



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**L-KYN COMO ATRAPADOR DE ESPECIES REACTIVAS Y
ANTIOXIDANTE EN DIFERENTES MODELOS PRO-
OXIDANTES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

Ugalde Muñiz Perla Eugenia



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Verónica Pérez De la Cruz
2012**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

<p>1. Datos del alumno Ugalde Muñiz Perla Eugenia 15 20 33 82 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 305151340</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. Verónica Pérez De la Cruz</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. José Pedraza Chaverri</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dr. Paul Carrillo Mora</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dra. Luisa Alvarina Alba Lois</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito L-KYN COMO ATRAPADOR DE ESPECIES REACTIVAS Y ANTIOXIDANTE EN DIFERENTES MODELOS PRO- OXIDANTES 50 p 2012</p>

INDICE

1. ABREVIATURAS.....	5
2. RESUMEN.....	7
3. ANTECEDENTES.....	8
3.1. VIA DE LA KINURENINA.....	8
3.1.1. METABOLITOS DE LA VIA DE LA KINURENINA.....	11
3.2. GENERALIDADES DE LA L-KINURENINA.....	12
3.3. LAS KAT'S Y SU PAPEL EN LA FORMACIÓN DE KYNA A PARTIR DE LA L-KYN.....	14
3.4. RATONES KNOCK-OUT PARA LA KINURENINA AMINOTRANSFERASA II (KAT II KO) COMO MODELO DE ESTUDIO.....	15
3.5. ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO.....	15
3.5.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ERO) Y NITROGENO (ERN)....	16
3.5.2. DAÑO OXIDATIVO EN MACROMOLECULAS.....	18
3.5.3. MODELOS PRO-OXIDANTES SULFATO FERROSO, ONOO⁻ Y ACIDO 3-NITROPROPIONICO COMO.....	19
4. JUSTIFICACIÓN.....	21
5. HIPÓTESIS.....	21
6. OBJETIVO GENERAL.....	21
7. OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
8. MÉTODOS.....	22
8.1. MATERIALES Y ANIMALES.....	22
8.2. DETERMINACIÓN DE CAPTURA DE ESPECIES REACTIVAS EN SISTEMAS SINTÉTICOS.....	23
8.2.1. ENSAYO DE ATRAPAMIENTO RADICAL HIDROXILO (OH[•]).....	23
8.2.2. ENSAYO DE ATRAPAMIENTO PEROXINITRITO (ONOO⁻).....	23
8.2.3. ENSAYO DE ATRAPAMIENTO ANIÓN SUPERÓXIDO (O₂^{•-}).....	24
8.2.4. ENSAYO DE ATRAPAMIENTO DE PERÓXIDO	

DE HIDROGENO H ₂ O ₂	24
8.3. CARACTERIZACIÓN DE RATONES KNOCK-OUT Y SILVESTRES.....	25
8.4. PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS DE CEREBRO.....	26
8.5. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ERO POR FLUOROMETRÍA.....	26
8.6. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ERO POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	26
8.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
9. RESULTADOS.....	28
9.1. CAPACIDAD ATRAPADORA DE LA L-KYN EN SISTEMAS SINTETICOS.....	28
9.2. LA L-KYN PREVIENE LA PRODUCCIÓN DE ERO EN HOMOGENADOS DE CEREBRO DE RATA.....	30
9.3. LA L-KYN PREVIENE LA PRODUCCIÓN DE ERO EN HOMOGENADOS DE CEREBRO DE RATONES KNOCK-OUT PARA LA KATII Y SILVESTRES.....	33
10. DISCUSIÓN.....	38
11. CONCLUSIONES.....	41
12. PERSPECTIVAS.....	41
13. BIBLIOGRAFÍA.....	42

1. ABREVIATURAS

3-hidroxicinurenina	3-HK
Ácido 3-hidroxiantranílico.....	3-HA
Ácido dietilenetriaminepentaacético.....	DTPA
Ácido hipocloroso.....	HCl
Ácido kinurénico.....	KYNA
Ácido quinolínico.....	QUIN
Ácido tiobarbitúrico.....	TBA
Adenosina trifosfato.....	ATP
Anión superóxido.....	O ₂ ^{•-}
Dicloro-dihidro-fluoresceína.....	DHCF
Diclorofluoresceína.....	DCF
Dimetil sulfóxido.....	DMSO
Dimetil tiourea.....	DMTU
Especies reactivas del nitrógeno.....	ERN
Especies reactivas del oxígeno.....	ERO
Fenazina metosulfato.....	PMS
Glutación.....	GSH
Indolamina-2,3-dioxigenasa.....	IDO
Kinurenina aminotransferasas.....	KATs
L-kinurenina.....	L-KYN
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.....	¹ O ₂
Ozono.....	O ₃
Peróxido de hidrógeno.....	H ₂ O ₂

Peróxidos orgánicos.....	ROOH
Peroxinitrito.....	ONOO ⁻
Radical alcoxilo.....	•OR
Radical hidroxilo.....	OH•
Radical hidroxiperoxilo.....	•OOH
Radical peroxilo.....	•OOR
Receptor para N-metil-D-aspartato.....	NMDAr
Superóxido dismutasa.....	SOD
Triptófano dioxigenasa.....	TDO
Vía de la kinurenina.....	VK

2. RESUMEN

Varios de los metabolitos de la vía de la kinurenina (VK) han mostrado tener relevancia fisiológica debido a que algunos poseen propiedades neuroactivas, pro-oxidantes y antioxidantes. Esta vía es responsable de la degradación del 95% del triptófano que se obtiene de la dieta; en el cerebro el triptófano es captado por los astrocitos, macrófagos, microglia y células dendríticas, y es convertido a L-kinurenina (L-KYN) por la enzima kinurenina formilasa a partir de la formil kinurenina. La L-KYN sirve como sustrato para distintas enzimas: la kinureninasa, la kinurenina 3-hidroxilasa, y las kinurenina amino transferasas (KAT's). En reportes previos se ha visto que la L-KYN tiene una alta capacidad de auto oxidarse comparándolo con otros metabolitos de la vía, lo cual sugiere que este metabolito podría tener actividad atrapadora de especies reactivas del oxígeno (ERO). En este trabajo se evaluó la capacidad de la L-KYN para atrapar anión superóxido, peroxinitrito, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno en sistemas de química combinatoria. Adicionalmente, se evaluó la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) por fluorimetría y citometría de flujo, en homogéneos de cerebro de rata y ratones knock-out (KATII KO) y silvestres expuestos a diferentes pro-oxidantes FeSO_4 (5 μM), 3-NP (5 mM) y ONOO^- (25 μM), en presencia de L-KYN. Se encontró que la L-KYN es capaz de atrapar radical hidroxilo y peroxinitrito de manera eficiente en los sistemas sintéticos, pero no muestra tener capacidad de atrapar anión superóxido y peróxido de hidrogeno. En homogenados de cerebro de rata, el FeSO_4 , 3-NP y ONOO^- aumentaron la producción de ERO (82%, 130% y 200% respectivamente), dicho efecto fue atenuado por la L-KYN desde tiempos cortos y a bajas concentraciones. En homogenados de cerebro de ratones knock-out y silvestres, la L-KYN previene la producción de ERO generada por los pro-oxidantes, Los resultados sugieren que L-KYN puede ser considerado como un antioxidante endógeno y que dicha propiedad es independiente de su capacidad como precursor de KYNA.

3. ANTECEDENTES.

3.1. VIA DE LA KINURENINA

La vía de la kinurenina (VK) es la principal ruta catabólica del L-triptófano en mamíferos, y su principal función es la producción de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) (Beadle et al., 1947). 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). Es importante mencionar que los humanos y los animales no poseen una maquinaria enzimática que les permita sintetizar triptófano por ellos mismos, es por esto que el triptófano lo obtienen de la dieta en forma de proteínas.

El primer paso de la vía es romper oxidativamente la estructura de anillo del L-triptófano, esto es controlado por dos enzimas la triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO) que se localiza en el hígado (Hayashi et al., 1957) y la indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO) que se localiza en el cerebro (Hayaishi, 1976) dicha reacción 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 y Hayaishi, 1971) y por el óxido nítrico (Thomas et al., 1994). El producto de esta reacción es la N-formil kinurenina, el siguiente paso es la conversión de la N-formil kinurenina a L-kinurenina (L-KYN), que va a servir de sustrato para diferentes enzimas: la kinurenasa - que produce ácido antranílico (ANA), las kinureninas aminotransferasas (KAT's) que catalizan la transaminación irreversible de L-KYN a ácido kinurénico (KYNA) y la kinurenina 3-hidroxilasa que forma 3-hidroxikinurenina (3-HK), esta última enzima es la que presenta la mayor afinidad por la kinurenina, lo que sugiere que bajo condiciones normales, es la que metaboliza la mayor parte de la kinurenina disponible (Bender y McCreanor, 1982).

El ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA) puede formarse por dos vías, la primera mediante la kinureninasa, en donde una enzima piridoxal dependiente de fosfato y que se encuentra en el citosol convierte a la 3-hidroxikinurenina (3-HK) a ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA), la otra vía es a partir del ácido antranílico el cual puede ser hidroxilado por enzimas de hidroxilación microsomal no específicas y producir de esta manera el 3-HA.

A través de la hidroxilación de la kinurenina a 3-hidroxikinurenina (3-HK) se forma otro metabolito de la vía, el ácido quinolínico (QUIN). Esta reacción es llevada a cabo por la kinurenina hidroxilasa (Okamoto et al., 1967) y requiere de la presencia de NADPH como donador de un electrón.

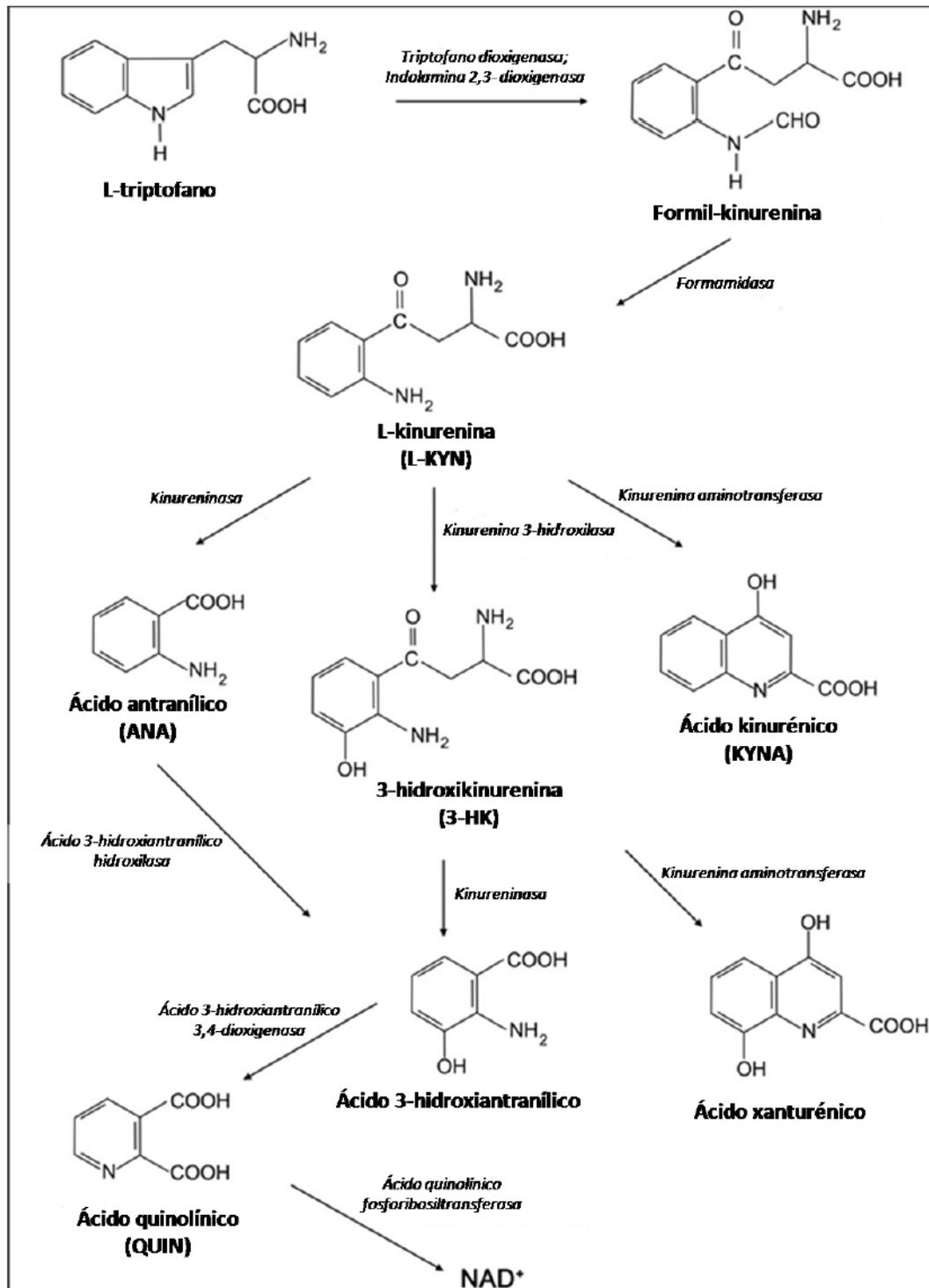


Figura 1. Vía de la kinurenina (modificado de Vamos et al., 2009)

3.1.1. METABOLITOS DE LA VIA DE LA KINURENINA CON PROPIEDADES NEUROACTIVAS, PRO-OXIDANTES Y ANTIOXIDANTES

Además de la importancia que tiene la VK por la degradación del triptófano, se han estudiado varios de sus metabolitos a los cuales se les han hallado propiedades que tienen repercusión en el sistema nervioso (Stone, 1993). En primera instancia la 3-HK, que como se mencionó anteriormente, es un derivado directo de la KYN, y ha cobrado atención dentro de la VK ya que, a través de la generación de radicales libres, desencadena procesos neurodegenerativos (Eastman y Guiliarte, 1989; Okuda et al., 1998), incluso se ha demostrado que puede potenciar eventos excitotóxicos en presencia de QUIN (Guidetti y Schwarcz, 1997). Por otro lado se sabe que el QUIN es un agonista de receptores glutamatérgicos tipo NMDA (NMDAr) y por ende es considerado un agente excitotóxico por su potencial neurotóxico en diferentes modelos experimentales (Lapin, 1978; Shwarcz et al., 1983). Recientemente ha sido involucrado en diferentes procesos fisiológicos y patológicos en relación a la actividad del receptor, adicionalmente QUIN es capaz de generar un ambiente oxidante por su habilidad de acomplejarse con el Fe y promover la reacción de Fenton.

Otro metabolito ampliamente estudiado es el KYNA, el cual funciona como bloqueador competitivo del sitio para glicina del NMDAr con una CE_{50} de $\sim 235 \mu\text{M}$ (Kessler et al., 1989). También se ha demostrado que KYNA es capaz de capturar (ERO): Goda y colaboradores en 1996 encontraron el primer indicio de que el KYNA posee la capacidad de atrapar OH^\bullet en sistemas no biológicos y más recientemente Lugo-Huitrón et al. (2011) demostraron que el KYNA es capaz de atrapar anión superóxido, radical hidroxilo y peroxinitrito, de manera eficiente en sistemas de química combinatoria y que este metabolito es capaz de disminuir la peroxidación de lípidos así como la formación de ERO inducida por FeSO_4 en homogenados de cerebro de rata, esto muestra que el KYNA presenta propiedades antioxidantes.

3.2. GENERALIDADES DE LA L-KINURENINA

La L-kinurenina (L-KYN) es un di-amino ácido y es un intermediario de la vía de la kinurenina (Fig. 2). En el cerebro, el triptófano es captado por los astrocitos, macrófagos, microglia y células dendríticas, y es convertido a L-KYN (Ruddick et al., 2006) y la enzima encargada de su formación es la kinurenina formilasa a partir de la formil kinurenina (Mehler y Knox, 1950). La L-KYN sirve como sustrato para distintas enzimas: la kinureninasa para la formación de ANA, la kinurenina 3-hidroxisilasa que produce 3-HK, y las KAT's que forman KYNA.

La L-KYN puede entrar al cerebro por un transportador de aminoácidos neutros (Fukui, 1991) y una vez adentro es transportado a los astrocitos y células de la microglia. También puede ser transportado a neuronas pero en menor cantidad, debido a que este transporte es más lento y depende del suministro de Na⁺ y se da por un transporte activo.

La L-KYN se encuentra en el cerebro de rata en una proporción aproximadamente del 5% comparado con la cantidad total de triptófano y no se encuentra uniformemente distribuida, se encuentra en un rango de 0.03 pmol/mg de tejido en el cerebelo y a 1.05 pmol/mg de tejido en el putamen (Joseph, 1978; Gal y Sherman, 1980). Se ha estimado que cerca del 60% del total de la L-KYN que se encuentra en el cerebro, se obtiene a partir del plasma sanguíneo (Gal y Sherman, 1980), esto debido a que la L-KYN puede cruzar la barrera hematoencefálica a través de un transportador de aminoácidos neutros independiente de Na⁺ (Smith et al., 1987; Fukui et al., 1988).

Aunado a esto Gregory et al. (2003) encontraron que la L-KYN presenta una alta capacidad de auto-oxidación, esto significa que presenta una alta capacidad de ceder electrones de su estructura química al medio, aumentando así su estado de oxidación, esto debido a la presencia de un grupo amino que facilita su oxidación a

potenciales eléctricos altos y un grupo hidroxilo adicional que se puede reducir dramáticamente bajo condiciones fisiológicas de oxidación-reducción, por lo que concluye que los procesos de oxidación y reducción se dan lugar en el anillo aromático de las kinureninas y la oxidación de fenoles y anilinas se dan en el grupo hidroxilo o amino de la molécula.

Recientemente, Silva-Adaya y colaboradores (2011) demostraron que, en un modelo de hemiparkinsonismo en ratas inducido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), la administración sistémica conjunta de L-KYN y probenecid un inhibidor de transporte de ácidos orgánicos, protege contra los efectos de esta toxina y redujo el daño oxidativo causado por las características pro-oxidantes de la 6-OHDA.

Por otro lado Carrillo-Mora y colaboradores en el 2010 encontraron una mejoría en la actividad locomotora y en la memoria espacial, así como una disminución en las alteraciones morfológicas causadas por la infusión del péptido beta amiloide en ratas administradas con L-KYN y probenecid. Por otro lado en un modelo de isquemia en gerbos, a los que se les administro L-KYN, se encontró una disminución en la muerte celular en el hipocampo y aunado a esto los animales evidenciaron una disminución en la hiper movilidad y en la pérdida de la memoria espacial (Gigler et al., 2007). En todos estos trabajos se utilizan modelos que producen un aumento en el daño oxidante, y el efecto neuroprotector que observan es atribuido a la formación de KYNA a partir de la administración de L-KYN, por lo que los autores sugieren que este aumento en los niveles de KYNA es el principal responsable de dicho efecto, sin embargo no se sabe cuánto KYNA se forma y se desconoce si la L-KYN también podría jugar un papel neuroprotector reduciendo el daño oxidativo en estos modelos.

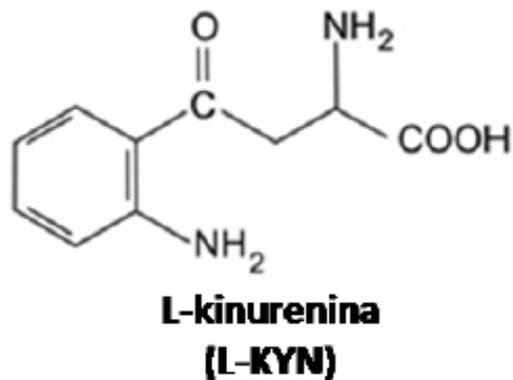


Figura 2. Estructura de la L- KYN

3.3. LAS KAT'S Y SU PAPEL EN LA FORMACIÓN DE KYNA A PARTIR DE LA L-KYN

Las kinurenina aminotransferasas (KAT) son las enzimas encargadas de la formación de ácido kinurénico a partir de la L-KYN. Esto se da por la transaminación de la L-KYN, lo cual conlleva a la formación de KYNA y es irreversible. Todas las enzimas que se requieren para la síntesis de KYNA están presentes en el cerebro (Schwarcz et al., 1990; Guidetti et al., 1995). Se ha encontrado una mayor cantidad de aminotransferasas capaces de formar KYNA a partir de kinurenina en órganos periféricos en comparación con el cerebro (Okuno y Kido, 1991), y en humanos se han identificado tres isoformas de KAT (KAT I, KAT II y la KAT III), por lo que la producción de KYNA es compleja (Okuno et al., 1991; Guidetti et al., 1997). Las KAT's difieren en el pH óptimo para ejercer su actividad, la KAT I tiene un pH óptimo de 9.5 a 10, por otro lado la KAT II funciona a pH fisiológico y ambas reconocen a la kinurenina (que se encuentra a concentraciones micromolares en el cerebro) (Schmidt et al., 1993); se sugiere que la KAT II es la principal enzima implicada en la formación de KYNA.

En el cerebro, todas las enzimas de la vía de la kynurenina están principalmente expresadas en astrocitos y/o células de la microglia, aparentemente los astrocitos no presentan la kinurenina-3-hidroxilasa que es la enzima encargada de llevar a cabo la formación de 3-HK a partir de la L-KYN, lo cual favorece la formación de

KYNA (Guillemin et al., 2001), después de que se formó el KYNA este es liberado del espacio extracelular por un sistema acarreador sensible al probenecid que transporta al KYNA fuera del cerebro (Moroni et al., 1988).

3.4. LOS RATONES KNOCK OUT PARA LA KINURENINA AMINOTRANSFERASA II (KAT II KO) COMO MODELO DE ESTUDIO

En el cerebro de ratas y humanos adultos más del 70% del KYNA es sintetizado por la kinurenina aminotransferasas II (KATII) (Guidetti et al., 2007).

Recientemente, el grupo del Dr. Schwarcz y colaboradores desarrolló un ratón knockout para la kinurenina aminotransferasas II (Kat-2), enzima responsable de la transaminación de kinurenina a KYNA. La destrucción del gen de kat-2 en ratones por recombinación homóloga, indujo una reducción perinatal de KYNA en el cerebro de los ratones durante el primer mes de edad; sin embargo, dichos niveles retornaron a valores normales más tarde. En contraste, la actividad de las kinureninas aminotrasferasas (KAT's) y los niveles de KYNA en hígado disminuyeron >90% durante toda su vida. La reducción en los niveles de KYNA cerebrales se acompañó por anomalías conductuales: los ratones llegaron a manifestar hiperactividad y coordinación motora anormal a las 2 semanas de edad, pero ésta se hizo indistinguible de la actividad de los ratones silvestres a los 30 días postnatales (Ping Yu et al., 2004). Es por esta razón que estos animales son una buena herramienta ya que si la KAT II no se encuentra activa la formación de KYNA se reducirá significativamente dado que no toda la L-KYN esta formando KYNA.

3.5. 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.

3.5.1. 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 oxidante (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 ($\bullet OOR$)	Ozono (O_3)
Radical hidroxiperoxilo ($\bullet OOH$)	Oxígeno singulete (1O_2)
Radical alcoxilo ($\bullet OR$)	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.

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 ciclooxigenasa 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 para formar 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 y dar lugar a la generación de otra especie muy agresiva, el ONOO

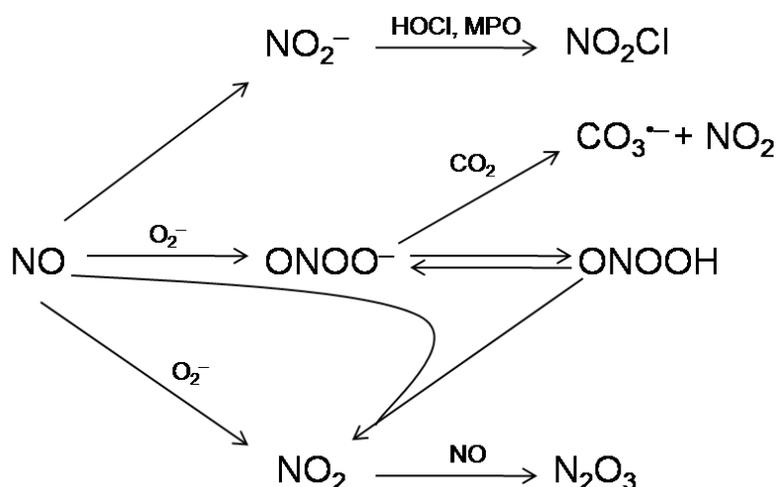


Figura 3. Vía de oxidación del ON y consecuente producción de ONOO^- y estrés nitrosativo (Tomado de Soneja et al., 2005).

3.5.2. DAÑO OXIDATIVO EN MACROMOLÉCULAS

La producción de ERO es 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 lípidos, proteínas y ADN, afectando así su estructura y función. El sistema nervioso es notablemente susceptible al daño a lípidos dada su gran cantidad presente en membranas, el efecto directo de las ERO sobre los lípidos es la lipoperoxidación. Los radicales OH^\bullet e hidroperoxilo (HO_2^\bullet), así como el $^1\text{O}_2$, 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).

Por otro lado las ERO, pueden dañar a las proteínas, alterando no sólo su estructura, sino también su función, 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.

El DNA también puede dañarse por efecto de las ERO, ya que estas especies reactivas reaccionan 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). 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.

3.5.3. MODELOS PRO-OXIDANTES: 3NP, ONOO⁻ Y SULFATO FERROSO

El 3NP es una micotoxina que causa neurotoxicidad en animales y humanos (Ludolph et al., 1991). El mecanismo primario de esta toxina involucra la inhibición de la succinato deshidrogenasa, una enzima localizada en el interior de la membrana mitocondrial y la cual es responsable de la oxidación del succinato a fumarato, llevando a la reducción de la síntesis de ATP y a la muerte neuronal, (Túnez et al., 2004; Coles et al., 1979). Este bloqueo en la actividad mitocondrial está asociado con la formación de ERO. La inhibición de enzimas en la cadena de transporte de electrones puede llevar a un incremento en la fuga de los mismos

desde la mitocondria y la consecuente producción de $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 y $\bullet OH$, lo cual conlleva al daño a las membranas celulares y al material genético.

Por otro lado el $ONOO^-$ es particularmente efectivo oxidando moléculas aromáticas y compuestos organosulfurados, incluyendo aminoácidos libres y residuos peptídicos. En sistemas *in vitro*, el $ONOO^-$ es muy reactivo pues oxida de grupos sulfhidrilos y tioésteres, y nitrifica e hidroxila compuestos aromáticos (incluyendo la tirosina, el triptófano y la guanina). La oxidación de grupos sulfhidrilo es responsable de la inhibición mitocondrial, de la aconitasa citosólica y de otras enzimas críticas en la cadena respiratoria mitocondrial (Hausladen y Fridovich, 1994). La mitocondria representa un blanco preferencial de las acciones tóxicas del $ONOO^-$. En experimentos iniciales (Radi et al., 1994) se demostró que el $ONOO^-$ afecta varios componentes de la cadena de transporte mitocondrial, de la síntesis de ATP y la enzima ferro-sulfurada del ciclo de Krebs, la aconitasa, causando así una inhibición de la respiración y una caída de la síntesis de ATP. Estos efectos, a su vez, tienen un impacto directo sobre la homeostasis mitocondrial y celular del Ca^{2+} . Aunado a esto se sabe que concentraciones bajas de $ONOO^-$ pueden disparar la muerte celular apoptótica, mientras que altas concentraciones pueden llevar a necrosis (Virág et al., 2003). En reportes previos se ha visto en cerebros de rata tratados con $ONOO^-$, un aumento en la formación de ERO, así como de la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas en un ensayo *in vitro* (Manusco et al., 2012).

Como ya se mencionó anteriormente el OH^{\bullet} es uno de los radicales más agresivos, ya que reacciona con cualquier molécula que se encuentre en las cercanías, causando gran daño a las principales biomoléculas, el mecanismo principal de su generación es la reacción de Fenton; el sulfato ferroso ($FeSO_4$) en estado acuoso se hidroliza, lo que genera el hierro (Fe^{3+}) que se necesita para que se lleve a cabo la reacción (Kehrer, 2000), por lo que la administración de $FeSO_4$, conlleva a un aumento en la producción de radical OH^{\bullet} . En ensayos *in vitro* se ha visto que el $FeSO_4$ aumenta la producción de ERO y la peroxidación de lípidos

(Lugo-Huitrón et al., 2011). Por otro lado se ha visto que la presencia de FeSO_4 en cultivos neuronales provoca un aumento en la peroxidación de lípidos así como en la muerte celular (Takadera et al., 2011).

4. JUSTIFICACIÓN

Dado que se han realizado pocos estudios sobre las propiedades de la L-KYN y su papel fisiológico, independiente de su función como intermediario de la vía de la kinurenina para la formación de varios metabolitos, es de gran relevancia investigar a profundidad las propiedades de este metabolito. Aunado a esto en varios modelos de diversas patologías observan neuroprotección cuando administran L-KYN, sin embargo no se ha estudiado si la L-KYN pueda jugar un papel neuroprotector, que pueda ser a través de una posible interacción con ERO.

5. HIPOTESIS

Si la L-kinurenina es capaz capturar radicales libres en sistemas no biológicos, entonces podrá atenuar el daño oxidativo inducido por los diferentes pro-oxidantes como son el FeSO_4 , el ONOO- y el 3NP en sistemas biológicos independientemente de la formación de KYNA.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antioxidante de la L-kynurenina, tanto en sistemas sintéticos generadores de especies reactivas, como en homogenados de cerebro de rata y de ratones KO KAT II.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la capacidad atrapadora de la L-KYN sobre $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , $ONOO^-$ y H_2O_2 en sistemas generadores de química combinatoria.

Evaluar si la L-KYN disminuye la producción de ERO inducida por $FeSO_4$, 3NP Y $ONOO^-$ en homogenados de cerebro de rata.

Comprobar si el efecto antioxidante de la L-KYN es independiente de la formación de KYNA evaluando la producción de ERO inducida por $FeSO_4$, 3NP Y $ONOO^-$ en homogenados de cerebros de ratones knock-out y silvestres.

8. MÉTODOS

8.1. 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 de entre 250 y 300 g de peso para la obtención del tejido cerebral. Se usaron ratones KAT II KO y silvestres de 3 semanas de edad, ya que es en este periodo de tiempo donde se han reportado los niveles más bajos de KYNA. Todos los animales se mantuvieron en cajas de acrílico, con acceso libre al alimento y al agua, los animales fueron alimentados con un producto comercial (Purina Chow) y agua. Los cuartos del bioterio se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura ($25\pm 3^{\circ}C$), humedad ($50\pm 10\%$) y luz (12:12 ciclo luz:oscuridad).

8.2. DETERMINACIÓN DE CAPTURA DE ESPECIES REACTIVAS EN SISTEMAS SINTÉTICOS

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

8.2.1. ENSAYO DE RADICAL HIDROXILO (OH[•])

Se llevó a cabo mediante el sistema Fe³⁺-EDTA-H₂O₂-desoxiribosa (Halliwell et al., 1987; Floriano-Sánchez et al., 2006). Para el ensayo 100% (sin el compuesto a probar) se colocaron en tubos 200 µl de ácido ascórbico 1 mM, 200 µl de desoxiribosa 2.8 mM, 100 µl de H₂O₂ 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/ FeCl₃ 1 mM. Para el ensayo problema se agregaron 100 µl de L-KYN 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 µM. Se incubaron durante una hora a 37°C, y después se agrega 1 ml de TBA/HCl/TCA/DFO y se calentaron 10 minutos en Baño María a 100°C para registrar las absorbencias a 532 nm.

8.2.2. 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 H₂O₂ 0.7 M en HCl 0.6 M con 5 ml de KNO₂ 0.6 M, y casi instantáneamente se detuvo la reacción con NaOH 1.2 M frío. El H₂O₂ residual se removió usando una columna de MnO₂ prelavada con NaOH 1.2 M durante 20 minutos. La mezcla obtenida se almacenó a -20°C por una noche. Se recolectó la capa de líquido amarillo y se mantuvo a -20°C. 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. La captura de ONOO⁻ se midió a través de la inhibición de la formación de diclorofluoresceína (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 H₂O y 15 µl del ONOO⁻ sintetizado. Al tubo problema se le agregaron 100 µl de L-KYN 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 µM y se registró la absorbencia a 500 nm durante tres minutos cada minuto.

8.2.3. ENSAYO DE ANIÓN SUPERÓXIDO (O₂^{•-})

La captura de O₂^{•-} se estimó mediante la generación del radical en el sistema descrito por Nikishikimi y colaboradores (1972), posteriormente modificado por Ponti et al. (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 las diferentes concentraciones de L-KYN 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 µM. Una vez realizada la mezcla se determinó la absorbencia a 560 nm en un espectrofotómetro, cada minuto durante 3 minutos.

8.2.4. ENSAYO DE PERÓXIDO DE HIDROGENO H₂O₂

La captura de H₂O₂ se estimó mediante la generación esta especie en el sistema descrito por Lee Hua y colaboradores (2001). Esta técnica se basa en la oxidación del ion ferroso (Fe²⁺) a la forma férrica (Fe³⁺) por el peróxido de hidrógeno, el ion Fe³⁺ se une entonces al naranja de xilenol y forma un complejo colorido con absorción máxima a los 560 nm. En un tubo de ensayo se mezclaron 100 µl de metanol, 900 µl de H₂O₂ y 900 µl de la solución FOX (metanol 90%; naranja de xilenol 100 µM; hidroxitolueno butilado 4 mM y ácido sulfúrico 25 mM) y se probaron las diferentes concentraciones de L-KYN (1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 µM). Una vez realizada la mezcla se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbencia a 560 nm en un espectrofotómetro.

8.3. CARACTERIZACIÓN DE RATONES KATII KO Y SILVESTRES

Los genotipos determinaron por PCR empleando dos pares de oligos del gen *mkat-2* tanto para ratones WT como *mkat-2*^{-/-}, con las secuencias (5'-3'):

WT

Oligo1: ACATGCTCGGGTTTGGAGAT

Oligo 2: AAGCTTTGGA ACTCTAGTGGG

mkat-2^{-/-}.

Oligo 3: GAGACAGACGCTTGATACT

Oligo 4: GTGGATGTGGAATGTGTGCG

Para la extracción de ADN se cortaron 0.5 cm de cola a cada ratón, y se incubaron durante toda la noche a 55°C en 500 µL de amortiguador de lisis que contenía Tris 100 mM (pH 8.5), EDTA 5 mM, SDS 0.2 %, NaCl 200 mM y proteinasa K 100 µg/ml. Tras la incubación se centrifugaron las colas a 6000 x g durante 10 min. Al sobrenadante se le agregaron 500 µL de isopropanol frío y se mezcló hasta observar el precipitado de ADN. Posteriormente se centrifugó a 6000 x g por 10 min, desechando el sobrenadante para posteriormente resuspender en agua estéril. Para la reacción se cargaron 100 ng de ADN en amortiguador con MgCl y amonio, con cada juego de oligos (Oligos 1 con 2 y 3 con 4) 0.1 µM cada uno, añadiendo 0.6 U de Taq ADN polimerasa (Ampliqon, Odense, Dinamarca). Los parámetros de termociclado se ajustaron de la siguiente manera: 2 min a 94°C, seguido de 25 ciclos de 40 seg a 94°C, 40 seg a 58° C y 1 min a 72°C. Al finalizar el ciclo de reacción, se cargaron 5 µl del amplificado en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio y se corrieron durante 45 min a 50 V. Las bandas de los amplificados se observan entre 1.4 y 1.7 kb y se determina qué par de oligos amplificó la secuencia.

8.4. PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS DE CEREBRO

Para los homogenados se extrajeron los cerebros tanto de rata como de ratón y se homogenizaron 1:10 en amortiguador 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). Los homogenados se obtuvieron el día del experimento y se preservaron en hielo hasta su utilización.

8.5. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ERO POR FLUOROMETRÍA

La formación de ERO se detectó por fluorescencia de la diclorofluoresceína (DCF) (Ali et al., 1992). Para esto se incubaron las muestras de los homogenados de tejido de rata durante una hora en presencia o ausencia de diferentes pro-oxidantes FeSO_4 (5 μM), 3-NP (5 mM) y ONOO^- (25 μM), con la presencia de L-KYN (0.1 μM) a 37°C, en un volumen final de 1.5 mL. 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 media hora; posteriormente las muestras se centrifugaron a 6000 x g durante 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 datos son expresados en porcentaje con respecto al control.

8.6. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ERO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para evaluar la formación de ERO por citometría de flujo se colocaron en un volumen final de 300 μl , se colocaron 100 μl de los homogenados de cerebro tanto de rata como de ratones KAT II KO y silvestres en presencia o ausencia de diferentes pro-oxidantes FeSO_4 (5 μM), 3-NP (5 mM) y ONOO^- (25 μM), en presencia de L-KYN (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 μM) a 37°C, una vez que se colocaron los diferentes tratamientos, se agregaron 20 μL de una solución de DCF-diacetato 75

μM , la formación de ERO se detecto por fluorescencia de la diclorofluoresceina diacetato (DCF-DA) y se hicieron tres adquisiciones a los tiempos 0, 30 y 60 minutos para cada muestra, esto para apreciar la formación de ERO en el tiempo, para leer la fluorescencia de las muestras se utilizó un citómetro de flujo BD FACS Callibur y la intensidad de fluorescencia fue detectada en el canal FL-1, excitando con el láser azul (488 nm). Se adquirieron un total de 10,000 eventos para cada muestra, los datos adquiridos se analizaron con el programa FlowJo para obtener la intensidad media de fluorescencia relativa.

8.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó el programa GraphPad, a los diferentes grupos se les realizó una ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey.

9. RESULTADOS

9.1. CAPACIDAD ATRAPADORA DE L-KYN

En la Figura 4 se presenta la capacidad de captura del L-KYN para; a) ONOO^- y b) OH^\bullet . La L-KYN es capaz de capturar OH^\bullet y ONOO^- en medios sintéticos ya que se observa que la L-KYN reduce la cantidad del radical de manera concentración-dependiente. La concentración efectiva al 50% para OH^\bullet y ONOO^- fue de $1.432 \pm 0.33 \mu\text{M}$ y de $2.23 \pm 0.53 \mu\text{M}$, respectivamente.

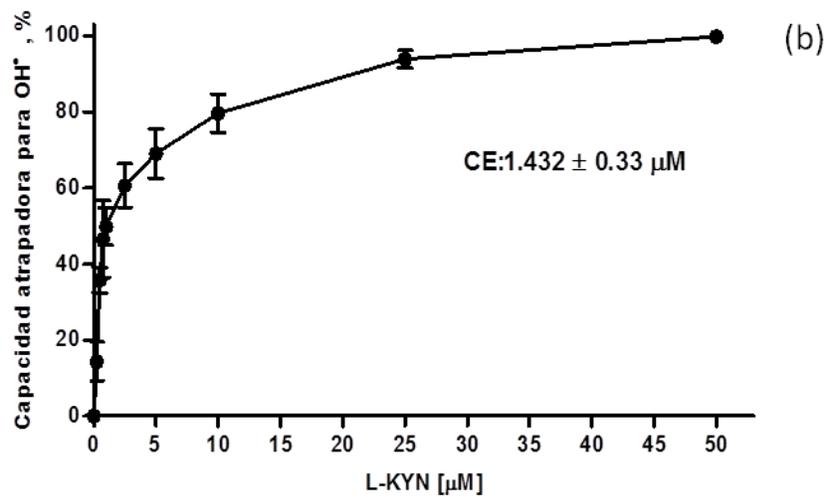
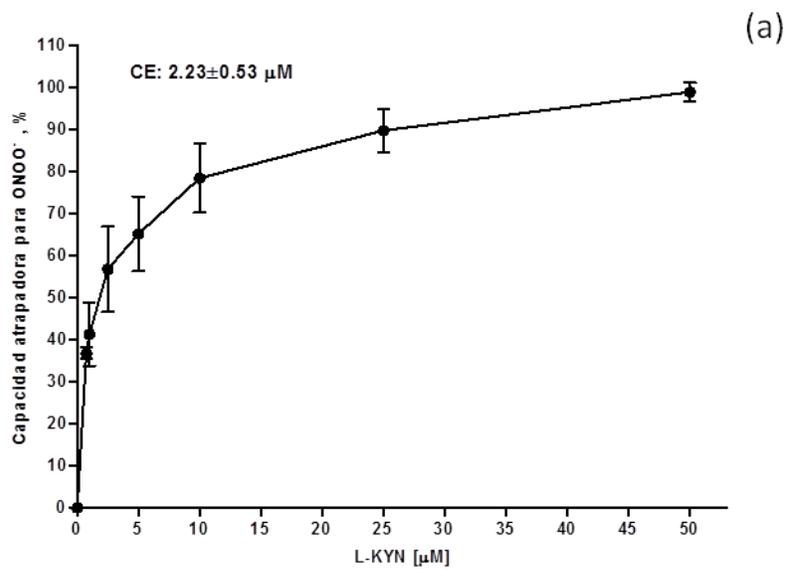


Figura 4. Efecto de la L-KYN (1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 μM) en la producción de radical ONOO^- (a) y OH^\bullet (b), en sistemas de química combinatoria.

9.2. La L-KYN PREVIENE LA PRODUCCIÓN TOTAL DE ERO EN HOMOGENADOS DE CEREBRO DE RATA

El FeSO_4 , el 3NP y el ONOO^- indujeron un aumento de la producción de ERO (82, 130 y 200 % vs. Control, respectivamente) en cerebro de rata y esta formación de ERO fue atenuada por L-KYN ($0.1 \mu\text{M}$) en todos los casos. La incubación solo con L-KYN no tuvo efecto en la producción de ERO.

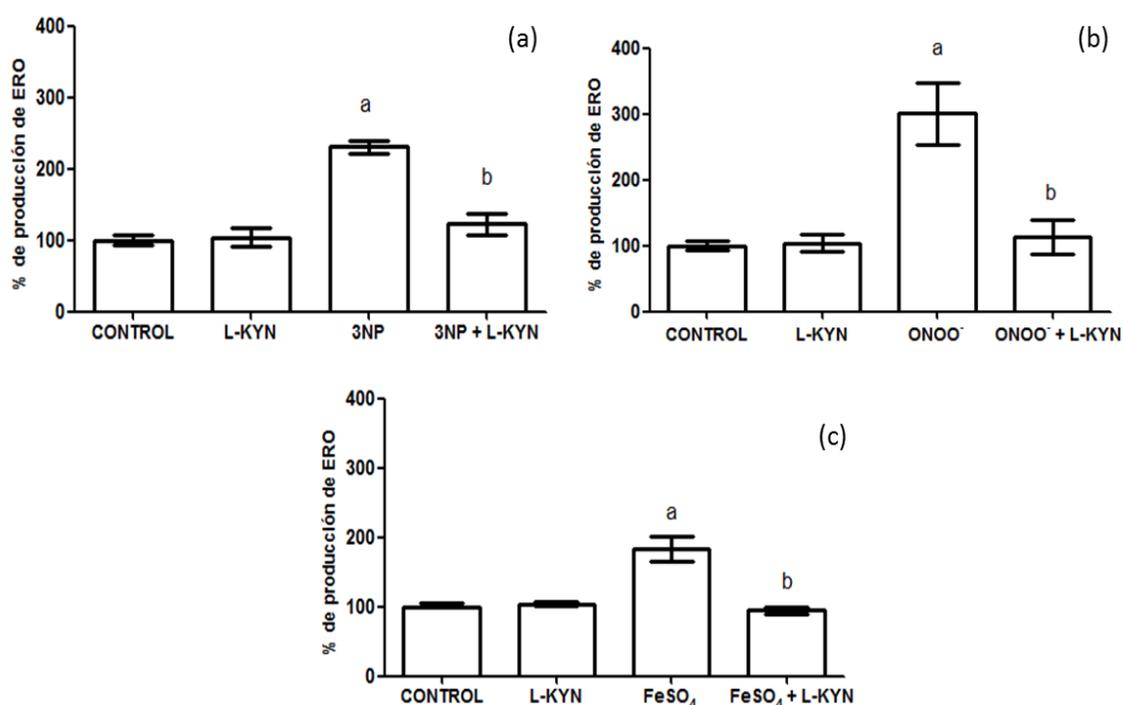


Figura 5. La L- KYN ($0.1 \mu\text{M}$) redujo la formación de ERO inducida por (a) 3NP, (b) ONOO^- y (c) FeSO_4 en cerebro de rata. Los valores están expresados en promedios \pm SEM. ^a $P < 0.05$ significativamente diferente al control, ^b $P < 0.05$ significativamente diferente al 3NP, ONOO^- y FeSO_4 .

EFFECTO PROTECTOR CONCENTRACION Y TIEMPO DEPENDIENTE DE L-KYN EN LA PRODUCCION DE ERO

En la figura 6 se hace evidente el aumento en la producción de ERO evocado por el (a) ONOO^- , (b) 3-NP y (c) FeSO_4 , dicho efecto es tiempo dependiente. Por su parte, la L-KYN (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 μM) previene la formación de ERO inducida por las toxinas de manera concentración y tiempo dependiente. Esta capacidad de la L-KYN es más pronunciado para el caso del ONOO^- y 3-NP, comparándolo con el FeSO_4 . Cabe mencionar que la incubación con L-KYN sola no tuvo efecto significativo con respecto al control.

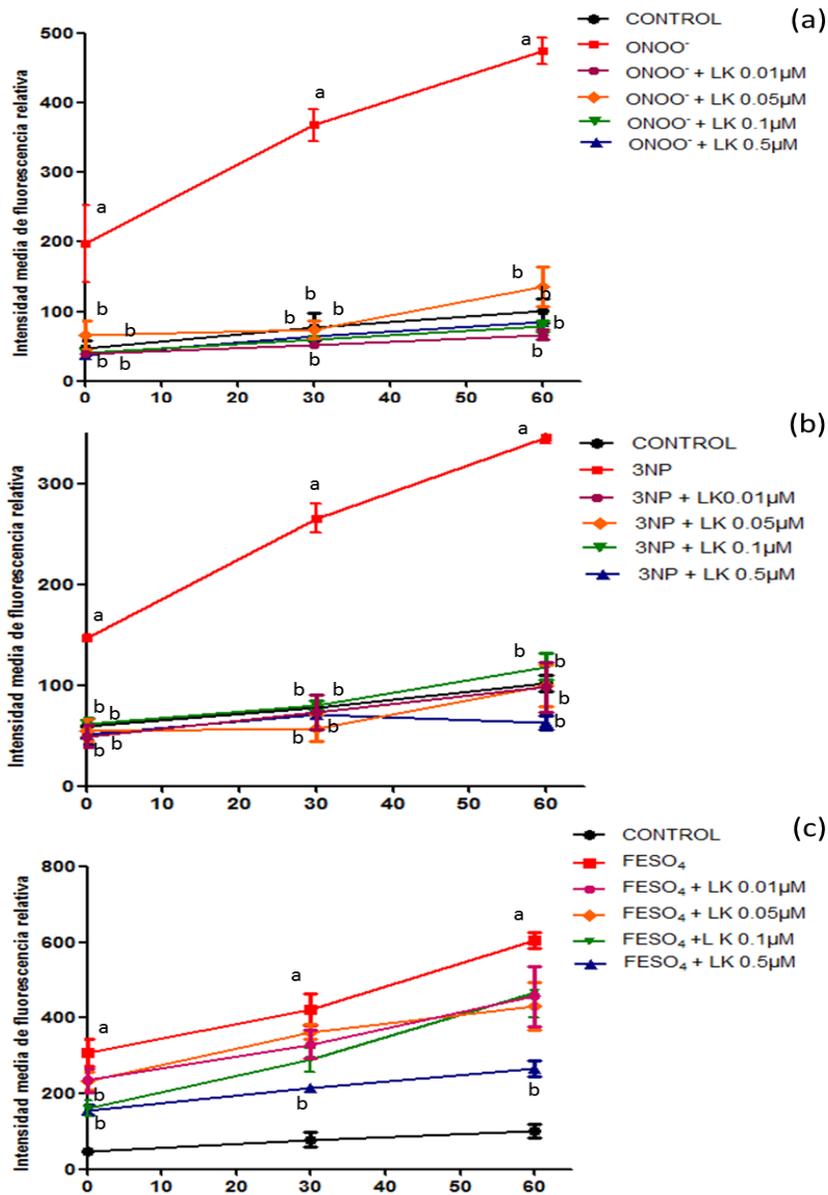


Figura 6. La L- KYN (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 μ M) reduce la formación de ERO en el tiempo inducida por ONOO⁻ (a), 3NP (b) y FeSO₄ (c) en cerebro de rata. Los valores están expresados en promedios \pm SEM. ^a $P < 0.05$ vs control, ^b $P < 0.05$ vs ONOO⁻, 3NP y FeSO₄.

9.3. LA L-KYN PREVIENE LA PRODUCCIÓN DE ERO EN HOMOGENADOS DE CEREBRO DE RATONES KNOCKOUT PARA LA KATII Y SILVESTRES

a) CARACTERIZACIÓN DE RATONES KO Y SILVESTRES

El genotipo de los ratones se caracterizó por PCR empleando los dos pares de oligos como se mencionó en la metodología. Posteriormente los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio obteniendo las bandas correspondientes para cada genotipo (figura 7).

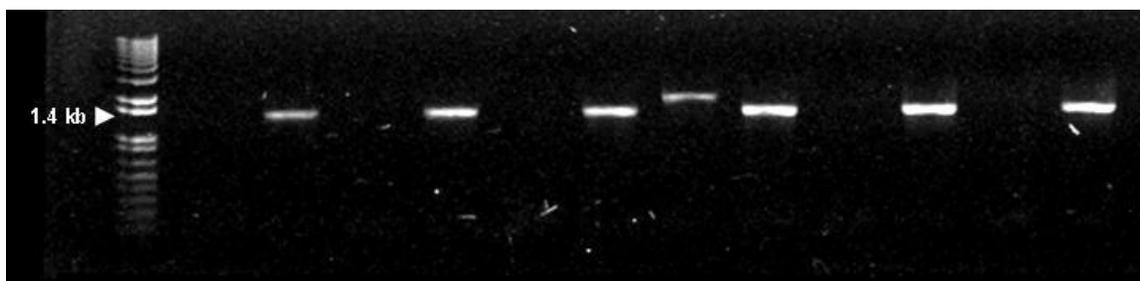


Figura 7. Imagen del gel con los productos de PCR para la caracterización de los ratones. Cada muestra de ADN se probó con ambos pares de oligos, donde sólo amplificó el oligo con el genotipo correspondiente. Los fragmentos amplificados son de 1.7 kb para WT y 1.4 kb para KO.

Una vez que se caracterizaron los ratones KAT II KO se aislaron de los ratones silvestres. En los homogenados de cerebros de ratones silvestres, el FeSO_4 (5 μM), 3-NP (5 mM) y ONOO^- (25 μM), indujeron un aumento de la producción de ERO y esta formación de ERO fue atenuada por L-KYN (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 μM) en este tejido (Fig. 8). Siendo mas potente el efecto protector de la L-KYN para el caso del 3NP y ONOO^- desde tiempos cortos, comparado con el FeSO_4 .

Para el caso de los homogenados de cerebros de ratones KAT II KO el FeSO_4 , el 3NP y ONOO^- indujeron un aumento de la producción de ERO y esta formación

de ERO fue atenuada por L-KYN (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 μM) en los homogenados tratados con 3NP y ONOO^- . Es importante señalar que la efectividad de L-KYN para capturar ROS fue de la siguiente manera con respecto al daño evocado por las toxinas: $\text{ONOO}^- > 3\text{-NP} > \text{FeSO}_4$ (Fig. 9). Para el caso del FeSO_4 , se pudo observar un aumento de ERO con respecto al control, sin embargo en este modelo la L-KYN (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 μM) no pudo atenuar dicha formación a esas concentraciones.

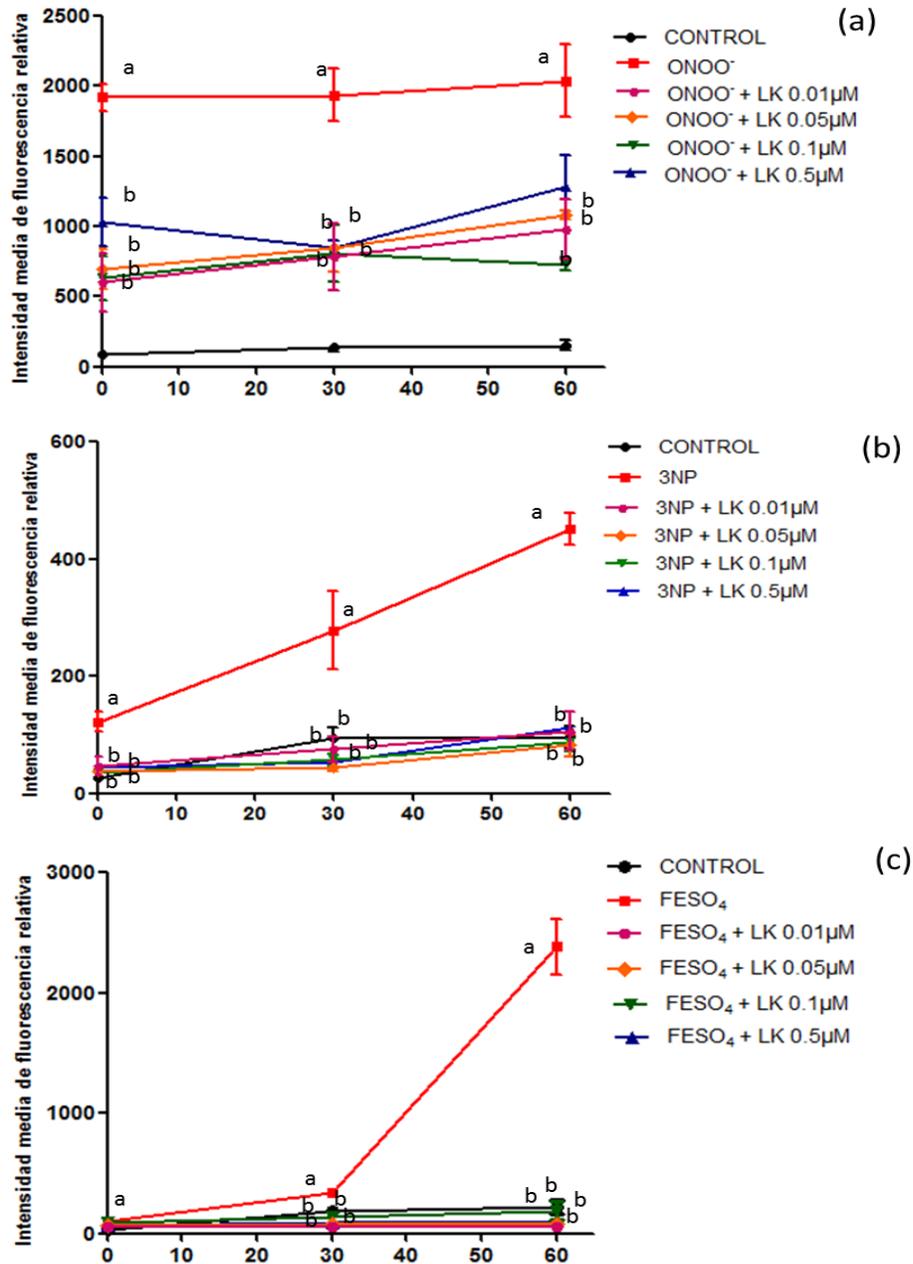


Figura 8. La L- KYN (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 μM) redujo la formación de ERO en el tiempo inducida por ONOO⁻ (a), 3NP (b) y FeSO₄ (c) en cerebros de ratones silvestres. Los valores están expresados en promedios ± SEM. ^a *P* < 0.05 vs control, ^b *P* < 0.05 vs ONOO⁻, 3NP y FeSO₄.

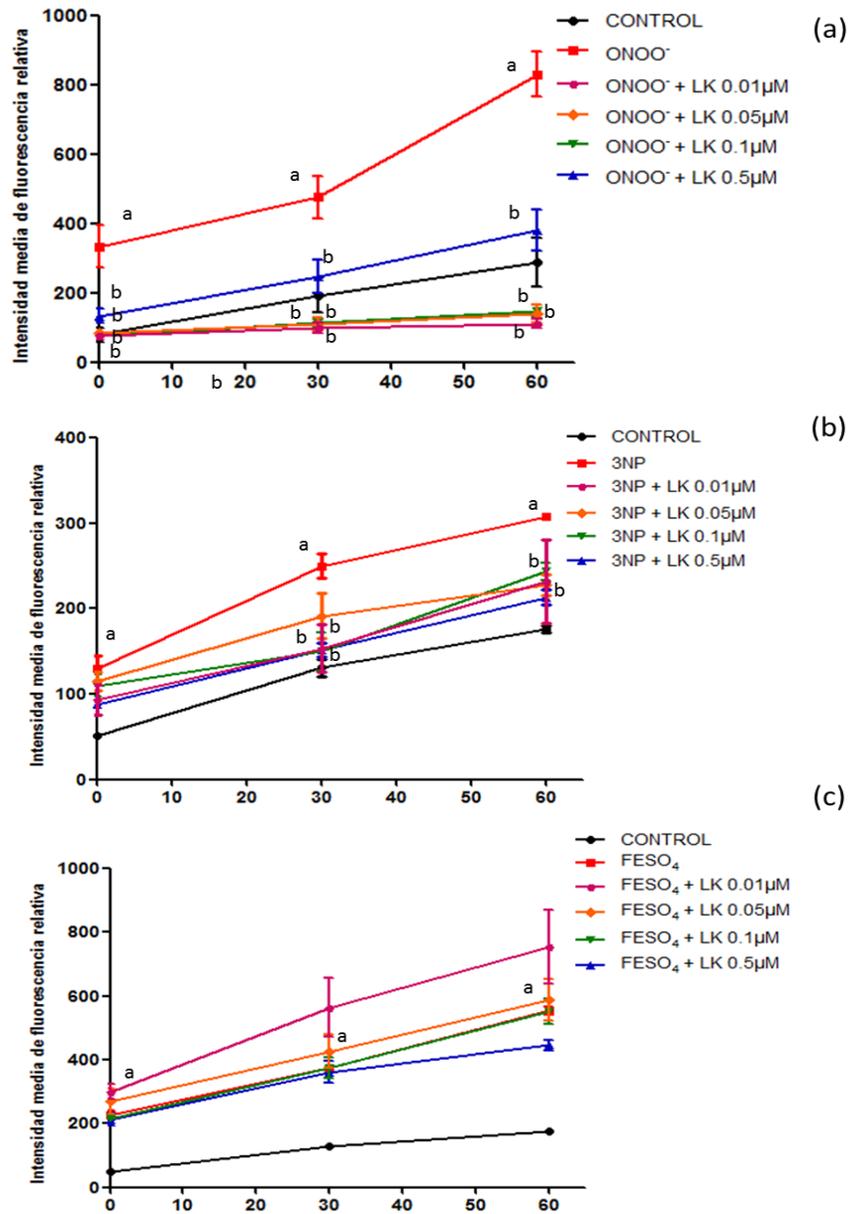


Figura 9. La L- KYN (0.01, 0.05, 0.1, 0.5μM) redujo la formación de ERO en el tiempo inducida por ONOO⁻ (a), 3NP (b), pero no para FeSO₄ (c) en cerebros de ratones KATII KO. Los valores están expresados en promedios ± SEM. ^a $P < 0.05$ vs control, ^b $P < 0.05$ vs ONOO⁻, 3NP y FeSO₄.

A los 60 minutos de incubación en los homogenados de ratones silvestres, el FeSO₄, el 3NP y ONOO⁻ indujeron un aumento en la producción de ERO y esta

formación de ERO fue atenuada por L-KYN (0.1 μ M). El FeSO₄ indujo un aumento de la producción de ERO en un 988%, el 3NP en un 369% y el ONOO⁻ en un 1,235%, con respecto al control; mientras que en homogenados de ratones KAT II KO, el FeSO₄, 3NP y ONOO⁻ aumentaron la producción de ERO y este aumento fue del 214%, 74% y 214%, respectivamente comparado con el control. La L-KYN (0.1 μ M) atenuó la producción de ROS inducida por el 3NP y ONOO⁻ pero no para el FeSO₄ (Fig.10).

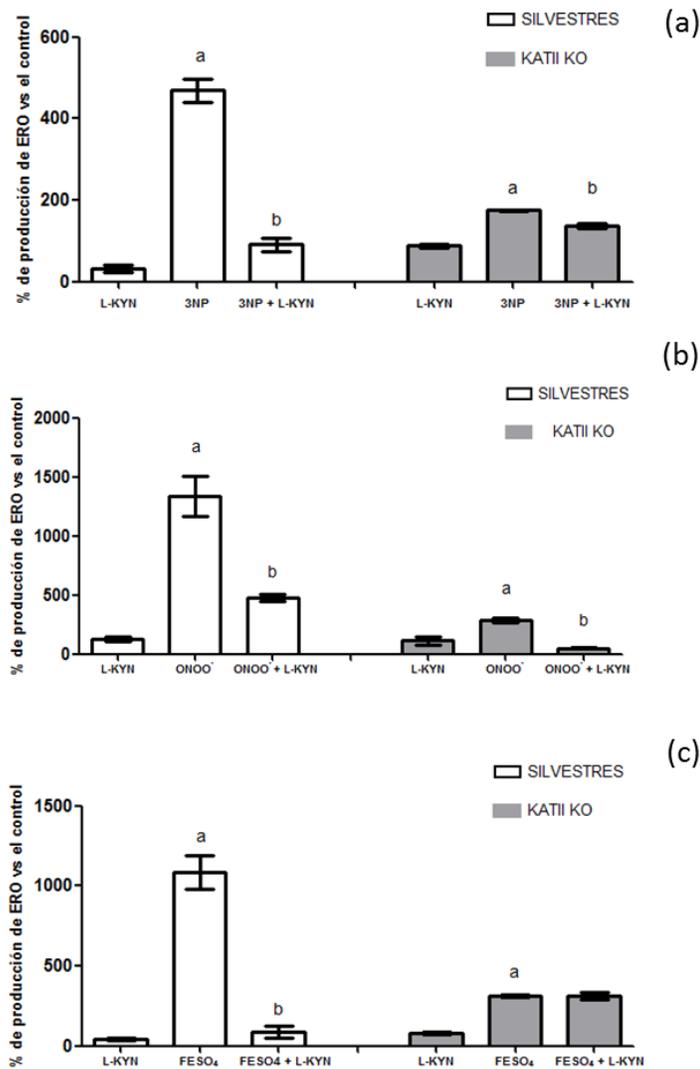


Figura 10. La L- KYN (0.1 μ M) redujo la formación de ERO inducida por 3NP (a), ONOO⁻ (b) y FeSO₄ (c) en cerebro de ratones silvestres y en ratones KATII KO por 3NP (a) y ONOO⁻ (b). Los valores están expresados en promedios \pm SEM. ^a $P < 0.05$ vs control, ^b $P < 0.05$ vs 3NP, ONOO⁻ y FeSO₄.

10. DISCUSIÓN

La L-KYN es un metabolito de la degradación del triptófano que sirve como sustrato para distintas enzimas: la kinureninasa (ANA), la kinurenina 3-hidroxilasa (3-HK), y las kinurenina amino transferasas (KYNA). En este trabajo demostramos las propiedades antioxidantes y atrapadoras de ERO que posee este metabolito. En este trabajo se utilizaron diversos sistemas sintéticos diseñados para producir radicales libres, y se demostró que la L-KYN puede atrapar OH^\bullet y ONOO^- , pero no es capaz de atrapar $\text{O}_2^{\bullet-}$ ni H_2O_2 . La CE_{50} de atrapamiento para OH^\bullet y ONOO^- fue de $1.432 \pm 0.33 \mu\text{M}$ y de $2.23 \pm 0.53 \mu\text{M}$, respectivamente. Cuando lo comparamos con los valores de CE_{50} de los antioxidantes de referencia informados por Lugo-Huitrón et al. (2011), se encontró que la L-KYN es mas efectiva para atrapar OH^\bullet comparado con la dimetiltiourea (DMTU) que tiene un valor de CE_{50} de 129.5 ± 8.5 y el dimetil sulfóxido (DMSO) 172.3 ± 19.6 . Además, la L-KYN presenta una mayor efectividad comparándola con otro metabolito de la vía, el KYNA cuya CE_{50} es de 209.0 ± 7.4 . Este efecto también lo observamos para el caso del ONOO^- ya que la CE_{50} del KYNA es de 598.4 ± 74.8 , un valor mucho mayor al que presenta la L-KYN.

Es importante destacar que la L-KYN resultó 149 y 268 veces más efectiva que el KYNA para atrapar OH^\bullet y ONOO^- en medios sintéticos. Estos datos confirman informes previos en los que se demuestra que la L-KYN tiene una alta capacidad de auto oxidarse comparándolo con otros metabolitos de la vía (Gregory et al., 2003). Esto significa que la L-KYN puede donar un electrón para estabilizar a las ERO y volverlas menos reactivas.

Adicionalmente, probamos la capacidad de la L-KYN como una molécula antioxidante utilizando los homogenados de cerebro de rata, en presencia de tres diferentes pro-oxidantes; 1) el 3NP: un inhibidor de la succinato deshidrogenasa, que es la enzima responsable de la oxidación del succinato a fumarato (Túnez et al., 2004; Coles et al., 1979) alterando la actividad mitocondrial que conlleva a la sobre producción de ERO. 2) El ONOO^- es una especie reactiva del oxígeno y

del nitrógeno con una gran capacidad oxidante el ONOO⁻ reacciona rápidamente con el dióxido de carbono (CO₂) presente en sistemas biológicos, conduciendo así a la formación de radicales secundarios, tales como los radicales carbonato (CO₃•⁻) y dióxido de nitrógeno (•NO₂). Finalmente, una pequeña fracción de ONOO⁻ se rompe, dando lugar a la formación del OH•. 3) El FeSO₄ a través de la reacción de Fenton, da paso a la formación de OH• que es uno de los radicales más agresivos, por su alta reactividad es capaz de oxidar casi cualquier molécula que se encuentre en las cercanías.

La L-KYN fue capaz de atenuar la formación de ERO evocada por los pro-oxidantes en los homogenados, y esto está asociado a su habilidad para capturar OH• y ONOO⁻ en los medios sintéticos; ya que en los tres modelos oxidantes se forman principalmente estas dos especies, donde el L-KYN tiene mayor efecto sobre el ONOO⁻, dicho efecto antioxidante se da desde cortos tiempos para el caso del ONOO⁻ y el 3NP, y pareciera ser concentración dependiente para el FeSO₄.

Otro de los objetivos del presente trabajo fue comprobar si la capacidad antioxidante de la L-KYN era independiente de la formación de KYNA debido a que se demostró en informes anteriores que el KYNA tiene propiedades antioxidantes (Lugo-Huitrón et al., 2011). Lo anterior se probó a través de el uso de cerebros de ratones KATII KO, utilizando los mismos modelos pro-oxidantes antes mencionados. Dado que la KAT II funciona a pH fisiológico, esta es la enzima encargada del mayor porcentaje de formación de KYNA en el cerebro (Schmidt et al., 1993), por lo que su inhibición conlleva a una disminución en la formación KYNA a partir de la L-KYN.

La L-KYN disminuyó la formación de ERO evocada por el ONOO⁻, 3NP y FeSO₄, en los homogenados de cerebros de ratones silvestres y este efecto se observa desde cortos períodos de tiempo para el ONOO⁻ y el 3NP. Para los cerebros de ratones KATII KO la L-KYN sólo disminuyó la formación de ERO para el ONOO⁻ y

el 3NP, siendo este efecto mas potente para el primero, esto demuestra que dicho efecto antioxidante se debe a la interacción de la L-KYN con las ERO y no a la formación de KYNA por la KATII. Sin embargo no es posible descartar del todo la participación del KYNA debido a que la KAT I y III siguen activas?. En estudios previos se ha visto que los niveles de KYNA en el cerebro de estos ratones son menores a los de los ratones normales o silvestres en las primeras semanas (Ping Yu et al., 2004), por lo que podemos decir que dicho efecto antioxidante se debe en una mayor proporción a la L-KYN. En base a nuestros resultados creemos que los ratones KATII KO son más resistentes ante un insulto tóxico.

En trabajos previos realizados en diversos modelos de daño neuronal, como lo es un modelo de beta amiloide (Carrillo-Mora et al. 2010), un modelo de isquemia (Sas et al., 2008., Gigler et al., 2007) y un modelo de hemiparkinsonismo (Silva-Adaya et al., 2011) se ha reportado que la administración de L-KYN, produce un efecto neuroprotector e incluso se ha encontrado una disminución en la pérdida neuronal, este efecto neuroprotector se le ha sido atribuido a la formación de KYNA a partir de la administración de L-KYN, sin embargo no aseguran que sea el KYNA el responsable de este efecto, ni que la L-KYN no este jugando un papel en el efecto neuroprotector que se observa, si la L-KYN tiene un efecto antioxidante independiente de la formación de KYNA, esta puede jugar un papel importante en la neuroprotección que se ha reportado en estos modelos, al prevenir la formación de ERO, ya que se sabe que las ERO contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades como la arterosclerosis, la diabetes, el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, la cirrosis y los procesos de envejecimiento (Halliwell y Gutteridge, 1999; Basaga, 1990). En este sentido, la L-KYN puede contribuir a prevenir o mejorar estos desórdenes al mantener un balance entre las ERO y las defensas antioxidantes.

11. CONCLUSIONES

La L-KYN es capaz de atrapar OH^\bullet y ONOO^- de manera eficiente en los sistemas sintéticos, evidenciando una interacción directa con estas especies reactivas.

La L-KYN disminuye la formación de ROS *in vitro* en homogenados de tejido de rata evocada por FeSO_4 , ONOO^- y 3NP. Dicha acción la ejerce desde tiempos cortos y a bajas concentraciones.

Asimismo la L-KYN previene la producción de ROS en homogenados de cerebro de ratones silvestres evocada por FeSO_4 , ONOO^- y 3NP y en ratones KAT II KO en presencia de ONOO^- y 3NP. Estos resultados sugieren que la protección que confiere la L-KYN no está vinculada a la formación de KYNA

12. PERSPECTIVAS

La L-KYN es un metabolito de la vía de las kinureninas que se ha estudiado muy poco, en este trabajo se expone su capacidad antioxidante, sin embargo es necesario investigar más a fondo sobre los mecanismos por los cuales ejerce esta actividad en las células. A partir de este trabajo es necesario hacer más pruebas que permitan conocer todas las propiedades de la L-KYN. Se realizarán pruebas donde se observe si a través de la capacidad antioxidante de la L-KYN se puede prevenir el daño a macromoléculas como proteínas, lípidos y DNA, en diferentes modelos tóxicos, donde se pueda probar si ejerce un efecto protector independientemente de la formación de otros metabolitos de la vía.

13. BIBLIOGRAFÍA

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

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

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 from tryptophane by neurospora. *Proc Natl Acad Sci USA* 33:155-8.

Bender DA., McCreanor GM., 1982. The preferred route of kynurenine metabolism in the rat. *Biochim Biophys Acta* 717:56-60.

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* 210:240-50.

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.

- Coles CJ., Edmonson DE., Singer TP. 1979. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J Biol Chem* 254:5161-5167.
- Eastman CL, Guiliarte TR. 1989. Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line. *Brain Res* 495: 225-231.
- 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.
- Fukui S, Schwarcz R, Rapoport SI, Takada Y, Smith QR. 1991. Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem* 56:2007–17.
- Fukui, S., R. Schwarcz, S. I. Rapoport, and Q. R. Smith. 1988. Facilitated transfer of kynurenine across the blood-brain barrier. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14:1037
- Gal EM., Sherman AD. 1980. L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain. *Neurochem Res* 5:223-239.
- Gigler G, Szénási G, Simó A, Lévy G, Hársing LG Jr, 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.* 14;564(1-3):116-22.
- Gigler G, Szenasi G, Simo A, Levay G, Harsing LGJr, Sas K, Vécsei L, Toldi J. 2007. Neuroprotective effect of I-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.
- Gregory I. Giles, Catriona A. Collins, Trevor W. Stone, and C. Jacob. 2003. Electrochemical and in vitro evaluation of the redox-properties of kynurenine species, *Biochem Biophys Res Commun* 300: 719–724.
- 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, Okuno E, Schwarcz R. 1997. Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II. *J Neurosci Res.* 50:457-465.
- Guidetti P., Eastman CL., Schwarcz R. 1995. Metabolism of [5-3H]kynurenine in the rat brain in vivo: evidence for the existence of a functional kynurenine pathway. *J Neurochem* 65:2621-2632.
- 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.
- 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, B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15:129-135.

- 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. 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.
- Hausladen A., Fridovich I. 1994. Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* 269:29405-29408.
- Hayaishi O. 1976. Properties and function of indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biochem* 79: 13-21.
- Hayaishi O., Rothberg, S., Mehler AH., Saito Y. 1957. Studies on oxygenases; enzymatic formation of kynurenine from tryptophan. *J Biol Chem* 229: 889-896.
- Hirata F, Hayaishi O. 1971. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction. *J Biol Chem* 246:7825-7826.
- Horton AA, Fairhurst S. 1987. Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol* 18:27-79.
- Kehrer JP. 2000. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology* 62:235-6.

- 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.
- Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF Jr. 1998. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 106: 289–295.
- Lapin IP. 1978. Convulsions and tremor in immature rats after intraperitoneal injection of kynurenine and its metabolites. *Pharmacol Res Commun.* 10:81-84.
- Lee Hua Long, Halliwell B. 2001. Antioxidant & prooxidant abilities of foods and beverages. *Methods in Enzymology*; 335: 181-190.
- Lindahl T, Wood RD. 1999. Quality control by DNA repair. *Science* 286: 1897-1905.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-75.
- Ludolph AC., He F., Spencer PS., Hammerstad J., Sabri M. 1991. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible striatal toxin. *Can J Neurol Sci* 18:492-498.
- Lugo-Huitrón R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muñiz P, Carrillo-Mora P, Pedraza-Chaverrí J, Silva-Adaya D, Maldonado PD, Torres I, Pinzón E, Ortiz-Islas E, López T, García E, Pineda B, Torres-Ramos M, Santamaría A, La Cruz VP. 2011. On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol*; 33(5):538-47. Epub 2011 Jul 13.

- Mancuso C, Barone E, Guido P, Miceli F, Di Domenico F, Perluigi M, Santangelo R, Preziosi P. 2012. Inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation by endogenous and exogenous antioxidants in rat brain microsomes in vitro. *Neurosci Lett.* 19;518(2):101-5
- Mehler and Knox. 1950. Poner complete las inicilaes de o los nom,bres The conversion of tryptophan to kynurenine in liver. li. The enzymatic hydrolysis of formylkynurenine. *J biol chem.*; 187(1):431-8.
- 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.
- 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.
- Okamoto H., Yamamoto S., Nozaki M., Hayaishi O. 1967. On the submitochondrial localization of l-kynurenine-3-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 26: 309-314.
- 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., Kido R., 1991. Kynureninase and kynurenine 3-hydroxylase in mammalian tissues. *Adv Exp Med Biol* 294:167-176.

- Okuno E, Schmidt W, Parks DA, Nakamura M, Schwarcz R. 1991. Measurement of rat brain kynurenine aminotransferase at physiological kynurenine concentrations. *J Neurochem.* 1991;57:533–40.
- Ping Yu, Di Prospero NA, Sapko MT, Cai T, Chen A, Melendez-Ferro M, Du F, Whetsell WO Jr, Guidetti P, Schwarcz R, Tagle DA. 2004. Biochemical and phenotypic abnormalities in kynurenine aminotransferase II-deficient mice. *Mol Cell Biol.*; 24(16):6919-30.
- 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.
- Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook GA, Lowry CA. 2006. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev Mol Med.*; 8(20):1-27.
- 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.
- Schmidt W, Guidetti P, Okuno E, Schwarcz R. 1993. Characterization of human brain kynurenine aminotransferases using 3H-kynurenine as a substrate. *Neuroscience.* 1993 Jul;55(1):177-84.
- Schwarcz R, Whetsell WO, Mangano RM. 1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that causes axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219: 316-318.

- Silva-Adaya D., Pérez-De La Cruz V., Villeda-Hernández J., Carrillo-Mora P., González-Herrera IG., García E., Colín-Barengue L., Pedraza-Chaverrí J., Santamaría A. 2011. Protective effect of L-kynurenine and probenecid on 6-hydroxydopamine-induced striatal toxicity in rats: implications of modulating kynurinate as protective strategy. *Neurotoxicol Teratol* 33:303-312.
- Smith, Q. R., S. Momma, M. Aoyagi, and S. I. Rapoport (1987) Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 49: 1651-1658.
- 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.
- Takadera T, Koriyama Y, Kimura T, Kato S.2011. 5-S-GAD attenuates Fe²⁺-induced lipid peroxidation and cell death in a neuronal cell model. *Neurotox Res.*;20(1):26-31. Epub 2010 Aug 31.
- Thomas SR, Mohr D, Stocker R. 1994. Nitric oxide inhibits indoleamine-2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 269: 14457-14464.
- Túnez I., Montilla P., Muñoz MC., Drucker-Colín R. 2004. Effect of nicotine on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes. *Eur J Pharmacol* 504:169-175.

- 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.
- Virág L., Szabó E., Gergely P., Szabó C., 2003. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 11:113-124.
- 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..