UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EL ACIDO KINURENICO PREVIENE EL DAÑO OXIDATIVO INDEPENDIENTEMENTE DE LA INHIBICION DE RECEPTORES NMDA Y ALFA-7-NICOTINICOS EN DIFERENTES TEJIDOS DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Rafael Lugo Huitrón

DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Verónica Pérez De la Cruz
2010

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Lugo
Huitrón
Rafael
57 62 76 29
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302110452

2. Datos del tutor
Dra
Verónica
Pérez
De la Cruz

3. Datos del sinodal 1
Dr
José
Pedraza
Chaverri

4. Datos del sinodal 2
M en C
Lilian
Gabriela
Valencia
Turcotte

5. Datos del sinodal 3
Dra
María
de Lourdes
Segura
Valdez

6. Datos del sinodal 4
Dr
Abel
Santamaría
Del Ángel

7. Datos del trabajo escrito
El ácido kinurénico previene el daño oxidativo independientemente de la inhibición de receptores NMDA y alfa 7-nicotínicos en diferentes tejidos de rata
54 p
2011

Índice

I. ABREVIATURAS……..5

II. RESUMEN……..7

III. ANTECEDENETES……...8

a. VÍA DE LA KINURENINA……..8

b. METABOLITOS NEUROACTIVOS DE LA VÍA DE LA KINURENINA……11

c. GENERALIDADES DEL ÁCIDO KINURÉNICO……..12

d. KYNA EN DESÓRDENES NEURODEGENERATIVOS……13

e. KYNA COMO ANTIOXIDANTE……..15

f. ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO……...16

g. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) Y NITRÓGENO (ERN)……..…17

h. EFECTO DE LAS ERO SOBRE LAS MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS……20

i. Daño a lípidos……20

ii. Daño a proteínas……...22

iii. Daño a ácidos nucleicos……22

i. ANTIOXIDANTES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS……23

i. SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS…….23

ii. SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS……24

IV. JUSTIFICACIÓN……25

V. HIPÓTESIS……..26

VI. OBJETIVO GENERAL……...26

VII. OBJETIVOS PARTICULARES……26

VIII. MÉTODOS……27

a. MATERIALES Y ANIMALES……..27

b. DETERMINACIÓN DE CAPTURA DE ESPECIES REACTIVAS EN SISTEMAS SINTÉTICOS……28

i. Ensayo de anión de anión superóxido (O_2^-)……..28

ii. Ensayo de de radical hidroxilo (•OH)……..28

iii. Ensayo de peroxinitrito ($ONOO^-$)……..29

c. PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS DE CEREBRO, CEREBELO E HÍGADO……..30

d. DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS……30

e. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ERO……..31

f. DEGRADACIÓN DE PROTEÍNA MEDIADA POR •OH…….31

IX. RESULTADOS……32

a. CAPACIDAD ATRAPADORA DE KYNA…….32

b. EFECTO DE KYNA EN LA PL EN PRESENCIA O AUSENCIA DE LOS INHIBIDORES DE RECEPTORES NMDA Y α7-NICOTÍNICOS……35

c. KYNA PREVIENE LA PRODUCCIÓN DE ERO……..38

d. KYNA PREVIENE LA DEGRADACIÓN DE ALBÚMINA INDUCIDA POR $OH^•$…….39

X. DISCUSIÓN……..40

XI. CONCLUSIONES……44

XII. PERSPECTIVAS……45

XIII. BIBLIOGRAFÍA……..46

I. ABREVIATURAS

3-hidroxikinurenina ……..3-HK
Ácido 3-hidroxiantranílico…….3-HA
Ácido dietilenetriaminepentaacético…….DTPA
Ácido hipocloroso……HCl
Ácido kinurénico……..KYNA
Ácido nordihidroguaiarético……..NDGA
Ácido quinolínico……..QUIN
Ácido tiobarbitúrico……TBA
ácido δ-aminolevulínico……ALA
Adenosin trifosfato……..ATP
Anión superóxido……...$O_2^{\bullet-}$
Dicloro-dihidro-fluoresceína……..DHCF
Diclorofluoresceína……DCF
Dimetil sulfóxido…….DMSO
Dimetil tiourea……DMTU
Especies reactivas del nitrógeno……ERN
Especies reactivas del oxógeno……..ERO
Fenazina metosulfato……PMS
Glutatión……..GSH
Glutatión oxidado ……...GSSG
Glutatión peroxidasa……..GPx
Glutatión reducido……GSH
Indolamina-2,3-dioxigenasa……..IDO
Kinurenina aminotransferasas……KATs
L-kinurenina……L-KYN
Malondialdehído……...MDA
N-acetil-cisteína…….NAC
Nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada……NAD^+
Nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida……..NADH
Nitroazul de tetrazolio……NBT
N-metil-D-aspartato……NMDA
Óxido nítrico……..NO
Oxígeno singulete……$^1O_2$
Ozono……..O_3
Peroxidación de lípidos……PL
Peróxido de hidrógeno……H_2O_2
Peróxidos orgánicos……..ROOH
Peroxinitrito……$ONOO^-$
Radical alcoxilo……•OR
Radical hidroxilo……..$OH^\bullet$
Radical hidroxiperoxilo……•OOH
Radical peroxilo……•OOR
Receptor para N-metil-D-aspartato……NMDAr
Sistema nervioso central……..SNC

Superóxido dismutasa……..SOD
Triptofano dioxigenasa……..TDO
Vía de la kinurenina……VK

II. RESUMEN

El ácido kinurénico (KYNA) es un metabolito endógeno de la vía de la kinurenina, y se sabe que es un antagonista tanto de receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA) como alfa-7 nicotínicos (α7nACh). También se ha demostrado que el KYNA es capaz de atrapar al radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) bajo condiciones controladas de producción de radicales libres. El propósito de este trabajo fue evaluar la capacidad del KYNA como atrapador de anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peroxinitrito ($ONOO^-$) y $OH^{\bullet}$ en sistemas sintéticos no biológicos, así como comparar dicha capacidad con compuestos de referencia para cada especie reactiva de oxígeno. Los datos obtenidos muestran que la capacidad del KYNA para atrapar especies reactivas (expresada como valores de CE_{50}) es la siguiente: $OH^{\bullet} = O_2^{\bullet -} > ONOO^-$. Adicionalmente, determinamos si la capacidad antioxidante de KYNA era independiente de su acción antagónica sobre receptores NMDA y nicotínicos. Para dicho propósito se evaluaron diferentes concentraciones de KYNA (0-1,000 μM) en homogenados de cerebelo, cerebro e hígado expuestos a $FeSO_4$ (5 μM) por 2 horas; en paralelo KYNA fue co-incubado con MK-801 y memantina (antagonistas para receptores NMDA y nicotínicos) en ausencia y presencia de $FeSO_4$. El $FeSO_4$ produjo un incremento significativo en la peroxidación de lípidos (PL), y dicho efecto también se observó al con-incubar con MK-801 y memantina, sugiriendo que los efectos en la PL por $FeSO_4$ son independientes de la activación de receptores para NMDA y nicotínicos. Al incubar los homogenados con $FeSO_4$ y diferentes concentraciones de KYNA, se observó una disminución en la PL de manera concentración-dependiente en los tejidos evaluados. Adicionalmente, el $FeSO_4$ incrementó la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en cerebro y cerebelo, mientras que la co-incubación del pro-oxidante con KYNA (150 μM) disminuyó dicho marcador, además KYNA fue capaz de atenuar la oxidación de albúmina inducida por $OH^{\bullet}$. Nuestros datos sugieren que KYNA, además de ser un antagonista de receptores nicotínicos y para NMDA, puede ser considerado como un potente antioxidante endógeno.

III. ANTECEDENTES

1. VÍA DE LA KINURENINA

La vía de la kinurenina (VK) es la principal ruta catabólica del L-triptófano en mamíferos, definida como tal en 1947. La función trascendental de ésta vía es la producción de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) (Beadle *et al.*, 1947) (Figura 1). Es importante mencionar que esta vía se lleva a cabo principalmente en hígado, riñón y cerebro de humanos, primates no humanos, roedores y otros mamíferos menores (Vender, 1975; Moroni *et al.*, 1988). Por otro lado se ha reportado que la VK desempeña un papel importante en diversas funciones fisiológicas, como la conducta y la termorregulación, entre otras (Stone, 1993; Curzon, 1996; Munn *et al.*, 1998; Guillermin *et al.*, 2001).

El inicio en la actividad de esta ruta es distinto en hígado y cerebro. En hígado el anillo indólico del L-triptofano es cortado oxidativamente por la enzima triptófano dioxigenasa (TDO) produciendo N-formil kinurenina, mientras que en el cerebro, la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) es la enzima responsable de llevar a cabo esta reacción y es dependiente de superóxido, por tanto requiere de sistemas generadores de este radical como son el ascorbato y la xantina-xantina-oxidasa, siendo inhibida por la superóxido dismutasa (Hirata & Hayaishi, 1971) y por el óxido nítrico (Thomas *et al.*, 1994). Enseguida, la formamidasa degrada la N-formil kinurenina a L-kinurenina (L-KYN). Este es un paso crucial para la vía debido a que la L-KYN funge como sustrato para diferentes enzimas: la kinurenasa - que produce ácido antranílico -, la kinurenina 3-hidroxilasa - que forma 3-

hidroxikinurenina (3-HK)-, y las kinureninas aminotransferasas (KAT's) - que catalizan la transaminación irreversible de L-KYN a ácido kinurénico (KYNA).

Cabe mencionar que existen tres isoformas de KAT (KAT I, KAT II y la KAT III) en humanos, por lo que la producción de KYNA es compleja. Las KAT's difieren en el pH óptimo para ejercer su actividad; mientras que para la KAT I y la KAT III su pH óptimo es de ~9 (Guidetti et al., 1997; Han et al., 2009), para la KAT II es a pH óptimo fisiológico (7.4), por lo que se sugiere que esta última es la principal responsable de la síntesis de KYNA en el cerebro humano (Gramsbergen *et al*., 1997).

Posteriormente, la vía nos lleva a la formación de QUIN a través de la hidroxilación de la kinurenina a 3-hidroxikinurenina. Esta reacción es llevada a cabo por la kinurenina hidroxilasa, una enzima localizada en la membrana mitocondrial externa (Okamoto et al., 1967), y requiere de la presencia de NADPH como donador de un electrón. La kinureninasa, una enzima pirridoxal dependiente de fosfato y que se encuentra en el citosol, convierte a la 3-hidroxikinurenina a ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA). Tanto la kinureninasa como la kinurenina hidroxilasa están presentes en el sistema nervioso central, pero tienen muy baja actividad. Existe otra alternativa en la VK para la formación del 3-HA, y es a través del ácido antranílico el cual puede ser hidroxilado por enzimas de hidroxilación microsomal no específicas y producir de esta manera el 3-HA.

La ácido 3-hidroxiantranílico dioxigenasa, es la enzima de la vía con mayor actividad en el cerebro (Okuno *et al*., 1987) convierte el 3-HA en 2-amino-3-carboximuconato semialdehído que instantáneamente es transformado a QUIN.

Por último, el QUIN es metabolizado a ácido nicotínico mononucleótido por la enzima ácido quinolínico fosforibosil transferasa.

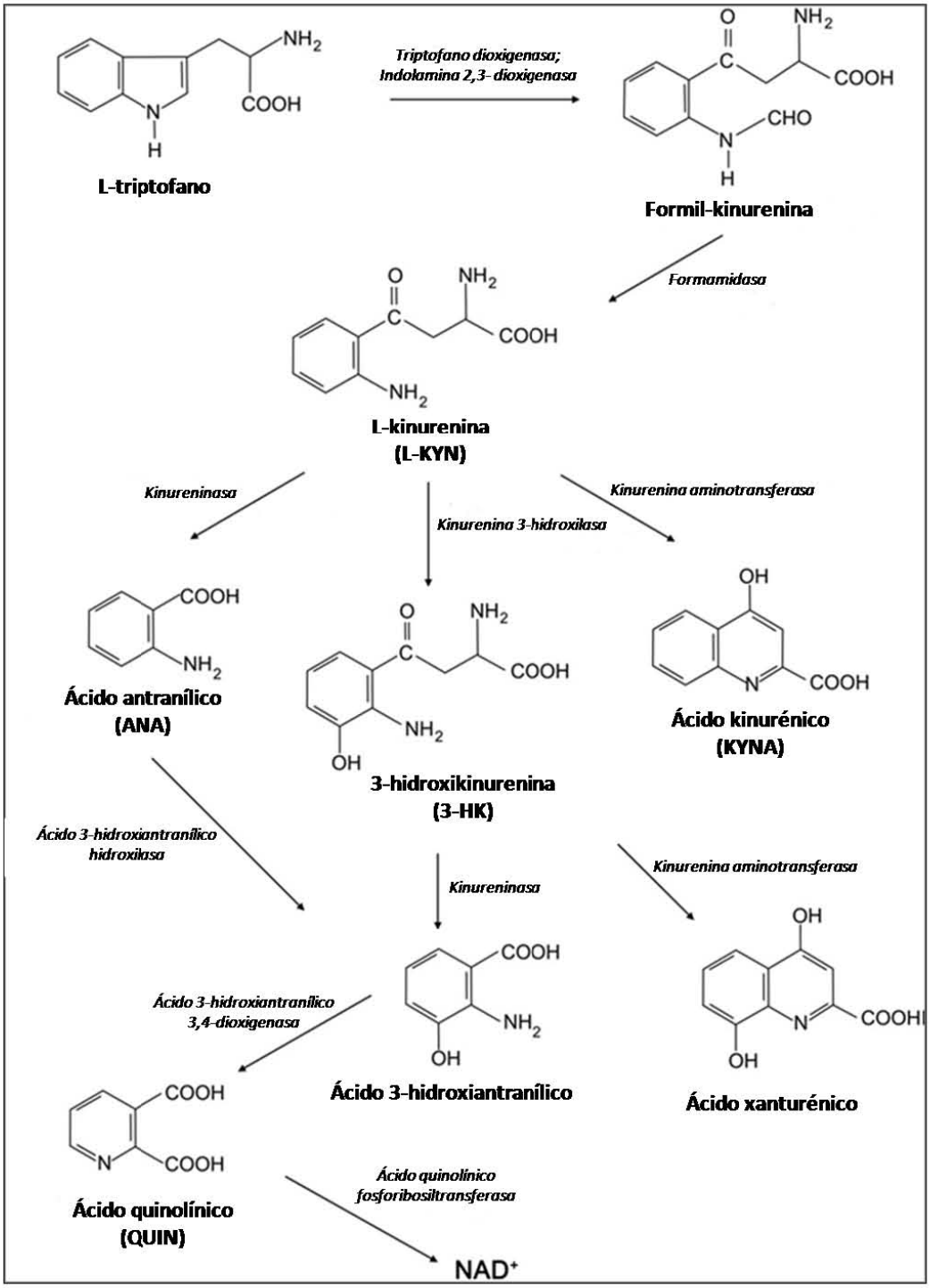

Figura 1. Vía de la kinurenina (modificado de Vamos et al., 2009)

2. METABOLITOS NEUROACTIVOS DE LA VÍA DE LA KINURENINA

Recientemente se han descrito diversas propiedades de algunos metabolitos de la vía, los cuales tienen efectos sobre el sistema nervioso (Stone, 1993). El primer indicio fue descrito por Lapin en 1978, observando que la administración intracerebroventricular de QUIN genera convulsiones en ratones. Años más tarde Schwarcz y colaboradores (1983) demostraron que el QUIN causa lesiones excitotóxicas en el cerebro, y dicho patrón de neurotoxicidad se debe a su actividad como agonista de receptores NMDA (NMDAr), sugieriendo de esta manera que el QUIN pudiera estar involucrado en procesos fisiológicos y patológicos asociados al receptor.

Por otro lado, al 3-HK se le han atribuido propiedades neurodegenerativas, esto a través de la formación de radicales libres (Eastman y Guiliarte, 1989), desencadenando una serie de eventos que resultan en la desintegración celular (Okuda *et al*., 1998). Estos eventos son capaces de potenciar la excitotoxicidad en neuronas tras ser expuestas a 3-HK y QUIN (Guidetti y Schwarcz, 1999). Aunado a esto, el 3-HK y el 3-HA generan anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) dependiente de cobre, promoviendo el daño oxidativo a proteínas (Goldstein *et al*., 2000).

El otro metabolito neuroactivo, y quizá el de mayor interés, es el ácido kinurénico (KYNA), que se ha definido como bloqueador competitivo del sitio para glicina del NMDAr con una CE_{50} de ~235 μM (Kessler *et al*., 1989), y como inhibidor no competitivo del receptor α7-nicotínico de acetílcolina con CE_{50} de ~7 μM (Hilmas *et al.,* 2001), esta afinidad de KYNA hacia receptores permeables a calcio en el

rango de concentraciones en que se encuentra en el cerebro sugiere que puede tener algún papel relevante en la modulación de la transmisión glutamatérgica y colinérgica. Esta hipótesis es apoyada por los experimentos de Poeggeler y colaboradores en 1998, quienes demostraron que la disminución en los niveles de KYNA inducida por la administración de d-anfetamina en el estriado aumenta la vulnerabilidad a la inyección del NMDA, mientras que al elevar las concentraciones de KYNA se inhibe la liberación de glutamato (Carpenedo *et al*., 2001).

3. GENERALIDADES DEL ÁCIDO KINURÉNICO

El KYNA (Figura 2) fue identificado en 1853 en orina canina (Liebig, 1853), pero fue sino hasta 1904 (Ellinger, 1904) que se reconoció como un producto de la degradación del triptófano por la VK. Este metabolito ha sido ampliamente descrito como un antagonista competitivo del sitio para glicina en receptores NMDA (NMDAr) (Stone, 1993; Parsons *et al*., 1997), y bloquea de manera no competitiva receptores α7-nicotínicos (Hilmas, *et al*., 2001) por lo que se le reconoce como un agente neuroprotector endógeno. Sin embargo, el efecto de KYNA sobre receptores para NMDA oscila en concentraciones micromolares (Stone, 1993), y dado que los niveles endógenos en el cerebro se encuentran entre 50 y 100 nM (Moroni, 1999), los receptores colinérgicos cobran gran importancia en los mecanismos de acción de KYNA debido a que esta molécula puede antagonizar dichos receptores a concentraciones menores que para NMDA. Lo anterior ha sido demostrado en ratas al observar que la liberación de glutamato se inhibe tras la

administración de KYNA (30 a 100 nM) y esta modulación es independiente de receptores glutamatérgicos, pero de manera interesante, los receptores colinérgicos son mediadores de dicho efecto (Carpenedo et al., 2001). Sin embargo, también se ha observado que el KYNA puede unirse a los receptores glutamatérgicos AMPA por diferentes mecanismos concentración-dependientes, comportándose como un modulador (excitador/inhibidor) en la señalización neuronal (Prescott *et al*., 2006; Rozsa *et al*., 2008). Así mismo se le ha atribuido un papel importante en la comunicación entre la neurotransmisión glutamatérgica, colinérgica y dopaminérgica en el cerebro.

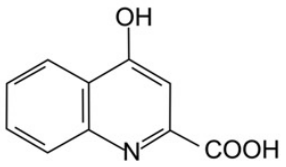

Figura 2. Estructura del ácido kinurénico

4. KYNA EN DESÓRDENES NEURODEGENERATIVOS

Si bien el KYNA ejerce un papel muy importante a nivel fisiológico como regulador dentro de la neurotransmisión, se puede inferir que algún desbalance en su concentración podría traer consigo modificaciones en estos sistemas de transmisión sináptica, desencadenando diversos mecanismos de daño celular. Por esto, se han realizado numerosos trabajos clínicos y experimentales, en los cuales se ha demostrado que alteraciones en la VK se asocian a diferentes neuropatologías.

Se ha observado que en líquido cefalorraquídeo de pacientes con Alzheimer, los niveles de KYNA se ven significativamente disminuidos (Heyes *et al*., 1992), no obstante, Baran y colaboradores (1999) al evaluar los niveles de KYNA en distintas regiones de cerebros *post mortem* con enfermedad de Alzheimer, encuentran un aumento en putamen y núcleo caudado de 192 y 177 %, respectivamente, asociado a una mayor actividad en la KAT I en ambas regiones, mientras que la KAT II no incrementa su actividad. Dichos hallazgos sugieren que el incremento de KYNA en el putamen y núcleo caudado, y el bloqueo constante de los NMDAr está asociado a la pérdida de memoria, aprendizaje y cognición en pacientes con esta enfermedad.

Numerosos han sido los estudios donde el desbalance en la VK se asocia con el progreso de la enfermedad de Huntington, a pesar de su carácter meramente genético. En 1992 (Schwarcz et al., 1992) se planteó la hipótesis de que el desarrollo de mecanismos de excitotoxicidad en la enfermedad de Huntington se debe principalmente a la disminución en los factores neuroprotectores endógenos, y en menor medida al aumento en los niveles de los agonistas de receptores. Específicamente se ha reportado que en estadios tempranos de la enfermedad, los niveles de QUIN aumentan y el KYNA permanece constante, pero en pacientes con la enfermedad avanzada, el QUIN se encuentra en concentraciones normales y el KYNA disminuye (Guidetti et al., 2004).

Por otra parte en la enfermedad de Parkinson el KYNA también disminuye en cerebros *post mortem* (Ogawa, 1992). Adicionalmente, se ha observado que en un modelo esta enfermedad generado por MPTP (un inhibidor del complejo I de la cadena de transporte de electrones) hay una disminución en las actividades de la

KAT I (Knyiha´r-Csillik *et al*,.2004) y la KAT II que conlleva a una disminución de KYNA (Luchowski *et al*,. 2002). Así, se asume que el KYNA es incapaz de inhibir los NMDAr para prevenir la excitotoxicidad. Aunado a esto, se sabe que los niveles de 3-HK y L-KYN aumentan, contribuyendo al daño en la enfermedad de Parkinson (Zádori *et al*., 2009).

5. KYNA COMO ANTIOXIDANTE

Además de la extensa participación del KYNA en el sistema nervioso central, también se ha descrito su capacidad de capturar especies reactivas de oxígeno. Goda y colaboradores en 1996 encontraron el primer indicio de que el KYNA posee la capacidad de atrapar $OH^{\bullet}$ en sistemas no biológicos de producción de este radical. Posteriormente, Hardeland y Zsizsik (1997) mostraron que, mediante detección por quimioluminiscencia, los radicales $O_2^{\bullet -}$ y $OH^{\bullet}$ oxidan al KYNA y la adición de atrapadores específicos de estas especies inhibe dicha oxidación. Al darle seguimiento a estos resultados (Zsizsik BK, Hardeland R. 1999a) empleando un sistema de auto-oxidación de hematoxilina y del sistema ABTS, compararon la capacidad de captura de $O_2^{\bullet -}$ y $OH^{\bullet}$ de KYNA, 4-hidroxiquinolina, ácido quindálico, y ácido xanturénico, otros metabolitos del triptófano, donde KYNA resultó ser más eficiente que la 4-hidroxiquinolina y el ácido quindálico, pero menos eficiente que el ácido xanturénico, al capturar los radicales. En ese mismo año estos autores también demuestran que KYNA previene la degradación de 2-desoxiribosa por radicales $OH^{\bullet}$ generados por fotólisis de la N-hidroxi-2-thiopiridona (Zsizsik BK, Hardeland R. 1999b). A pesar de que demostraron el

potencial de captura de radicales libres del KYNA, su trabajo redundó un poco con lo que ya se había descrito, dado que tampoco emplearon sistemas biológicos en sus trabajos.

Recientemente, Silva-Adaya y colaboradores (2010), mostraron que, en un modelo de hemiparkinsonismo en ratas inducido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), la administración sistémica conjunta de L-KYN - el precursor directo de KYNA-, y probenecid - un inhibidor de transporte de ácidos orgánicos -, protege contra los efectos de esta toxina al incrementar los niveles de KYNA, donde pudiera estar efectuando su actividad como antioxidante dadas las características pro-oxidantes de la 6-OHDA.

6. ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

Diversos desórdenes neurodegenerativos, incluyendo las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, comparten características que involucran la vulnerabilidad de las células a las diversas acciones nocivas de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ERO/ERN), que resultan en estrés oxidativo y nitrosativo. El estrés oxidativo se define como la producción de una serie de eventos tóxicos moleculares y celulares producidos por radicales derivados del oxígeno y otras moléculas reactivas, provocando un desbalance donde las especies reactivas rebasan la capacidad antioxidante de la célula. Las ERO incluyen los radicales libres - que se definen como especies reactivas que poseen un electrón desapareado en su último orbital, tales como $O_2^{\bullet -}$ y $OH^{\bullet}$ -, así como las especies no radicales, como el H_2O_2 y el peroxinitrito ($ONOO^-$). Estas ERO son

generadas normalmente por el metabolismo redox durante la reducción incompleta del oxígeno a agua en la cadena de transporte de electrones. Por otro lado, el estrés nitrosativo o nitrérgico se refiere a una serie de eventos tóxicos producidos a nivel molecular por radicales derivados del nitrógeno y moléculas reactivas como el óxido nítrico (NO) y el $ONOO^-$. El sistema nervioso central (SNC) es particularmente susceptible a los efectos de las ERO/ERN debido a: 1) su elevada proporción de lípidos con respecto a otros órganos; 2) su alta tasa metabólica, ya que el metabolismo aeróbico es el principal mecanismo que provee de energía a las células neuronales, y dado que las neuronas poseen una amplia distribución de mitocondrias y que estas últimas regulan el metabolismo oxidativo y la síntesis de ATP, el riesgo de que se produzca de manera excesiva el $O_2^{\bullet -}$ es muy alto. No obstante, en condiciones fisiológicas, los sistemas antioxidantes endógenos son capaces de neutralizar o remover estas especies reactivas; y 3) la restringida actividad de algunas enzimas antioxidantes, por ejemplo la catalasa.

7. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) Y NITRÓGENO (ERN)

Un radical libre es una especie química que puede existir de manera independiente y que contiene uno o más electrones desapareados, ya sea por la pérdida o por la ganancia de ellos. Estos electrones desapareados modifican la reactividad química de átomos o moléculas y las hacen más reactivas que su correspondiente “no radical”. Los radicales derivados del oxígeno (Tabla 1) son los de mayor importancia en la clínica (Zentella y Saldaña, 1996) por ser éste elemento la molécula más abundante en los sistemas biológicos. Las ERO son

intermediarios tóxicos predominantes y son responsables del estrés oxidativo (Kehrer, 2000).

Radicales	No radicales
Anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$)	Ácido hipocloroso (HCl)
Radical peroxilo (•OOR)	Ozono (O_3)
Radical hidroxiperoxilo (•OOH)	Oxígeno singulete ($^1O_2$)
Radical alcoxilo (•OR)	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
	Peróxidos orgánicos (ROOH)

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno.

Las principales ERO son $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 y $OH^{\bullet}$, y la mayor fuente de estas especies es la cadena respiratoria, donde se puede dar lugar a las siguientes reacciones:

$$O_2 \xrightarrow{+1e^-} O_2^{\bullet -} \xrightarrow[+2H^+]{+1e^-} H_2O_2 \xrightarrow{+1e^-} OH^{\bullet} + OH^- \xrightarrow[+2H^+]{+1e^-} 2H_2O$$

Figura 3. Generación de especies pro-oxidantes de la molécula de oxígeno.

El $OH^{\bullet}$ es uno de los radicales más agresivos, ya que reacciona con cualquier molécula que se encuentre en las cercanías. El mecanismo principal de su

generación en sistemas biológicos es la reacción de Haber-Weiss, catalizada por el hierro, hace uso de la química de Fenton (Kehrer, 2000):

1) $Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$

2) $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\bullet$ (Reacción de Fenton)

3) Reacción neta: $O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH^\bullet$

Por otro lado, el $O_2^{\bullet -}$ es el radical primordial en la célula y sus fuentes de producción varían en la célula. La principal de éstas es la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, en la que se pueden dar fugas de electrones en los complejos I y III. También puede generarse por el metabolismo del ácido araquidónico, el cual inicia cuando la fosfolipasa A_2 es activada por Ca^{++} y libera el ácido araquidónico, mismo que es oxidado por la ciclo-oxigenasa por la adición de dos moléculas de O_2, produciéndose así prostaglandina PGG_2, la cual es instantáneamente peroxidada a PGH_2 con la liberación simultánea de $O_2^{\bullet -}$. La xantina oxidasa y la NADPH oxidasa son otras enzimas que lo producen como parte de su actividad catalítica. Alternativamente, el $OH^\bullet$ puede formarse a partir de $ONOO^-$, ya que este se protona rápidamente al ácido peroxinitroso (ONOOH), y la descomposición espontánea de éste, genera $OH^\bullet$.

El estrés nitrosativo es generado por la rápida oxidación del ON. El ON puede reaccionar con diversas moléculas (Figura 3) y dar lugar a la generación de otra especie muy agresiva, el $ONOO^-$.

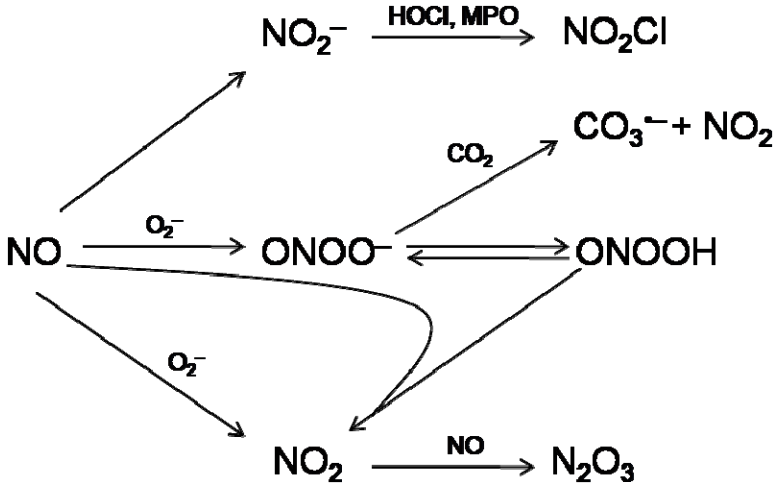

Figura 3. Vía de oxidación del ON y consecuente producción de ONOO y estrés nitrosativo (tomado de Soneja et al., 2005).

8. EFECTO DE LAS ERO SOBRE LAS MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS

La producción de ERO se da de manera constante en la célula, y son diversos sistemas antioxidantes los encargados de controlar dicha producción. Sin embargo, una deficiencia en estos sistemas, o bien la generación excesiva de ERO, conlleva a dañar las moléculas más importantes de los sistemas biológicos como son los lípidos, las proteínas y el ADN, afectando así su estructura y función.

A. Daño a lípidos

El sistema nervioso es peculiarmente susceptible al daño a lípidos dada su gran cantidad presente en membranas, específicamente los poli-insaturados. El efecto directo de las ERO sobre los lípidos es la lipoperoxidación. Los radicales $OH^{\bullet}$ e

hidroperoxilo (HO2•), así como el $^1O_2$, pueden reaccionar con los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos (Aikens y Dix, 1991; Choe et al., 1995, Choi y Yu 1995, Gutteridge y Halliwell, 1990; Halliwell y Gutteridge, 1984; Horton y Fairhurst, 1987; Niki et al., 1991; Schaich, 1992). La lipoperoxidación ocurre en varias fases; en la primera, la fase de iniciación comienza cuando el radical libre secuestra un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos de la cadena carbonatada para generar un radical libre lipídico (L•). Los ácidos grasos poli-insaturados de membrana son especialmente susceptibles de ser atacados por radicales libres, puesto que contienen grupos metilenos separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. Cuando un radical lipídico se origina, sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose así un dieno conjugado que puede reaccionar con el O_2 y formar un radical hidroperoxilo. Este radical libre da lugar a endoperóxidos, o bien, puede tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poli-insaturado adyacente para formar de nuevo un radical libre lipídico y un hidroperóxido. El radical lipídico se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por su parte, el hidroperóxido, que es un compuesto estable, entra en contacto con iones metálicos de transición y producirá más radicales libres que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena. Así las membranas resultan seriamente dañadas, y por tanto, se altera su funcionalidad (Rice y Burton, 1993).

B. Daño a proteínas

Las ERO, al dañar las proteínas, alteran no solo su estructura, sino también su función. En el caso de las enzimas, por ejemplo, se pierde su actividad catalítica, provocando interrupciones en la transducción de señales y vías metabólicas. Los efectos de las ERO sobre las proteínas incluyen la oxidación de los residuos de aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas. Ya que al parecer no existen mecanismos de reparación de proteínas, la prevención por los sistemas antioxidantes o la simple destrucción de las especies modificadas por proteólisis son mecanismos más viables (Grune et al., 1997). Aunque la mayoría de las proteínas oxidadas son removidas del sistema, algunas pueden acumularse gradualmente y contribuir al daño, como sucede en algunos desórdenes neurodegenrativos (Kehrer, 2000).

C. Daño a ácidos nucleicos

Las ERO dañan el ADN al reaccionar con la desoxirribosa y las bases nitrogenadas. Existen diversos sistemas de reparación del ADN ya que estas especies presentan niveles basales en la célula (Lindahl y Wood, 1999); no obstante, si las ERO se producen en sitios críticos o no son reparados rápidamente, puede tener consecuencias perjudiciales que van desde producir mutaciones hasta la apoptosis, la necrosis, e incluso la carcinogénesis (Klaunig et al., 1998). Uno de los efectos más sobresalientes de la presencia de ERO, y que de hecho se emplea como marcador de daño oxidativo, es la fragmentación del ADN, afectando su organización al romper los nucleosomas, y por tanto la

condensación de la cromatina, que finalmente impedirá la transcripción de genes (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

La producción de ERO es controlada en la célula por diversos sistemas antioxidantes; sin embargo, este equilibrio puede perderse cuando estos sistemas presentan alguna deficiencia o cuando la generación de ERO es excesiva, lo que conlleva a daños en las moléculas.

9. ANTIOXIDANTES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Las células poseen sistemas de defensa que les permiten controlar la concentración de especies reactivas. Estos sistemas se agrupan en dos tipos: no enzimáticos y enzimáticos.

A. SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Los antioxidantes no enzimáticos constituyen un grupo de moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, que capturan radicales libres y generan especies reactivas menos nocivas para la célula. Su mecanismo de acción se basa en la capacidad de ceder un electrón a un radical con el fin de estabilizarlo. Los antioxidantes no enzimáticos más importantes son:

- Vitamina E (α-tocoferol). Es considerado el antioxidante mayormente distribuido en los seres vivos. Posee la capacidad de interrumpir la peroxidación de lípidos en la fase de propagación, reaccionando con los radicales lipoperoxilos y alcoxilos. Al interactuar con lipoperoxilos, genera el radical α-tocoferilo, el cual es transformado de vuelta a α-tocoferol por el

ácido ascórbico en el sistema reductor tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (May *et al*., 1998).

- Glutatión (GSH/GSSG). El glutatión reducido (GSH) es considerado una típica forma antioxidante al impedir la oxidación de los grupos tiol (-SH) de las proteínas; tiene la capacidad de reaccionar con las ERO, transfiriéndoles un átomo de hidrógeno (Halliwell y Gutteridge, 2001).

- Ácido úrico. Comúnmente se le considera como un producto terminal del metabolismo de las purinas, y posee propiedades antioxidantes *per se*; sin embargo, se desconoce el mecanismo específico por el cual ejerce su acción, pero se sugiere que consiste en prevenir la oxidación de la vitamina C y formar complejos con los metales hierro y cobre (Yu, 1994).

B. SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Como lo denota su categoría, estos antioxidantes son enzimas encargadas de convertir las especies reactivas en menos reactivas, y entre estos destacan:

- Superóxido dismutasa (SOD). Es una metaloproteína cuya función es catalizar la dismutación del $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2. Esta enzima presenta tres isoformas, de las cuales dos tienen como sitio activo al Cu^{2+} y Zn^{2+}; localizadas en el citosol y en exterior de la célula respectivamente. La tercera isoforma tiene como sitio activo al Mn^{2+} y se encuentra en la matriz mitocondrial.

- Catalasa. Es una hemoproteína que se encuentra principalmente en los peroxisomas y las mitocondrias; su actividad antioxidante consiste en

disminuir el riesgo de la formación del $OH^{\bullet}$ por la interacción del H_2O_2 con metales de transición vía la reacción de Fenton (Halliwell, 1990). El mecanismo por el cual lleva a cabo su función tiene lugar en dos fases: primero, hace una ruptura del H_2O_2, generando en el grupo hemo la especie oxoferrilo con la formación de una molécula de agua, y después se lleva a cabo la reacción del oxoferrilo con otras molécula de H_2O_2.

- Glutatión peroxidasa. Es una selenoproteína que se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol. Esta enzima degrada H_2O_2, y requiere la presencia de GSH (Powers y Lennon, 1999).

- Glutatión reductasa. Esta enzima cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a GSH, requiere de NADPH, y es esencial para el ciclo redox del GSH que mantiene los niveles adecuados de esta molécula (Harris y Massey, 1992).

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a que KYNA desarrolla un papel importante en la modulación de la transmisión sináptica de diversos neurotransmisores, y que se ha implicado en diferentes enfermedades neurodegenerativas, es de gran trascendencia investigar otros mecanismos por los cuales el KYNA provee protección a las células; adicionalmente a su actividad antagónica sobre receptores del SNC. Dado que se ha demostrado su eficacia al capturar radicales libres en sistemas no biológicos, este trabajo representa la primera aproximación a este planteamiento. Así se

explorará nuevas alternativas referentes a las propiedades protectoras que posee KYNA.

V. HIPÓTESIS

Si el ácido kinurénico es capaz de atrapar radicales en sistemas *in vitro* no biológicos, entonces atenuará el daño oxidativo inducido por el pro-oxidante $FeSO_4$ en sistemas biológicos, como son los homogenados de diferentes tejidos; y dicho efecto será independiente de su acción antagónica.

VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antioxidante de KYNA, tanto en sistemas sintéticos generadores de especies reactivas, como en homogenados de distintos tejidos de rata, y evaluar si dicho efecto es independiente de su actividad sobre receptores tipo NMDA y α7-nicotínicos.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

a. Evaluar la capacidad atrapadora del KYNA sobre $O_2^{\bullet -}$, $OH^{\bullet}$ y $ONOO^{-}$ en sistemas generadores de química combinatoria, y comparar su eficacia con compuestos de referencia para cada especie.

b. Determinar si el KYNA es capaz de evitar la oxidación de albúmina producida por $OH^{\bullet}$.

c. Comprobar si KYNA previene la peroxidación de lípidos inducida por el pro-oxidante $FeSO_4$ en homogenados de cerebro, cerebelo e hígado de rata, empleando de manera comparativa antagonistas de receptores NMDA y α7-nicotínicos (MK-801 y memantina, respectivamente) para determinar si esta posible protección es dependiente o no de dichos receptores.

d. Evaluar si el KYNA disminuye la producción de ERO inducida por $FeSO_4$ en homogenados de cerebro y cerebelo.

VIII. MÉTODOS

1. Materiales y animales

Todos los reactivos empleados se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). Las soluciones se prepararon usando agua desionizada obtenida de un sistema purificador Milli-Q (Millipore).

Se usaron ratas Wistar macho (250-300 g) para la realización de este trabajo. Para todos los experimentos propuestos, los animales se agruparon en 5 por cada caja de acrílico, alimentados con un producto comercial (Purina Chow) y agua *ad libitum*. Los cuartos del bioterio se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (25 ± 3º C), humedad (50 ± 10 %), y luz (12:12 ciclo luz:oscuridad).

2. Determinación de captura de especies reactivas en sistemas sintéticos

Para la evaluación de la actividad de captura de especies reactivas, se realizaron ensayos de química combinatoria sin muestra biológica.

A. Ensayo de anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$). La captura de $O_2^{\bullet -}$ se estimó mediante la generación del radical en el sistema descrito por Nikishikimi y colaboradores en 1972, posteriormente modificado por Ponti et al. en 1978. Brevemente, en un tubo de ensayo se mezclaron 10 µl de dimetil sulfóxido (DMSO), amortiguador HEPES 20 mM, fenazina metosulfato (PMS) 4 µM, nitroazul de tetrazolio (NBT) 40 µM y nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) 196 µM. Al final se adicionaron diferentes concentraciones (100, 300, 500, 1,000 y 3,000 µM) de ácido kinurénico (KYNA), N-acetil-cisteína (NAC), glutatión (GSH) y ácido nordihidroguaiaretico (NDGA) 1, 5, 10, 20, 500 µM. Una vez realizada la mezcla de determinó la absorbencia a 560 nm en un espectrofotómetro Genesys, cada minuto durante 3 minutos. Una vez obtenidas las lecturas se calcula la CE_{50} para cada molécula.

B. Ensayo de radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$). Se llevó a cabo mediante el sistema Fe^{3+}-EDTA-H_2O_2-desoxiribosa (Halliwell et al., 1987; Floriano-Sánchez et al., 2006). Para el ensayo 100% se colocaron en tubos 200 µl de ácido ascórbico 1 mM, 200 µl de desoxiribosa 2.8 mM, 100 µl de H_2O_2 10 mM, 300 µl de amortiguador de fosfato de potasio 20 mM pH 7.4 y 200 µl de la solución EDTA 1.04 mM/ $FeCl_3$ 1 mM. Para el ensayo problema se agregaron 100 µl de los antioxidantes a comparar: KYNA, dimetil sulfóxido (DMSO), dimetil tiourea (DMTU) 50, 100, 150, 250, 500, 1000 y 3000 µM; y NDGA 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1 y 5 µM. Se

incubaron durante una hora a 37ºC, y después se agrega 1 ml de TBA/HCl/TCA/DFO y se calentaron 10 minutos en baño maría a 100º C para registrar las absorbencias a 532 nm.

C. ***Ensayo de peroxinitrito ($ONOO^-$)***. El $ONOO^-$ se sintetizó de la manera descrita por Floriano-Sánchez et al., 2006, mezclando, en baño de hielo, 5 ml de la solución de H_2O_2 0.7M en HCl 0.6 M con 5 ml de KNO_2 0.6 M, y casi instantáneamente se detuvo la reacción con NaOH 1.2 M frío. El H_2O_2 residual se removió usando una columna de MnO_2 prelavada con NaOH 1.2 M durante 20 minutos. La mezcla obtenida se almacenó a -20ºC por una noche. Se recolectó la capa de líquido amarillo y se mantuvo a -20ºC. La concentración de ($ONOO^-$) se determinó antes de cada experimento a 302 nm utilizando un coeficiente de extinción de 1.670 M^{-1} cm^{-1}. Para todos los experimentos, la concentración de $ONOO^-$ sintetizado fue de 90 mM. La captura de $ONOO^-$ se midió a través de la inhibición de la formación de diclorofluoresceina (DCF) a partir de dicloro-dihidro-fluoresceína (DHCF). En el tubo 100 % se colocan 20 µl de ácido dietilenetriaminepentaacético (DTPA) 1 mM, 30 µl de DHCF 1.75 mM, 0.95 ml de H_2O y 15 µl del $ONOO^-$ sintetizado. Al tubo problema se le agregaron 100 µl de los antioxidantes: KYNA (100, 300, 500, 1000, 3000 y 5000 µM), penicilamina (5, 10, 20, 50 y 100 µM) y NDGA (1, 2.5, 5, 10, 20 y 50 µM). Se registra la absorbencia a 500 nm durante tres minutos cada minuto.

3. Preparación de homogenados de cerebro, cerebelo e hígado

Para los experimentos *in vitro*, se emplearon como sistema biológico los homogenados de tejido de rata, para lo cual se extrajo cerebro, cerebelo e hígado, y se homogenizaron 1:20 en buffer Krebs-Ringer (NaCl 118.5 mM, KCl 4.75 mM, $CaCl_2$ 1.77 mM, $MgSO_4$ 1.18 mM, glucosa 5 mM, NaH_2PO_4 12.9 mM y $NaHPO_4$ 3 mM; pH 7.4).

4. Determinación de la peroxidación de lípidos

La evaluación de la peroxidación de lípidos (PL) en homogenados se estimó por el método de TBA, basado en la formación de malondialdehído (MDA), un producto de la lipoperoxidación que reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) formando productos fluorescentes (Santamaría et al., 1997; 2001ª; Triggs y Willmore, 1984). A 250 µl del homogenado se le agregaron diferentes concentraciones de KYNA (5 a 1000 µM) y $FeSO_4$ (5 µM), incubando por dos horas a 37ºC. En paralelo se evaluó el efecto del MK-801 (inhibidor de receptores NMDA) y memantina (inhibidor de receptores α7-nicotínicos y NMDA). Después de la incubación, se agregaron 500 µl de la solución de TBA (0.75 g de TBA + 15 g de ácido tricloroacético + 2.54 ml de HCl, en un volumen final de 50 ml en H_2O), se calentaron los tubos en baño maría a 100º C por 20 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 3,000 x g por 15 minutos. Finalmente, se obtuvieron las

absorbencias a 532 nm. Los resultados están expresados en porcentaje de peroxidación lipídica respecto al control.

5. Evaluación de la producción de ERO

Las ERO se detectaron por fluorescencia de la diclorofluoresceina (DCF) (Ali et al., 1992). Se incubaron alícuotas de 1.5 mL de los homogenados de tejido durante dos horas en presencia o ausencia de $FeSO_4$ (5 µM) y de KYNA (150 µM) durante dos horas a 37° C. Después de la incubación se agregaron 100 µL de una solución de DCF-diacetato 75 µM y se incubó a 37° C en la oscuridad durante una hora; posteriormente las muestras se centrifugaron a 6,000 x g por 10 minutos, y la señal fluorescente de la DCF de los sobrenadantes se determinó en un espectrómetro Perkin-Elmer LS50 con 488 nm de excitación y 532 de emisión. Los valores se expresan en porcentaje de producción de ERO con respecto al control.

6. Degradación de proteína mediada por $OH^{\bullet}$

La determinación de la oxidación de la albúmina de suero de bovino (BSA) mediada por $OH^{\bullet}$ se realizó empleando una reacción catalizada por metales basada en el método de Kocha y colaboradores en 1997, haciendo algunas modificaciones. Se preparó una solución de ácido ascórbico (1.6 mM)/EDTA (0.8 mM)/$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ (0.8 mM) en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.4) más BSA y KYNA. Se mezcló BSA al 1% con 250 µl de la solución de ácido ascórbico/EDTA/$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ en presencia o ausencia de KYNA. La reacción para generar $OH^{\bullet}$ se inició al añadir 15 µl de H_2O_2 al 2%. En el grupo control el

H_2O_2 se sustituyó por H_2O. Los tubos se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente, se les agregaron 250 µl de ácido tricloroacético al 20% y se centrifugaron a 1,000 x g por 30 min a 4º C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 500 µl de NaOH 0.1 M. Posteriormente se tomaron 40 µg de albúmina contenida en las muestras y se sometieron a una electroforesis desnaturalizante discontinua en un gel de poliacrilamida al 12% a 150 V por 1 h. Enseguida se tiñó el gel en azul de Coomassie 0.2% durante 1 h. Las imágenes se visualizaron y capturaron en un fotodocumentador de geles BioRad (Gel Doc 1000 BioRad). Los niveles de proteína se evaluaron por densitometría utilizando el programa Quantity One 4.2 (Galano et al., 2010).

IX. RESULTADOS

1. CAPACIDAD ATRAPADORA DE KYNA

En la figura 4 se presenta la capacidad de captura del KYNA para (a) $OH^{\bullet}$; (b) $ONOO^{-}$ y (c) $O2^{\bullet-}$. Adicionalmente, se muestra la comparación de la capacidad atrapadora con respecto a los compuestos de referencia para cada una de las ERO. En todos los casos se observa que el KYNA y los demás antioxidantes reducen la cantidad del radical de manera concentración-dependiente. El KYNA muestra mayor capacidad de captura de $O2^{\bullet-}$ que el GSH (Figura 4C).

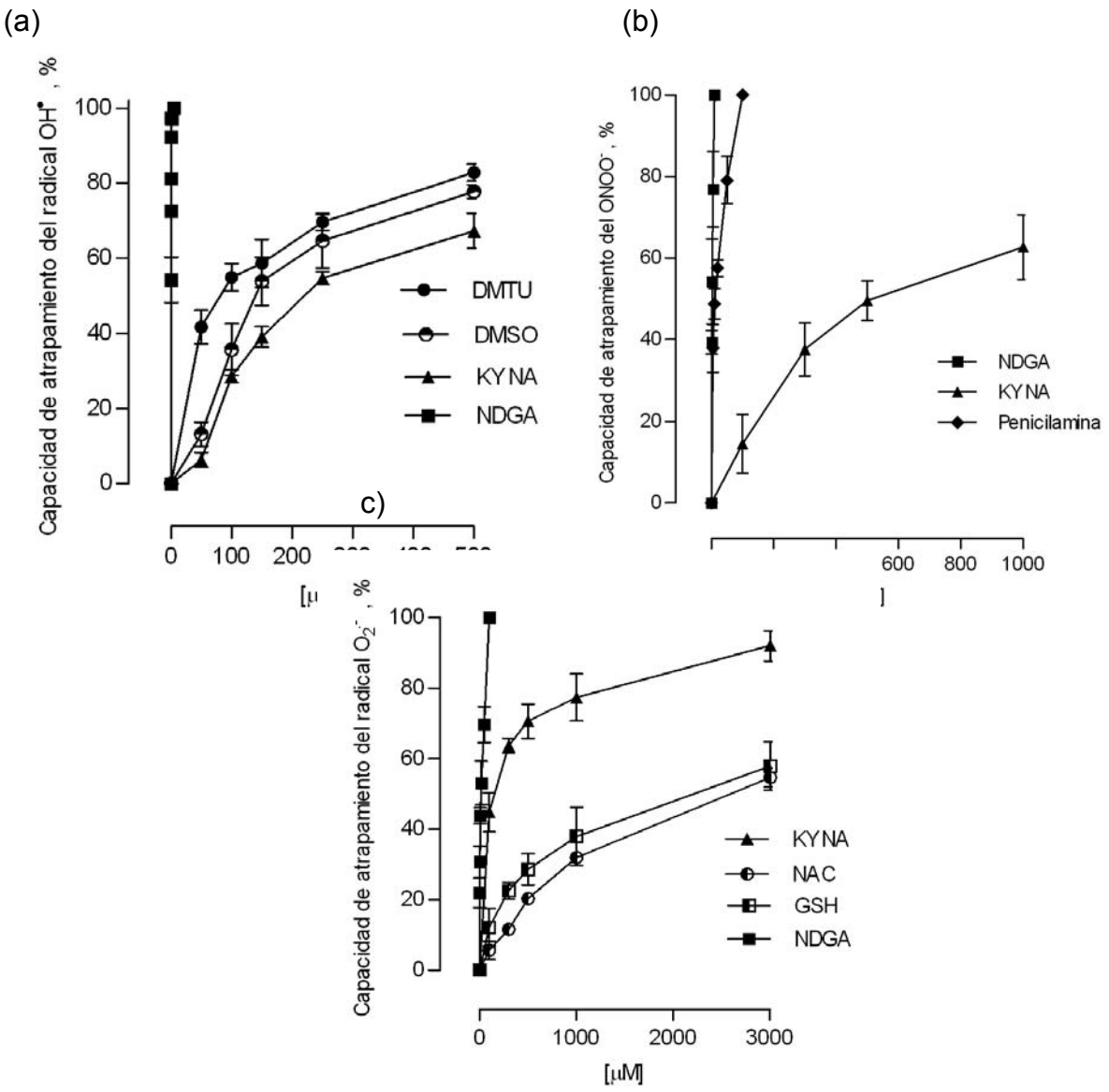

Figura 4. Comparación del efecto de KYNA (100, 300, 500, 1000 y 3000 µM) en la producción de radical $OH^{\bullet}$ (a), $ONOO^{-}$ (b) y $O2^{\bullet-}$ (c) con respecto a otros atrapadores de referencia, en sistemas no biológicos.

La Tabla 2 muestra los valores de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) de KYNA en la captura de las diferentes especies reactivas, así como su comparación con compuestos de referencia. La capacidad atrapadora de KYNA para las diferentes ERO, expresada como CE_{50}, fue la siguiente: $OH^{\bullet} = O2^{\bullet-} = ONOO^{-}$. La CE_{50} para el $OH^{\bullet}$ fue 209.0± 7.4 µM y la eficiencia de captura fue: NDGA > DMSO > DMTU > KYNA. El valor de CE_{50} de KYNA para la captura de $ONOO^{-}$ fue 598.4 ± 74.8 µM y la eficiencia fue menor que NDGA y penicilamina. Para la captura de $O2^{\bullet-}$, la CE50 de KYNA fue 212.3 ± 11.4 µM y la eficiencia quedó de la siguiente manera: NDGA > KYNA > GSH > NAC.

Tabla 2. Capacidad de captura de especies reactivas de KYNA y otros antioxidantes de referencia. Los valores están expresados en CE_{50} (µM).

Compuesto	$OH^{\bullet}$	$ONOO^{-}$	$O_2^{\cdot-}$
KYNA	209.0 ± 7.4	598.4 ± 74.8	212.3 ± 11.4
DMTU	129.5 ± 8.5		
DMSO	172.3 ± 19.6		
Penicilamina		21.3 ± 1.7	
NDGA	0.03 ± 0.002	2.8 ± 0.41	26.9 ± 2.5
NAC			2387.6 ± 17.3
GSH			2171.5 ± 156.3

Valores expresados en promedios ± SEM. KYNA: ácido kinurénico; DMTU: dimetil tiourea; DMSO: dimetil sulfóxido; NDGA: ácido nordihidroguaiarético; NAC: N-acetil-cisteína; GSH: glutatión.

2. EFECTO DE KYNA EN LA PL EN PRESENCIA O AUSENCIA DE LOS INHIBIDORES DE LOS RECEPTORES NMDA Y α7-NICOTÍNICOS

En la Figura 5 a, b y c se muestra que el KYNA previene la PL inducida por $FeSO_4$ de manera concentración dependiente en los tres tejidos y esta protección es independiente de los receptores NMDA, dado que la incubación con MK-801 no tiene efecto sobre la lipoperoxidación producida por el agente pro-oxidante. Por otro lado, en la Figura 6 se observa el efecto de KYNA sobre la PL inducida por $FeSO_4$ en presencia de memantina, un inhibidor de receptores nicotínicos y NMDA.

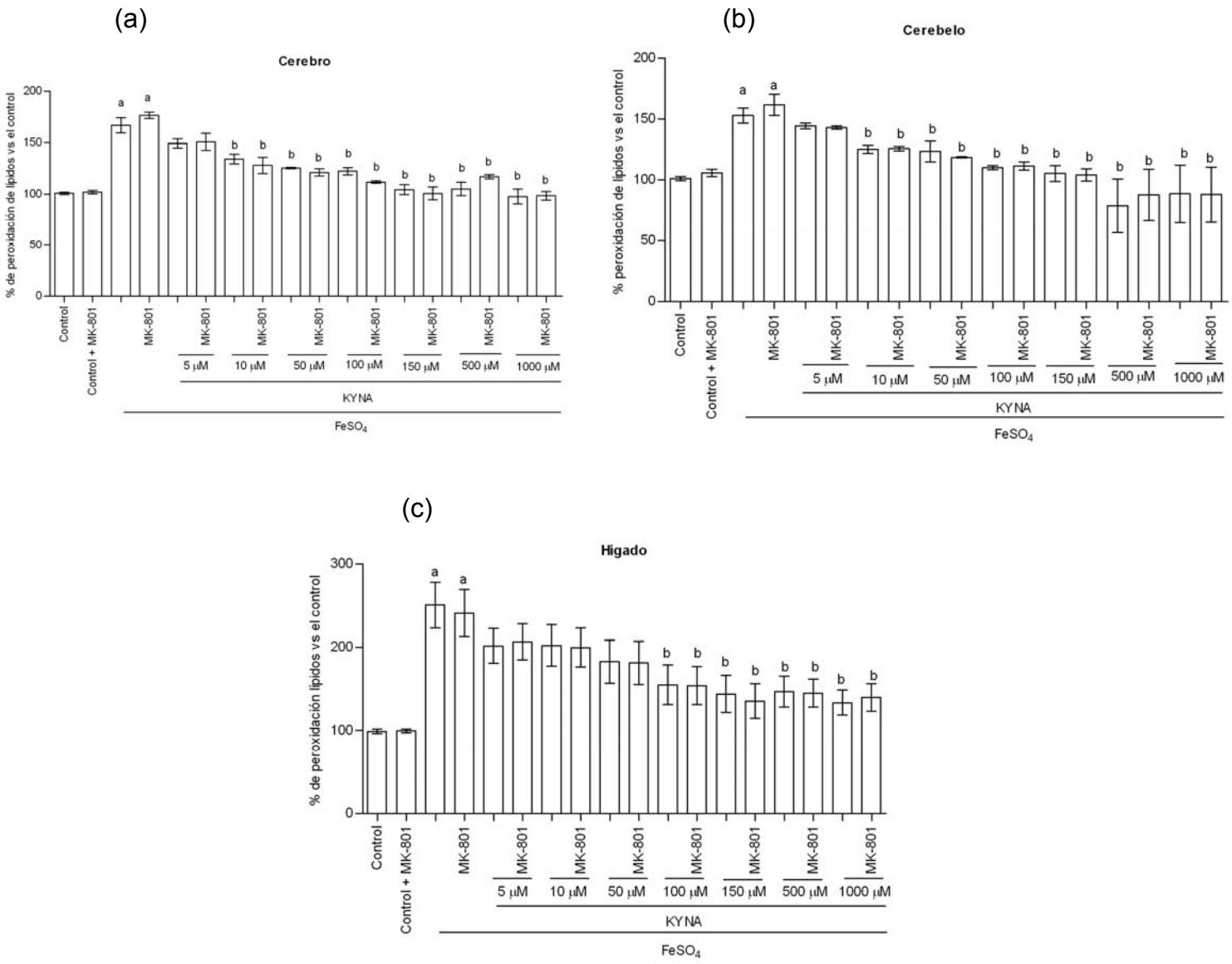

Figura 5. Efecto de las diferentes concentraciones de KYNA sobre la peroxidación de lípidos en homogenados de cerebro (a), cerebelo (b), hígado (c) en presencia de $FeSO_4$ (5 µM) y MK-801 (0.3 µM). Los valores están expresados en promedios ± SEM. $^{\#}$ *P<0.05* vs control, * *P<0.05* vs de $FeSO_4$.

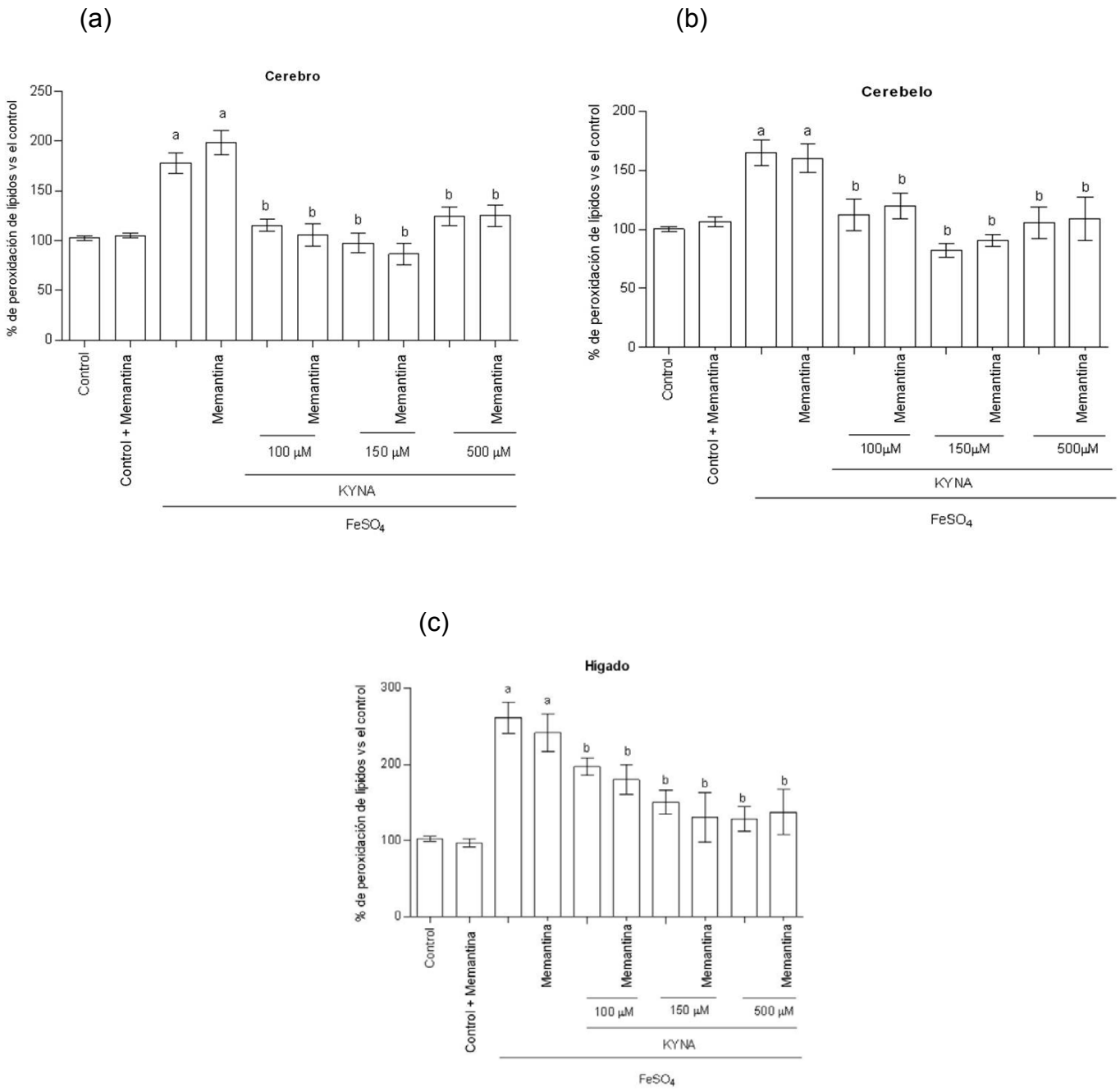

Figura 6. Efecto de las diferentes concentraciones de KYNA sobre la peroxidación de lípidos en homogenados de cerebro (a), cerebelo (b), e hígado (c) en presencia de $FeSO_4$ (5 µM) y Memantina (1 µM). Los valores están expresados en promedios ± SEM. ^{a} *P < 0.05* vs control, ^{b} *P < 0.05* vs $FeSO_4$.

3. EL KYNA PREVIENE LA PRODUCCIÓN DE ERO

El $FeSO_4$ indujo un aumento de la producción de ERO en cerebro y cerebelo en un 67% y 61%, respectivamente (Figura 7 a y b, respectivamente), y esta formación de ERO fue atenuada por KYNA (150 μM) en ambos tejidos.

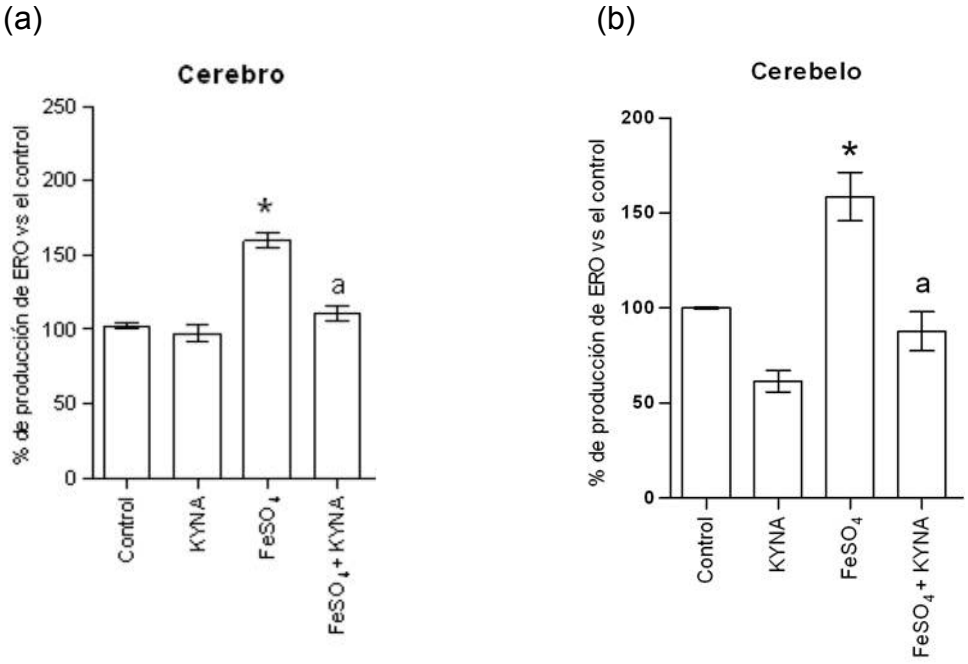

Figura 7. El KYNA (150 μM) redujo la formación de ERO inducida por $FeSO_4$ en cerebro (a) y cerebelo (b). Los valores están expresados en promedios ± SEM. * $P < 0.01$ vs control, $^a P < 0.01$ vs $FeSO_4$.

4. EL KYNA PREVIENE LA DEGRADACIÓN DE ALBÚMINA INDUCIDA POR $OH^{\bullet}$

El KYNA (100, 150 y 500 µM) previno la oxidación de albúmina inducida por $OH^{\bullet}$ de manera concentración-dependiente. Los resultados se evaluaron por densitometría (Figura 8). Estos datos confirman la capacidad de KYNA como atrapador de $OH^{\bullet}$.

(a) (b)

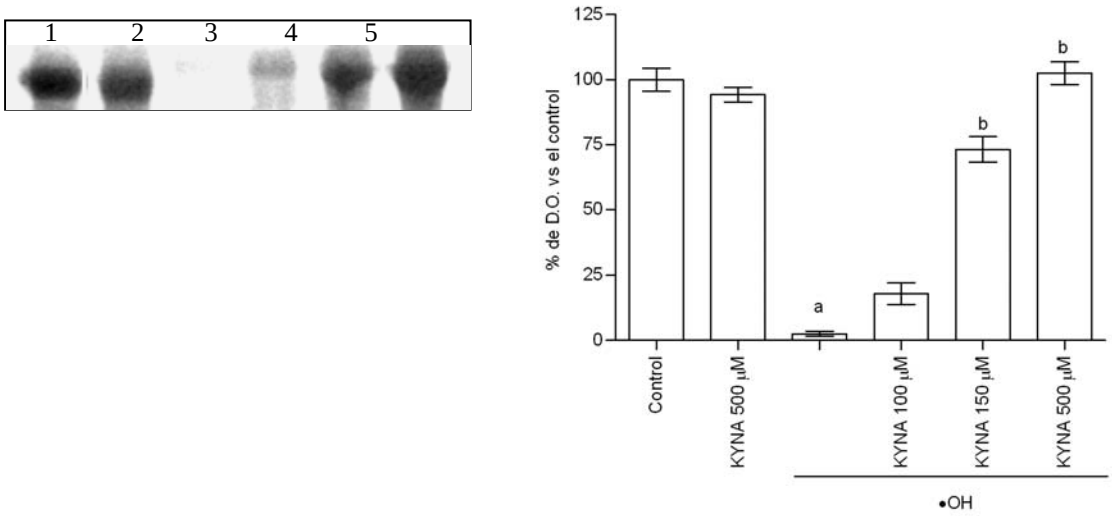

Figura 8. Efecto protector de KYNA sobre la oxidación de albúmina inducida por un sistema generador de $OH^{\bullet}$. a) Blot representativo para la detección de albúmina por medio de tinción: carril 1, albúmina (50 *µ*g); carril 2, KYNA (500 µM); carril 3, albúmina (50 *µ*g) + $OH^{\bullet}$; carriles 4-6, albúmina (50 *µ*g) + $OH^{\bullet}$ + KYNA (100 µM para el carril 4, 150 µM para el 5 y 500 µM para el 6). b) Representación cuantitativa (densidad óptica) para la detección de albúmina. Datos presentados como promedios ± S.E.M. de 3 experimentos independientes. $^{a}P<0.01$ vs. Control; $^{b}P<0.01$ vs $OH^{\bullet}$.

X. DISCUSIÓN

El KYNA es un metabolito de la degradación del triptofano y es ampliamente conocido por su actividad inhibidora de receptores NMDA y nicotínicos (Kessler et al., 1989; Hilmas et al., 2001). En este trabajo exploramos un nuevo mecanismo por el cual esta molécula ejerce sus acciones protectoras, al demostrar que KYNA es también un metabolito con propiedades antioxidantes y atrapadoras de ERO. Se demostró que KYNA es capaz de atrapar ERO en diferentes medios sintéticos de producción de radicales libres, mientras que en preparaciones biológicas de tejido este compuesto disminuyó diferentes marcadores de daño oxidativo producidos por $FeSO_4$. Es bien sabido que las ERO contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades como la arteroesclerosis, la diabetes, el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, la cirrosis y los procesos de envejecimiento (Halliwell and Gutteridge, 1999; Basaga, 1990), y que la PL se ha establecido como una consecuencia de la formación de ERO en células y tejidos (Basaga, 1990). En este sentido, los atrapadores de radicales pueden contribuir a prevenir o mejorar estos desórdenes al mantener la homeostasis. Por tanto, el hecho de que el KYNA actúe como un atrapador directo de ERO es de gran relevancia dada la naturaleza endógena de este metabolito. Cabe mencionar que las alteraciones en las concentraciones de KYNA han sido relacionadas con diferentes patologías, incluyendo alteraciones cognitivas, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, espasmos infantiles, dolor, abuso de drogas, anorexia, epilepsia e inflamación, entre otras (Schwarcz and Pelliciari, 2002; Pérez-De la Cruz et al., 2007).

En nuestro estudio se montaron diversos sistemas sintéticos diseñados para producir radicales libres, y demostramos que el KYNA presenta la misma eficacia para atrapar $O_2^{\bullet-}$ y $OH^{\bullet}$ (CE_{50}: 212 y 209 μM, respectivamente), mientras que su CE_{50} para $ONOO^-$ es mayor que las otras (CE_{50}: 598 μM). Es importante destacar que KYNA resultó casi 10 veces más efectivo que el GSH al atrapar $O_2^{\bullet-}$, permitiendo la postulación de este metabolito como un atractivo atrapador, ya que el GSH es uno de los antioxidantes endógenos más abundantes e importantes, y también debido a que el $O_2^{\bullet-}$ es un radical libre derivado comúnmente del metabolismo celular que puede llegar a ser una fuente para la posterior producción de otras ERO como el $OH^{\bullet}$. Estos datos confirman reportes previos en los cuales el KYNA también fue capaz de capturar radicales libres en diferentes condiciones experimentales (Goda et al., 1996; Hardeland & Zsizsik, 1997; Zsizsik & Hardeland, 1999a,b; Hardeland et al., 1999; Zsizsik, 2001a). Adicionalmente, demostramos la capacidad de KYNA como una molécula antioxidante, independientemente de su actividad sobre receptores NMDA y nicotínicos, a través de dos estrategias experimentales: (1) usando homogenados de hígado, en los cuales la cantidad de receptores para neurotransmisores puede considerarse como mínima; y (2) evaluando el efecto de KYNA en una co-administración con MK-801, un potente antagonista de receptores NMDA (McDonald et al., 1989) o con memantina (un antagonista tanto de receptores nicotínicos como NMDA) (Parsons et al., 1999). El KYNA disminuyó de manera concentración-dependiente la PL producida por $FeSO_4$ en los tres tejidos evaluados (cerebro, cerebelo e hígado), y se observó el mismo efecto protector al co-administrar los inhibidores.

Este hallazgo tiene particular relevancia ya que ambos antagonistas fueron incapaces de reducir los cambios en los marcadores de estrés oxidativo inducido por el $FeSO_4$. Por lo tanto, los efectos protectores de KYNA ampliamente descritos en trabajos previos (Gigler et al., 2007; Robotka et al., 2008; Carrillo-Mora et al., 2010; Sas et al., 2008) pudieran estar asociados a su habilidad para capturar $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$ y $ONOO^{-}$, lo cual se demostró previamente en este trabajo en sistemas no biológicos. Estos datos indican que el efecto observado de KYNA sobre estas especies reactivas es probablemente independiente de su actividad inhibidora sobre receptores, y que su habilidad como atrapador podría estar contribuyendo a sus propiedades neuroprotectoras.

Adicionalmente, nuestros datos demuestran que el KYNA (150 μM) puede atenuar la producción de ERO inducida por $FeSO_4$ y la oxidación de la albúmina evocada por $OH^{\bullet}$ (Matthews et al., 1998). Por su parte, Zsizsik y Hardeland (1999 b) demostraron que, en un sistema de producción de radicales libres generados por la fotólisis de N-hidroxi-2-piridinetiona, el KYNA es capaz de inhibir substancialmente la degradación de la desoxirribosa inducida por $OH^{\bullet}$. El mecanismo propuesto por el cual KYNA ejerce su actividad atrapadora implica su propia oxidación al capturar dos radicales $OH^{\bullet}$ y un $O_2^{\bullet-}$, produciendo al mismo tiempo otro radical $NO^{\bullet}$ (Zsizsik and Hardeland, 2001b). El hecho de que el KYNA pueda atenuar el daño oxidativo en el intervalo de concentraciones en el cual también actúa sobre receptores, sugiere que la protección que provee KYNA en diferentes modelos neurotóxicos no sólo se debe a su actividad como antagonista sobre receptores NMDA nicotínicos, sino también a su capacidad antioxidante.

Esto es respaldado por el hecho de que el KYNA previene el daño en diversos modelos de toxicidad donde destaca la producción de radicales libres. Ejemplificando, recientemente se han probado diferentes estrategias que comprenden la modulación positiva de los niveles de KYNA en el cerebro en diversos modelos tóxicos mediados por la sobreactivación glutamatérgica como la epilepsia, la isquemia y la toxicidad inducida por QUIN, el beta amiloide y el MPTP (Santamaría et al., 1996; Miranda et al., 1997; Stone, 2000; Hlinak and Krejci, 2006; Gigler et al., 2007; Robotka et al., 2008; Carrillo-Mora et al., 2010; Sas et al., 2008). En estos casos, la acción protectora de KYNA fue atribuida totalmente a su carácter antagónico. Resta entonces investigar si el KYNA ejerce acciones protectoras al probarlo en estos modelos tóxicos a través de sus propiedades antioxidantes.

En contraste a lo que hemos demostrado, es importante considerar que KYNA puede, bajo ciertas circunstancias, comportarse como un pro-oxidante, considerando sistemas experimentales similares donde el ácido δ-aminolevulínico (ALA), otra fuente de $OH^{\bullet}$, es generado particularmente por la sub-forma enólica de este metabolito. El KYNA potencia la destrucción de 2-desoxirribosa por radicales libres generados por ALA; sin embargo, se desconoce el mecanismo específico por el cual se lleva a cabo (Coto-Montes et al., 2001). Por otro lado, se ha demostrado que KYNA es capaz de disminuir la síntesis de ATP al elevar el consumo de oxígeno durante el estadio IV de la respiración, reduciendo el índice de control respiratorio y la relación ADP/oxígeno (Baran et al., 2001,2003). Esto puede adquirir relevancia en algunos aspectos patológicos donde los niveles de KYNA se encuentran aumentados, tales como la esquizofrenia y la cardiomiopatía.

Baran y colaboradores (2003) han sugerido una relación donde asumen que durante la reoxigenación del cerebro o la reperfusión del corazón, la síntesis de ATP probablemente no sea lo suficientemente eficiente debido a los niveles altos de KYNA producidos bajo condiciones patológicas. Por lo tanto, es esencial investigar en qué manera las características antioxidantes o pro-oxidantes de KYNA contribuyen a su patrón de acciones, ya sea en condiciones fisiológicas o fisiopatológicas.

XI. CONCLUSIONES

1. El KYNA es capaz de atrapar anión superóxido, radical hidroxilo y peroxinitrito, de manera eficiente.
2. El KYNA disminuyó de manera concentración-dependiente la lipoperoxidación inducida por $FeSO_4$, y esta acción parece ser independiente de su actividad sobre receptores NMDA y α-nicotínicos.
3. El incremento en la producción de ERO y la degradación de albúmina fueron atenuados completamente por KYNA.
4. Estos datos sugieren que el KYNA posee mecanismos adicionales, distintos a su efecto sobre receptores, los cuales deben ser estudiados en otros modelos.

XII. PERSPECTIVAS

Si bien queda demostrada la capacidad antioxidante de KYNA, es necesario indagar aún más sobre los mecanismos y las circunstancias en las que puede ejercer esta acción. Se abre un nuevo panorama sobre la visión que se tiene de este metabolito. Se realizarán pruebas en otros modelos de daño que podrían contribuir a dilucidar los factores relacionados a esta actividad atrapadora del KYNA.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

Aikens J, Dix TA. 1991. Perhydroxyl radical (HOO •) initiated lipid peroxidation: the role of fatty acid hydroperoxides. J Biol Chem 266:15091-15098.

Ali SF, LeBel CP, Bondy S. C. 1992 Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. Neurotox 13: 637–648.

Amori L, Guidetti P, Pellicciari R, Kajii Y, Schwarcz R, 2009. On the relationship between the two branches of the kynurenine pathway in the rat brain in vivo. J Neurochem. 109: 316-325.

Aracava Y, Pereira EFR, Maelicke A, Albuquerque EX, 2005. Memantine blocks α7* nicotinic acetylcholine receptors more potently than N-methyl-d-aspartate receptors in rat hippocampal neurons. J Pharmacol Exp The 312**:** 1195–1205.

Baran H, Jellinger K, Deecke L. 1999. Kynurenine metabolism in Alzheimer's desease. J Neural Transm. 106: 165-181.

Baran H, Staniek K, Kepplinger B, Gille L, Stolze K, Nohl H, 2001. Kynurenic acid influences the respiratory parameters of rat heart mitochondria. Pharmacology 62: 119-123.

Baran H, Staniek K, Kepplinger B, Stur J, Draxler M, Nohl H, 2003. Kynurenines and the respiratory parameters on rat heart mitochondria. Life Sci. 72: 1103-1115.

Basaga HS, 1990. Biochemical aspects of free radicals. Biochem Cell Biol 68: 989–998.

Beadle GW., Mitchell HK., Nyc JF. 1947. Kynurenine as an intermediate in the formation of nicotinic acid form tryptophane by Neurospora. Proc Natl Acad Sci U S A. Jun 15:155- 160.

Beal MF, Matson WR, Storey E, Milbury P, Ryan EA, Ogawa T, Bird ED. 1992 Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex. J Neurol Sci108:80–87

Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. 1994. Oxidative chemistry of peroxynitrite. Methods Enzymol. 233: 229–240.

Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. Educación Química. 17: 164-173.

Carpenedo R, Pittaluga A, Cozzi A, Attucci S, Galli A, Raiteri M. 2001. Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. Eur J Neurosci. 13: 2141–2147.

Carrillo-Mora P, Méndez-Cuesta LA, Pérez-De La Cruz V, Fortoul-van Der Goes TI, Santamaría A, 2010. Protective effect of systemic L-kynurenine and probenecid administration on behavioural and morphological alterations induced by toxic soluble amyloid beta (25-35) in rat hippocampus. Behav Brain Res. 210: 240-250.

Chakraborty H, Ray SN, Chakrabarti S. 2001. Lipid peroxidation associated protein damage in rat brain crude synaptosomal fraction mediated by iron and ascorbate. Neurochem Int. 39:311-317.

Chakraborty N, Tripathy BC. 1992. Involvement of singlet oxygen in 5-aminolevulinic acid-induced photodynamic damage of cucumber (Cucumbis sativus L.) chloroplasts. Plant Physiol. 98: 7–11.

Choe M, Jackson C, Yu BP. 1995. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. Free Radic Biol Med 18:977-984.

Choi JH, YU BP. 1995. Brain synaptosomal aging free radicals and membrane fluidity. Free Radic Biol Med 18:133-139.

Coto-Montes A, Zsizsik BK, Hardeland R. 2001. Kynurenic acid – not only an antioxidant: strong prooxidative interactions between kynurenic and δ-aminolevulinic acids under light exposure, in: Hardeland, R. (Eds.), Actions and Redox Propierties of Melatonine and other Aromatic Amino Acid Metabolites. Cuvillier, Göttingen, pp. 92-94.

Crow JP, Beckman JS. 1996. The importance of superoxide in nitric oxide-dependent toxicity: evidence for peroxynitrite-mediated injury. Adv Exp Med Biol. 387: 147-161.

Curzon G. 1996. Brain tryptophan. Normal and disturbed control. Adv Exp Med Biol 398: 27-34.

Eastman CL, Guiliarte TR. 1989. Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line. Brain Res 495: 225-231.

Ellinger A. 1904. Die entstehung der Kynurensäure. Z Physiol Chem. 43: 325-337

Erhardt S, Schwieler L, Emanuelsson C, Geyer M. 2004. Endogenous kynurenic acid disrupts prepulse inhibition. Biol Psychiatry 56: 255-260.

Floriano-Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sánchez-González DJ, Cárdenas-Rodríguez N., Pedraza-Chaverrí J, 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. Free Radic Res. 40: 523-533.

Fontana M, Mosca L, Rosei MA. 2001. Interaction of enkephalins with oxyradicals. Biochem Pharmacol. 6: 1253-1257.

Galano A, Macías-Ruvalcaba NA, Medina Campos ON, Pedraza-Chaverri J. 2010. Mechanism of the OH radical scavenging activity of nordihydroguaiaretic acid: a combined theoretical and experimental study. J. Phys Chem B. 114: 6625-6635.

Gigler G, Szenasi G, Simo A, Levay G, Harsing LGJr, Sas K, Vécsei L, Toldi J. 2007. Neuroprotective effect of l-KYNurenine sulfate administered before focal cerebral ischemia in mice and global cerebral ischemia in gerbils. Eur J Pharmacol. 564: 116–122.

Goda K, Kishimoto R, Shimizu S, Hamane Y, Ueda M. 1996. Quinolinic acid and active oxygens. Possible contribution of active oxygen during cell death in the brain. Adv Exp Med Biol 398: 247-254.

Goldstein LE, Leopold MC, Huang X, Atwood CS, Saunders AJ, Hartshorn M, Lim JT, Faget KY, Muffat JA, Scarpa RC, Chylack LT Jr, Bowden EF, Tanzi RE, Bush AI. 2000. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. Biochemistry 39:7266-7275.

Gramsbergen JB, Hodgkins PS, Rassoulpour A, Turski WA, Guidetti P, Schwarcz R. 1997. Brain-specific modulation of kynurenic acid synthesis in the rat. J Neurochem. 69:290-298.

Grune T, Davies KJ. 1997. Breakdown of oxidized proteins as a part of secondary antioxidant defenses in mammalian cells. Biofactors 6: 165-172.

Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R. 2004. Neostriataland cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntigton's desease. *Neurobio Dis* 17: 455-461

Guidetti P, Okuno E, Schwarcz R. 1997. Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II**.** J Neurosci Res. 50:457-465.

Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati Pj, Croitoru J, Brew BJ. 2001. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. J Neurochem 78: 842-853.

Gutteridge JM, Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci 15:129-135.

Halliwell B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end. Free Radic Res 31:261-272.

Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J 219:1-14.

Halliwell B, Gutteridge, J.M., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, third ed. Oxford Sciences Publication, Oxford, USA, 617–783.

Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Anal. Biochem. 165: 215–219.

Halliwell B, Gutteridge JM. 2001. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. USA. pp. 36-104.

Han Q, Robinson H, Cai T, Tagle DA, Li J. 2009. Biochemical and structural properties of mouse kynurenine aminotransferase III**.** Mol Cell Biol. 29:784-793.

Hardeland R, Zsizsik BK. 1997. Kynurenic acid as a free radical scavenger: Measurements of educt and product fluorescence and of light emission from an excited intermediate state, in: Hardeland, R. (Eds.), Biological Rhythms and Antioxidative Protection. Cuvillier, Göttingen, pp 153-160.

Hardeland R, Zsizsik BK, Poeggeler B, Fuhrberg B, Holst S, Coto-Montes A. 1999. Indole-3-pyruvic and -propionic acids, kynurenic acid, and related metabolites as luminophores and free-radical scavengers. Adv Exp Med Biol 467: 389-395.

Harris CM, Massey V. 1992. The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical. J Biol Chem 13:8370-8379.

Herrera-Mundo N, Sitges M. 2010. Mechanisms underlying striatal vulnerability to 3-nitropropionic acid. J Neurochem. 114: 597-605.

Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M, Dilling LA, Elia J, Kruesi MJ, Lackner A, Larsen SA, Lee K, Leonard HL, Markey SP, Martin A, Milstein S, Mouradian MM, Pranzatelli MR, Quearry BJ, Salazar A, Smith M, Strauss SE, Sunderland T, Swedo SW, Tourtellotte WW (1992) Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. Brain 115:1249–1273

Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. 2001. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. J Neurosci;21:7463–73.

Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. 2001. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. J. Neurosci. 21: 7463-73.

Hirata F, Hayaishi O. 1971. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction. J Biol Chem 246:7825-7826.

Hlinak Z, Krejci I. 2006. Spontaneous alternation behaviour in rats: kynurenic acid attenuated deficits induced by MK-801, Behav Brain Res 168: 144–149.

Horton AA, Fairhurst S. 1987. Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. CRC Crit Rev Toxicol 18:27-79.

Jauch D, Urbanska EM, Guidetti P, Bird ED, Vonsattel JP, Whetsell WO Jr, Schwarcz R. 1995. Dysfunction of brain kynurenic acid metabolism in Huntington's disease: focus on kynurenine aminotransferases. J Neurol Sci 130:39–47

Kemp JA, Foster AC, Leeson PD, Priestley T, Tridgett R, Iversen LL, Woodruff GN. 1988. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 6547-6550.

Kessler M, Terramani T, Lynch G, Baudry M.1989. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. J. Neurochem. 52: 1319-28.

Kehrer JP. 2000. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. Teratology 62:235-6.

Kim GW, Chan PH. 2002. Involvement of superoxide in excitotoxicity and DNA fragmentation in striatal vulnerability in mice after treatment with the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. J. Cereb. Blood Flow Metab. 22: 798–809.

Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EFJr. 1998. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. Environ. Health Perspect. 106: 289–295.

Knyiha´r-Csillik E, Csillik B, Pa´ka´ski M, Krisztin-Pe´va B, Dobo´ E, Okuno E, Ve´csei L. 2004. Decreased expression of kynurenine aminotransferase-I (KAT-I) in the substantia nigra of mice after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-etrahydropyridine (MPTP) treatment. Neurosci. 126:899–914

Kocha T, Yamaguchi M, Ohtaki H, Fukuda T, Aoyagi T. 1997. Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. Biochim Biophys Acta. 1337: 319-26.

Lapin IP. 1978. Convulsions and tremor in immature rats after intraperitoneal injection of kynurenine and its metabolites. Pharmacol Res Commun. 10:81-84.

Liebig J. 1853. Über kynurensäure. Justus Licbigs Ann Chem. 86: 125-6

Lindahl T, Wood RD. 1999. Quality control by DNA repair. Science 286: 1897-1905.

Long LH, Evans PJ, Halliwell B. 1999. Hydrogen peroxide in human urine: Implications for antioxidant defense and redox regulation. Biochem Biophys Res Commun. 262: 605–609.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193: 265-75.

Luchowski P, Luchowska E, Turski WA, Urbanska EM. 200. 1-Methyl-4-phenylpyridinium and 3-nitropropionic acid diminish cortical synthesis of kynurenic acid via interference with kynurenine aminotransferases in rats. Neurosci Lett 330:49–52.

MacDonald JF, Bartlett MC, Mody I, Pahapill P, Reynolds JN, Salter MW, Schneiderman JH, Pennefather PS. 1991. Actions of ketamine, phencyclidine and MK-801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurones. J Physiol. 432: 483-508.

Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R, Beal MF. 1998. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. J Neurosci. 18: 156–163.

May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. 1998. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by the thioredoxin reductasa. J Biol Chem 273:23039-23045.

McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. 1989. Neuroprotective effects of MK-801, TCP, PCP and CPP against N-methyl-D-aspartate induced neurotoxicity in an in vivo perinatal rat model. Brain Res 490: 33-40.

Miranda AF, Boegman RJ, Beninger RJ, Jhamandas K. 1997. Protection against quinolinc acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid. Neurosci. 78: 967–975.

Moroni L, Russi P, Carla V, Lombardi G. 1988. Kynurenic acid is present in the rat brain an dits content increases during development and aging processes. Neurosci Lett 94: 145-150.

Moroni F. 1999. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. Eur J Pharmacol. 375:87–100.

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Scie. 281: 1191-1193.

Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato E. 1991. Membrane damage due to lipid oxidation. Am J Clin Nutr. 53:2015-2055.

Nishikimi M, Appaji N, Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem Biophys Res Commun. 46:849-854.

Ogawa T, Matson WR, Beal MF. 1992 . Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. Neurol. 42: 1702-1706.

Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 1998. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. J Neurochem. 70: 299-307.

Okuno E, Kohler C, Schwarcz R. 1987. Rat 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase: purification from the liver and immunocytochemical localization in the brain. J Neurochem. 49:771-780.

Pang Z, Geddes JW. 1997. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. J Neurosci. 17: 3064-3073.

Parsons CG, Danysz W, Quack G, Hartmann S, Lorenz B, Wollenburg C, Baran L, Przegalinski E, Kostowski W, Krzascik P, Chizh B, Headley PM. 1997. Novel systemically active antagonists of the glycine site of the *N*-methyl-D aspartate receptor: electrophysiological, biochemical and behavioral characterization. J Pharmacol Exp Ther. 283:1264-1275

Parsons CG, Danysz W, Quack G. 1999. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. Neuropharm. 38:735-767.

Pavlica S, Gebhardt R. 2005. Protective effects of ellagic and chlorogenic acids against oxidative stress in PC12 cells. Free Radic Res. 39: 1377-1390.

Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macías-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, Castro L, Salcedo MI, Hernández-Pando R. 2004. S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo. BMC. Clin Pharmacol. 30: 4:1-5.

Pérez-De La Cruz V, Elinos-Calderón D, Carrillo-Mora P, Silva-Adaya D, Konigsberg M, Morán J, Ali SF, Chánez-Cárdenas ME, Pérez-De La Cruz G, Santamaría A. 2010. Time-course correlation of early toxic events in three models of striatal damage: modulation by proteases inhibition. Neurochem Int. 56: 834-842.

Pérez-De La Cruz V, Königsberg M, Santamaría A. 2007. Kynurenine pathway and disease: an overview. CNS Neurol Disord Drug. Targets 6: 398-410.

Perkins MN, Stone TW. 1982. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. Brain Res. 247: 184-187.

Poeggeler B, Rassoulpour A, Guidetti P, Wu HQ, Schwarcz R. 1998. Dopaminergic control of kynurenate levels and N-methyl-D-aspartate toxicity in the developing rat striatum. Dev Neurosci 20:146-153.

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

Powers SK, Lennon SL. 1999. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. Proc Nutr Soc. 58:1025-1033.

Prescott C, Weeks AM, Staley KJ, Partin KM. 2006. Kynurenic acid has a dual action on AMPA receptor responses. Neurosci Lett. 402:108–112.

Rassoulpour A, Wu HQ, Ferre S, Schwarcz R. 2005. Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum. J Neurochem. 93: 762-765.

Reinhard JFJr. 2004. Pharmacological manipulation of brain kynurenine metabolism. Ann NY Acad Sci. 1035: 335-349.

Rice-Evans C, Burdon R. 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. Prog Lipid Res. 32:71-110.

Robotka H, Sas K, Agoston M, Rozsa E, Szenasi G, Gigler G, Vécsei L, Toldi J. 2008. Neuroprotection achieved in the ischaemic rat cortex with l-kynurenine sulphate, Life Sci. 82: 915–919.

Rozsa E, Robotka H, Vecsei L, Toldi J. 2008. The Janus-faced kynurenic acid. J Neural Transm. 115:1087-1091.

Santamaría A, Rios C, Solis-Hernandez F, Ordaz-Moreno J, González-Reynoso S, Altagracia M, Krazov J. 1996. Systemic dl-KYNurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. Neuropharm 35: 23–28.

Santamaria A, Galvan-Arzate S, Lisy V, Ali SF, Duhart HM, Osorio-Rico L, Rios C, St'astny F. 2001. Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes. Neuroreport. 12: 871-874.

Santamaría A, Santamaría D, Diaz-Muñoz M, Espinoza-Gonzalez V, Rios C. 1997. Effects of N-omega-nitro-L-arginine and L-arginine on quinolinic acid-induced lipid peroxidation. Toxicol Lett. 93: 117-124.

Sas K, Robotka H, Rozsa E, Agoston M, Szenasi G, Gigler G, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Vécsei L, Toldi J, 2008. Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus, Neurobiol Dis. 32**:** 302–308.

Schaich KH. 1992. Metals and lipid oxidation. Lipids 27:209-218.

Schwarcz R, Pellicciari R. 2002. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. J. Pharmacol Exp Ther. 303: 1-10.

Schwarcz R, Whetsell WO, Mangano RM. 1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that causes axon-sparing lesions in rat brain. Science 219: 316-318.

Schwartz RF, Du W, Schmidt WA, Turski JPB, Gramsbergen E, Okuno RC, Roberts RC. 1992 Kynurenic acid: a potential pathogen in brain disorders. In: Langston, J.W. and Young, A. (Eds.), Neurotoxins and Neurodegenerative Disease. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 648, New York, pp. 140-153.

Soneja A, Drews M, Malinski T. 2005 Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. Pharmacol Rep. 57:108–119.

Stone TW. 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. Pharmacol Rev. 45:309-379.

Stone TW. 2000. Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection, Trends Pharmacol Sci. 21: 149–154.

Stone TW, Darlington LG. 2002. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. Nat Rev Drug Discov. 1: 609-20.

Thomas SR, Mohr D, Stocker R. 1994. Nitric oxide inhibits indoleamine-2,3-dioxigenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. J Biol Chem. 269: 14457-14464.

Triggs WJ, Willmore LJ. 1984. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe^{2+} injection. J Neurochem 42: 976-80.

Vamos E, Pardutz A, Klivenyi P, Toldi J, Vecsei L. 2009. The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection. J Neurol Sci. 283:21–27.

Vender AD. 1975. The kynurenine pathway of tryptophan catabolism. In John Wiley and Sons (Eds.), Aminoacid metabolism, John Wiley and Sons, USA pp 172-177.

Wu HQ, Rassoulpour A, Schwarcz R. 2007. Kynurenic acid leads, dopamine follows: a new case of volume transmission in the brain? J Neural Transm. 114: 33-41.

Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev 74:139-162.

Zádori D, Klivényi P, Vámos E, Fülöp F, Toldi J, Vécsei. 2009. Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. J Neural Transm. 116:1403-9.

Zentella M, Saldaña Y. 1996. Papel Fisiológico de los radicales libres. Bol Educ Bioquímica. 15:152-161.

Zsizsik BK, Hardeland R. 1999a. Comparative studies on kynurenic, xanhurenic, and quindalic acids as scavengers of hydroxyl and ABTS cation radicals.. Hardeland, R. (Eds.), Studies on Antioxidants and their Metabolites. Cuvillier, Göttingen, pp. 82-91.

Zsizsik BK, Hardeland R. 1999b. Kynurenic acid inhibits hydroxyl radical-induced destruction of 2-deoxyribose, in: Hardeland, R. (Eds.), Studies on Antioxidants and their Metabolites. Cuvillier, Göttingen, pp. 92-94.

Zsizsik BK, Hardeland R. 1999c. Indole-3-pyruvic and -propionic acids, kynurenic acid, and related metabolites as luminophores and free-radical scavengers. Adv Exp Med Biol 467: 389-395.

Zsizsik BK, Hardeland R. 2001a. A putative mechanism of kynurenic acid oxidation by free radicals: scavenging of two hydroxyl radicals and superoxide anion, release of •NO and CO_2, in: Hardeland, R. (Eds.), Actions and Redox Propierties of Melatonine and other Aromatic Amino Acid Metabolites. Cuvillier, Göttingen, 164-167.

Zsizsik BK, Hardeland R. 2001b. Chemiluminescence during oxidation of kynurenic acid and other quinolines in an alkaline H_2O_2 system free of iron catalysts: Profound kinetic differences to the hemin-catalyzed system, in: Hardeland, R. (Eds.), Actions and Redox Propierties of Melatonine and other Aromatic Amino Acid Metabolites. Cuvillier, Göttingen, 156-163.