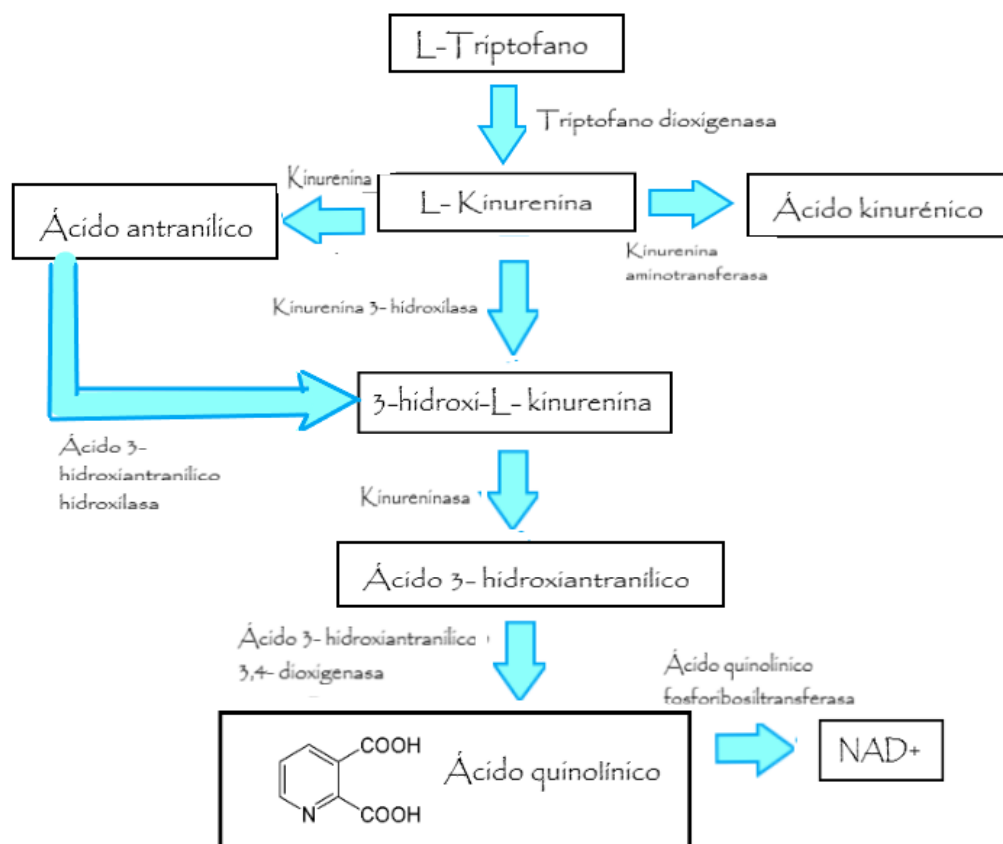


Figura 5. Principales componentes de la vía de la kinurenina. Modificado de (Guillemin y Brew, 2016).

El QUIN está involucrado en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas que se relacionan con la excitotoxicidad, como el Alzheimer (Guillemin y Brew, 2016), ya que además de activar los receptores NMDA puede inhibir la recaptura del glutamato en las vesículas sinápticas e incrementar su concentración a niveles excitotóxicos. El QUIN ha mostrado la capacidad de generar el OH^\bullet de manera independiente a la activación de los receptores NMDA mediante la formación del complejo QUIN-Fe (II) (Santamaría et al., 2001). Además, el QUIN es capaz de favorecer el aumento de la especie reactiva ONOO^- , como consecuencia de la disminución de SOD y el incremento de NOS (Perez et al., 2005).

El QUIN puede inducir la muerte neuronal a través de diferentes mecanismos:

- a) Sobreactivación de los receptores NMDA provocando un aumento de Ca^{2+} intracelular y la subsecuente activación de proteínas quinasas, fosfolipasas, proteasas, entre otras.
- b) Incremento de la concentración de glutamato debido a la inhibición de su recaptura por los astrocitos y las vesículas presinápticas.
- c) Inducción de lipoperoxidación y la rotura de la cadena de DNA *in vitro*, debido a la formación del complejo QUIN-Fe (II) que facilita la formación de EROs como OH^\bullet (Goda et al., 1996).
- d) Potencia su propia toxicidad y la de otras neurotoxinas; como el NMDA, el glutamato y la glicina, teniendo un efecto sinérgico.
- e) Activa la enzima NOS, que provoca un aumento de los niveles de NO^\bullet , favoreciendo el estrés oxidante.

En los últimos años se han ido descubriendo nuevos mecanismos de toxicidad del QUIN, que parecen tener una estrecha relación con la activación de los receptores NMDA (Guillemin, 2012).

La mayoría de las cascadas neurotóxicas desencadenadas por el QUIN generan EROs y ERN (Pérez et al., 2012), es por ello que el daño causado por el QUIN puede ser prevenido usando diferentes antioxidantes como la L-carnitina y melatonina (Behan et al., 1999).

La inyección estereotáxica intraestriatal de QUIN en ratas produce cambios neuropatológicos y neuroquímicos similares a los observados en la enfermedad de Huntington (Sanberg et al., 1989). De igual manera se ha detectado un aumento de QUIN en un análisis post-mortem de las placas seniles de pacientes con Alzheimer en etapa avanzada (Guillemin y Brew, 2016), así como en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Huntington en etapas tempranas (Guidetti et al., 2004). Además,

algunas alteraciones en la vía de la kinurenina se han relacionado con la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas (Lin Tan, 2012).

Debido a lo anterior, el modelo bioquímico mediante la administración de QUIN en ratas, ha sido ampliamente utilizado en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en las enfermedades neurodegenerativas, ya que se ha visto que genera un ambiente excitotóxico y estrés oxidativo similar al que se produce en estas patologías (Rahman et al., 2018). Algunos compuestos antioxidantes han sido estudiados como posibles candidatos terapéuticos en las enfermedades neurodegenerativas ya que son capaces de disminuir la excitotoxicidad generada en dichos padecimientos (Santana et al., 2014; Behan et al., 1999; Rodríguez et al., 2000). Por ello, en este trabajo se evaluó el efecto de la curcumina (CUR).

9. Antioxidante natural: Curcumina

El cuerpo cuenta con un sistema de defensa antioxidante endógeno de tipo enzimático y no enzimático para neutralizar la excesiva producción de ERO y ERN (Coyle y Puttfarcken, 1993). Las SODs, las catalasas (CATs) y las peroxidasas (glutatión peroxidasa y la tiorredoxina peroxidasa) son ejemplos de antioxidantes enzimáticos; dentro de los no-enzimáticos destacan la vitamina A, el ácido ascórbico (vitamina C), el α -tocoferol (vitamina E), el ácido úrico, la glicina, la taurina y el tripéptido glutatión, entre otros. Sin embargo, existen numerosos compuestos de origen natural que presentan propiedades antioxidantes como los polifenoles, flavonoides, isotiocianatos y los fitoquímicos (Coyle y Puttfarcken, 1993). La CUR es un compuesto natural ampliamente conocido por sus propiedades antioxidantes y este trabajo se centrará en resaltar a la CUR como candidato terapéutico en aquellas enfermedades que presentan al estrés oxidativo dentro de su fisiopatología (enfermedades neurodegenerativas).

La CUR pertenece a la familia de los curcuminoides, pigmentos polifenólicos presentes en los rizomas o tallos subterráneos de la planta tropical Cúrcuma (*Curcuma longa L, Zingibetaceae*) (Figura 6). La cúrcuma es una planta de tallo largo (cerca de 1 m de longitud) y sus flores son de color blanco. El rizoma de la planta; donde se encuentran los pigmentos curcuminoides, tiene unas dimensiones máximas de unos 7 cm de largo por 2.5 cm de ancho. La planta necesita aproximadamente 8-10 meses para madurar (González-Albadalejo et al., 2015).

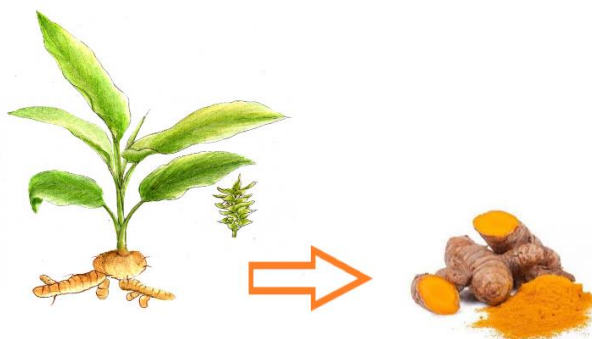


Figura 6. Rizoma de la Cúrcuma

La CUR es el principal polifenol curcuminóide encontrado en la cúrcuma, se produce en el tallo subterráneo o rizoma de la planta, además es el principal responsable de las propiedades medicinales y farmacológicas de la misma. Este compuesto presenta un esqueleto hidroxicarbonado dicetónico con varios grupos funcionales (*Figura 7*).

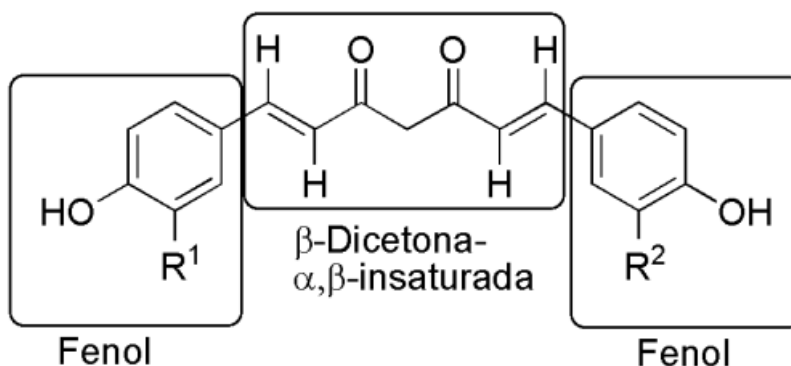


Figura 7. Estructura de CUR. Imagen recuperada de ([González et al., 2015](#))

Debido a sus grupos funcionales es prácticamente insoluble en agua, sin embargo se puede solubilizar en disolventes orgánicos como el DMSO o etanol. Su propiedad lipofílica lo hace capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro. En la búsqueda de la administración de CUR como agente terapéutico oral, se han utilizado emulsiones de CUR con carboximetilcelulosa.

Sus múltiples aplicaciones incluyen dar sabor a los alimentos, teñir telas de color amarillo-naranja y como remedio para aliviar diferentes trastornos de la salud, ya que se ha estudiado ampliamente como remedio herbolario. Algunos de sus efectos farmacológicos más estudiados son: anti-tumoral, anti-inflamatorio y anti-infeccioso.

La CUR posee propiedades biológicas como antioxidante directo ya que atrapa radicales libres y además es un conocido inductor del factor Nrf2 (antioxidante indirecto). Su habilidad para atrapar radicales libres se debe a sus grupos hidroxilo, además en su forma ceto es un potente donador de H^+ (Figura 8) (González et al., 2015).

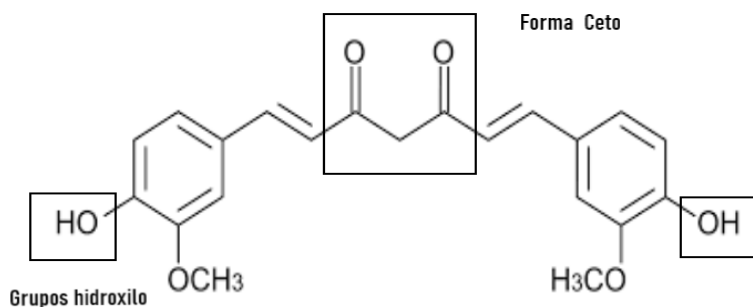


Figura 8. Propiedades estructurales de CUR responsables de su capacidad antioxidante directa. El grupo metileno entre la fracción beta-diacetona de la cadena heptadienona, contiene enlaces C-H muy débiles debido a la deslocalización del electrón desapareado en los oxígenos adyacentes. En su forma enólica son los grupos hidroxilo los que actúan como donadores de H^+ . Modificada de (González et al., 2015).

La CUR presenta tautomería ceto-enol (Figura 9); en medio ácido y neutro, la forma ceto es la forma que predomina siendo su forma más estable; sin embargo, en medio alcalino predomina la forma enol perdiendo su estabilidad. En la membrana celular la CUR se encuentra en su forma ceto (González et al., 2015). Sus características estructurales le confieren mayor capacidad antioxidante con respecto a otros antioxidantes fenólicos (Barzegar y Moosavi, 2011).

En un estudio reciente se demostró que un inhibidor de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) disminuyó la capacidad antioxidante de la CUR disminuyendo su capacidad de activar al factor Nrf2 en células de epitelio retinal (Bucolo et al., 2019). Además, se observó que un análogo de la CUR indujo la fosforilación de ERK1/2 favoreciendo la activación de Nrf2 (Kim et al., 2008).

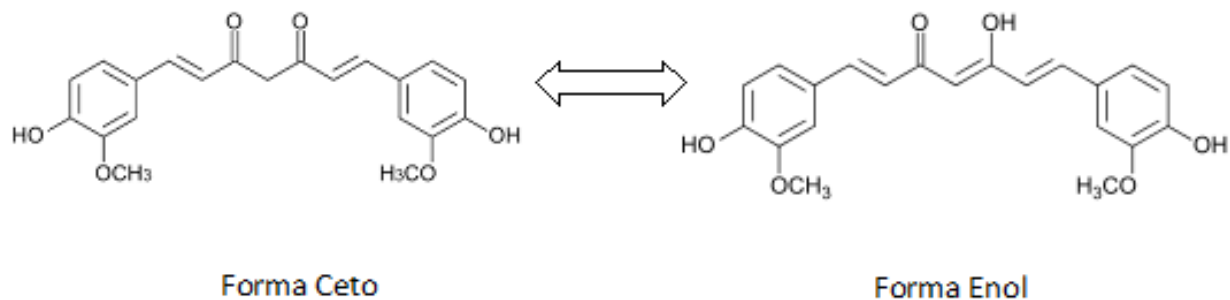


Figura 9. Tautomería ceto-enol de CUR

10. Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF)

BDNF pertenece a la familia de neurotrofinas (factor de crecimiento nervioso, la neurotrofina-3 y la neurotrofina 4/5) que se encargan de la supervivencia, el desarrollo y la función de las neuronas en el sistema nervioso periférico y central. La participación de las neurotrofinas en los procesos de desarrollo y mantenimiento ha sido estudiada y demostrada en modelos *in vitro* e *in vivo*. Además, modulan el crecimiento y la ramificación axonal y dendrítica (Bothwell, 1995). BDNF es considerado un potente modulador de la función neuronal, ya que promueve la supervivencia, la diferenciación y maduración neuronal y la plasticidad sináptica (Reichart, 2006). Los ratones que han sido genéticamente modificados con deficiencia genética de BDNF o de su receptor exhiben un exceso de actividad apoptótica en el cerebelo (Schwartz et al., 1997).

BDNF es sintetizado como un precursor inmaduro llamado pre-proBDNF, en donde el dominio “pre” corresponde al péptido señal que guía a la pro-proteína. Este péptido señal es rápidamente eliminado y procesado a proBDNF por enzimas específicas intracelulares como las proconvertasas (la más abundante es la furina) presentes en el aparato de Golgi y en vesículas secretoras. También enzimas extracelulares como las metaloproteasas de matriz presentes en la matriz extracelular pueden procesar este precursor inmaduro.

El pro-BDNF es un precursor con tamaño de 32 kDa que sufre N-glicosilaciones y glicosulfataciones dentro de su pro-dominio (Mowla et al., 2001). Posteriormente algunas proteasas extracelulares como la plasmina y la metaloproteína-7 se encargan de hacer una escisión N-terminal al pro-BDNF dentro de la red trans-Golgi o en vesículas secretoras inmaduras para generar BDNF maduro (mBDNF, 14 kDa). mBDNF forma dímeros C-terminales, los cuales son liberados por las neuronas a

través de secreción constitutiva (secreción liberada sin ninguna señal específica) o de manera dependiente de la actividad sináptica.

Solo mBDNF puede unirse a su receptor tirosina quinasa (TrkB) e inducir supervivencia y diferenciación neuronal, al contrario de pro-BDNF que se une a p75 NTR (miembro de la familia de receptores al factor de necrosis tumoral) y la sortilina (proteína transmembrana tipo I) e inducir apoptosis (Teng et al., 2005). p75 es un receptor de las neurotrofinas y es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y su activación desencadena mecanismos que conllevan a la muerte celular; como la activación de JNK que induce la activación de genes proapoptóticos y NFκ-B, un factor de transcripción relacionado con procesos inflamatorios (Königsberg, 2007; Reichart, 2006). Este tipo de receptor se expresa en diversas afecciones patológicas como la neurodegeneración y los péptidos potencialmente tóxicos, incluidos el péptido beta amiloide que se acumula en la enfermedad de Alzheimer, son ligandos para p75 (Dechant y Barde, 2002).

TrkB-T1 es una forma trunca del receptor TrkB que carece del dominio tirosina cinasa, se expresa en el cerebro y en células gliales. Este tipo de receptor compite por BDNF con TrkB-FL (receptor en su forma completa) y forma heterodímeros inactivos en las neuronas (Haapasalo et al., 2001). La expresión de TrkB-T1 en astrocitos es estimulada después del daño y puede modular la vulnerabilidad neuronal y el secuestro de BDNF en astrocitos (Binder y Scharfman, 2004). TrkB-T1 está también involucrado en la regulación de la concentración local de BDNF y en la modulación negativa de la expresión de los receptores TrkB y su función (Tejeda y Díaz, 2017).

mBDNF se concentra en diferentes regiones del cerebro de rata adulta como la corteza cerebral, el hipocampo, el cuerpo estriado, el cerebelo, el cerebro anterior basal, el tronco del encéfalo y varias regiones del hipotálamo (Tapia et al., 2004); sin embargo por medio de ensayos inmunohistoquímicos se ha observado que la cantidad de RNAm de BDNF en algunas regiones de cerebro es escaso como en el cuerpo estriado, estos hallazgos sugieren que BDNF es sintetizado y transportado de forma anterógrada desde los cuerpos celulares de la corteza cerebral, sustancia compacta, amígdala y tálamo hasta el cuerpo estriado y otras regiones (Altar et al., 1997).

Como ya se había mencionado, el receptor de BDNF es TrkB miembro de la familia de receptores quinasa relacionados con la tropomiosina (Trk). Los receptores Trk existen en su forma completa (TrkB-FL) y en su forma trunca (TrkB-T1 y TrkB-Shc), con la ausencia del dominio quinasa. La unión de BDNF a TrkB-FL se ha relacionado con la proliferación y la supervivencia neuronal (Pérez et al., 2000), el crecimiento axonal y dendrítico (Orefice et al., 2013), así como con la plasticidad sináptica (Huang y Reichardt, 2003).

La unión de BDNF a TrkB-FL desencadena cascadas de señalización intracelular, siendo las tres vías principales (*Figura 10*): 1) la ruta de la fosfolipasa C-gama (PLC- γ) que conduce a la producción de diacilglicerol, IP3 y Ca^{2+} como segundos mensajeros encargados de activar a PKC (proteína cinasa C) y su función primordial es promover la supervivencia y la plasticidad sináptica; 2) la ruta de PI-3-kinasa (PI3K) que activa a AKT (proteína cinasa B) encargada de regular factores anti-apoptóticos y controla la actividad de varias proteínas esenciales para el crecimiento axonal y dendrítico; y 3) la ruta de la cinasa regulada por señal extracelular 1/2 (ERK 1/2) que promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia neuronal mediante la supresión de la proteína Bcl-2 asociada a muerte (BAD, proteína pro-apoptótica) y la activación del factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc). Las diferentes vías se activan dependiendo del estímulo recibido, en el caso de la vía PLC γ se ve favorecido en la plasticidad sináptica, la vía PI3K se favorece ante estímulos de crecimiento axonal y dendríticos y la vía MAPK1/2 se favorece en la proliferación y diferenciación (*Tejeda y Díaz, 2017*).

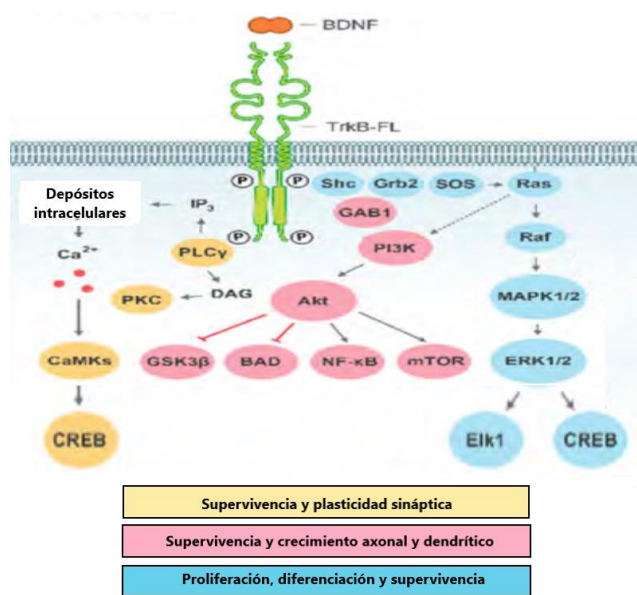


Figura 10. Las tres principales vías de señalización de BDNF. Al unirse BDNF a TrkB-FL induce la homodimerización y activación (autofosforilación) del receptor desencadenando las 3 principales vías: 1)MAPK/ERK (vía azul), 2) PI3K (vía rosa) y 3) PLC γ (vía amarilla). La primera promueve la diferenciación y supervivencia mediante la supresión de las proteínas pro-apopticas como BAD y activación del factor de transcripción CREB. La segunda controla la actividad de varias proteínas esenciales para la supervivencia neuronal como Bcl-2, antagonista de muerte celular o GSK-3 β . Y la tercera desencadena el reclutamiento de la fosfolipasa C γ (PLC γ) que promueve la supervivencia neuronal, el crecimiento de la neurona y la plasticidad sináptica. Modificado de *Tejeda y Díaz- Guerra, 2017*.

Un análisis post-mortem de pacientes con la enfermedad de Huntington y Parkinson muestran una reducción de los niveles de BDNF (Ferrer et al, 2000). De los factores neurotróficos, BDNF parece ser el principal regulador de la cascada de señalización de las MAPK en el cerebro. ERK1/2 (miembro de la familia de las MAPK) es activada por BDNF e induce un aumento en los niveles de neurotrofinas por medio de la activación de CREB. La activación ERK 1/2 es mediada por BDNF promoviendo la supervivencia celular en cultivos de hipocampo (Hetman y Gozdz, 2004) y exhibiendo un efecto protector en episodios de isquemia (Wang et al., 2016)

11. MAPK cinasas (proteínas cinasas activadas por mitógenos)

Las MAPK son proteínas cinasas citoplásmicas que fosforilan residuos de serina/treonina. Su principal función consiste en la transducción de señales desde la superficie al interior de la célula, amplificando una respuesta fisiológica de forma específica y apropiada. Son activadas por la unión de un ligando a su receptor o por condiciones oxidativas, su activación también está asociada a respuestas de hipo e hiperosmolaridad, luz ultravioleta, agentes genotóxicos, entre otros. El estrés oxidativo activa en algunos casos la señalización de las MAPK para promover la supervivencia celular, pero también la activación de la misma vía puede promover la muerte celular. Sus sustratos pueden asociarse tanto con la neurodegeneración (Mielke y Herdegen, 2000) como con la neuroprotección (Karmarkar, et al., 2011); por lo tanto, varias cascadas de señalización podrían activarse en paralelo. Su participación a nivel molecular ocurre en procesos de apoptosis, de transcripción, traducción y síntesis de ácidos nucleicos (Gavilanes, 2005).

Hay tres miembros principales de la familia de las MAPK evolutivamente conservadas: la cinasa regulada por señal extracelular (ERK), c-Jun N-terminal cinasa (JNK) y p38. Cada cascada de señalización de las MAPK consta de al menos de tres componentes: una MAPK cinasa cinasa (MAP3K), una MAPK cinasa (MAP2K) y una MAPK. La MAPK activada cataliza la fosforilación de una gran variedad de sustratos como factores de transcripción, proteínas citoplásmicas, proteínas cinasas y otras proteínas funcionales. Las MAP3K son cinasas de serina/treonina que se activan por fosforilación o por su interacción con una GTPasa como Ras o Rho. La activación de MAP3K lleva a cabo la fosforilación y activación de las MAP2K, las cuales se activan por la fosforilación de serina o treonina; son enzimas con especificidad dual para su sustrato ya que activan por fosforilación a las MAPK en residuos de treonina y tirosina en el motivo Thr-X-Tyr, o bien pueden iniciar su activación con la fosforilación de un solo sitio. Las MAPKs se activan diferencialmente dependiendo del tipo de

estímulo. Por ejemplo, la activación de ERK se favorece en respuesta a estímulos mitogénicos, mientras que JNK y p38 son potencialmente activados por estrés (Zipper y Mulcahy, 2000).

12. Cinasa Regulada por señal extracelular 1/2 (ERK1/2)

ERK1/2 es uno de los miembros de la familia de las MAPK que se ha asociado con la regulación de procesos relacionados con la supervivencia, progresión, migración y diferenciación celular (Hetman y Gozdz, 2004). ERK1 y ERK2 constan de 379 y 360 residuos de aminoácidos en el humano, respectivamente; mientras que en rata y/o ratón constan de 380 y 358 residuos de aminoácidos, respectivamente y se expresan simultáneamente en una gran cantidad de organelos (Roskoski, 2012). Además, son 84% idénticas en secuencia y comparten la mayoría de sus funciones por lo que comúnmente se les denomina ERK1/2. Su principal cascada de transducción es denominada Ras-Raf-MEK-ERK (Wortzel y Seger, 2011) y cuando se activa también se ha asociado a muerte celular (Chu et al., 2004), ya que además de activarse por factores de crecimiento, factores neurotróficos y algunas citocinas, esta vía también puede activarse en respuesta al estrés oxidativo (Montaner, 2007). La vía ERK1/2 inicia con la activación de un receptor de membrana como el receptor tirosin-quinasa (TKR), acoplado a proteína G (GPCRs), canales iónicos y otros. La activación del receptor permite el reclutamiento de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) que se encarga de activar a Ras. La proteína Ras es una cinasa que actúa como “interruptor molecular” donde Ras-GDP es la forma inactiva y Ras-GTP es la forma activa. Ras-GTP conduce a la activación de la familia Raf cinasas que se encargan de fosforilar y activar a MEK1/2. Las proteínas MEK1/2 son cinasas de doble especificidad que llevan a cabo la fosforilación de residuos de tirosina y treonina en ERK1/2 (Figura 11). A su vez, la forma activa de ERK1/2 (p-ERK) fosforila una gran cantidad de sustratos. Cuando el receptor TrkB es activado, el mismo receptor se dimeriza y autofosforila permitiendo la unión de Shc. La proteína Shc recluta proteínas adaptadoras como Grb2 y Sos 1/2 (proteína intercambiadora de nucleótidos) que consecutivamente permiten la activación de Ras desencadenando la vía Ras-Raf-MEK-ERK (Wortzel y Seger, 2011).

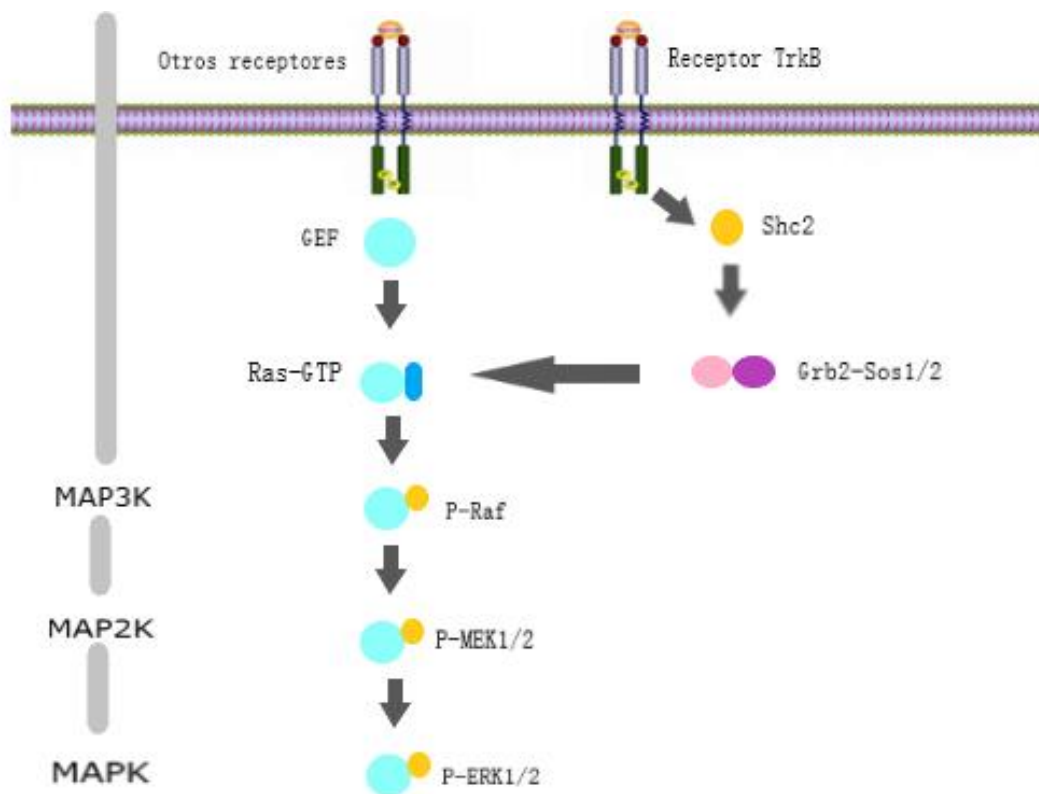


Figura 11. Vía de señalización de ERK1/2. La cascada inicia con la activación de un receptor acoplado a proteínas G o canal iónico que permite el reclutamiento de GEF (factor de intercambio de nucleótidos de guanina) que será encargado de activar a Ras (Ras-GTP). Ras de forma activa conduce a la fosforilación de las Raf cinasas (P-Raf) que se encargan de fosforilar y activar a MEK1/2, a su vez las proteínas MEK1/2 llevan a cabo la fosforilación de ERK1/2 dando inicio a mecanismos de crecimiento y proliferación celular (círculos azules). Cuando se trata de la activación del receptor TrkB, el mismo receptor se dimeriza y autofosforila permitiendo la unión de Shc (círculo amarillo) que a su vez recluta proteínas adaptadoras como Grb2 y Sos 1/2 (proteína intercambiadora de nucleótidos) que consecutivamente permiten la activación de Ras siguiendo la misma cascada anteriormente mencionada. En forma paralela se colocó los tres componentes de los cuales consta cada cascada de señalización de las MAPK: P-Raf es una MAPK cinasa cinasa (MAP3K), P-MEK una MAPK cinasa (MAP2K) y P-ERK 1/2 es una MAPK.

La activación de ERK1/2 promueve la supervivencia celular mediante la expresión de c-Fos y c-Myc en el núcleo. Por otro lado, el principal blanco citosólico de ERK1/2 es la proteína ribosomal S6 cinasa (RSK), que activa varios factores de transcripción que incluyen a CREB. La activación de CREB participa en la regulación de algunas neurotrofinas, como BDNF. Además se ha asociado a ERK1/2 con el aumento de la translocación nuclear de Nrf2 como mecanismo de protección contra el estrés oxidativo (Yang et al., 2011) y por ello se propone a Nrf2 como sustrato para mediar la supervivencia celular (Cullinan et al., 2003).

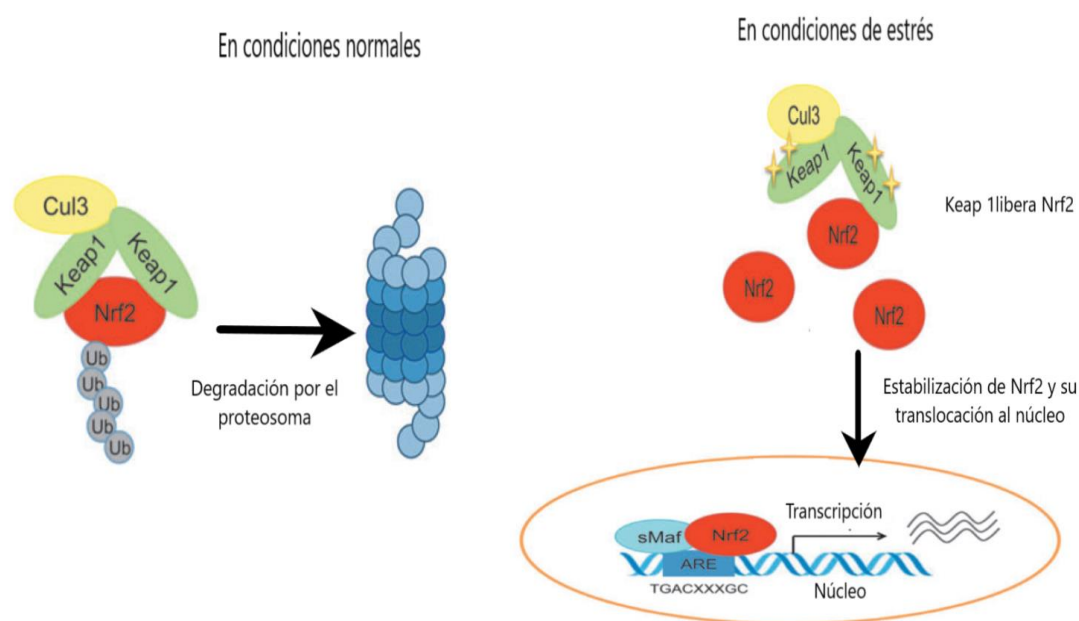
13. Factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide-2 (Nrf2)

Nrf2 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la respuesta antioxidante. La activación de Nrf2 protege a las células contra la muerte y el daño celular inducido por el estrés oxidativo. En modelos animales de isquemia cerebral, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Huntington, hepatotoxicidad, entre otras; se ha demostrado el efecto protector de Nrf2 (Silva y Maldonado, 2018). Nrf2 pertenece a la familia de proteínas básicas con cierre de leucinas (bZip) o “zipper” en la región C-terminal, con una región básica corriente arriba de bZip responsable de la unión al ADN, mientras que la región acídica se requiere para la activación transcripcional (Niture et al., 2010). Tiene 605 aminoácidos, sin embargo, mediante la técnica de electroforesis se determinó un peso molecular 96-118 kDa, debido a la presencia de residuos ácidos en su estructura y a las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación (Pi et al., 2007).

El sitio de unión en el ADN de Nrf2 se conoce como ARE (Elementos de Respuesta Antioxidante) y es una región amplificadora o “enhancer” tipo *cis*, con una secuencia definida como 5'-TGACnnnGCA-3' (Espada, 2010) que media la activación transcripcional de genes que codifican para proteínas que están involucradas en la detoxificación y la eliminación de xenobióticos. ARE puede ser activada por diversos compuestos oxidantes y electrófilos (Königsberg, 2007).

Nrf2 es regulado por su represor Keap1 (Proteína 1 asociada- ECH Kelch-like), que se encarga de reprimir su actividad mediante la formación del complejo Nrf2-Keap1 en el citoplasma. Cuando Keap1 detecta estrés oxidante libera a Nrf2; sin embargo; en ausencia de estrés, Keap1 funciona como un adaptador de sustratos del proteosoma. La selectividad y especificidad del mecanismo de degradación de proteínas del proteosoma esta dado por una proteína llamada ubiquitina (UBQ) que se une a las proteínas que se van a degradar y una vez que las proteínas están ubiquitinadas (o poliubiquitinadas) son reconocidas por un complejo de proteasas conocido como proteosoma 26S que desdobra y degrada las proteínas. El proceso de poli-ubiquitinación y reconocimiento requiere de la participación de varias enzimas: las E1 para la activación de UBQ, las E2 para la congugación de la UBQ y las E3 para su unión. Existen una gran cantidad de ligasas E3 en los organismos eucariotes como la familia de ligasas “Cullin-based” (Cul). Se ha demostrado que Keap1 es un adaptador que une a Nrf2 con la ligasa Cul-3 lo que permite la regulación de Nrf2 mediante su degradación (Tornelli et al.,2018; Königsberg, 2007) por el proteosoma a través de la vía ubiquitina-proteosoma 26S y prevenir así la expresión innecesaria de genes antioxidantes (Kobayashi et al., 2005).

Cuando Nrf2 es liberado por Keap1; Nrf2 se transloca al núcleo, se dimeriza con miembros de la familia pequeña Maf, cuyos heterodímeros se unen a ARE para coordinar la transcripción de genes involucrados en la fase II de detoxificación y de respuesta antioxidante (*Figura 12*) (Gan y Johnson, 2013). Nrf2 regula la transcripción de genes cuyos productos son enzimas de defensa antioxidante como la hemoxigenasa-1 (HO-1), las SODs, peroxidasas, las CATs, entre otras (Chen et al., 2015). Se han identificado más de siete mil genes blanco de Nrf2 mediante el uso de ratones *knock out* para el gen de Nrf2 y otras técnicas (Suzuki et al., 2013). La activación de ARE inducida por Nrf2 es responsable de la inducción coordinada de los genes que codifican para las proteínas de fase II que promueven la reducción de las EROs y ERNs (Königsberg, 2007).



FALTA PIE DE FIGURA 12

Nrf2 puede ser regulado a través de múltiples niveles en un proceso finamente coordinado; la traslocación citoplásmica-nuclear, la regulación transcripcional mediante la respuesta al estrés Nrf2-ARE y una disminución de la degradación, han sido propuestos como mecanismos de activación de Nrf2. Múltiples estudios demuestran que la fosforilación de la proteína es necesaria para la

activación del Nrf2-ARE. La fosforilación de Nrf2 en la Ser-40 mediado por PKC juega un papel esencial en la disociación de Nrf2-Keap-1 (Pi et al.,2007). Entre las posibles vías de señalización involucradas en la regulación de Nrf2 se incluyen a las MAPK (Yu et al., 2000). En otros estudios se ha reportado que la activación de Nrf2 dependiente de p-ERK, contribuye a la homeostasis redox y a la supervivencia celular (Cullinan et al., 2003).

V. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La CUR es un antioxidante natural que se extrae del rizoma de la cúrcuma (*Curcuma Longa*), es ampliamente conocido y utilizado por sus fines terapéuticos. Se ha reportado que la CUR además de ser un atrapador de EROs y ERNs, la principal vía por la que ejerce su efecto antioxidante está asociada con su capacidad de activar el factor de transcripción Nrf2 (González, 2015), ya que de esta forma es capaz de aumentar el sistema de defensa antioxidante (Li Gan, 2014). Sin embargo, el mecanismo de activación de Nrf2 mediado por la CUR aún no está completamente claro. Existen estudios que relacionan el efecto protector de la CUR con su capacidad para incrementar los niveles de BDNF (Srivastava et al., 2016), el cual es un potente modulador de la función neuronal ya que promueve la supervivencia, diferenciación y maduración (Reichart, 2016). Otros estudios han asociado el efecto protector de la CUR con su capacidad para activar la cinasa ERK 1/2; que es una proteína cinasa que se ha relacionado con la regulación de procesos involucrados en la supervivencia celular (Hetman y Gozdz, 2004). No obstante, no existe evidencia que relacione a estas proteínas (BDNF y ERK 1/2) como las responsables de la activación de Nrf2 y por lo tanto del efecto protector de la CUR. Por ello, en este trabajo se estudió la participación de BDNF y ERK 1/2 como posibles responsables de la activación del factor Nrf2 en la neurodegeneración inducida por la administración intraestriatal de QUIN *in vivo*.

VI. HIPÓTESIS

Se ha reportado que la administración de CUR induce la activación del factor Nrf2, la acumulación de Nrf2 inducida por la CUR estará relacionada con la activación de ERK 1/2 a través de un mecanismo de señalización dependiente de BDNF en un modelo de neurotoxicidad inducida por el QUIN.

VII. OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES

1. Objetivo general

Determinar la participación de BDNF en la activación de ERK 1/2 como mecanismo de activación de Nrf2 inducido por la CUR en un modelo de neurodegeneración inducido con QUIN.

2. Objetivos particulares

En ratas Wistar inyectadas intraestrially con QUIN (240 nmol) y tratadas con CUR durante 6 días post-lesión determinar:

- Los niveles de BDNF en estriado mediante inmunohistoquímica y Western blot.
- La activación de p-ERK 1/2 (forma activa) en estriado cuantificando sus niveles mediante Western blot.
- La activación de Nrf2 en estriado cuantificando sus niveles mediante inmunohistoquímica y Western blot.
- El daño histológico en estriado mediante la tinción de Nissl.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y Anticuerpos

El QUIN, la CUR, la albúmina sérica bovina (BSA), el p-formaldehído, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y los inhibidores de proteasas y fosfatasa fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). La membrana de polifluoruro de vinilo (PVDF) fue de Millipore (Bedford, MA, EUA). Los anticuerpos primarios anti-Nrf2 (C-20), anti-fosfo ERK 1/2, anti- ERK 1/2 fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, EUA). El anticuerpo primario anti-BDNF fue de Abcam (Cambridge, MA, EUA). Los anticuerpos secundarios fueron de Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, EUA). Todos los otros reactivos fueron obtenidos de fuentes comerciales conocidas.

2. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 280-320 g de peso, que se mantuvieron en cajas de acrílico limpias libre de patógenos específicos, en condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) e iluminación (ciclos de luz y oscuridad de 12 h). Los animales tuvieron libre

acceso a la dieta comercial estándar para ratas (Laboratory rodent diet 5001, PMI Feeds Inc., Richmond, IN; USA) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales desarrollados en los animales se apegaron a los lineamientos del Comité Institucional para el Cuidado de los Animales de Laboratorio del INNN (CICUAL-INNN), siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Durante los experimentos, se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales. Este trabajo forma parte del protocolo No. 44/15 del INNN.

3. Diseño experimental

Los animales fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos (n = 6):

- 1) **SHAM:** Las ratas fueron inyectadas intraestriatalmente con solución salina isotónica (SSI) y administradas con carboximetilcelulosa (vehículo, i.g.).
- 2) **CUR:** Las ratas fueron inyectadas intraestriatalmente con SSI y administradas con CUR (400 mg/Kg, i.g.). Debido a que la CUR es insoluble en agua, se preparo una emulsión en carboximetilcelulosa al 0.5% con una concentración de 15 mg/ml.
- 3) **QUIN:** Las ratas fueron inyectadas intraestriatalmente con QUIN y administradas con carboximetilcelulosa (vehículo, i.g.)
- 4) **QUIN + CUR:** Las ratas fueron inyectadas intraestriatalmente con QUIN y administradas con CUR (400 mg/ Kg, i.g.).

Los animales de los grupos SHAM y QUIN recibieron carboximetilcelulosa y los animales de los grupos CUR y QUIN + CUR fueron administrados vía i.g. con CUR (400 mg/ kg) durante 6 días consecutivos post-lesión. La primera dosis se administró 24 h después de la inyección intraestriatal. Veinticuatro horas después de la última administración (día 7) las ratas fueron sacrificadas por decapitación (previa sensibilización con pentobarbital sódico) o perfusión dependiendo de la técnica empleada (análisis histológico e inmunohistoquímica o Western Blot) (*Figura 13*).

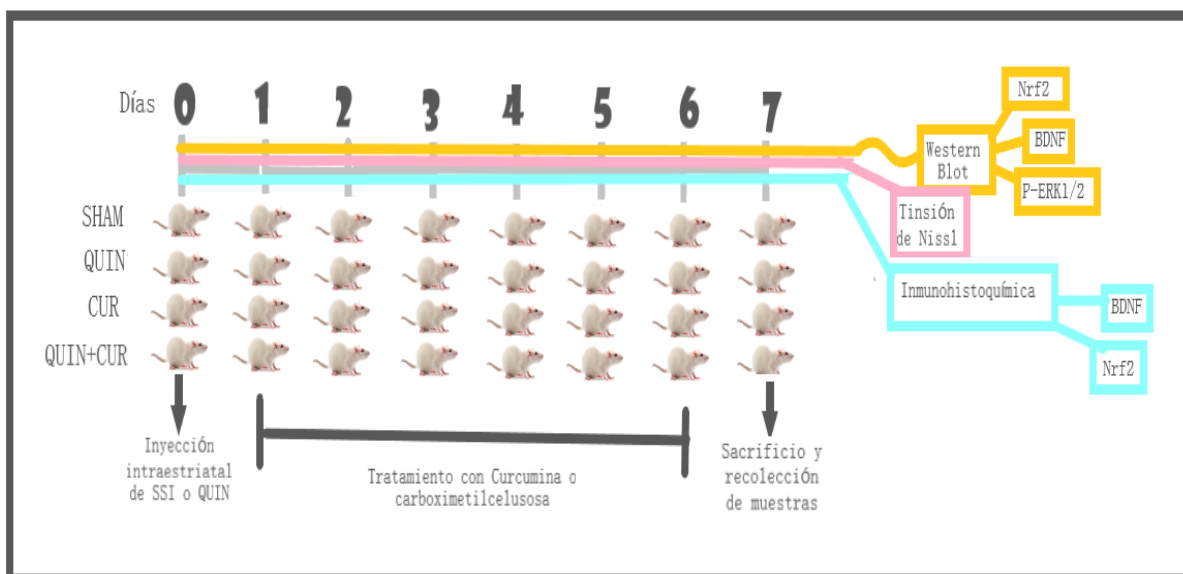


Figura 13. Diseño Experimental. Los sujetos experimentales se separaron en 4 grupos SHAM, QUIN, CUR y QUIN+CUR. El día 0 los sujetos fueron sometidos a una inyección intraestriatal con QUIN en el caso de los grupos QUIN y QUIN+ CUR o SSI en el caso de los grupos SHAM y CUR. Del día 1 al 6 los sujetos recibieron vía intragástrica un tratamiento con CUR (emulsión preparada con carboximetilcelusosa al 0.5%) en el caso de los grupos CUR y QUIN+CUR o el vehículo (carboximetilcelusosa al 0.5%) en los grupos SHAM y QUIN. El día 7 todos los sujetos fueron sacrificados y se llevo a cabo la recolección de las muestras para evaluar el daño histológico mediante la tinción de Nissl, medir los niveles de Nrf2 y BDNF por inmunohistoquímica y Western Blot, así como medir los niveles de ERK 1/2 por Western Blot.

4. Inyección estriatal

- 1) El QUIN se disolvió en SSI y se ajustó el pH a 7.4 con NaOH.
- 2) Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/Kg, i.p.).
- 3) Se montó a la rata en el estereotáxico con el cráneo expuesto (*Figura 14*) y se buscaron las siguientes coordenadas de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1986): +0.5 mm anterior al bregma, -2.6 mm lateral al bregma y -4.5 mm ventral a la dura. Se perforó hasta dejar el cerebro expuesto.
- 4) Las ratas recibieron una inyección unilateral dentro del estriado derecho (coordenadas anteriores descritas). Se administró 1 μ L de QUIN o SSI (equivalente a 240 nmol) en intervalos de 0.25 μ L de QUIN cada 30 s hasta completar un 1 μ L como volumen final. Se dejó la microjeringa durante 2 min y después se retiró cuidadosamente. Finalmente, el área se limpió y la piel se suturó.

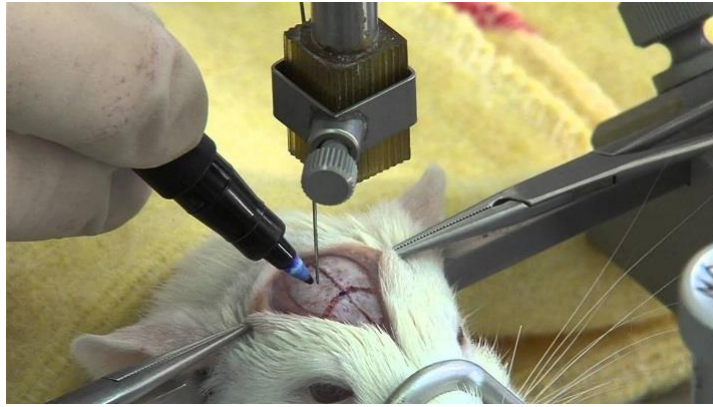


Figura 14. Rata montada en aparato estereotáxico. Recuperada de Técnicas Básicas en el Laboratorio de Neurociencia I. Cirugía estereotáxica (Espinosa et al., 2014).

5. Obtención de las muestras empleadas en el análisis histológico e inmunohistoquímica

Siete días después de la inyección con QUIN o SSI:

- 1) Las ratas se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg, i.p.).
- 2) Se perfundieron por vía transcardíaca con SSI fría y heparina (1/500, v/v), seguido de una solución fría de paraformaldehído 4% (*Figura 15*).
- 3) Se extrajeron los cerebros y se fijaron en paraformaldehído 4% por 24 h.
- 4) Los cerebros se deshidrataron gradualmente pasando por un carril de alcohol 96%, alcohol 100%, alcohol-xilol (1:1) y xilol 100%.
- 5) Después de pasar por xilol 100% los cerebros se pasaron a parafina previamente derretida.
- 6) Tras el embebimiento completo de las muestras se vertió parafina líquida en un molde, se introdujo la muestra con la orientación deseada y se dejó solidificar a temperatura ambiente (Fijación).
- 7) Empleando un microtomo rotatorio, se obtuvieron cortes coronales (5 μm de grosor), cada 100 μm , cubriendo una distancia total de 300 μm (100 μm anterior y 100 μm posterior al trayecto de la aguja).

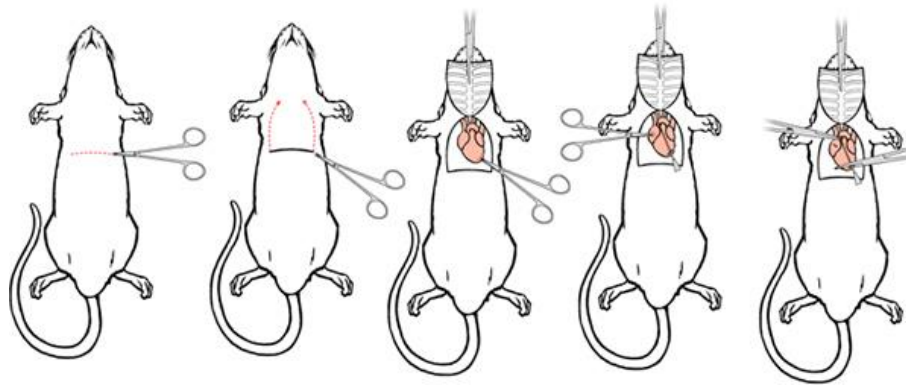


Figura 15. Perfusión por vía transcardíaca. Recuperado de Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents (Gage et al., 2012).

6. Tinción de Nissl

Fundamento: El colorante básico (violeta de cresilo) se une a los cuerpos de Nissl que son cúmulos de retículo endoplásmico rugoso ricos en ribosomas. Los cuerpos de Nissl se encuentran en el citoplasma de la célula y se encuentran en el soma y las dendritas de la neurona, su función es sintetizar y liberar proteínas esenciales para el crecimiento neuronal y la regeneración de axones. Sin embargo, en algunas patologías los cuerpos de Nissl pueden disminuir e incluso desaparecer (cromatolisis).

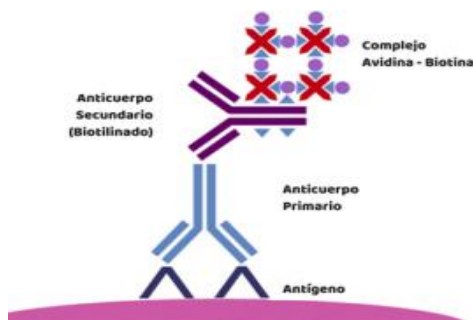
Procedimiento:

- 1) Los cortes coronales se hidrataron pasando por un tren de disolventes.
 - a) Xilol 100% por 1 h
 - b) Alcohol-Xilol (1:1) por 5 min
 - c) Alcohol 100% por 5 min
 - d) Alcohol 96% por 5 min
 - e) Agua por 5 min
- 2) Los cortes se tiñeron con violeta de cresilo 0.1% durante 1 min y se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
- 3) Los cortes se contrastaron con eosina y se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
- 4) Las muestras fueron deshidratadas pasando por una serie de disolventes con orden decreciente de polaridad.
 - a) Agua por 5 min
 - b) Alcohol 96% por 5 min

- c) Alcohol 100% por 5 min
- d) Alcohol-Xilol (1:1) por 5 min
- e) Xilol 100% por 5 min

- 5) Se colocó resina a los cortes y posteriormente se montó el cubreobjetos.
- 6) Se obtuvieron imágenes del cuerpo estriado de cada corte, usando el objetivo 40X.
- 7) El resultado se expresó como porcentaje de células positivas a Nissl.

7. Inmunohistoquímicas



Fundamento: Esta técnica permite localizar moléculas en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos (proteínas del tipo inmunoglobulina G). Por la gran especificidad y la alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer moléculas y unirse a ellas, permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en el tejido (*Figura 16*).

Figura 16. Fundamento de la técnica de inmunohistoquímica. Recuperado de <https://www.labclinics.com/decalogo-para-principiantes-en-inmunohistoquimica/>

Procedimiento:

- 1) Los cortes coronales se hidrataron pasando por un tren de disolventes
 - a) Xilol 100% por 1 h
 - b) Alcohol-Xilol (1:1) por 5 min
 - c) Alcohol 100% por 5 min
 - d) Alcohol 96% por 5 min
 - e) PBS-T 0.05% por 5 min
- 2) Las muestras se sumergieron en amortiguador de citrato de sodio 5% más Tritón X-100 al 0.2% por 15 min.
- 3) Se inactivó la peroxidasa con H₂O₂ 1% por 15 min.
- 4) Las muestras se bloquearon con BSA 0.01% durante 1 h.
- 5) Posteriormente, se incubaron con anticuerpo primario anti-BDNF (1:50) y anti-Nrf2 (1:25) durante 48 h. Transcurrido el tiempo, las muestras se lavaron para eliminar el exceso de anticuerpo,

se incubaron con el Kit Biotynlated Universal (Estreptavidina y HRP) y se revelaron con 3-3'-diaminobenzidina.

6) Las muestras se contratiñeron con hematoxilina y se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.

7) Las muestras fueron deshidratadas pasando por un tren de disolventes con orden decreciente de polaridad.

8) Se colocó resina sobre las muestras y posteriormente se montó el cubreobjetos

9) Se obtuvieron imágenes del cuerpo estriado de cada corte, usando el objetivo 40x (se seleccionaron dos campos al azar en cada rata de los 4 grupos).

10) El resultado se expresó como porcentaje de células positivas a BDNF o Nrf2.

8. Obtención de las muestras para la preparación del homogeneizado de tejido

1) Se obtuvo el estriado derecho de cada rata de cada grupo SHAM, CUR, QUIN y SHAM+CUR y se colocó en hielo.

2) El tejido se homogenizó en 500 µl de amortiguador de lisis pH 7.9, se centrifugó a 20,800 x g durante 30 min a 4°C y se obtuvo el sobrenadante que se usó en el ensayo de Western Blot. Adicionalmente, el sobrenadante se empleó para cuantificar los niveles de proteína por el método de Lowry.

9. Ensayo de Western blot

Fundamento: Es una técnica analítica ampliamente utilizada para el estudio de proteínas. Permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad del Western blot se logra mediante la utilización de un anticuerpo primario que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés.

Procedimiento:

1) Se cargaron 50 µg de proteína del homogenado completo.

2) Se separaron las proteínas por peso molecular mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE al 10% (para Nrf2) y 12% (para BDNF).

3) Las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF).

4) Las membranas se incubaron con anti-BDNF (1:1000), anti-Nrf2 (1:1000), anti-fosfo ERK 1/2 (1:1000), anti-ERK 1/2 y anti-tubulina (1:8000) a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se lavaron 3 veces con TBS-T (Tween 0.1%) y se bloquearon usando BSA al 5% durante 2 h a temperatura ambiente con agitación moderada.

5) Se añadió el anticuerpo policlonal secundario conjugado con peroxidasa de rábano anti-conejo (1:10,000), anti-ratón (1:10,000) y anti-cabra (1:10,000).

6) Las membranas se revelaron usando el sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, USA) y se obtuvieron imágenes usando el programa Imaging System Fusion Solo S.

7) Los valores de área de cada grupo se estandarizaron para el valor de área del grupo SHAM (valor = 1). Los datos se expresaron como la proporción de (densidad óptica) OD del cociente proteína/ α -tubulina utilizando el software ImageJ.

8) Las membranas se lavaron con solución de stripping para la detección de dos o más proteínas.

10 . Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey para las comparaciones entre grupos experimentales utilizando el programa GraphPad Prism 6.0. Las diferencias significativas se consideraron con un valor de $P < 0.05$.

IX. RESULTADOS

1. CUR incrementa los niveles de BDNF en el estriado

Para evaluar los niveles de BDNF se llevó a cabo la técnica de inmunohistoquímica. Se observó el marcaje positivo a BDNF en la región perinuclear. En el grupo SHAM se observó abundante expresión de BDNF, mientras que la administración de CUR (91.0%) incrementó casi el 40% los niveles de BDNF con respecto al grupo SHAM (51.4%). La inyección de QUIN disminuyó significativamente los niveles de BDNF (22.1%) comparado con el grupo SHAM y CUR; sin embargo, el tratamiento con CUR + QUIN (76.4%) mostró un reestablecimiento e incluso un aumento del 25.1% de células positivas a BDNF con respecto al grupo SHAM y del 54.3% de células positivas con respecto al grupo QUIN (*Figura 17*). Además, se puede observar que la intensidad del marcaje en los grupos inyectados con SSI (SHAM y CUR) es más fuerte con respecto a los grupos inyectados con QUIN (QUIN y QUIN+CUR).

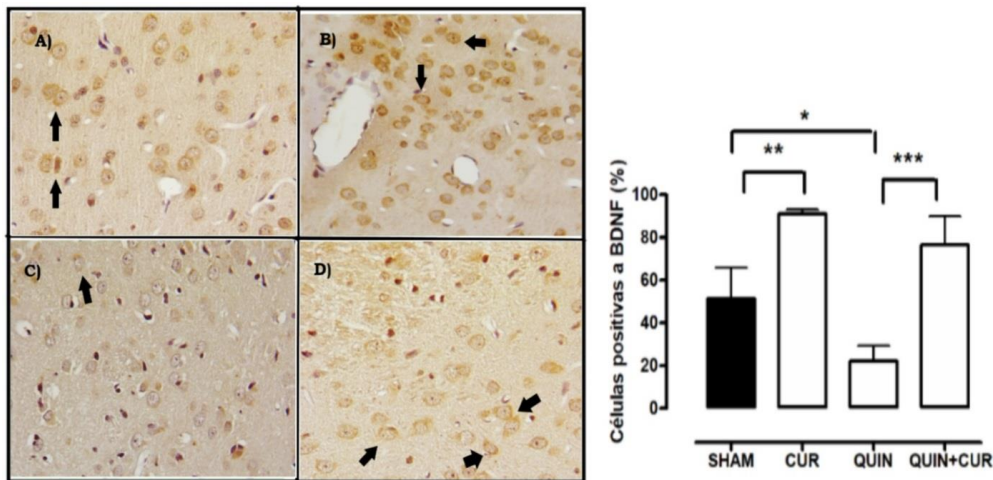


Figura 17. Efecto del ácido quinolínico (QUIN) y la curcumina (CUR) sobre los niveles de BDNF. Los niveles de BDNF se evaluaron el día 7 después de la inyección intraestrial con SSI o QUIN. Se presenta una microfotografía (40X) representativa del estriado derecho de cada grupo: A) SHAM, B) CUR, C) QUIN y D) QUIN+CUR). Las flechas negras indican células positivas a BDNF. La gráfica muestra el porcentaje de células positivas a BDNF/por campo, el cual fue obtenido a partir de 2 campos seleccionados aleatoriamente a lo largo del estriado derecho. Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=3). *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

Para corroborar los cambios observados en los niveles de BDNF por el ensayo de inmunohistoquímica, se utilizó la técnica de Western Blot, en la que se observó el mismo comportamiento que en el ensayo con inmunohistoquímica. En el grupo QUIN (0.8) se observó una disminución del 20% de los niveles de BDNF con respecto a los grupos SHAM (1.0) y una disminución de aproximadamente el 40% con respecto al grupo CUR (1.4); sin embargo, el tratamiento con CUR (1.1) reestableció los niveles de BDNF aumentando aproximadamente el 30% de los niveles de BDNF con respecto al grupo QUIN (Figura 18).

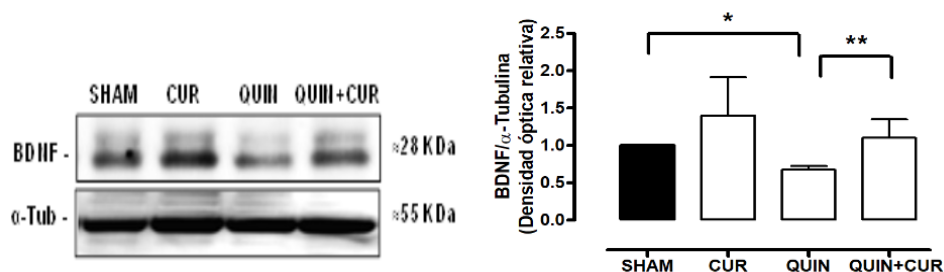


Figura 18. Efecto de ácido quinolínico (QUIN) y la curcumina (CUR) sobre los niveles de BDNF en estriado por Western Blot. Los niveles de BDNF se evaluaron el día 7 después de la inyección intraestrial con SSI o QUIN. Se presenta un Blot representativo y la cuantificación de la densidad óptica de cada grupo: SHAM, CUR, QUIN y QUIN+CUR. Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=3). *p<0.05 y **p<0.01.

2. CUR incrementa los niveles de p-ERK1/2 en el estriado

La fosforilación de ERK1/2 fue evaluado como posible mecanismo involucrado en la activación de Nrf2. Mediante la técnica de inmunohistoquímica se evaluaron los niveles de p-ERK1/2 en el estriado derecho. Se observó que el tratamiento con CUR (0.95) no indujo cambios significativos con respecto al grupo SHAM (1.0). La administración de QUIN (0.34) disminuyó los niveles de p-ERK1/2 aproximadamente un 66% con respecto al grupo SHAM y el tratamiento con QUIN+ CUR (0.8) fue capaz de contrarrestar la disminución de p-ERK1/2 inducida por el QUIN ya que aumentó un 46% con respecto al grupo QUIN, mostrando niveles muy semejantes a los grupos SHAM y CUR (*Figura 19*).

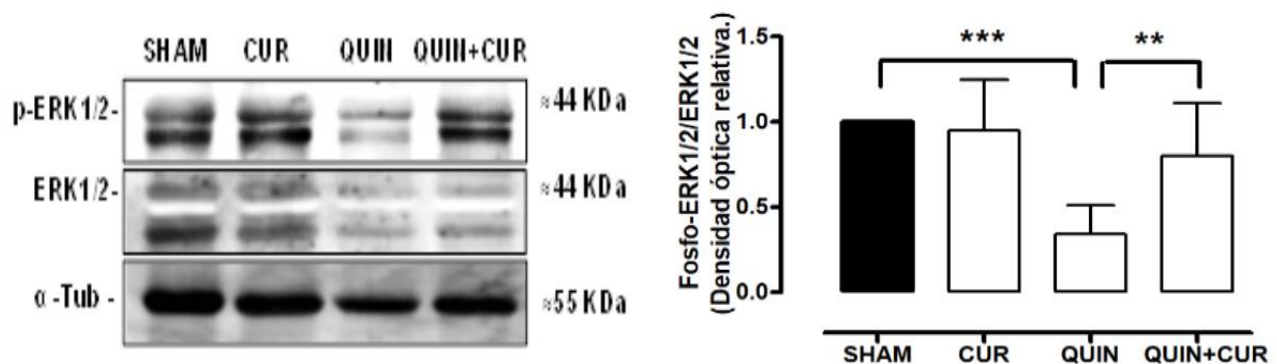


Figura 19. Efecto del ácido quinolínico (QUIN) y la curcumina (CUR) sobre los niveles de p-ERK1/2 y ERK1/2 en el estriado por Western Blot. Los niveles de p-ERK 1/2 y ERK1/2 se evaluaron el día 7 después de la inyección intraestrial con SSI o QUIN. Se presenta un blot representativo y la cuantificación de la densidad óptica de cada grupo: SHAM, CUR, QUIN y QUIN+CUR. Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=3). ***p<0.001 y **p<0.01.

3. CUR incrementa los niveles de Nrf2 en el estriado

Los niveles de Nrf2 evaluados por inmunohistoquímica muestran un comportamiento muy similar a BDNF y p-ERK con algunas variaciones. Se observó que la CUR (60.4%) aumentó aproximadamente un 38% de manera significativa los niveles de Nrf2 con respecto al grupo SHAM (22.7%), mostrando en ambos grupos un marcaje de intensidad similar. El grupo QUIN (13.5%) mostró un porcentaje muy bajo de células positivas a Nrf2, disminuyendo de manera significativa un 9.1% con respecto al grupo SHAM. Sin embargo, el tratamiento con CUR (grupo QUIN+CUR) (58.7%) aumentó significativamente un 45% el número de células positivas a Nrf2 con respecto al grupo QUIN (*Figura 20*). Por otro lado, se observó un marcaje ligeramente más intenso en los grupos SHAM y CUR.

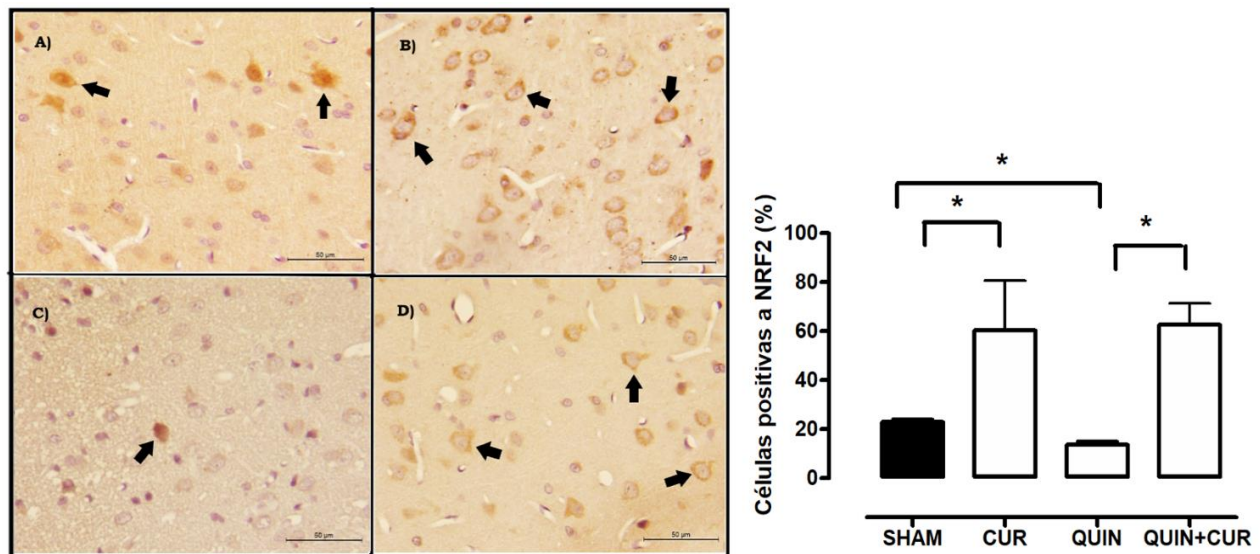


Figura 20. Efecto del ácido quinolínico (QUIN) y la curcumina (CUR) sobre los niveles de Nrf2 por inmunohistoquímica. Los niveles de Nrf2 fueron evaluados al día 7 después de la inyección intraestriatal con SSI o QUIN. Se presenta una microfotografía (40X) representativa del estriado derecho de cada grupo: A) SHAM, B) CUR, C) QUIN y D) QUIN+CUR. Las flechas negras muestran las células positivas a Nrf2. La gráfica muestra el porcentaje de células positivas a Nrf2/por campo, obtenido a partir de 2 campos seleccionados aleatoriamente a lo largo del estriado derecho. Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=3). *p<0.05.

Se realizó además un ensayo de Western Blot para corroborar los datos encontrados por la técnica de inmunohistoquímica. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los niveles totales de Nrf2 (Figura 21), lo cual podría deberse a que en esta técnica se usa todo el cuerpo estriado y la cuantificación en el ensayo de inmunohistoquímica se llevó a cabo en la zona periférica a la lesión provocada por la inyección.

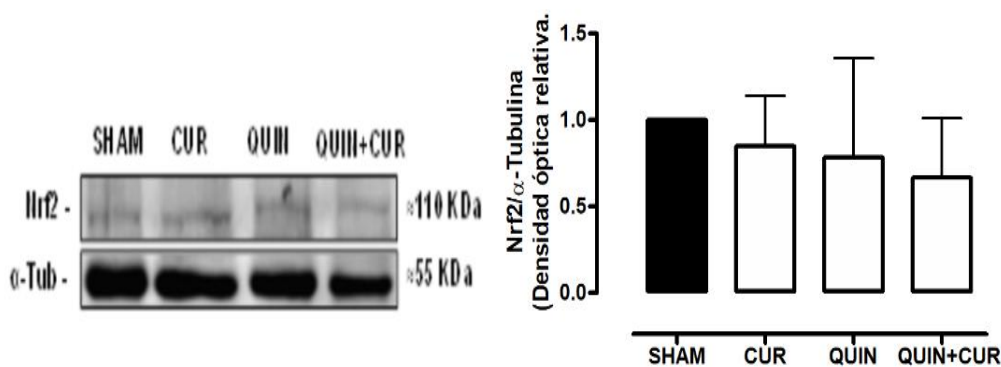


Figura 21. Efecto del ácido quinolínico (QUIN) y la curcumina (CUR) sobre los niveles totales de Nrf2 en el estriado por Western Blot. Los niveles de Nrf2 se evaluaron el día 7 después de la inyección intraestriatal con SSI o QUIN. Se presenta un blot representativo y la cuantificación de la densidad óptica de cada grupo: SHAM, CUR, QUIN y QUIN+CUR. Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=3).

3. CUR disminuye el daño histológico inducido por el QUIN

Para evaluar el daño celular inducido por el QUIN en las células del cuerpo estriado, se realizó la tinción de Nissl. Se observaron células positivas a Nissl en los grupos SHAM y CUR, 7 días después de la inyección intraestriatal con solución salina. Sin embargo, en los grupos QUIN y QUIN+CUR, que fueron inyectados con QUIN, hubo una importante pérdida de células positivas a Nissl. En el caso del grupo QUIN el porcentaje de células positivas a Nissl fue de 12%, que representa una disminución de casi el 54% con respecto al grupo SHAM que su porcentaje de células positivas fue 66.7%. En el caso del grupo que recibió tratamiento con CUR (grupo QUIN+CUR) hubo un aumento considerable y significativo del número de células positivas a Nissl con respecto al grupo QUIN (*Figura 22*).

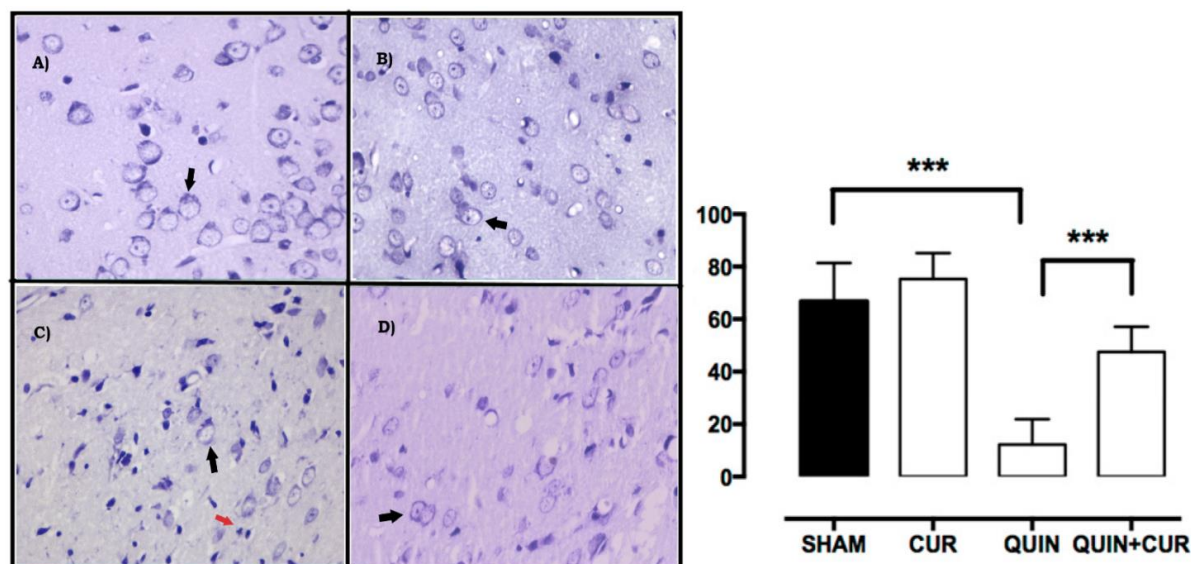


Figura 22. Efecto de la curcumina (CUR) sobre el daño histológico inducido por el ácido quinolínico (QUIN). El daño histológico se evaluó al día 7 después de la inyección intraestriatal de SSI o QUIN. Se presenta una microfotografía (40X) representativa del estriado derecho de cada grupo: A) SHAM, B) CUR, C) QUIN y D) QUIN+CUR. Las flechas negras indican las células positivas a Nissl y la flecha roja indica células dañadas. La gráfica muestra el porcentaje de células positivas a Nissl/por campo, fue obtenido a partir de 2 campos seleccionados aleatoriamente a lo largo del estriado derecho. Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=3). ***p<0.001.

X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El QUIN es una endotoxina que en concentraciones elevadas es capaz de ejercer muerte celular debido a una sobreexcitación de los receptores NMDA. El QUIN se une selectivamente a los receptores NMDA que expresan la subunidad NR2B, provocando una elevación de la concentración de Ca^{2+} , sobreproducción de EROs y NO, daño por radicales libres, falla mitocondrial, disminución de ATP y ruptura de las hebras de ADN. El daño al ADN ocasionado por el QUIN, se caracteriza por la condensación de la cromatina (núcleos picnóticos), fragmentación del núcleo (cariorraxis) y disolución del núcleo (cariolisis); por este motivo, el QUIN se ha usado como un modelo bioquímico para estudiar algunos de los mecanismos involucrados en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas. Como resultado del patrón de toxicidad del QUIN, se observa una pérdida selectiva de las neuronas espinosas medianas del estriado ya que el QUIN actúa de manera selectiva sobre este tipo de neuronas, que comprenden más del 95% de las células estriatales en el roedor y están íntimamente relacionadas con el inicio y el control de los movimientos de las extremidades del cuerpo (Tepper et al., 2018).

El núcleo de la lesión con QUIN está caracterizado por presentar una marcada disminución de todos los tipos celulares. Sin embargo, como consecuencia de la lisis celular, las células vecinas son dañadas creando una zona de penumbra alrededor del núcleo de la lesión en la cual hay pérdida selectiva de neuronas. También se ha reportado que uno de los mecanismos excitotóxicos del QUIN está relacionado con la liberación del citocromo c, que en estudios *in vitro*, promueve la apoptosis en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Guillemin et al., 2004).

La tinción de Nissl es una técnica histológica usada para teñir los cuerpos del mismo nombre que son cúmulos de retículo endoplásmico rugoso. La principal función de los cuerpos de Nissl es sintetizar y liberar proteínas en condiciones fisiológicas; sin embargo, en condiciones patológicas, estas estructuras pueden disminuir y desaparecer (cromatólisis). El proceso de cromatólisis hace que esta técnica sea ampliamente utilizada para evaluar el daño celular (Montalvo, 2020). En este trabajo se demostró con la tinción de Nissl que la CUR es capaz de conferir protección contra el daño celular ya que disminuyó el daño histológico ocasionado por el QUIN en células del estriado (Figura 22).

Existe un gran número de compuestos antioxidantes que son capaces de ejercer un efecto protector, ya que pueden actuar como antioxidantes directos atrapando por sí mismos radicales libres o como antioxidantes indirectos induciendo la expresión de proteínas específicas que son útiles en la supervivencia celular. Los compuestos antioxidantes han mostrado tener un efecto protector

importante en diferentes enfermedades incluidas las neurodegenerativas (González et al., 2015). Sin embargo, es importante determinar el mecanismo por el cual estos compuestos ejercen su efecto protector para poder sugerir blancos terapéuticos que se puedan implementar en el tratamiento de estos padecimientos.

En este trabajo se propuso estudiar el mecanismo de señalización a través del cual la CUR ejerce su efecto neuroprotector. Ya se ha reportado que la CUR es un antioxidante directo debido a que es capaz de atrapar radicales libres; e indirecto ya que puede activar y translocar al factor Nrf2 al núcleo (Wu et al., 2013) donde induce la expresión de enzimas de la defensa antioxidante (Balestrino, 2012). Sin embargo, poco se conoce sobre el mecanismo por el cual la CUR activa al factor Nrf2.

Mediante la técnica de inmunohistoquímica se observó que el QUIN disminuyó los niveles de Nrf2 (Figura 20). Aún es poco claro el mecanismo por el cual el QUIN ejerce este efecto, ya que esperábamos que este fármaco, al aumentar la producción de las EROs, induciría la translocación de Nrf2 al núcleo; sin embargo, este trabajo así como estudios previos, han demostrado que el QUIN disminuye los niveles de Nrf2 (Carmona et al., 2013). Esta reducción podría deberse a que el QUIN induce un decremento en los niveles de BDNF y p-ERK1/2, generando así los bajos niveles de Nrf2. La disminución de la cantidad de BDNF inducida por el QUIN (Figura 17 y 18) podría estar asociada con una reducción en la expresión de su receptor TrkB. Contrario a estos resultados, la CUR fue capaz de aumentar los niveles de BDNF (Figura 17 y 18) y p-ERK1/2 (Figura 19), dos moléculas que podrían estar relacionadas con el aumento en la expresión de Nrf2. Finalmente, este aumento en la expresión de Nrf2 se ve reflejado en la disminución de la neurodegeneración.

Los niveles de BDNF parecen ser clave en el daño celular, ya que mientras más bajos sean los niveles de esta proteína más afectación celular se observa. Como se ha visto en estudios previos, BDNF es una proteína clave, en los procesos de neuroplasticidad después del accidente cerebro vascular ya que sus mecanismos de señalización son muy relevantes para la recuperación de las neuronas (Béjot et al., 2010).

En este trabajo se demostró que la CUR tiene la capacidad de incrementar la expresión de BDNF, p-ERK1/2 y Nrf2 después de la disminución inducida por la inyección del QUIN, sugiriendo que el mecanismo por el cual la CUR incrementa los niveles de Nrf2 podría involucrar la activación de BDNF y p-ERK1/2. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no pueden descartar que Keap1 esté involucrada en el mecanismo por el cual la CUR active a Nrf2.

Dando soporte a los resultados obtenidos en este trabajo, en un artículo publicado en 2016 la CUR en combinación con piperina mostró un efecto protector contra la neurodegeneración inducida por el QUIN en ratas (Singh y Kumar, 2016). También, Wu y colaboradores (2013) reportaron que la CUR

tiene un efecto protector sobre el daño por isquemia cerebral activando la vía Akt/Nrf2 (Wu et al., 2013). Asimismo, González y colaboradores confirmaron que la CUR es capaz de inducir al factor Nrf2 como respuesta antioxidante contra la toxicidad inducida por la hemina en un cultivo primario de neuronas granulosas cerebrales de rata (González et al., 2013). Por otro lado, a partir del 2016 se empezó a asociar a BDNF con el efecto protector de la CUR en un modelo de alteración en la señalización dopaminérgica inducido por arsénico en ratas (Srivastava et al., 2016). Motaghinejad y colaboradores asociaron a BDNF con el efecto neuroprotector de la CUR en un modelo de neurodegeneración en ratas inducido por alcohol (Motaghinejad et al., 2017). Sumado a esto en un estudio se relacionó el aumento de BDNF con el aumento de Nrf2 en la corteza e hipocampo en ratones macho tratados con fluoxetina en un modelo de depresión/ansiedad; sin embargo, no se pudo comprobar que BDNF estaba implicado en el aumento de Nrf2 dejando la puerta para posteriores investigaciones (Indira et al., 2015) y existe bibliografía que propone que las neurotrofinas pueden activar Nrf2 via p75^{NTR} en astrocitos y neuronas (Ishii y Mann 2018). En este sentido, se realizó un estudio en células PC3 (línea celular de cáncer de próstata) en el que se relacionó a ERK y JNK con la fosforilación y translocación nuclear de Nrf2 (Xu et al., 2015). Varios estudios muestran que el incremento de los factores neurotróficos: como BDNF, puede activar varias vías de señalización intracelular incluyendo ERK (Choi et al., 2008), relacionándose todas las proteínas estudiadas entre sí, mostrándo el posible mecanismo que utiliza CUR para activar al factor Nrf2.

Todos los estudios mencionados anteriormente han arrojado grandes avances en la investigación que nos han permitido proponer un posible mecanismo de acción para el efecto neuroprotector de la CUR. En este sentido, se abordaron tres posibles proteínas involucradas en el mecanismo de acción del efecto antioxidante y protector de la CUR en el modelo bioquímico de neurodegeneración inducido con QUIN. Si bien es cierto que aún existen muchas preguntas por contestar, para conocer con certeza los mecanismos involucrados en el efecto neuroprotector de la CUR, ya existe información clave. Otros estudios complementan los resultados obtenidos en este trabajo; por ejemplo, Silva y colaboradores (2018) resaltan que un grupo de genes dependientes de la activación de Nrf2 y que codifican para enzimas involucradas en el sistema de defensa antioxidante que es uno de los pasos clave y finales en el efecto neuroprotector de la CUR; sin embargo, la acción de estas enzimas solo es el inicio de otro mecanismo de señalización especializado para contrarrestar las EROs y ERNs. Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo forman parte de un artículo ya publicado, que reporta el efecto protector y restaurador de la CUR sobre las alteraciones conductuales e histológicas ocasionadas por el QUIN; además, propone que el efecto terapéutico de la CUR podría involucrar la acción de BDNF sobre la activación de ERK1/2 que incrementa los

niveles de GSH, así como la cantidad de proteína y la actividad de enzimas antioxidantes reguladas por Nrf2 (Santana-Martinez et al., 2019). Resultados similares a los obtenidos en esta tesis fueron reportados por Bruna y colaboradores que propusieron una vía de señalización similar a la propuesta en este trabajo, donde la inducción y translocación nuclear de Nrf2 fue mediada por ERK, PI3K y BDNF (Bruna et al., 2018).

XI. CONCLUSIÓN

La administración de QUIN disminuyó los niveles de BDNF, p-ERK1/2 y Nrf2 debido al estrés oxidante que induce esta neurotoxina y esto podría estar participando en el mecanismo de daño neuronal inducido por el QUIN. Por otro lado, el efecto terapéutico de la CUR en la degeneración inducida con QUIN en el estriado, está asociado con su habilidad de activar el factor Nrf2 y aumentar los niveles de BDNF y ERK1/2 (Figura 23), sugiriendo que el mecanismo de activación de Nrf2 podría ser un blanco terapéutico en las enfermedades neurodegenerativas. Este es el único trabajo que relaciona las tres proteínas como posible mecanismo de señalización del efecto neuroprotector de CUR en un estudio *in vivo*.

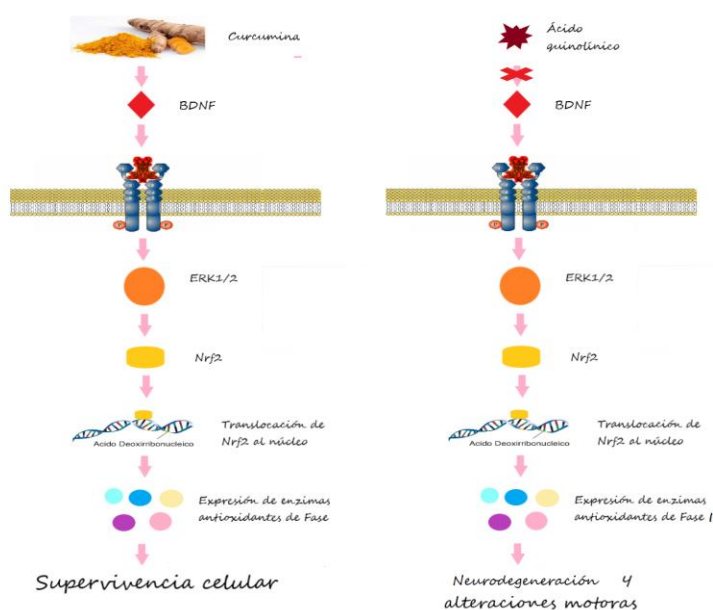


Figura 23. Propuesta del mecanismo de señalización que participa en el efecto protector de la curcumina (CUR) en el daño inducido por el ácido quinolínico (QUIN). El QUIN disminuye los niveles de BDNF, p-ERK1/2 y Nrf2 como consecuencia del estrés oxidante generado por la sobreexcitación de los receptores NMDA, lo que se ve reflejado en la neurodegeneración y las alteraciones motoras. Por otro lado, la CUR es capaz de aumentar los niveles de BDNF, que se une a su receptor y activa una de sus principales vías de señalización dependiente de ERK1/2. ERK1/2 a su vez, es capaz de activar y translocar al factor Nrf2 al núcleo para que se una al ADN e induzca la expresión de enzimas antioxidantes, lo que se ve reflejado en la supervivencia celular y la disminución del daño provocado por el QUIN.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Ung, V., Foshaug, R., MacFarlane, S., Churchill, T., G. Doyle, J., Sydora, B., et al. (2009). Oral Administration of Curcumin Emulsified in Carboxymethyl Cellulose Has a Ptent Anti-inflammatory Effect in the IL-10 Gene-Deficient Mouse Model of IBD. *Digestive Diseases and Sciences* , 55 (5), 1272-1277.
- Cajal, S.R. (2012). *Histología del Sistema Nervioso del Hombre y de los vertebrados* (Vol. II). Madrid: Ministerio de Sanidad.
- Carmona Ramírez, I. (2011). Tesis de Licenciatura. La curcumina induce un estado de porteccción, en un modelo de neurodegeneración, medianye la activación del factor de transcripción Nrf2.
- Castren, E., Thoenen, H., Lindholm, D. (1995). Brain- Derived Neurotrophin Factor Messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus. *Pergamon*, 64 (1), 71-80.
- Castro, J.Z. (2005). *Manual de técnica básicas de biología molecular*. Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán Mérida.
- Chen, B., Lu, Y., Cheng, J. (2015). The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *Journal of Endocrinology*, 225 (1), 83-99.
- Lenka Kubicova, F.H. (2015). Effects of endogenous neurotoxin quinolinic acid on reactive oxygen species production by Fenton reaction catalyzed by iron or copper. *Journal of Organometallic Chemistry*, 782, 111-115.
- Li Gan, J.A. (2014). Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Molecular Basis of Disease*, 1842 (8), 1208-1218.
- Ciabarra, A., Sullivan, J.M., Gahn, L. G., Pecht, G., Heinemann, S., Sevarino, K.A. (1995). Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *Journal of Neuroscience*, 15 (10), 6498-6508.
- Cid, F.M. (2016). Plasticidad Sináptica, BDNF y ejercicio físico. *Revista Digital de Educación Física*, 7 (40), 51-63.
- Lin Tan, J.-T.Y. (2012). The kynurenine pathway in neurodegenerative diseases: Mechanistic and therapeutic considerations. *Journal of Neurological Sciences*, 323 (1-2), 1-8.
- Colquhoun, S.S. (2003). Studies of NMDA Receptor function and stoichiometry with Truncated and Tandem Subunits. *The Journal of Neuroscience*, 24 (4), 1151-1158.
- Choi, D.W. (1987). Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 7 (2), 369-379.
- Corrales, L., Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo:origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10 (18), 135-250.
- Coyle, J., Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*, 262 (5134), 689-695.
- Cull, C., Brickley, S., Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits; diversity,development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11 (3), 327-335.
- Cullinan, S., Diehl, J. (2004). PERK-dependent Activation of Nrf2 Contributes to Redox Homeostasis and Cell Survival following Endoplasmic Reticulum Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (19), 20108-20117.
- Cullinan, S., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R., Diehl, J. (2003). Nrf2 is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Molecular and Cellular Biology*, 23 (20), 7198-7209.
- Chu, C., Levinthal, D., Kulich, S., Chalovich, E., DeFranco, D. (2004). Oxidative neuronal injury.The dark side of ERK1/2. *European Journal of Biochemistry*, 271 (11), 2060-2066.
- Cuamani Mitznahuatl, G., García Arenas, O. (2016). El papel emergente del factor nuclear eritroide 2 Nrf2 en la neuroprotección mediada por astrocitos. *Neurociencia*, 17 (5), 49-59.

- Altar, A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J.M., Acheson, A.L., et al. (1997). Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*, 389, 856-860.
- Ankita Mehta, M.P. (2012). Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*, 698, 6-18.
- Avila, H., Pérez, I. (2016). Glutamato para principiantes. *Archivos de Neurociencias INNN*, 21 (3), 25-28.
- Bleich, S., Römer, K., Wiltfang, J., & Kornhuber, J. (2003). Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action. *Int J Geriatr Psychiatry*, 18 (1), 33-40.
- Barzegar, A., Moosavi, A. (2011). Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical- Scavenging Activity of Curcumin. *Public Library of Science*, 6 (10), 1-7.
- Beas Zárate, C. (2005). El glutamato: de nutriente cerebral a neurotóxico. *Ciencia*, 56 (3), 25-30.
- Behan, W.M., McDonald, M., Darlington, L., Stone, T. (1999). Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *British Journal of Pharmacology*, 1754-1760.
- Béjot, Y., Prigent Tessier, A., Cachia, C., Giroud, M., Mossiat, C., Bertrand, N., et al. (2010). Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochemistry International*, 58, 102-111.
- Binder, D., Scharfman, H. (2004). Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*, 22 (3), 123-131.
- Borrell, F.M. (2017). Enfermedad de Alzheimer y factores de riesgo ambientales. *Revista Cubana de Enfermería*, 33 (1).
- Bothwell, M. (1995). Functional Interactions of Neurotrophins and NeuroTrophin Receptor. *Neurosciences*, 223-253.
- Bruna, B., Lobos, P., Herrera Molina, R., Hidalgo, C., Lima, A. P., Adasme, T. (2018). The signaling pathways underlying BDNF-induced Nrf2 hippocampal nuclear translocation involve ROS, RyR- Mediated Ca²⁺ signals, ERK and PI3K. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505 (1), 1-7.
- Bucolo, C., Drago, F., Maisto, R., Luca Romano, G., D'Agata, V., Maugeri, G., et al. (2019). Curcumin prevents high glucose damage in retinal pigment epithelial cells through ERK 1/2- mediated activation of the Nrf2/OH-1 pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 234 (10), 1-10.
- D. Tornero, V.C.-G. (2002). Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Revista de Neurología*, 35 (4), 354-361.
- Dechant, G., Barde, Y. (2002). The neurotrophin receptor p75NTR novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature Publishing Group*, 5 (11), 1131-1136.
- De Carvalho, L., Bochet, P., Rossier, J. (1995). The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits. *Pergamon*, 28 (4), 445-452.
- Dong, X.-X., Wang, Y., Qin, Z.H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30 (4), 379-387.
- Espada Serrano, S. (2010). *Regulación de la vía Nrf2/OH-1 por receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas y efecto farmacológico del ácido nordihidroguayarético, relevancia en neuroprotección frente a estrés oxidativo*. Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Solís". Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Estrada Sanchez, A.M., Mejía Toiber, J., Massieu, L. (2007). Excitotoxic Neuronal Death and the pathogenesis of Huntington's Disease. *Archives of Medical Research*, 39 (3), 265-276.
- Flores Soto, M., Chaparro Huerta, V., Escoto Delgadillo, V., Vazquez Valls, E., González Castañeda, R., Beas Zarate, C. (2011). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*, 27 (5), 301-310.
- Ferrer, I., Goutan, E., Marín, C., Rey, M., Ribalta, T. (2000). Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Research*, 866 (1-2), 257-261.

- Fouillieux, C., Contreras, F., Rivera, M., Terán, A., Velasco, M. (2004). Receptores de glutamato.- Implicaciones terapéuticas. *Archivos venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 23 (2), 99-108.
- Friedman, W.J. (2010). Proneurotrophins, Seizures and Neuronal Apoptosis. *National Institutes of Health*, 16 (3), 244-252.
- Galloway, E.G. (2003). *Muerte neuronal excitotóxica:interacción entre las rutas de señalización del IGF-I y el glutamato (Tesis doctoral)*. Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Biología Celular, Madrid.
- Gage, G., Kipke, D., Shain, W. (2012). Whole Perfusion Fixation for Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, 65 (3564), 1-9.
- Gan, L., Johnson, J. (2014). Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Molecular Basis of Disease*, 1842 (8), 1208-1218.
- Gavilanes, M.S. (2005). Las MAP KINASAS: Elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. *Revista de educación de bioquímica*, 24 (001), 4-11.
- Gazal, N. (2018). *Efecto del polimorfismo Val66Met en el gen de BDNF en el desarrollo y estructura de neuronas hipocámpales*. Instituto Ferreyra. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales Carrera de Ciencias Biológicas.
- Gilles J. Guillemín, B.J. (2002). Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer´s disease. *Redox Report*, 7 (4), 199-206.
- Gilles J. Guillemín, B.J. (2007). Mass spectrometric detection of quinolinic acid in microdissected Alzheimer´s disease plaques. *International Congress Series*, 1304 (1), 404-408.
- Goda, K., Kishimoto, R., Shimizu, S., Hamane, Y., Ueda, M. (1996). Quinolinic acid and active oxygens. *Recent Advances in Tryptophan Research*, 398, 247-25.
- González Jiménez, F.E., Hernández Espinosa, N., Cooper Bribiesca, B., Núñez Bretón, L., Reyes Reyes, M. (2015). Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 18 (1), 16-21.
- González Reyes, S., Guzmán Beltrán, S., Medina Campos, O., Pedraza Chaverri, J. (2013). Curcumin Pretreatment induces Nrf2 and an Antioxidant Response and Prevents Hemin-Induced Toxicity in Primary Cultures of Cerebellar Granule Neurons of Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013 (801418), 1-14.
- González, A.J. (2015). Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 81 (4), 278-310.
- González, F., Hernández, N., Cooper, B., Núñez, L., Reyes, M. (2015). Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 18 (1), 16-21.
- González, J., Sanz, D., Claramunt, R., Lavandera, J., Alkorta, I., Elguero, J. (2015). Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 81 (4), 278-310.
- Guillemin, G.J. (2012). Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS*, 279 (8), 1356-1365.
- Guillemin, G., Brew, B. (2016). Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer´s disease. *Redox Report*, 7 (4), 199-206.
- Guillemin, G., Smythe, G., Takikawa, O., Brew, B. (2004). Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Production of Quinolinic Acid by Human Microglia, Astrocytes and Neurons. *Glia*, 49 (1), 15-23.
- Guidetti, P., Luthi Carter, R., Augood, S., Schwarcz, R. (2004). Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington´s disease. *Neurobiology of Disease*, 17 (3), 455-461.

- Haapasalo, A., Koponen, E., Hoppe, E., Wong, G., Castrén, E. (2001). Truncated trkB. T1 is dominant negative inhibitor of trkB. TK+ mediated cell survival. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280 (5), 1352-1358.
- Hetman, M., Gozdz, A. (2004). Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *European Journal of Biochemistry*, 271 (11), 2050-2055.
- Huang, E., Reichardt, L. (2003). Trk Receptors: Roles in neuronal signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 609-642.
- Indira Mendez, D., Tritschler, L., Zeina El, A., Marie Hélène, D., Marc Pallardy, Denis J.,D., et al. (2015). Nrf2 signaling and Bdnf: A new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression. *Neuroscience letters*, 597 (15), 1-6.
- Islam, M.T. (2016). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research*, 39 (1), 1-10.
- Ishii, T., Mann, G. (2018). When and how does brain-derived neurotrophic factor activate Nrf2 in astrocytes and neurons? *Neural Regeneration Research*, 13 (5), 803-804.
- Ishii, T., Warabi, E., Mann, G. E. (2018). Circadian control of p75 neurotrophin receptor leads to lternate activation of Nrf2 and c-Rel to reset energy metabolism in astrocytes via brain-derived neurotrophic factor. *Free radical Biology and Medicine*, 19, 1-11.
- Jeong, G.S., Oh, G.S., Pae, H.O., Jeong, S.O., Kim, Y.C., Shin, M.K., et al. (2006). Comparative effects of curcuminoids on endothelial heme oxygenase-1 expression:ortho-methoxy groups are essential to enhance heme oxygenase activity and protection. *Experimental and molecular medicine*, 38 (4), 393-400.
- Jianmin Yang, L.C.-H.-J. (2014). ProBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission and synaptic plasticity in hippocampus. *National Institutes of Health*, 7 (3), 796-806.
- Jingbo Pi, Y.B. (2007). Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: Role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radical Biology & Medicine*, 42, 1797-1806.
- June Liu, S., Savtchouk, I. (2012). Ca²⁺ permeable AMPA receptors switch allegiances: mechanisms and consequences. *The Journal of Physiology*, 590 (1), 13-20.
- Königsberg, M. (2007). Nrf2: La historia de un Nuevo Facotr de Transcripción que Responde a Estrés Oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 26 (1), 18-25.
- Karmarkar, S., Bottum, K., Krager, S., Tischkau, S. (2011). ERK/MAPK is essential for endogenous neuroprotection in SCN2.2 Cells. *PLOS one*, 6, 1-13.
- Kim, J.-W., Li, M.-H., Jang, J.-H., Na, H.-K., Song, N.-Y., Lee, C., et al. (2008). 15- Deoxy- Delta 12, 14- prostaglandin J2 rescues PC12 cells from h2O2- induced apoptosis through Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1: Potential roles of Akt and ERK1/2. *Biochemical Pharmacology*, 76, 1577-1589.
- kobayashi, A., Kang, M.-l., Watai, Y., Tong, K., Shibata, T., Uchida, K., et al. (2005). Oxidative and Electrophilic Stresses activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. *Molecular and Cellular Biology*, 26 (1), 21-29.
- Kubicova, L., Hadacek, F., Weckwerth, W., Chobot, V. (2015). Effects of endogenous neurotoxin quinolinic acid on reactive oxygen species production by Fenton reaction catalyzed by iron or copper. *Journal of Organometallic Chemistry*, 782, 111-115.
- McKenna, M.C. (2007). The Glutamate-Glutamine Cycle is not stoichiometric:fates of GLutamate in Brain. *InterScience*, 85, 3347-3358.
- Marco, S., Pérez Ota o, I., Luján, R. (2011). Los receptores de glutamato como dianas moleculares en la terapia de enfermedades neurológicas. *Comsolider*, 40 (01), 1-15.

- Martínez Samano, J., Torres Durán, P., Juárez Oropeza, M. (2011). El Glutacion y su Asociación con las Enfermedades Neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Revista de educación bioquímica*, 30 (2), 56-67.
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., Sharma, P. (2012). Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*, 698 (1-3), 1-13.
- Michaelis, E.K. (1998). Molecular Biology of glutamate receptor in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*, 54, 369-415.
- Mielke, K., Herdegen, T. (2000). JNK and p38 stresskinases-degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, 61 (1), 45-60.
- Montaner, J. (2007). *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. España: Avances en patología neurovascular.
- Moreno Gonzáles, G., Zarain Herzberg, A. (2006). Papel de los receptores de glutamato durante la diferenciación neuronal. *Salud Mental*, 29 (5), 38-48.
- Motaghinejad, M., Motevalian, M., Sulai, F., Hashemi, H., Gholami, M. (2017). Curcumin confers neuroprotection against alcohol-induced hippocampal neurodegeneration via CREB-BDNF pathway in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87, 721-740.
- Movahedi, A.B. (2011). Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical- Scavenging Activity of Curcumin. *Public Library of Science*, 6 (10), 1-7.
- Mowla, S., Farhadi, H., Pareek, S., Atwal, J., Morris, S., Seidah, N., et al. (2001). Biosynthesis and Post-traslational processing of the precursor to Brain-derived Neurotrophic Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (16), 12660-12666.
- Munshi, A., Ramesh, R. (2013). Mitogen-Activated Protein Kinases and their Role in Radiation Response. *Genes & Cancer*, 4 (9-10), 401-408.
- Nahir Guadalupe Gazal y Agustín Anastasía. *Efecto del polimorfismo Val66Met en el gen de BDNF en el desarrollo y estructura de neuronas hipocampales*. Instituto Ferreyra. Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales Carrera de Ciencias Biológicas.
- Nakamura, T., Gu, Z., Lipton, S. (2007). Contribution of glutamatergic signaling to nitrosative stress-induced protein misfolding in normal brain aging and neurodegenerative diseases. *Sging Cell*, 6 (3), 351-359.
- Niture, S., Kaspar, J., Shen, J., Jaiswal, A. (2010). Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 244 (1), 37-42.
- Olivares Corichi, I., Medina Navarro, R., Torres Ramos, Y., Montes Cortés, D. (2006). Daño a proteínas por estrés oxidante: Lipoproteína de baja densidad e insulina. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 14 (4), 237-240.
- Orefice, L., Waterhouse, E., Partridge, J., Lalchandani, R., Vicini, S., Xu, B. (2013). Distinct Roles for Somatically and Dendritically Synthesized Brain-Derived Neurotrophic Factor in Morphogenesis of Dendritic Spines. *The Journal of Neuroscience*, 33 (28), 11618-11632.
- Pérez De la Cruz, V., Carrillo Mora, P., Santamaría, A. (2012). Quinolinic Acid, an Endogenous Molecule Combining Excitotoxicity, Oxidative Stress and Other toxic Mechanisms. *International Journal of Tryptophan Research*, 5, 1-8.
- Perez De la Cruz, V., González Cortés, C., Galván Arzate, S., Medina Campos, N., Pérez Severiano, F., Ali, S., et al. (2005). Excitotoxic Brain Damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: Protective role of iron porphyrinate 5, 10, 15, 20. tetrakis (4- sulfonatophenyl) porphyrinate iron (III). *Neuroscience*, 135 (2), 463-474.

- Pérez- Navarro, E., Canuda, A., Akerud, P., Alberch, J., Arenas, E. (2000). Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin-3, and Neurotrophin-4/5 Prevent the Death of Striatal Projection Neurons in a Rodent Model of Huntington's Disease. *Jornal Of Neurochemistry*, 75 (5), 2190-2199.
- Pérez, E., Canudas, A., Akerud, P., Alberch, J., Arenas, E. (2000). Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin-3, and Neurotrophin-4/5 Prevent the Death of Striatal Projection Neurons in a Rodent Model of Huntington's Disease. *Jornal Of Neurochemistry*, 75 (5), 2190-2199.
- Pérez, V., Carrillo, P., Santamaría, A. (2012). Quinolinic Acid, an Endogenous Molecule Combining Excitotoxicity, Oxidative Stress and Other Toxic Mechanisms. *International Journal of Tryptophan Research*, 5, 1-8.
- Pi, J., Bai, Y., Reece, J., Williams, J., Liu, D., Freeman, M., et al. (2007). Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: Role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radical Biology & Medicine*, (42), 1797-1806.
- Prado de Carvalho, L., Bochet, P., Rossier, J. (1995). The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits. *Pergamon*, 28 (4), 445-452.
- Quintanar Escorza, M., Calderón Salinas, J. (2007). Calcio y eritrocitos. *Revista de educación bioquímica*, 26 (1), 3-10.
- Rahman, A., Rao, M., Khan, K. (2018). Intraventricular infusion of quinolinic acid impairs spatial learning and memory in young rats: a novel mechanism of lead-induced neurotoxicity. *Journal of Neuroinflammation*, 15 (1), 1-15.
- Reddy, P., Lokesh. (1994). Effect of dietary turmeric (Curcuma Longa) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. *Food and chemical toxicology*, 32 (3), 279-283.
- Reichart, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of Royal Society*, 361 (1473), 1545-1564.
- Rejane G. Tavares, C.I.-I. (2000). Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. *NeuroReport*, 11 (27), 249-253.
- Rodríguez, E., Camacho, A., Maldonado, P., Pedraza, J., Santamaría, D., Galván, S., et al. (2000). Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Reserch*, 852 (2), 436-439.
- Roskoski, R.J. (2012). ERK 1/2 MAP kinases: Structure, function and regulation. *Pharmacological Research*, 66 (2), 105-143.
- Schüler, T., Mesic, I., Madry, C., Bartholomäus, I., Laube, B. (2008). Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 Heterodimers Constitutes the Initial Step in M-Methyl-D-aspartate Receptor Assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 23 (1), 37-46.
- Scharfman, D.K. (2004). *Brain-derived Neurotrophic Factor* (Vol. 22). New York: National Institutes of Health.
- Schorge, S., Colquhoun, D. (2003). Studies of NMDA Receptor function and stoichiometry with Truncated and Tandem Subunits. *The Journal of Neuroscience*, 24 (4), 1151-1158.
- Schwartz, P., Borghesani, P., Pomeroy, S., Segal, R. (1997). Abnormal Cerebellar Development and Foliation in BDNF -/- Mice Reveals a Role for Neurotrophins in CNS Patterning. *Neuron*, 269-281.
- Sanberg, P., Calderon, S., Giordano, M., Tew, J., Norman, A. (1989). The Quinolinic Acid Model of Huntington's Disease: Locomotor Abnormalities. *Experimental Neurology*, 105 (1), 45-53.
- Santamaría, A., Jiménez Capdeville, M., Camacho, A., Rodríguez Martínez, E., Flores, A., Galván Arzate, S. (2001). In vivo Hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuropharmacology and Neurotoxicology*, 12 (12), 2693-2696.
- Santana-Martínez, R., Galván Árzate, S., Hernández Pando, R., Chánez Cardenas, S., Avila Chávez, E., Lopez Acosta, G., et al. (2014). Sulforaphane reduces the alterations induced by quinolinic acid: Modulation of glutathione levels. *Neuroscience*, 272, 188-198.

- Sevilla, G.O. (2011). *Análisis de Proteínas. Electroforesis, Transferencia e Inmunodetección*. (Vol. 76). Madrid: Advansta.
- Silva Islas, C., Santana, R.A., Colín González, A.L., Maldonado, P.D. (2012). Nrf2 Activation, an Innovative Therapeutic Alternative in Cerebral Ischemia. In *Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke*. Balestrino, M. IntechOpen. p. 347.
- Silva, C., Maldonado, P.D. (2018). Canonical y non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacological research*, 134, 92-99.
- Silva, D., Pérez, V., Herrera, M., Mendoza, K., Villeda, J., Binienda, Z., et al. (2008). Exitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *Journal of Chemistry*, 105 (3), 677-689.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24 (8), 1-20.
- Singh, S., Kumar, P. (2016). Neuroprotective Activity of Curcumin in Combination with Piperine against Quinolinic Acid Induced Neurodegeneration in Rats. *Pharmacology*, 97 (3-4), 153-160.
- Srivastava, P., Dhuriya, Y., Gupta, R., Shukla, R., Yadav, R., Dwivedi, H., et al. (2016). Protective Effect of Curcumin by Modulating BDNF/DARPP32/CREB in Arsenic-Induced Alterations in Dopaminergic Signaling in Rat Corpus Striatum. (S. Science, Ed.) *Molecular Neurobiology*, 55 (1), 445-461.
- Suzuki, T., Motohashi, H., Yamamoto, M. (2013). Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34 (6), 340-346.
- Tao Che, Y.W. (2017). Brain-Derived Neurotrophic Factor Increases Synaptic Protein Levels via the MAPK/Erk Signaling Pathway and Nrf2/Trx Axis Following the Transplantation of Neural Stem Cells in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Neurochemical Research*, 42 (11), 3073-3083.
- Tapia Arancibia, L., Rage, F., Givalios, L., Arancibia, S. (2004). Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Frontier in Neuroendocrinology*, 25 (2), 77-107.
- Tavares, G., Tasca, C., Santos, E., Wajner, M., Souza, D., Dutra, C. (2000). Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. *NeuroReport*, 11 (27), 249-253.
- Tejeda, G., Díaz, M. (2017). Integral Characterization of Defective BDNF/TrkB Signalling in Neurological and Psychiatric Disorders leads the way to New Therapies. *Int J Mol Sci*, 18 (2), 268-292.
- Teng, H., Teng, K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R., et al. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of Neuroscience*, 25 (22), 5455-5463.
- Tepper, J., Koós, T., Ibañez Sandoval, O., Tecuapetla, F., Faust, T., Assous, M. (2018). Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons: Update 2018. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12, 1-14.
- Tomohiro Nakamura, Z.G. (2007). Contribution of glutamatergic signaling to nitrosative stress-induced protein misfolding in normal brain aging and neurodegenerative diseases. *Aging Cell*, 85, 3347-3358.
- Tonelli, C., Christine Chio, I., Tuveson, D. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & redox signaling*, 29 (17), 1727-1745.
- Tornero, D., Ceña, V., González, C., Jordán, J. (2002). Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Revista de Neurología*, 35 (4), 354-361.
- Wang, J., Zhang, S., Ma, H., Yang, S., Liu, Z., Wu, X., et al. (2016). Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia Pretreatment Ameliorates Ischemia-Induced Cognitive Dysfunction Through Activation of ERK1/2-CREB-BDNF Pathway in Anesthetized Mice. *Neurochemical Research*, 42, 501-512.
- Wen, A., Sakamoto, K., Miller, L. (2014). The role of the transcription factor CREB in immune function. *The Journal of Immunology*, 185 (11), 6413-6419.

- Wojda, U., Salinska, E., Kuznicki, J. (2008). Calcium Ions in Neuronal Degeneration. *IUBMB Life*, 60 (9), 575-590.
- Wortzel, I., Seger, R. (2011). The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & Cancer*, 2 (3), 195-209.
- Wright, J.S. (2002). Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. *Journal of Molecular Structure*, 591, 207-217.
- Wu, J., Li, Q., Wang, X., Yu, S., Li, L., Wu, X., et al. (2013). Neuroprotection by Curcumin in Ischemic Brain Injury Involves the Akt/Nrf2 Pathway. *Public Library of Science*, 8 (3), 1-9.
- Xu, C., Yuan, X., Pan, Z., Shen, G., Kim, J.-H., Yu, S., et al. (2015). Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5 (8), 1918-1926.
- Yang, Y.-C., Lii, C.-K., Lin, A.-H., Yeh, Y.-W., Yao, H.-T., Li, C.-C., et al. (2011). Induction of glutathione synthesis and heme oxygenase 1 by the flavonoids butein and phloretin is mediated through the ERK/Nrf2 pathway and protects against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, 2073-2081.
- Yu, R., Chen, C., Mo, Y.-Y., Hebbar, V., Owuor, E., Tan, T.-H., et al. (2000). Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Induces Antioxidant Response Element- mediated Gene Expression via a Nrf2-dependent Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (51), 39907- 39913.
- Zipper, L., Mulcahy, T. (2000). Inhibition of ERK and p38 MAP Kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS Genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278 (2), 484-492.

Páginas Web

- ¿Qué es una enfermedad neurodegenerativa? (2017). Obtenido de Joint Programme-Neurodegenerative Disease Research : <http://www.neurodegenerationresearch.eu/es/acerca-del-jpnd/que-es-una-enfermedad-neurodegenerativa/>
- Demencia. (12 de Diciembre de 2017). Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Benes, F.M.(2016) Enfermedad de Huntington: Esperanza a través de la investigación. New York, E.U: National Institute of Neurological Disorder and Stroke. Recuperado de https://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/Enfermedad_de_Huntington.htm
- Espinosa, M., Herrera, A., & Martínez R., Técnicas Básicas en el Laboratorio de Neurociencia I. Cirugía estereotáxica. Video.1 Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=ozB5iPjTsPY>