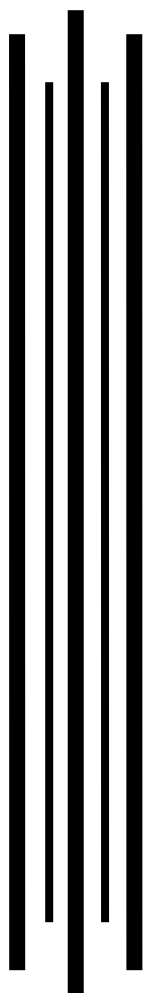




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



**LA CURCUMINA INDUCE UN ESTADO DE PROTECCIÓN,
EN UN MODELO DE NEURODEGENERACIÓN, MEDIANTE
LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

IVÁN CARMONA RAMÍREZ



MÉXICO, D. F.

2011



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: Dra. Perla Carolina Castañeda López

VOCAL: Dr. José Pedraza Chaverrí

SECRETARIO: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

1er SUPLENTE: Dra. María Elena Ibarra Rubio

2° SUPLENTE Dr. Euclides Ávila Chávez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral

ASESOR DEL TEMA

Dra. Perla D. Maldonado Jiménez

SUSTENTANTE

Iván Carmona Ramírez

SE AGRADECE A LA COMISIÓN COORDINADORA DE LOS INSTITUTOS NACIONALES DE SALUD Y HOSPITALES DE ALTA ESPECIALIDAD POR LA BECA PROBEI (PROGRAMA DE BECAS DE INICIO A LA INVESTIGACIÓN) OTORGADA AL ALUMNO DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

ESTE TRABAJO FUE PARCIALMENTE APOYADO POR UN DONATIVO DE CONACYT No.
103527 Y DE DGAPA PAPIIT No. IN201910

A mis papás

AGRADECIMIENTOS

Ha llegado el momento de culminar una etapa y con ello, el momento de cerrar círculos para ir labrando otros. Durante toda esta etapa hubo muchas personas que estuvieron presentes de una u otra forma en mi vida y que tras bambalinas estuvieron brindándome su apoyo. Sería muy egoísta de mi parte no agradecer a ustedes.

A *Dios* por permitirme llegar a esta etapa de mi vida. Por darme la familia y amigos que tengo y sobre todo, por permitirme vivir esta maravillosa vida.

A *mis papás*, los máximos pilares de mi existencia. Gracias por ser mis papás, por formarme de la manera que lo han hecho (que no les quepa la menor duda de ha sido la mejor). Gracias por todo su apoyo y cariño incondicional; recuerden que mis logros también son de ustedes.

A *mi hermana* por acompañarme en muchas aventuras, de las cuales muchas veces fuimos cómplices. No olvides que siempre estaré para apoyarte en lo que sea necesario. *Sayutzetzela*

A *mi hermano* porque me has enseñado otra forma de ver las circunstancias. Sé que es grande la distancia, pero también es grande el afecto.

Me considero una persona muy afortunada al tener tantos amigos, que si nombrará a todos y cada uno de ellos, este trabajo sería del doble de páginas...

Gracias a *la bandita* ya que aligeraron estudiar esta carrera y muchas veces la hicieron divertida; por orden de asiento: Andrea, Lulú, Diana, Alfredo, José Luis, Emmanuel, Paola, Pablo y Ulises. Hasta entonces banditios (Bn).

A *Laura* y *Dianita* porque muchas veces fueron mis confidentes y estuvieron dispuestas a apoyarme en todo momento.

A mis demás amigos de la Facultad, con los que curse alguna materia o algún laboratorio, y a aquellos con los que simplemente terminamos siendo amigos.

A la *UNAM*, a la *Facultad de Química* y a todos y cada uno de mis *profesores* que me formaron académicamente.

A la Dra. Perla Maldonado, gracias por tu apoyo y confianza a lo largo de todo este trabajo. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de tu equipo de trabajo.

Al Dr. Abel Santamaría por sus valiosos comentarios para el óptimo desarrollo de este trabajo, así como a la Dra. Juana Villeda y la Dra. Francisca Fernández por su gentil apoyo técnico.

A todos los integrantes del laboratorio de patología vascular (PVC's): a la Dra. María Elena, la Dra. Penélope, Silvia, Ricardo, Susana, Ana, Carlos, Frida, Emmanuel, Ricardo, Pepo, Juan y Martin. Gracias por hacer amena mi estancia en el laboratorio. Así como a otros integrantes del instituto como la Dra. Sonia Galván, la Dra. Victoria Campos, la Dra. Irma González, la Dra. Verónica Pérez de la Cruz y aquellos integrantes del laboratorio de Aminoácidos Excitadores.

Gracias

Por mi raza hablará el espíritu

México D. F., 2011

ABREVIATURAS

ARE	Elemento de respuesta antioxidante (<u>A</u> ntioxidant <u>R</u> esponse <u>E</u> lement)
CUR	Curcumina
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GSH/GSSH	Glutación reducido/oxidado
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Keap1	Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (<u>K</u> elch-like, erythroid cell derived protein with CNC homology (<u>E</u> CH)- <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein <u>1</u>)
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide-2 (<u>N</u> uclear factor-erythroid 2 (NF-E2)- <u>r</u> elated <u>f</u> actor <u>2</u>)
O₂	Oxígeno molecular
O₂⁻	Radical anión superóxido
OH[•]	Radical hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
QUIN	Ácido quinolínico
rNMDA	Receptores a N-metil-D-aspartato
SON	Sintasa de óxido nítrico

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
1. Enfermedades neurodegenerativas	3
2. Excitotoxicidad	5
2.1 Receptores de glutamato	6
2.2 El papel del Ca ²⁺	7
3. Estrés oxidante y nitrante	9
3.1 Radicales libres y especies reactivas	10
3.2 Reactividad del estrés oxidante	11
3.3 Reactividad del estrés nitrante	13
4. Curcumina	15
5. La vía Nrf2-ARE	18
6. El modelo experimental con ácido quinolínico	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVOS	24
1. Objetivo general	24
2. Objetivos particulares	24
VI. METODOLOGÍA	25
1. Materiales	25
2. Animales	25

3. Diseño del experimento	26
4. Prueba de conducta	27
5. Análisis histológico	27
6. Conteo celular	28
7. Determinación del contenido de grupos carbonilo	28
8. Tinción con fluoro-jade B para evaluar neurodegeneración	29
9. Nivel de Nrf2 por inmunofluorescencia	30
10. Análisis estadístico	30
VII. RESULTADOS	31
1. Conducta de rotación	31
2. Análisis histológico	32
3. Conteo celular	33
4. Contenido de grupos carbonilo	34
5. Determinación de la neurodegeneración	35
6. Nivel de Nrf2	37
VIII. DISCUSIÓN	40
IX. CONCLUSIONES	45
X. PERSPECTIVAS	45
XI. REFERENCIAS	46

I. RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo de padecimientos que se caracterizan por pérdida de la estructura y función neuronal, lo que afecta el comportamiento. Constituyen un problema de salud y además se espera que a mediano plazo se conviertan en una pandemia. Diversos mecanismos se han involucrado en el desarrollo de estos trastornos, dentro de los cuales se encuentran la excitotoxicidad y el estrés oxidante, entre otros. La excitotoxicidad se refiere al efecto tóxico de los aminoácidos excitadores, a través de los receptores glutamatérgicos, que ocasionan un incremento masivo en la concentración de Ca^{2+} intracelular para desencadenar la cascada excitotóxica, que consiste en la activación de diversas rutas enzimáticas que, además provoca un estado altamente oxidante y nitrante lo que finalmente lleva a la muerte celular. Las terapias neuroprotectoras se basan en la activación del sistema antioxidante endógeno, y esto puede ser logrado por la activación del factor de transcripción Nrf2; el cual bajo condiciones normales se inactiva por su represor Keap1, pero que en condiciones de estrés oxidante Keap1, libera a Nrf2 que se trasloca al núcleo e inicia la transcripción de genes que codifican para proteínas detoxificantes y antioxidantes. La curcumina (CUR) es un antioxidante polifenólico a la que se le atribuyen diversos efectos, entre ellos su capacidad de inducir al factor Nrf2; además, por su carácter lipofílico, puede atravesar la barrera hemato-encefálica. La administración intraestriatal de ácido quinolínico (QUIN) genera un modelo excitotóxico/pro-oxidante que reproduce algunas características conductuales, histológicas y morfológicas que caracterizan a los procesos neurodegenerativos. Debido a lo anterior, se evaluó la capacidad de la CUR para activar al factor de transcripción Nrf2 en el modelo con QUIN en ratas.

Los animales se trataron durante 10 días con CUR (400 mg/kg; *po*) y el último día recibieron la lesión intraestriatal con QUIN (240 nmol). El tratamiento con CUR fue capaz de prevenir la neurodegeneración (1 y 3 días post-lesión), el daño histológico (7

días post-lesión) y la conducta de rotación (6 días post-lesión) que se inducen en el modelo con QUIN. Además, previno el incremento en el nivel de proteínas oxidadas (6 h post-lesión). El efecto protector de la CUR podría estar asociado a su capacidad de inducir los niveles del factor Nrf2 desde los 30 min posteriores a la lesión intraestriatal, generando de esta forma un estado de protección. Además, es posible que el factor Nrf2 se encuentre inactivo en las enfermedades neurodegenerativas; similar a lo que ocurre en el modelo con QUIN, por lo que la modulación de este factor podría proponerse como un blanco terapéutico.

II. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo de desórdenes que se originan a partir de una lenta, sistemática e irreversible pérdida celular en distintas regiones del sistema nervioso central. Se caracterizan por una disfunción progresiva y pérdida de las sinapsis, así como de neuronas, en ciertas regiones vulnerables (Double *et al.*, 2010). Los trastornos crónico-neurodegenerativos representativos que constituyen un serio problema de salud son la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington y la Esclerosis Lateral Amiotrófica, ya que repercuten directamente sobre la calidad de vida del paciente, así como en la familia y los recursos sanitarios. Estas enfermedades se caracterizan porque afectan de forma directa procesos indispensables para el desarrollo humano, como lo son la memoria, la cognición, el lenguaje, la personalidad y los movimientos (Jellinger, 2009; Tarawneh y Galvin, 2010).

Cerca del 90% de estas enfermedades ocurren de forma espontánea, mientras que el 8–9% está relacionado con factores genéticos y sólo el 1–2% tienen un origen infeccioso. En las siguientes décadas se espera un considerable incremento en la prevalencia de estos padecimientos y se espera que por su incidencia, las enfermedades neurodegenerativas lleguen a constituir una pandemia (Tabla 1). Por ejemplo, se espera que para el año 2050 el número de casos de estas enfermedades ascienda a 100 millones de personas a nivel mundial. Esto implica que el costo anual del tratamiento de un paciente se incremente de 40 mil dólares a casi 200 mil millones de dólares (Danev y St Stoyanov, 2010). Hasta la fecha, no existen terapias adecuadas para la prevención o el tratamiento de estas enfermedades. La mayoría de las terapias se basa en tratar los síntomas, pero con un éxito moderado (Miksys y Tyndale, 2010).

Tabla 1. Prevalencia de las principales enfermedades neurodegenerativas a nivel mundial en el siglo XXI. EA: Enfermedad de Alzheimer; EP: Enfermedad de Parkinson; EH: Enfermedad de Huntington; ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica (Danev y St Stoyanov, 2010).

Enfermedad	2001	2025	2050
EA	4 000 000	10 000 000	20 000 000
EP	1 000 000	3 000 000	5 000 000
EH	30 000	60 000	100 000
ELA	20 000	40 000	100 000

Aunque el tipo y la localización de la degeneración celular es diferente en cada una de las enfermedades neurodegenerativas y a pesar de que no se ha logrado definir el mecanismo exacto por el cual ocurren estos desórdenes, existen diversos mecanismos que son compartidos entre estos trastornos, como lo son la agregación proteica, el estrés oxidante, la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial, la neuroinflamación, la disfunción del transporte axonal y neuronal y la muerte celular (Danev y St Stoyanov, 2010; Jellinger, 2009; Dong *et al.*, 2009; Fatokun *et al.*, 2008).

A pesar de que diversos mecanismos se encuentran involucrados en el proceso neurodegenerativo, se ha observado que la excitotoxicidad es fundamental ya que la activación de los receptores de glutamato desencadena una serie de eventos que inducen la producción de especies oxidantes y radicales libres, a través de enzimas y procesos dependientes de Ca^{2+} , generando un estado oxidante en el cerebro (Dong *et al.*, 2009; Fatokun *et al.*, 2008).

Las neuronas que expresan altos niveles de receptores a N-metil-D-aspartato (rNMDA) se pierden tempranamente en el estriado de individuos con alguna de las enfermedades neurodegenerativas (Dong *et al.*, 2009). El estriado es un componente clave de los ganglios basales y es un conjunto de interconexión del núcleo subcortical, que está involucrado en la forma de actuar en contextos particulares. El estriado está compuesto principalmente de neuronas GABAérgicas con dendritas que son cubiertas de espinas. Estas neuronas de proyección espinal pueden dividirse en base a su proyección axonal, tamaño dendrítico y fisiología, así como su expresión de receptores dopaminérgicos y liberación de péptidos; además desempeñan papeles complementarios en el control del movimiento y la selección de acciones. Tienen una incrementada conectividad así como una sinapsis altamente convergente con neuronas glutamatérgicas distribuidas en gran parte de la corteza cerebral y del tálamo (Eidelberg y Surmeier, 2011).

Por lo anterior, el estriado es una parte del cerebro muy importante ya que se encuentra involucrado en procesos fundamentales para el ser humano y que se encuentra alterado en los procesos neurodegenerativos.

2. Excitotoxicidad

Bajo condiciones normales, el glutamato es el principal neurotransmisor implicado en la percepción primaria y la cognición, generando una respuesta excitadora. Cuando los receptores de glutamato son sobreactivados, se produce un efecto tóxico sobre las células neuronales. A este proceso suele llamársele excitotoxicidad (Dong *et al.*, 2009).

2.1 Receptores de glutamato

Los efectos del glutamato son producidos mediante sus dos principales clases de receptores (Tabla 2): ionotrópicos (canales iónicos) y metabotrópicos (acoplados a proteínas G). Aunque el fenómeno excitotóxico puede producirse mediante cualquiera de estos tipos de receptores, los principalmente implicados en el daño excitotóxico y que reciben especial atención, son los rNMDA, nombrados así por su afinidad al NMDA. Estos receptores están implicados en diversos procesos, desde la lectura y la memoria, hasta la neurodegeneración (Dong *et al.*, 2009; Lau y Tymianski, 2010).

Tabla 2. Receptores de glutamato y subunidades que los constituyen. NMDA: N-metil-D-aspartato, AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato, KA: kainato.

RECEPTORES A GLUTAMATO						
Receptores Ionotrópicos			Receptores metabotrópicos			
NMDA	AMPA	KA	Grupo I	Grupo II	Grupo III	
NR1	GluR1	GluR5	mGluR1s	mGluR2s	mGluR4s	
NR2A	GluR2	GluR6	mGluR5s	mGluR3s	mGluR6s	
NR2B	GluR3	GluR7			mGluR7s	
NR2C	GluR4	KA1			mGluR8s	
NR2D		KA2				
NR3A						
NR3B						

Los rNMDA son heterotetrámeros compuestos por dos subunidades NR1 y dos NR2. Las dos subunidades NR1 forman el canal iónico y muestran todas las propiedades clásicas de los rNMDA: activación por glutamato, bloqueo por Mg^{2+} , inactivación por Zn^{2+} , activación por glicina, interacciones con poliaminas y sensibilidad al pH. Además de la unión a glutamato en las neuronas que expresan este tipo de receptores, es necesaria la despolarización para remover electrostáticamente al Mg^{2+} que suele obstruir el poro del canal iónico. Las subunidades NR2 tienen un papel más refinado y regulador en la función de los rNMDA, ya que modulan las características del canal iónico NR1 y se les ha atribuido una función específica en la arquitectura postsináptica. Recientemente, se ha demostrado la existencia de una tercera subunidad, NR3; la cual no es activada por NMDA o por glutamato, sino más bien provoca una respuesta excitadora, impermeable a Ca^{2+} a través de glicina (Heng *et al.*, 2009; Lau y Tymianski, 2010).

Los rNMDA se expresan en la mayoría de las neuronas centrales y son los principales responsables del daño neuronal debido a su alta permeabilidad a Ca^{2+} y a sus propiedades de conductancia. Una excesiva despolarización de la membrana postsináptica provoca la entrada de Na^+ , Cl^- , H_2O , pero sobre todo de Ca^{2+} , generando un desbalance osmótico que ocasiona la ruptura de las membranas celulares. La continua activación de un gran número de rNMDA, especialmente del subtipo NR1/NR2B, provoca un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y en la actividad de enzimas catabólicas, que desencadenan una cascada de eventos que dirigen a apoptosis o a necrosis (Dong *et al.*, 2009; Sheldon y Robinson, 2007; Lau y Tymianski, 2010).

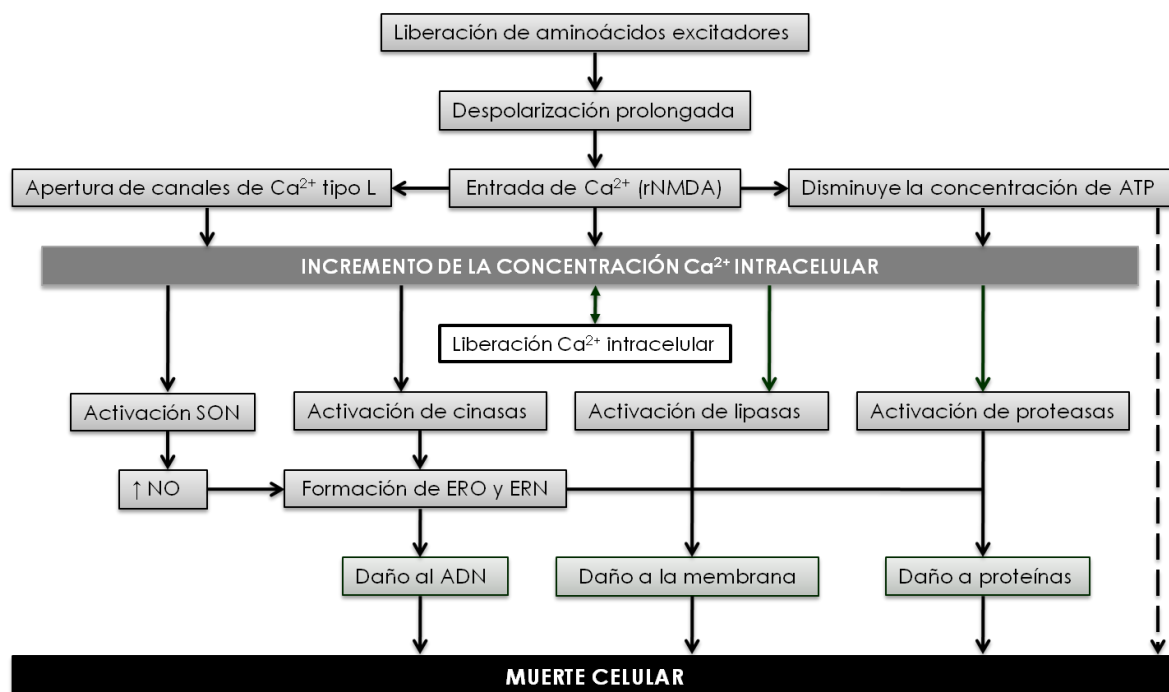
2.2 El papel del Ca^{2+}

La homeostasis del Ca^{2+} y su señalización regulan múltiples funciones neuronales, que incluyen la transmisión sináptica, la plasticidad y la sobrevivencia celular. Bajo condiciones normales la activación de las neuronas presinápticas

ocasiona la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico a través de procesos dependientes de Ca^{2+} . La liberación de neurotransmisores activa receptores membranales en las neuronas contiguas para iniciar la transmisión de señales. El Ca^{2+} es indispensable para diversos procesos fisiológicos ya que actúa como segundo mensajero activando diferentes vías y procesos, pero un incremento en su concentración intracelular resulta en un efecto tóxico. El incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular puede ser mediado por estímulos eléctricos o a través de receptores para desencadenar una serie de señales (Araújo *et al.*, 2010; Zündorf y Reiser, 2011).

En cuanto a la excitotoxicidad se refiere, los rNMDA son altamente permeables a este catión, por lo que una sobreactivación de dichos receptores ocasiona un incremento en la concentración intracelular del Ca^{2+} (Wojda *et al.*, 2008). Además, la sobreactivación provoca despolarización membranal, lo que ocasiona la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L. Cuando se ha incrementado el nivel intracelular de Ca^{2+} , éste puede activar a los receptores de rianodina y de inositol-1,4,5-trifosfato en el retículo endoplásmico que liberan aún más Ca^{2+} ; por otro lado, se estimulan los uniportadores de Ca^{2+} de la mitocondria para intentar restaurar los niveles de este segundo mensajero. Pero cuando hay una acumulación excesiva de este ion en la mitocondria, se induce la formación del poro de transición de membrana lo que provoca el colapso del potencial membranal (Pivovarova y Andrews, 2010).

Todos estos eventos moleculares incluyen una serie de trasducción de señales relacionadas principalmente con cascadas de fosforilación. La cascada de señalización es diversa y activa diferentes proteínas, tales como cinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina, proteína cinasa C, proteína cinasa A, endonucleasas, fosfolipasas, proteasas como la calpaina y la caspasa-3 (Araújo *et al.*, 2010), y otras enzimas como la poli (ADP-ribosa) y la sintasa de óxido nítrico (SON). Algunas de las cascadas de señalización propagadas en el citoplasma pueden llegar



Esquema 1. Principales procesos desencadenados durante el daño excitotóxico. rNMDA: receptores a N-metil-D-aspartato; SON: sintasa de óxido nítrico; NO: óxido nítrico; ERO/ERN: especies reactivas de oxígeno/nitrógeno.

al núcleo y afectar la transcripción de genes. A su vez, la pérdida del potencial de membrana de la mitocondria provoca desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, deficiencia energética, liberación del citocromo c y de proteínas pro-apoptóticas (Pivovarova y Andrews, 2010; Zündorf y Reiser, 2011). Todos estos mecanismos resultan en la producción de especies reactivas y de radicales libres, generando un estado oxidante, y eventualmente culminan en la activación de la señalización de muerte celular (Araújo *et al.*, 2010; Pivovarova y Andrews, 2010; Zündorf y Reiser, 2011) (Esquema 1).

3. Estrés oxidante y nitrante

El estrés oxidante es un proceso que está íntimamente relacionado con los procesos degenerativos y se refiere al desbalance entre los sistemas oxidantes y

antioxidantes presentes en el organismo (Tabla 3), a favor de los primeros (Esquema 2), lo que provoca la producción de especies reactivas y de radicales libres, que tienen la capacidad de dañar biomoléculas (Fatokun *et al.*, 2008; Duracková, 2010).

3.1 Radicales libres y especies reactivas

Aunque el término especie reactiva se usa indistintamente del término radical libre, esto es un error, ya que ambas sustancias mantienen diferencias entre sí. Los *radicales libres* son iones y moléculas capaces de existir en forma independiente, con uno o más electrones desapareados. Son químicamente reactivos y tienden a tomar electrones o átomos de hidrógeno de moléculas vecinas para ganar estabilidad, desatando así reacciones en cadena (Fatokun *et al.*, 2008).

Tabla 3. Principales componentes del sistema de defensa antioxidante.

Enzimáticos	No enzimáticos
NADPH:quinona oxidoreductasa 1	Glutati3n reducido
UDP-glucuronosil transferasa	Vitamina C
Glutati3n transferasa	Vitamina E
Glutati3n reductasa	Compuestos de selenio
Glutati3n peroxidasa	Ácido lipo3ico
Catalasa	Ubiquinonas
Super3xido dismutasa	

Mientras que el término *especies reactivas* se refiere a sustancias dentro de las que se incluyen los radicales libres y aquellas que no son radicales, pero que se caracterizan principalmente por estar incompletamente reducidas, por lo que son altamente reactivas. Dentro de estas se pueden incluir a las *especies reactivas de oxígeno* (ERO) y *de nitrógeno* (ERN) (Jones, 2008; Sayre *et al.*, 2008; Golden y Patel, 2009; Duracková, 2010). De esta forma, un radical libre es una especie reactiva, pero no necesariamente se cumple a la inversa.

Generalmente, las especies reactivas y los radicales son necesarios porque están involucrados en la señalización celular, pero cuando se producen en exceso y bajo ciertas circunstancias, se vuelven tóxicos para el organismo generando daño y muerte celular (Fatokun *et al.*, 2008; Duracková, 2010). Tanto los radicales libres como las ERO y ERN están implicadas en generar daño oxidante y nitrante en los procesos neurodegenerativos y se consideran la principal consecuencia directa del proceso excitotóxico (Dong *et al.*, 2009).

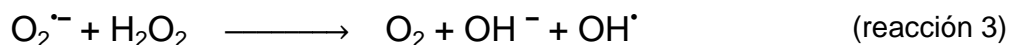
3.2 Reactividad del estrés oxidante

La mitocondria es el principal organelo que genera ERO, se estima que del 2–4% del oxígeno (O_2) que se consume durante la fosforilación oxidativa, es convertido a ERO. La principal ERO que se produce es el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a través de la reducción del O_2 en la cadena transportadora de electrones. El $O_2^{\cdot-}$ también puede ser producido por algunas oxidasas (NADPH oxidasa, xantina oxidasa, etc.) (Fatokun *et al.*, 2008; Sayre *et al.*, 2008). El $O_2^{\cdot-}$ tiene un tiempo de vida media muy corto, del orden de nanosegundos, y carece de la capacidad para penetrar las membranas lipídicas, por lo que se confina al compartimento donde es producido. El $O_2^{\cdot-}$ se somete a la acción de la superóxido dismutasa (SOD) quien cataliza su dismutación a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y O_2 (Fatokun *et al.*, 2008; Golden y Patel, 2009).

El H₂O₂ no es un radical libre y es producido del 1-4% del O₂ total consumido (Jones, 2008), su tiempo de vida media es del orden de segundos y tiene la capacidad de atravesar las membranas lipídicas. Además es capaz de reducir a iones metálicos como el Fe³⁺ o el Cu²⁺ (quienes generalmente se encuentran unidos a complejos proteícos) a través de la reacción de Haber-Weiss, empleando la química de Fenton (Reacciones 1, 2 y 3). El resultado de estas reacciones es la formación del radical hidroxilo (OH[•]). Esta vía se considera el principal mecanismo por el cual se genera dicho radical (Fatokun *et al.*, 2008; Kehrer, 2000).



Reacción de Fenton



Reacción neta (Haber-Weiss)

El OH[•] tiene un tiempo de vida media del orden de nanosegundos y es considerado el más reactivo y tóxico de las ERO (Sayre *et al.*, 2008). En teoría, el 50% del daño molecular mediado por radicales libres es consecuencia directa del OH[•] (Fatokun *et al.*, 2008).

Los ácidos grasos poliinsaturados son característicamente susceptibles al daño oxidante debido a la presencia de un enlace C-H bis-alílico particularmente débil (Sayre *et al.*, 2008), de esta forma el OH[•] al ser altamente reactivo, puede tomar un

átomo de hidrógeno para ganar estabilidad, generando en el ácido graso un radical peroxilo y permitiendo la propagación de un proceso de auto-oxidación conocido como lipoperoxidación (Sayre *et al.*, 2008; Duracková, 2010). Como resultado de este proceso se generan hidroperóxidos inestables que sufren ruptura y son reducidos a aldehídos, como el 4-hidroxinonenal y el malondialdehído, principalmente. Estos aldehídos modifican rápidamente a proteínas y al ADN, lo que incrementa la vulnerabilidad a mutaciones genéticas y alteraciones en la transcripción (Kehrer, 2000). Se han encontrado niveles incrementados de marcadores de lipoperoxidación en diferentes procesos neurodegenerativos (Praticò, 2008; Zhou *et al.*, 2008; Baillet *et al.*, 2010).

Si la oxidación de los lípidos de membrana es extensa, la neurotoxicidad puede surgir derivada en parte de la función comprometida de la membrana, ya que ocurren cambios en la estructura, en la función y en la permeabilidad, disminuyendo la fluidez de la membrana e incrementando el daño a proteínas de membrana e inactivación de receptores, enzimas y canales iónicos (Sayre *et al.*, 2008; Fatokun *et al.*, 2008)

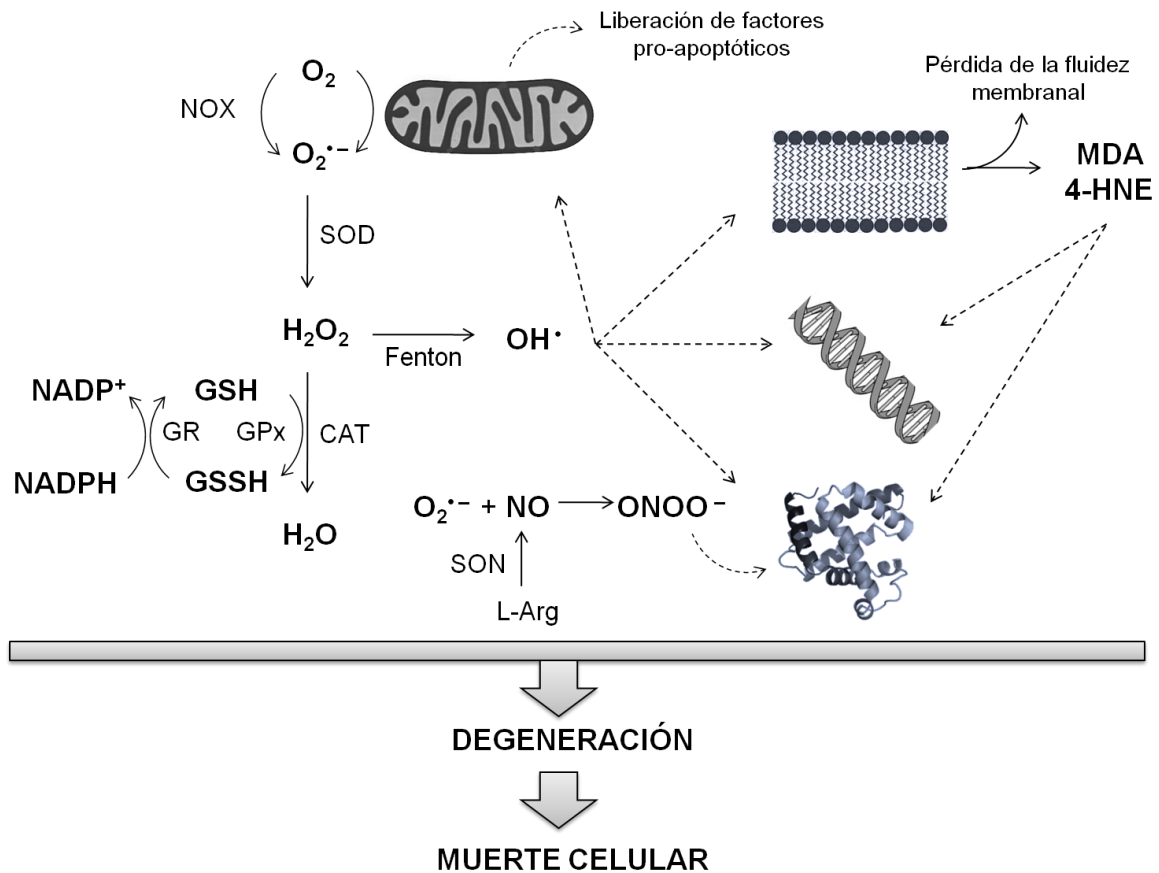
Debido a la α,β -insaturación, dichos aldehídos pueden formar reacciones de adición, generando aductos, especialmente en las cadenas laterales de residuos de histidina y cisteína, incrementando la cantidad de grupos carbonilo en las proteínas. Estas proteínas oxidadas son funcionalmente inactivas y rápidamente son removidas debido a que aparentemente no existen sistemas de reparación de proteínas y algunas otras gradualmente se van acumulando contribuyendo al daño neurodegenerativo (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

3.3 Reactividad del estrés nitrante

Las ERN, algunas de las cuales son radicales, son igualmente una fuente de daño celular cuando se presentan en cantidades excesivas, debido a que inducen un estado de estrés nitrante. El óxido nítrico (NO) es un gas que se sintetiza a partir de la

acción catalítica de la SON sobre la L-arginina y actúa como un neurotransmisor en el sistema nervioso central. Existen tres isoformas de la SON: la neuronal (nSON), la endotelial (eSON) y la inducible (iSON); la nSON es predominantemente activa en neuronas centrales y periféricas cuando la producción de NO es importante para la comunicación celular y su activación es dependiente de Ca^{2+} . Debido a que el NO es un gas, no se almacena en las vesículas sinápticas, por lo que es sintetizado por las neuronas dependiendo de la demanda (Knott y Bossy-Wetzel, 2009; Brown, 2010).

El incremento intracelular de Ca^{2+} como consecuencia de la prolongada despolarización de los rNMDA, ocasiona la activación de la nSON para generar NO.



Esquema 2. Mecanismos de generación de especies reactivas y principales formas de daño. O_2 : oxígeno molecular; $\text{O}_2^{\bullet -}$: radical anión superóxido; NOX: NADPH oxidasa; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; GSH/GSSG: glutatión reducido/oxidado; GR: glutatión reductasa; GPx: glutatión peroxidasa; CAT: catalasa; OH^{\bullet} : radical hidroxilo; L-arg: L-arginina; SON: sintasa de óxido nítrico; NO: óxido nítrico; ONOO^- : peroxinitrito; MDA: malondialdehído; 4-HNE: 4-hidroxinonenal.

Éste puede reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ para generar peroxinitrito ($ONOO^-$). Esta reacción es tres veces más rápida que la catalizada por la SOD (Fatokun *et al.*, 2008). Cerca del 15% de $O_2^{\cdot-}$ que se produce en la mitocondria es convertido a $ONOO^-$ y su formación induce la liberación del citocromo c (Knott y Bossy-Wetzel, 2009). Por otro lado, el $ONOO^-$ puede promover la fragmentación del ADN por daño oxidante o puede reaccionar con residuos de tirosina de las cadenas laterales de proteínas. Cuando se produce esta reacción se genera la 3-nitrotirosina que inhibe la fosforilación por tirosin-cinasas, alterando esta vía de trasducción de señales (Knott y Bossy-Wetzel, 2009).

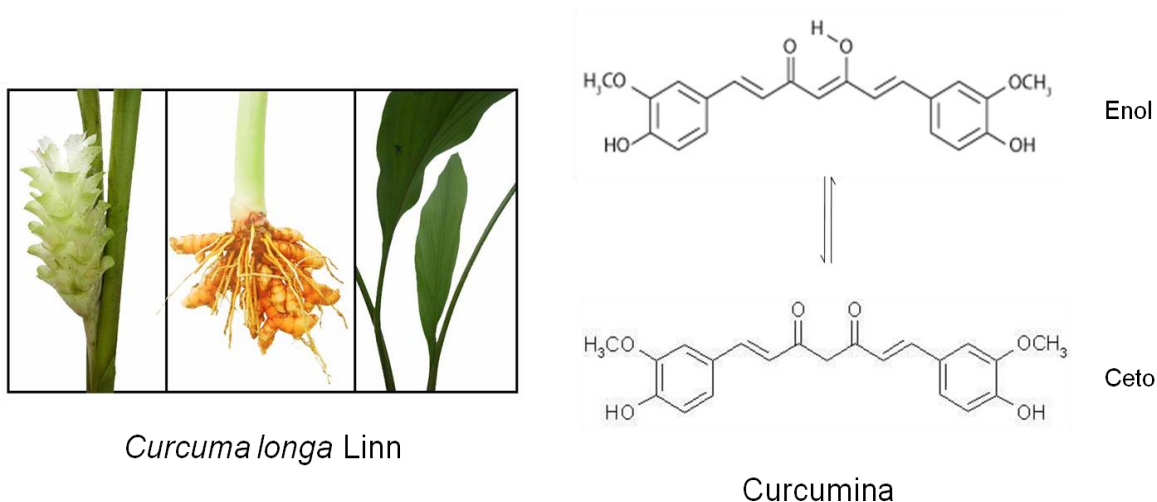
Todos estos procesos convergen en el daño a macromoléculas y en la alteración de las vías de trasducción de señales, que dependiendo de la magnitud, dirigen a muerte celular por apoptosis o por necrosis (Fatokun *et al.*, 2008) (Esquema 2).

El cerebro es particularmente vulnerable al estrés oxidante debido a que tiene un elevado consumo de O_2 (20% del normal basal), presenta grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados y de otras moléculas susceptibles al daño oxidante, tiene altas concentraciones de metales de transición que favorecen la reacción de Fenton, tiene bajas cantidades de antioxidantes y una baja capacidad de regeneración (Fatokun *et al.*, 2008). Todo esto justifica que las terapias neuroprotectoras puedan ser a base del tratamiento con antioxidantes.

4. Curcumina

La curcumina (CUR) es un compuesto derivado del rizoma de la planta *Curcuma longa* Linn (Esquema 3) de la familia Zingiberaceae, a la que se le conoce popularmente como turmérico. Esta especie ha sido ampliamente usada como condimento, saborizante y remedio tradicional en registros que datan desde los años

600 aC: está registrada en la antigua escritura hindú, el Ayurveda. Los extractos de *C. longa* L. contienen diferentes tipos de compuestos como son turmerina (un péptido hidrosoluble), turmeronas, atlantonas y zingiberenonas (aceites esenciales), curcumina, desmetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina (curcuminoides) (Sharma *et al.*, 2005; Pari *et al.*, 2008).



Esquema 3. Estructura química de la curcumina obtenida del rizoma de *C. longa* L.

La CUR [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona] es un polifenol de bajo peso molecular, que fue caracterizado químicamente en 1910 y se considera como el principal componente activo, ya que comprende del 2–8% del turmérico (Lin *et al.*, 2000). Su estructura química es una β -dicetona α,β -insaturada y existe en equilibrio con su tautomero enol (Esquema 3) (Sharma *et al.*, 2005). Además de ser fotosensible, se degrada en forma pH dependiente a *trans*-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexanal, como compuesto mayoritario y en menor proporción a ácido ferúlico, feruloilmetano y vainillina (Sharma *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2000). Su mayor estabilidad es a pH ácido.

En los estudios farmacocinéticos, los cuales están enfocados en sus efectos anticancerígenos, se ha encontrado que la CUR presenta una baja biodisponibilidad debido a que está sujeta a metabolismo, sobre todo por reacciones de glucuronidación y sulfatación (Ireson *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2004). La administración oral de CUR es bien tolerada a altas dosis y no se han indicado reacciones adversas o efectos colaterales (Pari *et al.*, 2008). Por otro lado, cuando es administrada con piperina, se incrementa su biodisponibilidad por la potencial inhibición de la glucuronidación (Bisht y Maitra, 2009). Debido a que es altamente lipofílica, tiene la capacidad de atravesar la barrera hemato-encefálica (Yang *et al.*, 2005).

Los efectos que se le han atribuido a la CUR son diversos y muy variados, como son inhibición de la carcinogénesis, inducción de apoptosis en células tumorales, actividad antiinflamatoria, inhibición de la agregación plaquetaria y de la lipoperoxidación, entre otros. Su propiedad antioxidante se debe a que es un potente atrapador de especies reactivas que incluyen $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , NO y $ONOO^-$ (Lin *et al.*, 2000) y son principalmente debidas a la presencia de los grupos hidroxilo de los anillos aromáticos (Priyadarsini *et al.*, 2003). Se ha demostrado su propiedad como antioxidante directo, siendo más potente que la vitamina E (M Khopde *et al.*, 1999). Además, se ha descrito un efecto neuroprotector en modelos de excitotoxicidad (Ataie *et al.*, 2010), isquemia cerebral (Yang *et al.*, 2009), enfermedad de Alzheimer (Begum *et al.*, 2008), entre otros.

Molecularmente, la CUR modula la actividad de ciertas proteínas de detoxificación como lo es la γ -glutamilcisteína ligasa la cual es la enzima limitante en la síntesis del glutatión (GSH), el principal antioxidante no enzimático; así como de ciertos factores de transcripción, dentro de los que se incluyen el factor nuclear κB (NF- κB), p53, Nrf-2, entre otros (Pari *et al.*, 2008). En particular, se ha observado en modelos de cultivos celulares que la CUR tiene la capacidad de inducir al factor Nrf-2 (Nishinaka *et al.*, 2007), aunque no se conoce el mecanismo exacto de cómo lo hace.

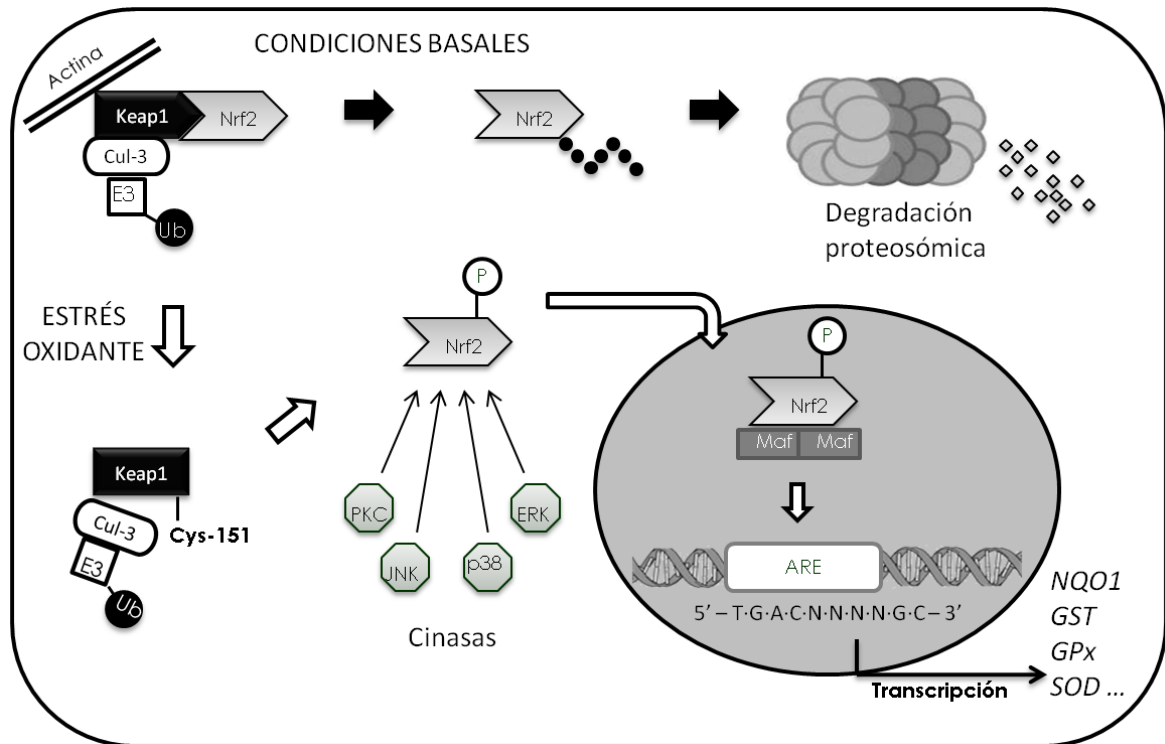
5. La vía Nrf2-ARE

El factor de transcripción *factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide-2* (Nrf2, Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)- related factor 2) fue descrito y caracterizado por primera vez en 1994, donde se observó que se encuentra ampliamente distribuido a diferentes niveles y en diversos órganos, sobre todo se expresa a mayores niveles en el riñón y en menor proporción en el cerebro (Moi *et al.*, 1994). El Nrf2 es un regulador maestro de la transcripción de genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes; es un factor de transcripción constituido por un cierre de leucinas básico (bZIP, basic leucine zipper) que contiene un dominio ácido de activación transcripcional, presenta un tiempo de vida media aproximado de 20 min (Kensler *et al.*, 2007).

Bajo condiciones normales, el Nrf-2 es secuestrado en el citoplasma por la *proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch* (Keap1, Kelch-like, erythroid cell derived protein with CNC homology (ECH)-assoiated protein 1) a través de la interacción del dominio Kelch de Keap1 y el dominio Neh2 de Nrf-2. Keap1 por un lado, se mantiene unido a la actina del citoesqueleto para retener con mayor fuerza al Nrf2, y por otra parte, ubiquitina al Nrf2 en diferentes residuos de lisina (Lys-44, 50, 52, 56, 64 y 68) a través de la ubiquitin-ligasa-E3 culina-3 (Cul-3), dirigiéndolo a degradación proteosómica. Keap1 presenta diferentes residuos de cisteína conservados (25 residuos en el ratón y 27 residuos en el humano) y en particular 3 residuos son altamente reactivos y los más importantes: Cys-151, Cys-273 y Cys-288 (Kensler *et al.*, 2007; Sekhar *et al.*, 2010).

Un cambio en los residuos de cisteína en las posiciones 273 y 288, inhiben la capacidad de Keap1 para dirigir la ubiquitinación de Nrf2; mientras que un cambio del residuo Cys-151, el sitio de unión a Cul-3, ocasiona un cambio conformacional en Keap1 que provoca la liberación de Nrf2 (Sekhar *et al.*, 2010). Una vez que es liberado, el Nrf2 es fosforilado por alguna cinasa (ERK, PI3K, JNK, PKC, p38) y entonces puede traslocarse al núcleo para conjugarse con pequeñas proteínas Maf y unirse a una secuencia específica del ADN denominada *elemento de respuesta antioxidante* (ARE, Antioxidant Response Element), un elemento regulatorio que

actúa en cis (*cis*-acting) y que se encuentra en 5' de la región promotora de genes que codifican para proteínas destoxicantes y antioxidantes (Esquema 4) (Surh, 2003; Kensler *et al.*, 2007; Sekhar *et al.*, 2010).



Esquema 4. Vía de señalización de Nrf2-ARE. En condiciones basales (flechas negras) el Nrf2 es ubiquitinado por el dominio Cul-3 de Keap1, dirigiéndolo a degradación proteosómica. Bajo ciertas circunstancias, como en condiciones de estrés oxidante (flechas blancas), se genera un cambio en el residuo Cys-151 lo que origina un cambio conformacional en Keap1 y ocasiona la liberación de Nrf2, el cual es fosforilado por alguna cinasa para ser traslocado al núcleo y conjugarse con proteínas Maf para unirse al elemento de respuesta antioxidante (ARE) y estimular la transcripción de genes que codifican para proteínas antioxidantes y destoxicantes.

Se ha observado que la expresión de Nrf2 tiene un papel determinante en la protección celular neuronal (Shih *et al.*, 2005) y que se expresa en astrocitos para proteger a las neuronas del estrés oxidante (Kraft *et al.*, 2004) mediante la inducción de la transcripción de enzimas destoxicantes, proteínas relacionadas con el glutatión,

proteínas antioxidantes, enzimas productoras de NADPH y anti-inflamatorias, las cuales son vitales para el mantenimiento y la respuesta del sistema de defensa celular (Lee *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha reportado la posibilidad de que la ubicación de Nrf2 sea nuclear más que citoplásmica y que la interacción con Keap1 sea un evento transitorio regulado espacial y temporalmente (Nguyen *et al.*, 2009). Sin embargo, lo que es un hecho es que Nrf2 debe localizarse nuclearmente para poder ejercer la transcripción de proteínas detoxificantes y antioxidantes mediante su unión con ARE. Debido a que las enfermedades neurodegenerativas están estrechamente relacionadas con el estrés oxidante, la manipulación de esta vía puede significar un potencial blanco terapéutico.

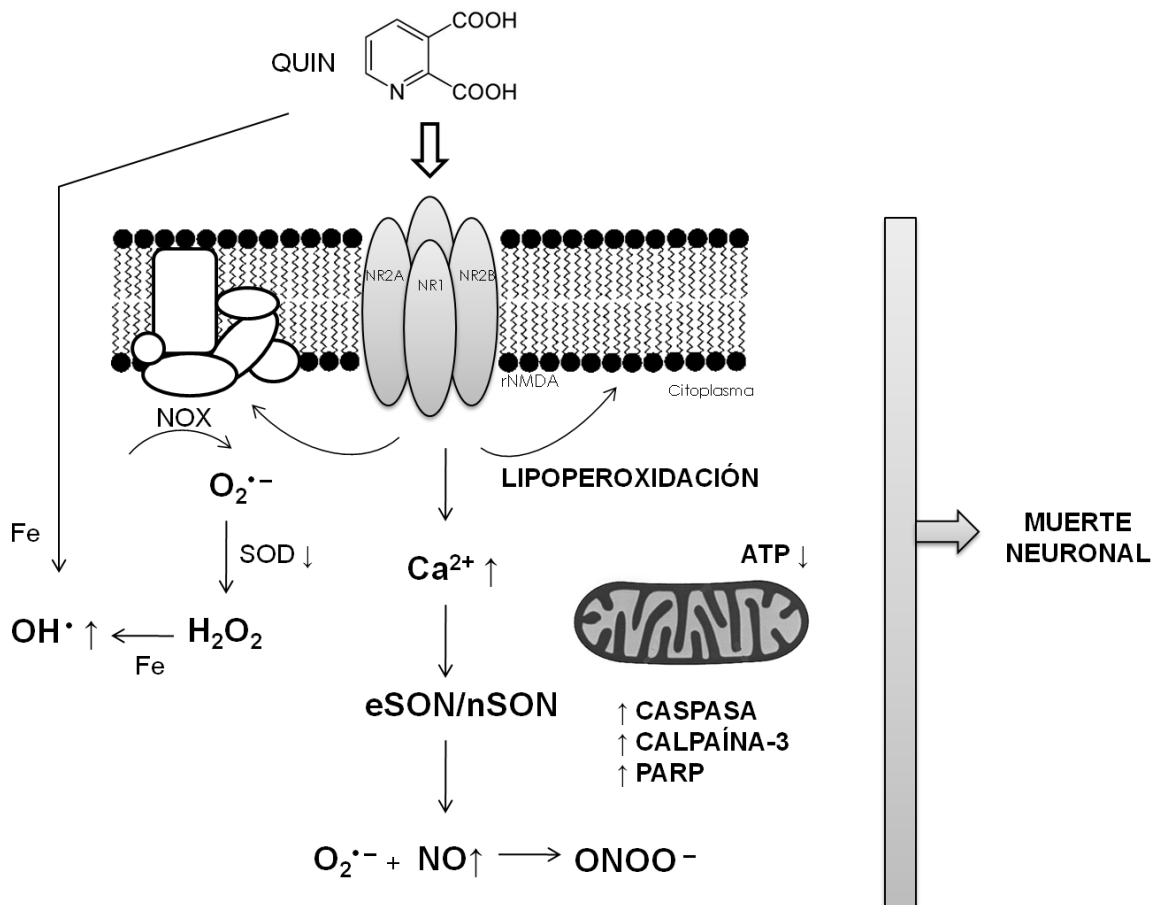
6. El modelo experimental con ácido quinolínico

La vía de la kinurenina es la principal ruta del catabolismo del triptófano y es la principal responsable de la producción de NAD⁺ y NADP⁺. Se han encontrado alteraciones en esta ruta en diferentes enfermedades neurodegenerativas. El compuesto central de esta vía es la L-kinurenina que puede seguir su metabolismo mediante dos rutas a ácido kinurénico o a 3-hidroxi-L-kinurenina y a ácido quinolínico (QUIN) (Zádori *et al.*, 2009).

El QUIN (ácido 2,3-piridín-dicarboxílico) es considerado como una neurotoxina endógena agonista de los rNMDA, sobre todo de aquellos conformados por las subunidades NR2A y NR2B, que ocasiona lesiones excitotóxicas en el cerebro, ya sea por una activación directa de los rNMDA, o bien por la inhibición de la recaptura del glutamato endógeno. Diferentes estudios han puesto de manifiesto el papel de esta neurotoxina, ya que se ha demostrado que actúa como un agonista selectivo de los rNMDA ocasionando despolarización membranal y con ello la entrada de Ca²⁺ a

las neuronas para generar un perfil altamente oxidante y nitrante; mismos mecanismos que se encuentran íntimamente involucrados en los trastornos neurodegenerativos (Zádori *et al.*, 2009; Sheldon y Robinson, 2007; Braiudy *et al.*, 2009; Schwarcz *et al.*, 2010).

La administración intraestriatal de QUIN en ratas provoca un incremento en la lipoperoxidación (Santamaría y Rios, 1993), activa la eSON/nSON (Aguilera *et al.*, 2007) y genera altos niveles de OH^\bullet (Santamaría *et al.*, 2001), lo que lleva a la formación de ONOO^- ocasionando la fragmentación del ADN (Pérez-de la Cruz *et al.*, 2005). Por otro lado, provoca desbalance del sistema antioxidante endógeno, sobre



Esquema 5. Mecanismos implicados en el modelo experimental con ácido quinolínico (QUIN). NOX: NADPH oxidasa; SOD: superóxido dismutasa; Fe: hierro; PARP: poli (ADP-ribosa); $\text{O}_2^{\bullet-}$: radical anión superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; OH^\bullet : radical hidroxilo; eSON/nSON: sintasa de óxido nítrico endotelial/inducible; NO: óxido nítrico; ONOO^- : peroxinitrito.

todo ocasiona la disminución en los niveles de GSH (Cruz-Aguado *et al.*, 2000; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2000), disminuye la actividad de la SOD (Pérez-de la Cruz *et al.*, 2005) e incrementa la actividad de la NADPH oxidasa, por un mecanismo dependiente de los rNMDA, para generar $O_2^{\cdot-}$ (Maldonado *et al.*, 2010). A nivel mitocondrial, ocasiona una disminución del consumo de O_2 , para reducir así los niveles de ATP y NAD^+ , así como de las concentraciones de aspartato y glutamato (Bordelon *et al.*, 1997).

Todos estos mecanismos generan un elevado daño por especies reactivas (Esquema 5), que junto con la activación de los mecanismos dependientes de Ca^{2+} (Pérez-de la Cruz *et al.*, 2008) a través de la activación de los rNMDA, ocasionan el daño a biomoléculas. Además, el QUIN incrementa los productos de glucosilación avanzada, quienes activan la señalización mediada por NF- κ B (Cuevas *et al.*, 2010), e incrementa la actividad de la caspasa-3 (Pérez-de la Cruz *et al.*, 2005) y de la poli (ADP-ribosa) (Maldonado *et al.*, 2007) para culminar en la muerte celular por apoptosis y necrosis.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En años subsecuentes se espera un considerable incremento en la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas, tanto que podrían llegar a constituir una pandemia. Hasta la fecha no existen terapias eficaces en la prevención o en el tratamiento de dichos padecimientos. Se han realizado numerosos estudios para describir el mecanismo exacto por el cual ocurren estos trastornos y aunque no se han logrado definir con certeza, se han encontrado diversos procesos que mantienen en común, dentro de los que destacan la excitotoxicidad y el estrés oxidante.

El daño oxidante es la principal consecuencia directa de la excitotoxicidad y en virtud de que puede alterar los mecanismos de señalización y ocasionar la muerte neuronal, una de las terapias neuroprotectoras se basa en la activación del sistema antioxidante endógeno, lo cual puede ser posible mediante la activación del factor de transcripción Nrf2, regulador maestro de genes que codifican para proteínas antioxidantes y detoxificantes.

Determinados eventos y compuestos tienen la capacidad de inducir la activación de dicho factor de transcripción, dentro de los cuales destacan algunos compuestos naturales, como es el caso de la CUR. Este compuesto, además tiene la capacidad de atravesar la barrera hemato-encefálica, principal inconveniente de la terapia neuroprotectora. Por lo anterior, se decidió determinar el papel neuroprotector de la CUR en el modelo experimental con QUIN, quien además de generar daño excitotóxico, se ha observado que induce un elevado daño oxidante.

Con esto se pretende desarrollar nuevas terapias dirigidas a la prevención de las enfermedades neurodegenerativas, sobre todo, aquellas relacionadas con el proceso excitotóxico y el estrés oxidante y nitrante.

IV. HIPÓTESIS

Si la CUR es capaz de activar al factor de transcripción Nrf2, entonces esto inducirá un estado de protección antioxidante que prevenga el daño excitotóxico/pro-oxidante que se induce en el modelo experimental con QUIN.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de la CUR para prevenir el daño excitotóxico/pro-oxidante que se genera en el modelo experimental con QUIN.

2. Objetivos particulares

2.1 Evaluar el efecto de la CUR sobre las alteraciones conductuales que se producen por la infusión intraestriatal con QUIN.

2.2 Evaluar el efecto de la CUR sobre las alteraciones histológicas inducidas por la administración intraestriatal de QUIN.

2.3 Determinar la capacidad de la CUR para prevenir el estrés oxidante en estriado de animales tratados con QUIN.

2.4 Evaluar la neurodegeneración que se induce en el modelo experimental con QUIN y determinar si la CUR es capaz de prevenirla.

2.5 Determinar la capacidad de la CUR para inducir el factor de transcripción Nrf2.

VI. METODOLOGÍA

1. Materiales

La curcumina (CUR), el ácido quinolínico (QUIN), la apomorfina, la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) y la albúmina sérica bovina fueron de Sigma (St. Louis, USA). El fluoro-jade B fue de Millipore (AG310; Bedford, USA). El anticuerpo anti-Nrf-2 (C-20, sc-722) y el diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, sc-3598) fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santacruz, USA). El anticuerpo secundario conjugado a Alexa fluor-488 fue de Invitrogen (Carlsbad, USA). El medio de montaje VectaShield fue de Vector Labs Inc. (Burlingame, USA). Los demás reactivos se adquirieron de casas comerciales conocidas. El agua empleada para la preparación de soluciones se obtuvo con un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, USA).

2. Animales

Se emplearon ratas macho Wistar con un peso de 250–300 g. Los animales se colocaron en cajas de acrílico en condiciones constantes de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) y humedad ($50\% \pm 10\%$). Se mantuvieron en ciclos de 12 h luz/oscuridad con acceso al agua y al alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales estuvieron apegados a “Guidelines for the Care and use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research” Institute for Laboratory Animal, Research, National Research Council of the National Academies (www.nap.edu); además, se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

3. Diseño del experimento

Se emplearon cuatro grupos de animales ($n = 6$) divididos al azar como se menciona a continuación: grupo control (CT): tratados con vehículo y con solución salina isotónica (SSI); grupo CUR: tratados con CUR y con SSI y grupo QUIN: tratados con vehículo y con QUIN; grupo CUR+QUIN: tratados con CUR y con QUIN. Se administró intraestriatalmente 1 μL de SSI (grupos CT y CUR) o de QUIN, equivalente a 240 nmol (grupos QUIN y CUR+QUIN) en un equipo estereotáxico (Stoelting Co., Wood Dale, USA) por medio de una microjeringa (Hamilton Co., Reno, USA) en las siguientes coordenadas estereotáxicas: + 0.5 mm anterior al bregma, - 2.6 mm lateral al bregma y - 4.5 mm ventral a la dura, de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos (Paxinos y Watson, 1998), la SSI o el QUIN se administraron después de la décima administración de vehículo o de CUR.

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (0.2 mL/250 g, *ip*) y una vez anestesiados se inyectó la solución en el hemisferio derecho en una proporción de 1 $\mu\text{L}/2$ min, manteniendo la microjeringa *in situ* por un tiempo de 2 min para permitir la difusión pasiva. Posteriormente, la jeringa se retiró cuidadosamente y la herida se cerró con sutura. Los animales se mantuvieron en observación hasta que se recuperaron de la anestesia. La CUR se administró a diferentes dosis: 100, 200 y 400 mg/Kg (grupos CUR y CUR+QUIN), la cual se disolvió por agitación mecánica en carboximetilcelulosa 0.5% (vehículo) para su administración intragástrica mediante una sonda plástica durante 10 días cada 24 horas. Los grupos CT y QUIN recibieron vehículo por vía intragástrica durante 10 días.

4. Prueba de conducta

Se evaluó la conducta de rotación como una alteración motriz derivada del daño al estriado como se indica en estudios previos (Norman *et al.*, 1990; Santamaria *et al.*, 1996). Seis días posteriores a la lesión intraestriatal, los animales se administraron con apomorfina (1 mg/Kg, sc) y se colocaron en cajas de acrílico individuales. Transcurridos 5 min, se registró el número de giros ipsilaterales a la lesión durante 1 h, un giro se definió como una vuelta de 360°. Los resultados se presentan como número de giros ipsilaterales en 1 h.

5. Análisis histológico

Los tejidos se procesaron de la manera descrita en estudios previos (Silva-Adaya *et al.*, 2008; Maldonado *et al.*, 2010). Siete días posteriores a la lesión intratestriatal, los animales se administraron con 0.5 mL de pentobarbital sódico y se perfundieron transcardialmente con SSI y heparina (200/1 v/v) seguido de una solución de p-formaldehído 4% a 4°C. Los cerebros se removieron y se mantuvieron durante 7 días en p-formaldehído 4%. Posteriormente estos se deshidrataron gradualmente en etanol absoluto seguido de xilol y se embebieron en parafina. Se realizaron cortes coronales de 5 µm de grosor en un microtomo histo-STAT (American Instrument Exchange Inc., Haverhill, USA) comenzando en 100 µm anteriores y 100 µm posteriores al sitio de la lesión, cubriendo una distancia total de 300 µm. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para la observación de los cuerpos celulares.

6. Conteo celular

A partir de los cortes histológicos se realizó un conteo celular como se indica en estudios previos (Maldonado *et al.*, 2010). Los cortes se visualizaron en un microscopio Leica IM100 (Leica, Cambridge, UK) a 40x y las imágenes se capturaron con una cámara Leica DFC-300FX (Leica Microsystems Digital Imaging, Coldhams Lane, UK), el criterio general de daño fue núcleos picnóticos, vacuolización citoplásmica, atrofia neuronal, necrosis y edema intersticial. Se obtuvo el número de neuronas preservadas y dañadas en 5 campos seleccionados al azar (cubriendo todo el estriado de medial a lateral, en el sitio lateral al ventrículo del hemisferio lesionado), obtenidos de 3 cortes por tejido. La cuantificación la realizó una persona en ciego y los datos se expresan como porcentaje de neuronas dañadas por campo.

7. Determinación del contenido de grupos carbonilo

Se determinó el contenido de grupos carbonilo como marcador de estrés oxidante mediante la reacción de la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) como se indica en estudios previos (Reznick y Packer, 1994; Maldonado *et al.*, 2010). Se obtuvo el estriado de los animales 6 h posteriores a la infusión intraestriatal y se homogenizó en PBS-Tritón 0.01% y EDTA 1 mM, se centrifugó durante 20 min a 23,000xg y se incubó toda la noche con sulfato de estreptomicina 10% a 4°C para eliminar los ácidos nucleicos. Posteriormente se centrifugó a 2,655xg durante 10 min y se agregó DNPH 10 mM. Después de precipitar las proteínas con TCA 20% y realizar lavados con etanol-acetato de etilo (1:1), el precipitado se resuspendió en guanidina 6 M y se determinó la absorbancia a 370 nm. Los cálculos se realizaron de acuerdo a la ley de Lambert-Beer empleando el coeficiente de extinción molar de DNPH ($\epsilon = 22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se corrigió por mg de proteína de acuerdo a la lectura de densidad óptica a 280 nm en tubos blanco que se prepararon simultáneamente (tratados con HCl en

lugar de DNPH). Los resultados se presentan como nmol de DNPH por mg de proteína.

8. Tinción con fluoro-jade B para evaluar neurodegeneración

Una vez que los animales se trataron como se menciona en la técnica de análisis histológico, los cerebros se removieron y se mantuvieron en p-formaldehído 2%/sacarosa 30% durante 7 días a 4°C. Los tejidos se embebieron en el compuesto para cortes a óptima temperatura (Tissue Tek), se sumergieron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se realizaron cortes coronales de 6–10 µm de grosor a -25°C en un criostato microm HM520 (Thermo Scientific, Pittsburgh, USA), se colocaron en portaobjetos gelatinizados al 5% y se procesaron para la tinción como está descrito en estudios previos (Schmued y Hopkins, 2000). Los tejidos se sumergieron en NaOH 1% y etanol 80% y se transfirieron a una solución de etanol 70% seguido de agua destilada. Posteriormente, se colocaron en una solución de KMnO₄ 0.06% (m/v) y se lavaron con agua destilada. Los cortes se transfirieron a la solución de tinción [fluoro-jade B 0.0004% (v/v) y DAPI 0.0002% v/v]. Los cortes se lavaron con agua destilada y se colocaron a 50°C hasta que estuvieron completamente secos. Las preparaciones se observaron en un microscopio Leica IM100 (Leica, Cambridge, UK) con aumento de 40x. Los fluorocromos se observaron a través de filtros específicos y se analizaron en dos canales: la tinción con fluoro-jade B se observó en el canal verde, la tinción con DAPI se observó en el canal azul. Las imágenes se tomaron en el estriado de medial a lateral, en el sitio lateral al ventrículo del hemisferio lesionado y fueron capturadas con una cámara Leica DFC-300FX empleando un software Leica IM1000. La intensidad de la fluorescencia se consideró de forma proporcional a la neurodegeneración.

9. Nivel de Nrf2 por inmunofluorescencia

A partir de los cortes histológicos en el compuesto de cortes a óptima temperatura (Tissue Tek), los tejidos se permeabilizaron con tritón al 0.1% en PBS durante 10 min y se bloquearon con albúmina sérica bovina al 3% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario de conejo anti-Nrf2 (1:100) toda la noche a 4°C. Los cortes se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (1:500) conjugado a Alexa Fluor-488 durante 1.5 h a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 1:1,000) durante 10 min. Por último, se lavaron tres veces con PBS y se cubrieron con medio de montaje VectaShield, adecuado para inmunofluorescencia. Paralelamente, se trabajaron los controles negativos en donde a estos no se les adicionó el anticuerpo primario, para eliminar los falsos negativos. Las inmunotinciones se observaron en un microscopio Leica IM100 con aumento de 40x. Los fluorocromos se observaron a través de filtros específicos y se analizaron en dos canales: el anticuerpo secundario conjugado a Alexa fluor-488 se observó en el canal verde, la tinción con DAPI se observó en el canal azul. Las imágenes se tomaron en el estriado de medial a lateral, en el sitio lateral al ventrículo del hemisferio lesionado y se capturaron con una cámara Leica DFC-300FX empleando un software Leica IM1000. Se determinó el número de células inmunoreactivas a Nrf2 y se expresaron gráficamente de acuerdo a su posición respecto al núcleo.

10. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía y como método *post hoc* se empleó la prueba de Tukey usando el software Prism 5.02 (GraphPad; San Diego, USA) Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

VII. RESULTADOS

1. Conducta de rotación

Se observa que el grupo QUIN es el que presenta el mayor número de giros ipsilaterales a la lesión (233 ± 60 giros) respecto al grupo CT. En los grupos en que se administró CUR durante 10 días previos a la lesión intraestriatal se observa una disminución gradual del número de giros ipsilaterales a la lesión, respecto al grupo QUIN, conforme se incrementa la dosis de CUR (Gráfico 1). Cabe subrayar que de estos tres grupos que recibieron CUR previamente a la lesión intraestriatal, el grupo CUR400+QUIN fue el que presentó el menor incremento del número de giros ipsilaterales (53 ± 26 giros) respecto al grupo QUIN. El tratamiento sólo con CUR 400 mg/kg no indujo cambios estadísticamente significativa respecto al grupo CT.

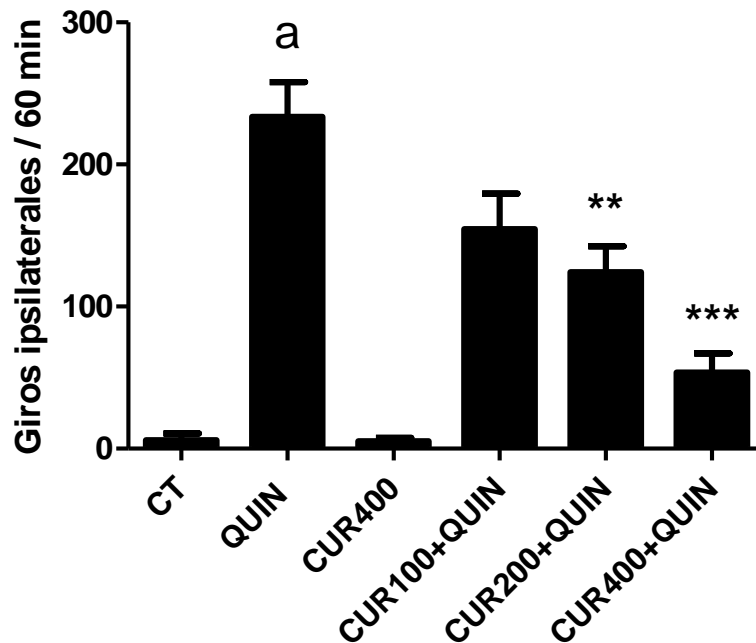


Gráfico 1. Efecto de la curcumina (CUR) sobre la conducta de rotación inducida por el ácido quinolínico (QUIN). Se presenta el promedio \pm EEM. CT: grupo control; 100, 200 y 400: dosis empleadas de CUR, en mg/kg. ^a $P < 0.001$ respecto al grupo CT; ^{**} $P < 0.01$ y ^{***} $P < 0.001$ respecto al grupo QUIN.

2. Análisis histológico

En el análisis histológico el tejido representativo del grupo QUIN presenta el mayor daño celular en comparación con el grupo CT, dicho daño celular se caracteriza por la presencia de picnosis núcleo-citoplasmática, retracción del neuropilo y edema intersticial. Mientras que los grupos que recibieron CUR presentan menor daño desde la dosis de 100 mg/kg, correspondiente al grupo CUR100+QUIN (Figura 1) y siendo mayor el efecto en el grupo tratado con la dosis de 400 mg/kg (CUR400+QUIN) comparando con el grupo QUIN. Por otro lado, el tratamiento con CUR 400 mg/kg (CUR400) no induce alteraciones histológicas.

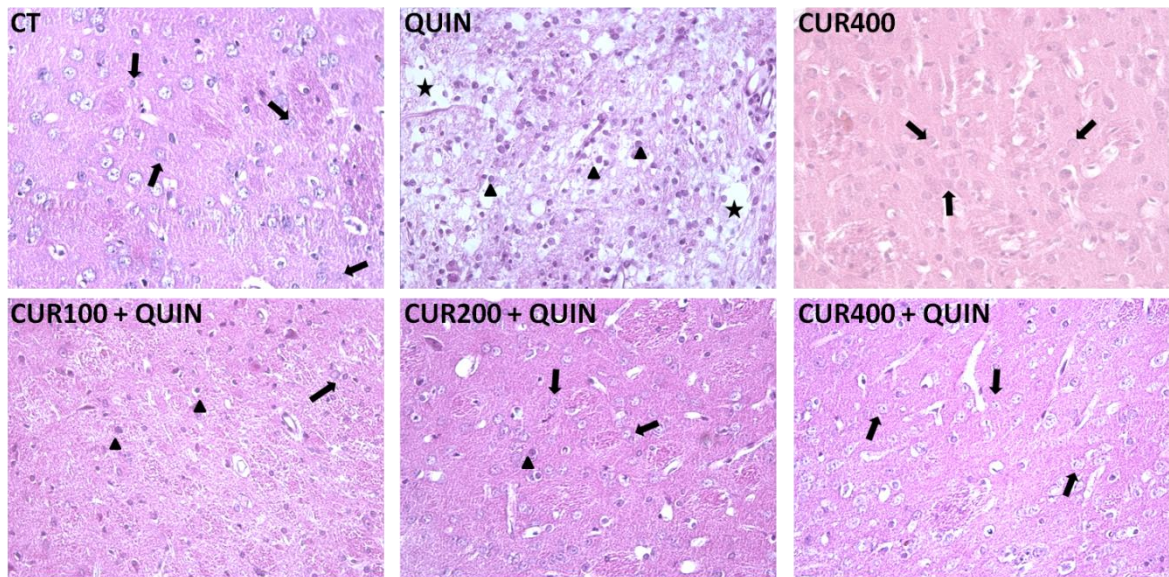


Figura 1. Efecto de la CUR sobre el daño histológico inducido por el QUIN. Los cortes de 5 μm de estriado se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Se presentan fotomicrografías representativas de cada grupo: CUR, curcumina; QUIN, ácido quinolínico. La dosis empleada de CUR fue 100, 200 y 400 mg/kg. Se señalan el edema y la retracción del neuropilo (estrellas), la presencia de picnosis núcleo-citoplasmática (triángulos negros) y las células preservadas (flechas negras).

3. Conteo celular

A partir de los cortes histológicos se realizó un conteo celular. El grupo QUIN presenta diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo CT, siendo el grupo en el que se observa el mayor porcentaje de células dañadas. En los grupos en los que se administró CUR previo a la lesión intraestriatal se observa disminución del porcentaje de células dañadas de manera dosis dependiente. Se encontró diferencia estadísticamente significativa desde la dosis de 100 mg/kg y siendo el grupo CUR400+QUIN el que presenta el menor porcentaje de células dañadas respecto al grupo QUIN (Gráfico 2). El grupo tratado solamente con CUR400 no presentó diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo CT.

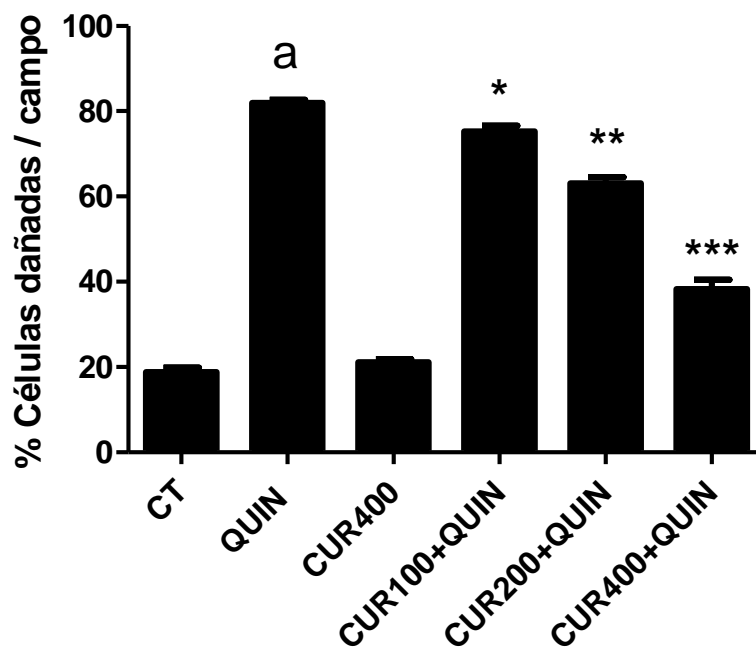


Gráfico 2. Conteo de células dañadas en el daño inducido por QUIN. Se presenta el promedio \pm EEM. ^a $P < 0.001$ respecto al grupo CT; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ respecto al grupo QUIN.

Debido a que la dosis de 400 mg/kg de CUR Mostró el mayor efecto protector en la conducta y en el daño morfológico, esta dosis fue la que se eligió para los estudios siguientes.

4. Contenido de grupos carbonilo

La administración intraestriatal de QUIN causó un notable incremento en la cantidad de hidrazonas (3.99 ± 1.02 nmol DNPH/ mg proteína), las cuales aumentaron en un 156% en comparación con el grupo CT (1.55 ± 0.11 nmol DNPH/ mg proteína) (Gráfico 3). Mientras que el tratamiento con CUR previo a la lesión intraestriatal previene el incremento en la cantidad de proteínas oxidadas, siendo similares al grupo CT (1.38 ± 0.09 nmol DNPH/mg proteína) y estadísticamente significativo ($P < 0.001$) en comparación con el grupo QUIN. El tratamiento solo con CUR (1.69 ± 0.13 nmol DNPH/mg proteína) no presentó diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo CT.

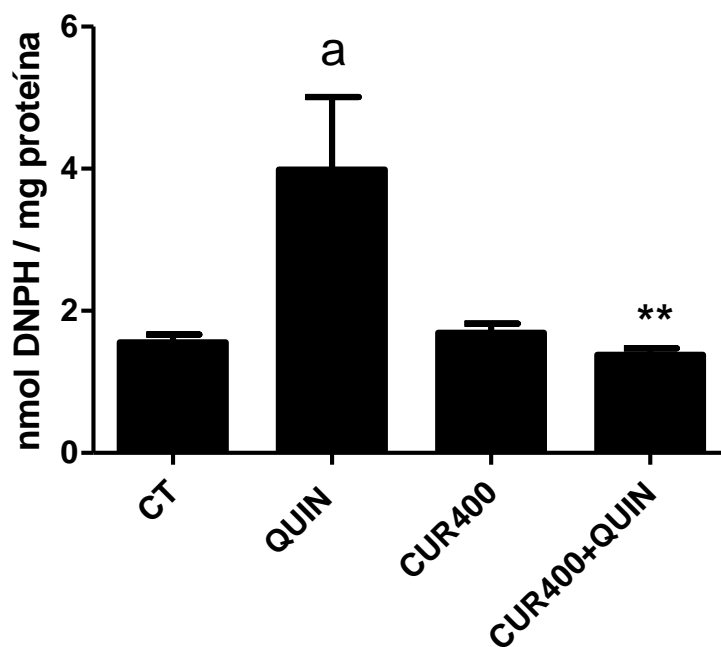


Gráfico 3. Efecto de CUR sobre el daño a proteínas inducido por QUIN. Los datos se presentan como promedio \pm EEM. ^a $P < 0.05$ respecto al grupo CT, ** $P < 0.001$ respecto al grupo QUIN.

5. Determinación de la neurodegeneración

La tinción con fluoro-jade B observó poca fluorescencia de los grupos CT y CUR tanto a 1 como a 3 días posteriores a la lesión (Figuras 2 y 3, respectivamente); mientras que en el grupo tratado con QUIN se observó una marcada fluorescencia de células positivas a fluoro-jade B, sobre todo a los 3 días, lo que sugiere la degeneración de las neuronas estriatales. En aquellos grupos que recibieron CUR de

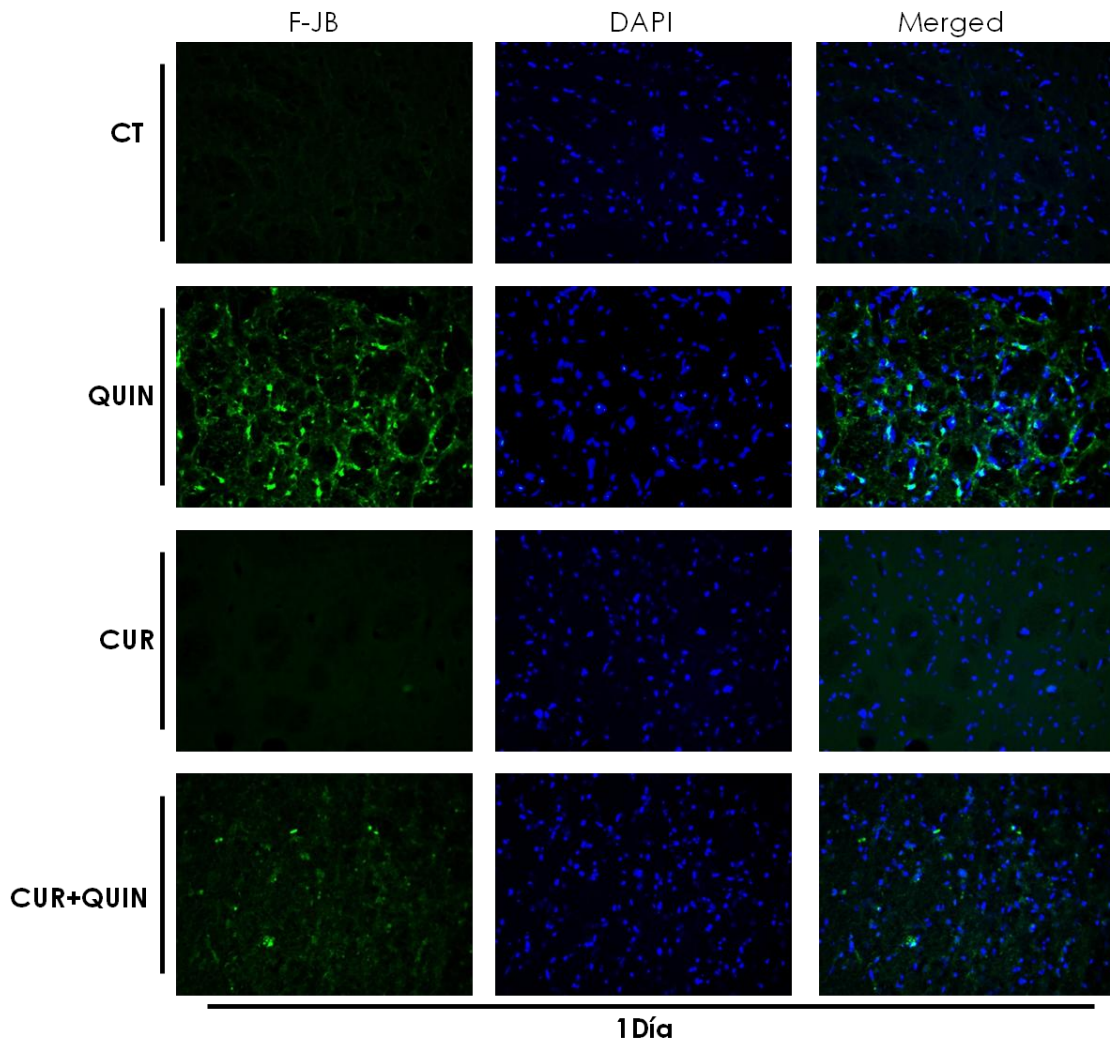


Figura 2. Efecto de la CUR sobre la neurodegeneración inducida por QUIN, 1 día post-lesión. Se muestran fotomicrografías representativas de cada grupo: CT: control, QUIN: ácido quinolínico; CUR: curcumina y CUR+QUIN: curcumina y ácido quinolínico; F-JB: fluoro-jade B, DAPI: diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol. En verde se presenta a las células positivas a F-JB y en azul la tinción de núcleos; la columna de la derecha es la co-localización de la observación con F-JB con DAPI.

forma previa a la lesión intraestriatal disminuyó la fluorescencia de células positivas fluoro-jade B, siendo similar a la del grupo CT de 1 día; pero sobre todo se observa que a tiempos largos (3 días) las células positivas a fluoro-jade B disminuyen considerablemente, siendo la positividad a fluoro-jade B aún menor que la del grupo CT.

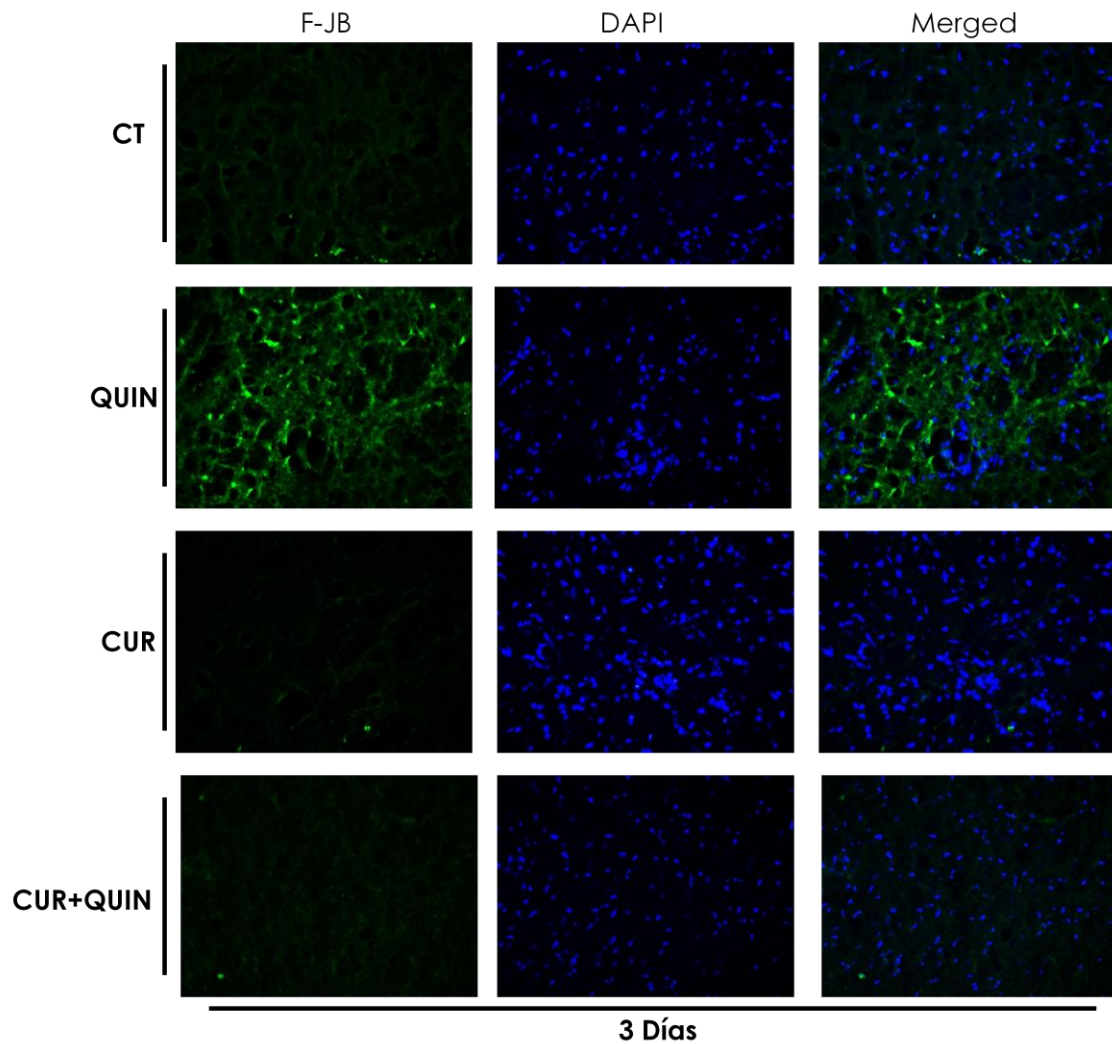


Figura 3. Efecto de la CUR sobre la neurodegeneración inducida por QUIN, 3 días post-lesión. Se muestran fotomicrografías representativas de cada grupo: CT: control, QUIN: ácido quinolínico; CUR: curcumina y CUR+QUIN: curcumina y ácido quinolínico; F-JB: fluoro-jade B, DAPI: diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol. En verde se presenta a las células positivas a F-JB y en azul la tinción de núcleos; la columna de la derecha es la co-localización de la observación con F-JB con DAPI.

6. Nivel de Nrf2

En las inmunofluorescencias se observaron las células positivas a Nrf2 y la co-localización con el marcador de núcleos para determinar la localización subcelular del factor de transcripción, mismos resultados que fueron corroborados mediante el conteo de células positivas a Nrf2 y su localización respecto al núcleo (Figura 4 y 5). En los grupos CT se observó la presencia de Nrf2 y su localización se mantiene balanceada tanto dentro como fuera del núcleo; mientras que en el grupo tratado solo con QUIN 30 min post-lesión se observó que disminuye el número de células positivas a Nrf2 y sobre todo, disminuye la forma intranuclear incrementándose la forma perinuclear. Por otro lado, en el grupo de 120 min post-lesión además de observarse algo similar, se observa claramente que se incrementa la localización extranuclear. Los grupos tratados sólo con CUR muestran un incremento en la localización intranuclear de Nrf2 y la posterior administración de QUIN (grupo CUR+QUIN) presentaron niveles similares de células positivas a Nrf2 que el grupo CT, tanto a 30 min como a 120 min post-lesión.

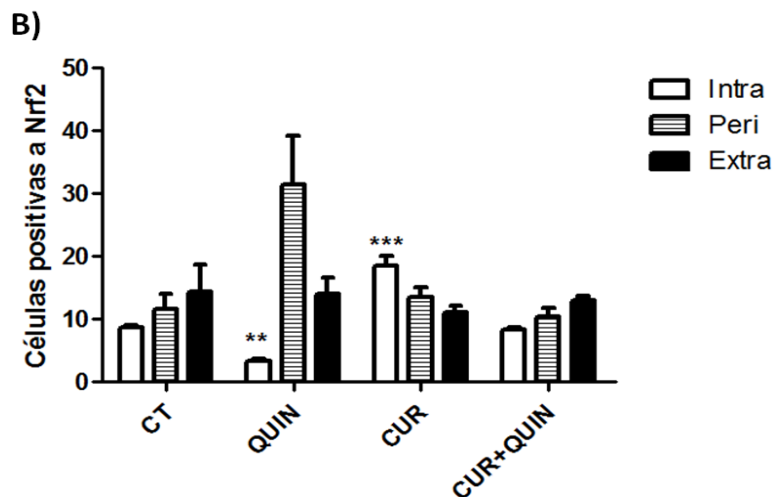
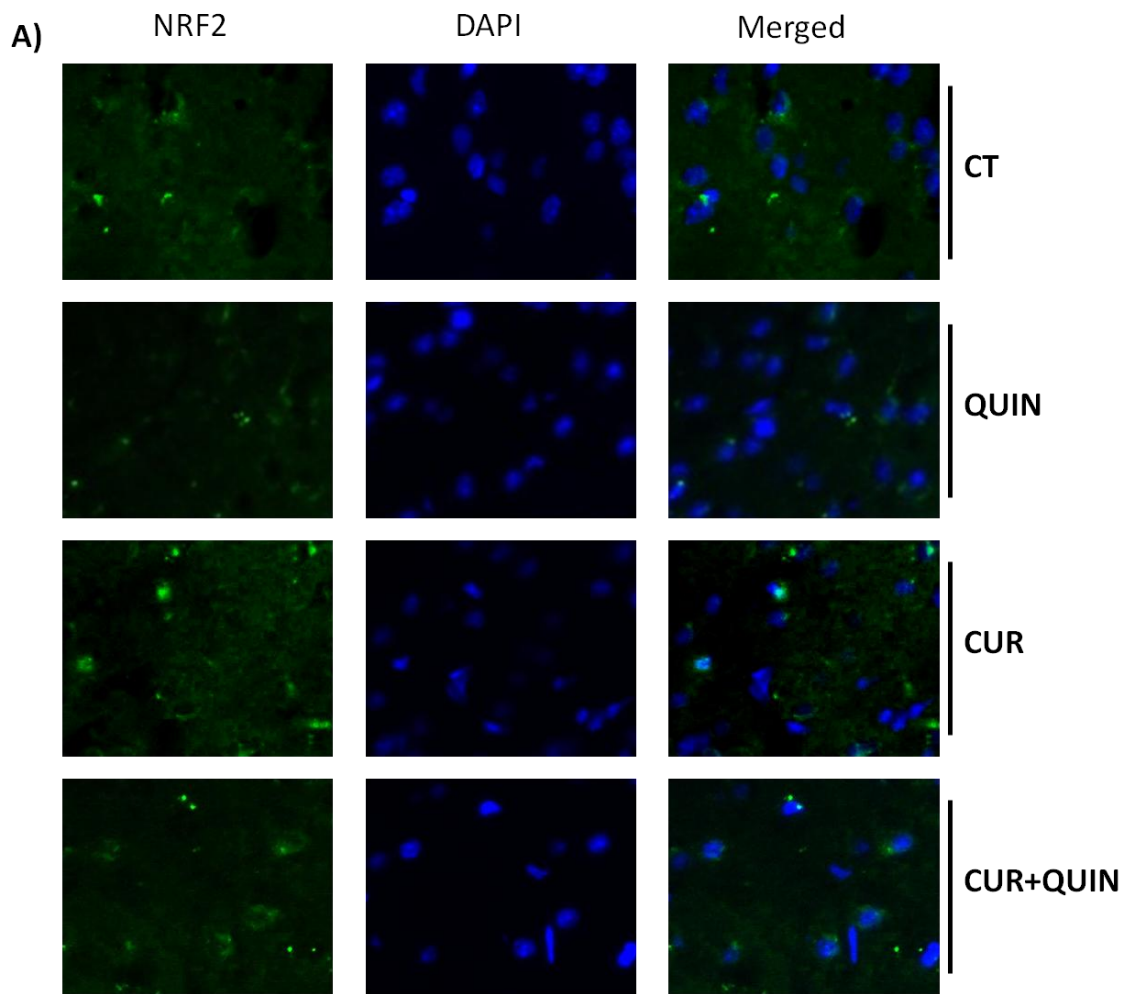


Figura 4. Efecto de la CUR sobre la inducción del factor de transcripción Nrf2 30 min post-lesión con QUIN. A) Se presentan fotomicrografías representativas de cada grupo, en verde se presenta a las células positivas a Nrf2 y en azul la tinción de núcleos (DAPI); la columna de la derecha es la co-localización de la observación con Nrf2 y con DAPI. CT: control, QUIN: ácido quinolínico; CUR: curcumina y CUR+QUIN: curcumina y ácido quinolínico.

B) Conteo de células positivas a Nrf2 y su localización respecto al núcleo. Se presenta promedio \pm EEM. ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ respecto a CT.

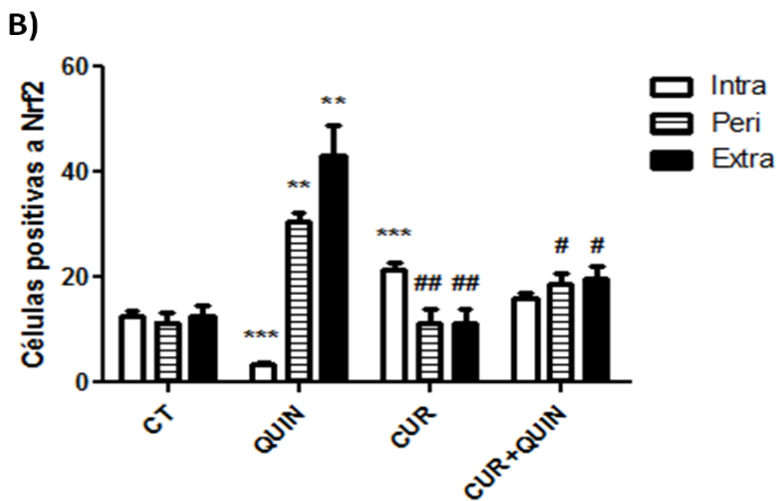
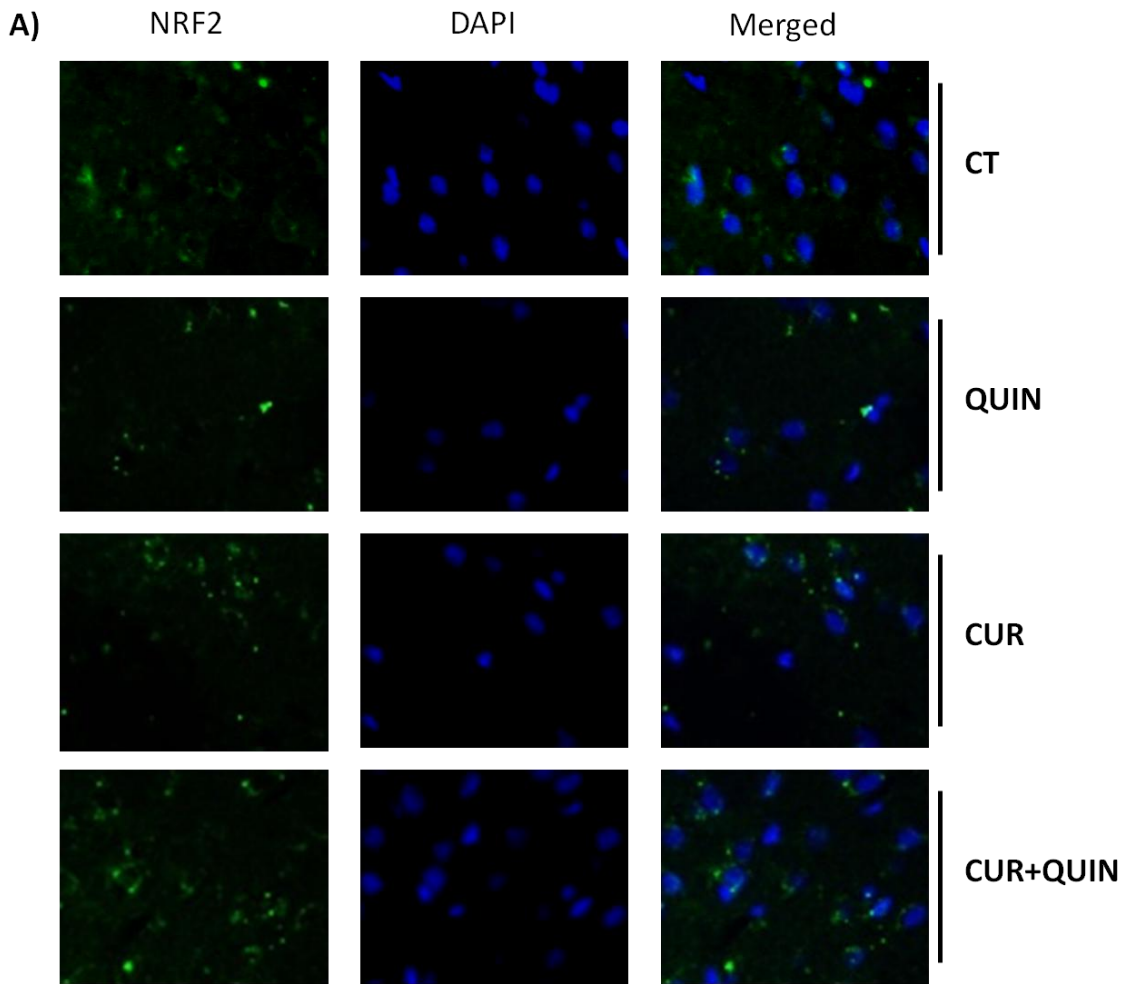


Figura 5. Efecto de la CUR sobre la inducción del factor de transcripción Nrf2 120 min post-lesión con QUIN. A) Se presentan fotomicrografías representativas de cada grupo, en verde se presenta a las células positivas a Nrf2 y en azul la tinción de núcleos (DAPI); la columna de la derecha es la co-localización de la observación con Nrf2 y con DAPI. CT: control, QUIN: ácido quinolínico; CUR: curcumina y CUR+QUIN: curcumina y ácido quinolínico. B) Conteo de células

positivas a Nrf2 y su localización respecto al núcleo. Se presenta promedio \pm EEM. ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ respecto a CT; # $P < 0.05$ y ## $P < 0.01$ respecto a QUIN.

VIII. Discusión

La CUR muestra un estado de protección contra el daño inducido por el QUIN. En estudios previos (Schwarcz *et al.*, 1979; Norman *et al.*, 1990) se ha mostrado que la infusión intraestriatal de agonistas glutamatérgicos ocasiona la degeneración y desaferenciación del sistema dopaminérgico estriatal provocando una hipersensibilidad de los receptores a dopamina, y que la posterior administración sistémica de agonistas de dopamina ocasiona la hiperactivación de los receptores dopaminérgicos en el hemisferio lesionado, provocando el comportamiento en giros ipsilaterales. En el modelo experimental con QUIN se ha demostrado que la administración subcutánea de apomorfina provoca un incremento en el número de giros ipsilaterales 6 días después de la infusión intraestriatal (Santamaría y Rios, 1993; Santamaría *et al.*, 1996), lo que pone de manifiesto el papel de dicha neurotoxina. La administración previa de CUR muestra un menor número de giros ipsilaterales de forma dosis-dependiente, siendo significativos con la dosis de 200 mg/kg pero evidenciando que la dosis de 400 mg/kg fue la que mostró la mayor protección (Figura 1). Estos resultados son consistentes con otros modelos de excitotoxicidad (Ataie *et al.*, 2010), en particular con homocisteína, donde se demuestra el efecto neuroprotector de la CUR (50 mg/kg; *ip*) y con otros donde se muestra que el tratamiento previo con un antioxidante es capaz de prevenir las alteraciones conductuales que se inducen en el modelo con QUIN (Santamaría *et al.*, 2003).

Durante el fenómeno excitotóxico, la sobreactivación de los rNMDA provoca la entrada de iones a la célula, como son Na⁺, Cl⁻, pero sobre todo de Ca²⁺, causando un desbalance osmótico que eventualmente ocasiona la ruptura y la muerte celular (Dong *et al.*, 2009). El QUIN es un agonista glutamatérgico en la subunidad NR2B de los rNMDA, por lo que su infusión intraestriatal conlleva a la sobreactivación de dichos receptores que permiten la entrada, principalmente, de Ca²⁺ y desata una serie de

eventos que finalmente culminan en la muerte celular (Pérez-de la Cruz *et al.*, 2005). Este proceso está íntimamente ligado con los trastornos neurodegenerativos ya que ocasiona pérdida de la función y muerte neuronal por necrosis o apoptosis (Jellinger, 2009), por lo que es necesaria su prevención. El tratamiento previo con CUR mejora la viabilidad celular, ya que previene las alteraciones histológicas propias de la neurotoxicidad ejercida por el QUIN, en particular con la dosis de 400 mg/kg. Este efecto dosis-dependiente podría estar estrechamente relacionado con la baja biodisponibilidad de la CUR (Ireson *et al.*, 2002). En virtud de que la CUR presenta un efecto neuroprotector, sobre todo a dosis altas, se decidió utilizar la dosis de 400 mg/kg en los experimentos subsecuentes.

La actividad pro-oxidante del QUIN está bien documentada, se sabe que induce lipoperoxidación, activa la NADPH oxidasa, incrementa el nivel de OH[•], activa la SON e incrementa la concentración de Ca²⁺ intracelular (Santamaría y Rios, 1993; Maldonado *et al.*, 2010; Aguilera *et al.*, 2007; Santamaría *et al.*, 2001; Pérez-de la Cruz *et al.*, 2008) lo que genera un perfil altamente oxidante. El estrés oxidante y nitrante puede ocasionar efectos deletéreos en las células, sobre todo por su capacidad de dañar biomoléculas como son el ADN, los lípidos y las proteínas. Cuando estas últimas son dañadas, ya sea por efecto directo de las especies reactivas o por los productos derivados de la lipoperoxidación (Sayre *et al.*, 2008) se incrementa la cantidad de grupos carbonilo en las cadenas laterales, sobre todo en residuos de histidina y cisteína lo que ocasiona su inactivación (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Se sabe que la infusión de QUIN ocasiona niveles incrementados de proteínas oxidadas a tiempos tempranos (3 h) (Maldonado *et al.*, 2010) y con base en los resultados de este trabajo se observa que a un tiempo mayor (6 h) estos niveles no vuelven a los basales. Esto pone de manifiesto el gran estrés al que está sujeto el tejido y que éste permanece por largo tiempo. El tratamiento con CUR previene el incremento en los niveles de proteínas oxidadas. Esto implica que la CUR podría

prevenir la serie de eventos pro-oxidantes que se generan tras la infusión intraestriatal con QUIN, y por tanto la neurodegeneración.

En este hecho es de resaltar que el QUIN promueve la rápida neurodegeneración (Figura 2) y que ésta es sostenida en el tiempo (Figura 3), lo cual implicaría que todos los efectos del QUIN ocurran a tiempos tempranos y que estos ocasionen la degeneración neuronal. También es importante hacer notar que el tratamiento con CUR previene significativamente la neurodegeneración inducida por el QUIN, sobre todo transcurridos 3 días de la lesión intratestriatal.

Con base en los resultados de la localización subcelular se observa que en condiciones normales el factor Nrf2 se encuentra presente, tanto dentro como fuera del núcleo, observándose una dinámica balanceada de su forma activa/inactiva. Pero tras el reto excitotóxico, disminuyen considerablemente los niveles de Nrf2, tal pareciera que el QUIN induce la degradación de Nrf2 e impide su internalización al núcleo; o bien, promueve su salida. Este hecho es de relevante importancia, ya que se esperaría que ante un estado oxidante como el inducido por QUIN, la célula encienda la maquinaria de transcripción de proteínas antioxidantes para contrarrestar el daño, lo que pone de manifiesto el potencial daño a la transcripción de genes por el QUIN. Además de que esto nos brinda un acercamiento a lo que podría ocurrir en las enfermedades neurodegenerativas, sobre todo que el daño oxidante no pueda ser contrarrestado. Pero lo que es un hecho es que ante este estímulo la transcripción inducible de genes citoprotectores no responde eficientemente. Por otro lado, el tratamiento solo con CUR ocasiona que se incremente la forma activa del Nrf2 que, eventualmente, propiciará en la célula un ambiente antioxidante. El tratamiento con CUR previo al reto excitotóxico previene la disminución de la forma activa del Nrf2 que se observa en el tratamiento solo con el QUIN, esto podría deberse a que el QUIN por un lado ocasiona su inactivación, mientras que por el otro lado la CUR

promueve su forma activa, resultando en un balance de ambos procesos y haciendo que los niveles de Nrf2 se observen similares a los basales.

Estos resultados son consistentes con los presentados por Yang *et al.* (2009) quienes mostraron en un modelo de isquemia, que la CUR es capaz de inducir la forma activa del Nrf2 sobre todo a altas dosis (100 mg/kg; *ip*).

El hecho de que la CUR pueda actuar como un antioxidante indirecto, por su capacidad de inducir al factor de transcripción Nrf2, le brinda particular importancia ya que los antioxidantes finales son las proteínas citoprotectoras. Estos actúan catalíticamente, no se consumen, poseen una vida media relativamente alta y catalizan una amplia variedad de reacciones químicas que invariablemente conducen a la detoxificación de oxidantes y electrófilos (Gao *et al.*, 2001) y esta capacidad en un modelo de neurodegeneración es de suma importancia, ya que no todas las terapias neuroprotectoras tienen la eficiencia requerida (Moosmann y Behl, 2002); además de que el cerebro es característicamente susceptible al daño oxidante y posee una baja proporción de Nrf2 (Fatokun *et al.*, 2008; Moi *et al.*, 1994).

El Nrf2 se une al ARE para activar la transcripción de proteínas necesarias para el mantenimiento y la respuesta del sistema de defensa celular, como son enzimas detoxificantes, proteínas relacionadas con el glutatión, proteínas antioxidantes, enzimas productoras de NADPH y anti-inflamatorias (Lee *et al.*, 2003). En otros modelos, se ha visto que la CUR tiene la capacidad de activar al factor de transcripción Nrf2 y que, a través de una vía dependiente de ARE, induce la transcripción de proteínas antioxidantes tales como hemo oxigenasa-1 (Balogun *et al.*, 2003) y glutatión-S-transferasa (Nishinaka *et al.*, 2007), entre otras. Son necesarios estudios posteriores para determinar en este modelo cuáles son las principales proteínas que se inducen tras la activación del factor de transcripción Nrf2.

Por último, la CUR tiene la capacidad de inducir enzimas citoprotectoras y que esta capacidad está estrechamente relacionada con la presencia de los grupos hidroxilo en posición *orto* de los anillos aromáticos y la funcionalidad β -dicetona de dicho compuesto (Dinkova-Kostova y Talalay, 1999). Esta característica química particular de la CUR podría estar relacionada con su capacidad de inducir al factor de transcripción Nrf2 a través de la interacción con Keap1; ya que como se comentó anteriormente, Keap1 presenta algunos residuos de Cys que cuando son modificados ocasionan la liberación de Nrf2. Con base en lo anterior se podría esperar que la CUR pueda interaccionar con los residuos de Cys de Keap1 a través de los grupos hidroxilo de los anillos aromáticos, para ocasionar un cambio conformacional y liberar a Nrf2 para que sea traslocado al núcleo, tal y como se ha observado con otros inductores de Nrf2, como el sulforafano (Hu *et al.*, 2011). Son necesarios estudios posteriores para esclarecer el mecanismo de acción de CUR a través de Nrf2.

IX. CONCLUSIONES

1. El QUIN incrementa la neurodegeneración y promueve la inactivación del factor de transcripción Nrf2.
2. La CUR es capaz de prevenir las alteraciones conductuales e histológicas, así como la neurodegeneración y el daño oxidante a las proteínas debido a su capacidad de inducir al factor de transcripción Nrf2.

X. PERSPECTIVAS

1. Determinar cuáles son las principales proteínas que se transcriben en respuesta a Nrf2 y que son responsables del efecto protector.
2. Determinar el mecanismo por el que la CUR para induce al factor de transcripción Nrf2.

XI. REFERENCIAS

Aguilera P, Cháñez-Cárdenas ME, Floriano-Sánchez E, Barrera D, Santamaría A, Sánchez-González DJ, Pérez-Severiano F, Pedraza-Chaverrí J, Jiménez PD. Time-related changes in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the rat striatum in a model of Huntington's disease. *Neurotoxicology*. 2007 Nov;28(6):1200-7.

Araújo IM, Carreira BP, Carvalho CM, Carvalho AP. Calpains and delayed calcium deregulation in excitotoxicity. *Neurochem Res*. 2010 Dec;35(12):1966-9.

Ataie A, Sabetkasaei M, Haghparast A, Moghaddam AH, Kazeminejad B. Neuroprotective effects of the polyphenolic antioxidant agent, Curcumin, against homocysteine-induced cognitive impairment and oxidative stress in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010 Oct;96(4):378-85.

Baillet A, Chanteperdrix V, Trocmé C, Casez P, Garrel C, Besson G. The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 2010 Oct;35(10):1530-7.

Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J*. 2003 May;371(Pt 3):887-95.

Begum AN, Jones MR, Lim GP, Morihara T, Kim P, Heath DD, Rock CL, Pruitt MA, Yang F, Hudspeth B, Hu S, Faull KF, Teter B, Cole GM, Frautschy SA. Curcumin

structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Jul;326(1):196-208.

Bisht S, Maitra A. Systemic delivery of curcumin: 21st century solutions for an ancient conundrum. *Curr Drug Discov Technol.* 2009 Sep;6(3):192-9.

Bordelon YM, Chesselet MF, Nelson D, Welsh F, Erecińska M. Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem.* 1997 Oct;69(4):1629-39.

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

Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide.* 2010 Nov;23(3):153-65.

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

Cuevas E, Lantz S, Newport G, Divine B, Wu Q, Paule MG, Tobón-Velasco JC, Ali SF, Santamaría A. On the early toxic effect of quinolinic acid: involvement of RAGE. *Neurosci Lett.* 2010 Apr;474(2):74-8.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003 Mar;329(1-2):23-38.

Danev SI, St Stoyanov D. Early noninvasive diagnosis of neurodegenerative diseases. *Folia Med (Plovdiv)*. 2010 Apr-Jun;52(2):5-13.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*. 1999 May;20(5):911-4.

Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2009 Apr;30(4):379-87.

Double KL, Reyes S, Werry EL, Halliday GM. Selective cell death in neurodegeneration: why are some neurons spared in vulnerable regions? *Prog Neurobiol*. 2010 Nov;92(3):316-29.

Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res*. 2010;59(4):459-69.

Eidelberg D, Surmeier DJ. Brain networks in Huntington disease. *J Clin Invest*. 2011 Feb;121(2):484-92.

Fatokun AA, Stone TW, Smith RA. Oxidative stress in neurodegeneration and available means of protection. *Front Biosci*. 2008 May;13:3288-311.

Gao X, Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes, and mouse leukemia cells against oxidative damage: the indirect antioxidant effects of sulforaphane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec;98(26):15221-6.

Golden TR, Patel M. Catalytic antioxidants and neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Mar;11(3):555-70.

Heng MY, Detloff PJ, Wang PL, Tsien JZ, Albin RL. In vivo evidence for NMDA receptor-mediated excitotoxicity in a murine genetic model of Huntington disease. *J Neurosci*. 2009 Mar;29(10):3200-5.

Hu C, Egger AL, Mesecar AD, van Breemen RB. Modification of keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chem Res Toxicol*. 2011 Apr;24(4):515-21.

Ireson CR, Jones DJ, Orr S, Coughtrie MW, Boocock DJ, Williams ML, Farmer PB, Steward WP, Gescher AJ. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Jan;11(1):105-11.

Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm*. 2009 Sep;116(9):1111-62.

Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Oct;295(4):C849-68.

Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000 Aug;149(1):43-50.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:89-116.

Knott AB, Bossy-Wetzler E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Mar;11(3):541-54.

Kraft AD, Johnson DA, Johnson JA. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. *J Neurosci*. 2004 Feb;24(5):1101-12.

Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*. 2010 Jul;460(2):525-42.

Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary

cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem.* 2003 Apr;278(14):12029-38.

Lin JK, Pan MH, Lin-Shiau SY. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. *Biofactors.* 2000;13(1-4):153-8.

M Khopde S, Priyadarsini KI, Venkatesan P, Rao MN. Free radical scavenging ability and antioxidant efficiency of curcumin and its substituted analogue. *Biophys Chem.* 1999 Aug;80(2):85-91.

Maldonado PD, Chánez-Cárdenas ME, Barrera D, Villeda-Hernández J, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is involved in the neuronal death induced by quinolinic acid in rats. *Neurosci Lett.* 2007 Sep;425(1):28-33.

Maldonado PD, Molina-Jijón E, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J. NAD(P)H oxidase contributes to neurotoxicity in an excitotoxic/prooxidant model of Huntington's disease in rats: protective role of apocynin. *J Neurosci Res.* 2010 Feb;88(3):620-9.

Miksys SL, Tyndale RF. Neurodegenerative diseases: a growing challenge. *Clin Pharmacol Ther.* 2010 Oct;88(4):427-30.

Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-

E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct;91(21):9926-30.

Moosmann B, Behl C. Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002 Oct;11(10):1407-35.

Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*. 2009 May;284(20):13291-5.

Nishinaka T, Ichijo Y, Ito M, Kimura M, Katsuyama M, Iwata K, Miura T, Terada T, Yabe-Nishimura C. Nishinaka T, Ichijo Y, Ito M, Kimura M, Katsuyama M, Iwata K, Miura T, Terada T, Yabe-Nishimura C. Curcumin activates human glutathione S-transferase P1 expression through antioxidant response element. *Toxicol Lett*. 2007 May;170(3):238-47.

Norman AB, Wyatt LM, Hildebrand JP, Kolmonpunporn M, Moody CA, Lehman MN, Sanberg PR. Sensitization of rotation behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine or kainic acid-induced striatal lesions. *Pharmacol Biochem Behav*. 1990 Dec; 37(4):755-9.

Pari L, Tewas D, Eckel J. Role of curcumin in health and disease. *Arch Physiol Biochem*. 2008 Apr;114(2):127-49.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th edition. London, UK: *Academic Press*; 1998.

Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Galván-Arzate S, Medina-Campos ON, Pérez-Severiano F, Ali SF, Pedraza-Chaverri J, Santamaría A. 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*. 2005;135(2):463-74.

Pérez-De La Cruz V, Konigsberg M, Pedraza-Chaverri J, Herrera-Mundo N, Díaz-Muñoz M, Morán J, Fortoul-van der Goes T, Rondán-Zárata A, Maldonado PD, Ali SF, Santamaría A. Cytoplasmic calcium mediates oxidative damage in an excitotoxic /energetic deficit synergic model in rats. *Eur J Neurosci*. 2008 Mar;27(5):1075-85.

Pivovarova NB, Andrews SB. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J*. 2010 Sep;277(18):3622-36.

Praticò D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec;1147:70-8.

Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Satav JG, Mohan H. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic Biol Med*. 2003 Sep;35(5):475-84.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994; 233:357–363.

Rodríguez-Martínez E, Camacho A, Maldonado PD, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría D, Galván-Arzate S, Santamaría A. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res.* 2000 Mar;858(2):436-9.

Santamaría A, Ríos C. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett.* 1993 Sep;159(1-2):51-4.

Santamaría A, Ríos C, Solís-Hernández F, Ordaz-Moreno J, González-Reynoso L, Altagracia M, Kravzov J. Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology.* 1996 Jan;35(1):23-8.

Santamaría A, Jiménez-Capdeville ME, Camacho A, Rodríguez-Martínez E, Flores A, Galván-Arzate S. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport.* 2001 Aug;12(12):2693-6.

Santamaría A, Salvatierra-Sánchez R, Vázquez-Román B, Santiago-López D, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Jiménez-Capdeville ME, Ali SF. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem.* 2003 Jul;86(2):479-88.

Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2008 Jan;21(1):172-88.

Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res*. 2000 Aug;874(2):123-30.

Schwarcz R, Fuxe K, Agnati LF, Hökfelt T, Coyle JT. Rotational behaviour in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: a behavioural model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Res*. 1979 Jul;170(3):485-95.

Schwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar KV, Muchowski PJ. Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol*. 2010 Feb;90(2):230-45.

Sekhar KR, Rachakonda G, Freeman ML. Cysteine-based regulation of the CUL3 adaptor protein Keap1. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Apr;244(1):21-6.

Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR, Marczylo TH, Morgan B, Hemingway D, Plummer SM, Pirmohamed M, Gescher AJ, Steward WP. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct;10(20):6847-54.

Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*. 2005 Sep;41(13):1955-68.

Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int.* 2007 Nov-Dec;51(6-7):333-55.

Shih AY, Imbeault S, Barakauskas V, Erb H, Jiang L, Li P, Murphy TH. Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo. *J Biol Chem.* 2005 Jun;280(24):22925-36.

Silva-Adaya D., Pérez-De la Cruz V., Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Binienda Z, Ali SF, Santamaría A. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J Neurochem.* 2008 May;105(3): 677-89.

Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 2003 Oct;3(10):768-80.

Tarawneh R, Galvin JE. Potential future neuroprotective therapies for neurodegenerative disorders and stroke. *Clin Geriatr Med.* 2010 Feb;26(1):125-47.

Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life.* 2008 Sep;60(9):575-90.

Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kaye R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM. Curcumin inhibits formation of amyloid

beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem.* 2005 Feb;280(7):5892-901.

Yang C, Zhang X, Fan H, Liu Y. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res.* 2009 Jul;1282:133-41.

Zádori D, Klivényi P, Vámos E, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L. Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. *J Neural Transm.* 2009 Nov;116(11):1403-9.

Zhou C, Huang Y, Przedborski S. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Dec;1147:93-104.

Zündorf G, Reiser G. Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Apr;14(7):1275-88.