



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CULLIN 3 Y NEDD8 EN LA
NEURODEGENERACIÓN POR ESTRÉS OXIDANTE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

Ana Cristina Andérica Romero



MÉXICO, D.F.

2012



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: **Profesor: PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ**

VOCAL: **Profesor: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**

SECRETARIO: **Profesor: IRMA GABRIELA GONZALEZ HERRERA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA**

2° SUPLENTE: **Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA, LABORATORIO DE AMINOÁCIDOS
EXCITADORES.**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. IRMA GABRIELA GONZALEZ HERRERA

SUSTENTANTE (S):

ANA CRISTINA ANDÉRICA ROMERO

A ti, porque...

“Eras sí pero ahora
suenas un poco a mí.

Era sí pero ahora
tengo un poco de ti.

No demasiado, solamente un toque,
acaso un leve rasgo familiar,
pero que fuerce a todos a abarcarnos
a ti y a mí cuando nos piensen solos.”

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de estar aquí y porque siempre está a mi lado colmándome de bendiciones.

A mi mami, por ser mi fuente de inspiración y porque gracias a sus palabras de aliento hoy veo llegar a su fin una de las metas de mi vida, porque a pesar de todas las dificultades me has apoyado sin importar nada, por ser mi amiga y confidente.

A mi papi, por la fortaleza que me inspira y por depositar en mí su confianza para que el esfuerzo y sacrificios no fueran en vano, gracias papi por ser la figura y el modelo a seguir desde pequeña.

A ti Emo, por ser el mejor hermanito que Dios me pudo dar, por tus travesuras y compañía, gracias ☺

A mi abu, que desde pequeña estuviste a mi lado cuidándome y acompañándome en incontables desveladas, siempre dispuesta a brindarme tu amor, tu cuidado y tus sabios consejos. Sé que desde donde estás, me verás brillar hasta el día en que nos reencontremos mami...

A mis amigos, por hacer que este camino sea aún mejor de lo que podría ser, por su compañía, sus risas, por ser mi diván en innumerables ocasiones, por su cariño, GRACIAS: Chío, Claus, Dany, Dorus, Luis, Lucy, Kik, Pancho, Rubén, Tere... Los quiere, su Titina.

A la Dra. Irma, por confiar incondicionalmente en mí y nunca dudar de mis capacidades, gracias por los consejos y por enseñarme el valor del trabajo con ética y profesionalismo, pero sobretodo gracias por la amistad que me has brindado.

A las doctoras del laboratorio de Patología Vasculat Cerebral por permitirme realizar gran parte de este trabajo en sus instalaciones y por hacer que mi estancia en el laboratorio fuera una experiencia memorable.

A todos los chavos de PVC por brindarme su amistad desde el primer día y por hacer que este trabajo fuera más ligero, por las aventuras que pasamos juntos, "los congresos" y por los kilos subidos con ustedes: Frida, Carlitos, Richard, Jorge, Ceci, Rudolf, Ana y Any.

¡ Gracias !

"La grandeza de las acciones humanas, se mide por la inspiración que las hacen nacer" Louis Pasteur

ABREVIATURAS

ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ATP	Adenosín Trifosfato
BTB	Dominio Broad-complex C/ Tramtrack/ Bric a Brac
CNC	Cap n' collar
CONAPO	Consejo Nacional de Población
CRLs	Cullin-RING ligasas
CUL3	Culina 3
EP	Enfermedad de Parkinson
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
KEAP1	Proteína 1 asociada-ECH Kelch-like
NEDD8	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 8
NRF2	Factor relacionado al factor nuclear eritroide 2
QUIN	Acido- 2,3- piridin dicarboxílico; ácido quinolínico
RING	Really Interesting New Gene
SOD	Superóxido dismutasa
UPS	Ubiquitin proteasoma system

El factor de transcripción Nrf2 es clave en la neuroprotección al promover la activación de los genes codificantes de las enzimas antioxidantes. Hasta ahora la regulación de su actividad ha estado ligada principalmente con la proteína Keap1 en el citoplasma, de la cual se libera ante un estímulo pro o antioxidante para translocarse al núcleo en donde ejerce su acción, sin embargo, el avance y el interés que ha surgido por estudiar diversas alternativas terapéuticas para promover la neuroprotección han llevado a la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. Diversos estudios han revelado la importancia del sistema ubiquitin proteosoma (UPS) en la regulación de la actividad de diversos procesos celulares, por lo que este trabajo se centró en el estudio de dos proteínas que participan en la degradación de Nrf2 vía UPS. Cul3 y Nedd8 son proteínas que además de regular el mecanismo de ubiquitinación de Nrf2 están relacionadas con diversos mecanismos de regulación celular y particularmente Nedd8 se ha identificado en agregados intranucleares en diversas enfermedades neurodegenerativas.

Dada la importancia de estas proteínas, este trabajo se realizó para estudiar la influencia del estrés oxidante en las proteínas Cul3 y Nedd8, y en su participación en la neurodegeneración producida por ácido quinolínico (QUIN), un agonista selectivo de los receptores NMDA capaz de inducir un estado oxidante en la célula, modelo utilizado en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas.

Con base a lo anterior, se empleó el modelo *in vitro* de las rebanadas estriatales de cerebro de rata y el modelo *in vivo* de QUIN. Los cambios en la expresión de Cul3 y Nedd8 se evaluaron con la técnica de western blot en las fracciones celulares de núcleo y citoplasma y la localización celular de éstas se evaluó por inmunofluorescencia. Se demostró que el estrés oxidante generado por QUIN induce la acumulación de Cul3 y Nedd8 en el núcleo de las células del estriado

cerebral, mientras que en el citoplasma no ocurren cambios en los niveles de expresión ni en la activación de Cul3. Estos resultados sugieren que la activación de Cul3 por Nedd8 en el núcleo podría ser importante en el mecanismo de regulación de la respuesta antioxidante y por lo tanto, un evento crítico en el proceso de neurodegeneración.

	Pág.
Abreviaturas	5
Resumen	6
1. Introducción	
1.1. Envejecimiento y Neurodegeneración	10
1.2. Estrés oxidante	12
1.2.1. Estrés oxidante y el cerebro	13
1.2.2. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	14
1.3. Defensa antioxidante	16
1.3.1. Enzimas antioxidantes	17
1.3.2. Factores de transcripción en estrés oxidante	19
1.4. Factor de transcripción Nrf2	19
1.4.1. Regulación de la función de Nrf2	20
1.5. Degradación de proteínas	23
1.5.1. Sistema de ubiquitin proteosoma (UPS)	23
1.5.2. Proteosoma y enfermedades neurodegenerativas	24
1.5.3. Mecanismo de ubiquitinación de proteínas	25
1.5.4. Ligasas E3 de ubiquitina	26
1.6. Complejos ligasas E3 basados en culinas	27
1.6.1. Complejo E3 ligasa basado en Culina 3	29
1.6.2. Regulación de la función de las culinas	33
1.6.3. Nedd8 y enfermedades neurodegenerativas.	34
1.7. Modelo de neurodegeneración: Acido Quinolínico	35
2. Justificación	37
3. Hipótesis	38
4. Objetivos	39
4.1. Objetivo general	39
4.2. Objetivos particulares	39
5. Materiales y métodos	40
5.1. Reactivos	40
5.2. Animales	40
5.3. Estudio <i>in vitro</i>	40
5.3.1. Obtención de rebanadas de estriado	40
5.3.2. Separación y precipitación de proteínas nucleares y citoplásmicas	41
5.3.3. Detección de Cul3 y Nedd8 por Western blot	41

5.4.	Estudio <i>in vivo</i>	42
5.4.1.	Análisis inmunocitoquímico	43
5.4.2.	Inmunofluorescencia:colocalización de Cul3 y Nedd8	43
5.5.	Inmunoprecipitación (IP) de Cul3	44
5.5.1.	Extracción de proteínas nucleares para la IP	44
5.5.2.	Preparación de la resina	45
5.5.3.	Pre lavado del lisado celular	45
5.5.4.	Western blot para la detección de Nrf2	46
5.6.	Análisis estadístico	46
6.	Resultados	47
6.1.	Estudio <i>in vitro</i>	47
6.1.1.	Efecto del estrés oxidante sobre los niveles de expresión de Cul3 y Nedd8	47
6.2.	Estudio <i>in vivo</i>	50
6.2.1.	Localización de las proteínas Cul3 y Nedd8 en células de estriado	50
6.3.	Inmunoprecipitación de Cul3	53
7.	Análisis de resultados y Discusión	54
8.	Conclusiones	61
9.	Referencias bibliográficas	62

1.1 Envejecimiento y neurodegeneración

El proceso de envejecimiento es un proceso irreversible y tiene un componente tanto genético como ambiental, y se define como un declive progresivo en las funciones fisiológicas de un organismo después de la fase reproductiva de la vida (Valko et al., 2007).

El envejecimiento afecta de forma heterogénea a las células que conforman a los seres vivos, las cuales, con el paso del tiempo se ven sometidas a un deterioro morfofuncional que puede conducir las a la muerte (Peinado et al., 2000).

En nuestros días este proceso adquiere suma importancia, ya que de acuerdo con un informe del Consejo Nacional de Población (CONAPO 2011), la dinámica poblacional del grupo de adultos mayores (65 años y más) tendrá el crecimiento más alto en la primera mitad del siglo XXI, el monto actual de 5.8 millones se cuadruplicará en 2050, cuando la población ascienda a 28.7 millones. Así, resulta evidente que este crecimiento en la población de adultos mayores planteará enormes desafíos, no sólo a nivel de políticas públicas, sociales e institucionales sino también a nivel de la investigación científica y tecnológica donde se tendrá que enfocar la atención en problemáticas propias del envejecimiento, para así lograr satisfacer las necesidades de este sector de la población, desarrollando estrategias que ayuden a entender a fondo el proceso de neurodegeneración, término que hace referencia a la pérdida progresiva de la estructura y/o de la función de las neuronas, incluyendo la muerte de éstas.

Las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica presentan diferentes síntomas pero tienen en común que son causadas por una combinación de eventos que afectan la función normal de las neuronas, además todos estos padecimientos frecuentemente presentan inflamación, mutaciones genéticas, agregados de proteínas, activación glial, disfunción mitocondrial (Angoa y Rivas, 2007; Halliwell, 2006) e independientemente de la fisiopatología de cada una de estas enfermedades, en todas se ha observado un incremento en los índices de especies reactivas de oxígeno y como consecuencia en los niveles de marcadores de estrés oxidante, involucrando la oxidación de proteínas, DNA y peroxidación lipídica; varios de estos marcadores han sido reportados dentro de una región específica del cerebro lo que habla de vulnerabilidad y una neurodegeneración selectiva (Andersen, 2004; Saxena y Caroni, 2011).

Por ejemplo, estudios bioquímicos han evidenciado que en la enfermedad de Huntington, la presencia de alteraciones y defectos en el metabolismo energético debidos a la disfunción mitocondrial, disminuyen la producción de ATP e incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) (Gil y Rego, 2008; Tunéz y Santamaría, 2009); se ha observado que en la enfermedad de Parkinson (EP) existe una deficiencia en el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial así como depleción de glutatión en la sustancia nigra de los pacientes con EP idiopática lo que resulta en la generación de estrés oxidante (revisado en Lin y Beal, 2006); en la enfermedad de Alzheimer el *estrés oxidante*, proveniente de la disfunción mitocondrial, ocurre tempranamente, debido a que la formación de los agregados de β -amiloide y la alta afinidad de la APP (*amyloid precursor protein*) al Cu^{2+} contribuyen de manera indirecta a la producción de *radicales libres* (Bossy et al., 2004; Jung et al., 2009).

1.2 Estrés oxidante

El estrés oxidante ha resultado ser un factor muy importante durante la etapa del envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas, incluso la teoría más aceptada para explicar el proceso de envejecimiento está relacionada con el estrés oxidante, ya que dicho proceso está involucrado con la disminución de la capacidad detoxificadora y protectora de la célula ante el estrés oxidante (Davies, 2000).

Este estado puede ser visto como una consecuencia inevitable de una vida con una atmósfera rica en oxígeno, convirtiéndose en una paradoja, donde el oxígeno es peligroso para muchas formas de vida pero para las cuales también es un componente esencial para la producción de energía. Esta condición se cumple para las especies aeróbicas que no pueden vivir sin oxígeno, donde los radicales de oxígeno y otras especies reactivas de oxígeno son generadas como producto inevitable del metabolismo aeróbico (Davies, 2000; Kohen y Nyska, 2002), así como por la exposición a varios agentes tóxicos, tanto naturales como sintéticos.

La exposición continua a varios tipos de estrés oxidante provenientes de varias fuentes llevaron a la célula a desarrollar mecanismos eficientes para la protección contra metabolitos reactivos, este sistema de defensa involucra mecanismos de reparación, prevención y defensas físicas contra el daño celular así como una importante defensa antioxidante que incluye tanto enzimas antioxidantes como un sistema no enzimático que utiliza antioxidantes de bajo peso molecular que sirven como quelantes o "scavengers" contra especies reactivas (Valko et al., 2007).

El estrés oxidante resulta de una condición de desequilibrio entre los sistemas prooxidantes y antioxidantes en el organismo, y puede ser generado por el incremento a la exposición de agentes oxidantes o por la disminución de los sistemas antioxidantes ó incluso, por la aparición de ambos problemas simultáneamente (revisado en Konigsberg, 2008).

1.2.1 Estrés oxidante y el cerebro

El cerebro suele ser el órgano más susceptible a los daños provocados por las especies reactivas, ya que presenta una elevada tasa metabólica derivada de la glucosa, posee niveles muy bajos de defensas antioxidantes, contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados que son posible blanco de peroxidación lipídica, y además es rico en actividades enzimáticas relacionadas con metales de transición como el Fe^{2+} y el Cu^{2+} , los cuales pueden catalizar la formación de radicales libres (Revisado en Konigsberg, 2008; Andersen, 2004; Peinado et al., 2000). Otro factor que contribuye a la generación de especies reactivas en el cerebro es el alto consumo de oxígeno para la producción de ATP que es necesitado para mantener la homeostasis iónica en las neuronas, la cual está asociada con la propagación del potencial de acción, la neurosecreción y la transmisión sináptica. En este último evento el uso de neurotransmisores se ha correlacionado a la generación de estrés oxidante. Es de particular interés el principal neurotransmisor excitador, el glutamato, cuya neurotoxicidad se ha asociado a un desequilibrio iónico por la entrada excesiva de calcio a la célula con lo que la activación de diversas enzimas (proteasas, fosfolipasas, endonucleasas, oxido nítrico sintasas) incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Revisado en Meldrum, 2000).

1.2.2 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

Un radical libre es cualquier especie química capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 2006). Existen varios tipos de radicales libres *in vivo*, como los de nitrógeno, bromo, cloro y oxígeno; los radicales libres derivados del oxígeno representan la más importante clase de especies radicales generados en los sistemas biológicos.

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) incluye tanto a los radicales de oxígeno como a los no radicales (Tabla 1). Todos los radicales de oxígeno son ERO pero no todos las ERO son radicales de oxígeno (Halliwell, 2006; Valko et al., 2007).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno(modificada de Halliwell 2006)

Radicales libres	No radicales
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^{\cdot}	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Hidroperoxilo, HO_2^{\cdot} (superóxido protonado)	Ozono, O_3
Ión carbonato, $CO_3^{\cdot-}$	Singulete, $O_2^1 \Delta g$
Peroxilo, RO_2^{\cdot}	Peróxidos orgánicos, $ROOH$
Alcoxilo, RO^{\cdot}	Peroxinitrito, $ONOO^-$
Radical dióxido de carbono, $CO_2^{\cdot-}$	Peroxinitrato, O_2NOO^-
Singulete $O_2^1 \Sigma g^+$	Ácido peroxinitroso, $ONOOH$

Es importante mencionar que el oxígeno molecular tiene una configuración única y es *per se* un radical, al adicionarse un electrón al oxígeno se forma el radical *anión superóxido* ($\text{O}_2^{\cdot-}$) el cual es considerado como la primera especie reactiva de oxígeno (figura 1) y puede interaccionar fuertemente con otras moléculas para así generar especies reactivas secundarias, incluso puede generarlas directamente pero principalmente por procesos enzimáticos o catalizados por metales. El *peróxido de hidrógeno* es considerado un oxidante importante en las células de organismos aerobios, formado principalmente por la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y aunque no es un radical, tiene una gran capacidad para atravesar membranas celulares y reaccionar con el anión superóxido para generar así al *radical hidroxilo*.

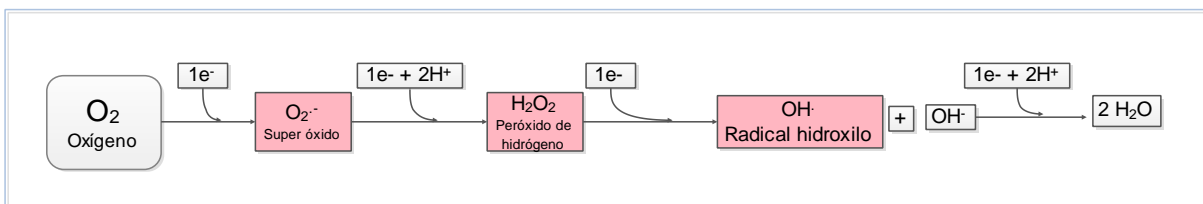


Figura 1. Reducción univalente del oxígeno.

El *radical hidroxilo* ($\text{OH}\cdot$) es altamente reactivo y una de las vías para su generación es a través de la reacción de Fenton (Figura 2), la cual es facilitada por el anión superóxido que actúa como oxidante de ciertas enzimas que contienen hierro, haciendo que el Fe^{2+} se encuentre disponible para la reacción (Valko et al., 2007), la formación de este radical también se puede lograr fácilmente a través de la reacción de Haber- Weiss entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 (Figura 2).

Otros radicales reactivos derivados del oxígeno son los $\text{ROO}\cdot$, el más simple es el $\text{HOO}\cdot$, que es la forma protonada del superóxido y es usualmente llamado radical hidroperoxilo. Se ha demostrado que

éste, al igual que el peroxinitrito, comienza la peroxidación de los ácidos grasos (Carr, Mc Call y Frei, 2000).

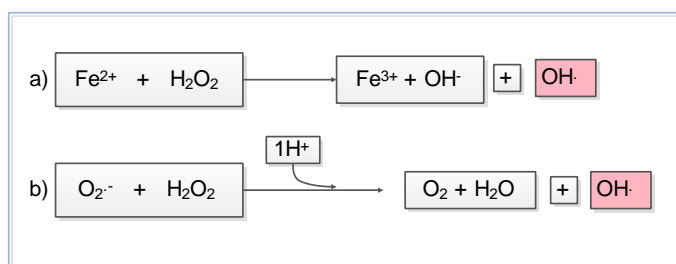


Figura 2. Reacciones de Fenton (a) y Haber Weiss (b) para la formación del radical hidroxilo.

El óxido nítrico (**NO \cdot**) es una molécula pequeña que contiene un electrón desapareado en el orbital $2p_y^*$, es un radical principalmente generado por la enzima óxido nítrico sintasa y se ha observado que tiene efectos en la transmisión neuronal como también en la plasticidad sináptica. Esta *especie reactiva de nitrógeno* (ERN) puede reaccionar particularmente y de manera muy rápida con el **O $_2^{\cdot-}$** para formar el peroxinitrito y consecutivamente una serie de ERN las cuales pueden generar estrés nitrosativo (Halliwell y Carroll Cross, 1994; Ridnour et al., 2004).

1.3 Defensa antioxidante

Como consecuencia de la respiración aeróbica normal, la mitocondria consume O_2 reduciéndolo a través de una serie de pasos hasta producir H_2O (Figura 1). Todos los organismos, incluyendo los seres humanos, utilizan una serie de defensas antioxidantes primarias con el objetivo de proteger a las células del daño oxidante generado por este proceso. Entre estas defensas se encuentran moléculas neutralizantes como el α -tocoferol que se encuentra unido a la membrana o el ácido ascórbico, el cual está mayoritariamente en fase acuosa; otros compuestos antioxidantes que son solubles en agua incluyen al ácido úrico, glutatión y a la ceruloplasmina. El β -caroteno

y la ubiquinona son antioxidantes con características liposolubles pero que también tienen gran importancia *in vivo* (Davies, 2000).

1.3.1 Enzimas antioxidantes

La exposición de la célula a antioxidantes y xenobióticos también la conduce a la inducción de una gran cantidad de genes que codifican para enzimas detoxificadoras de la fase II [NAD(P)H: Quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), glutatión-S-transferasa (GST), hemooxigenasa 1 (HO-1)], antioxidantes y otras proteínas relacionadas [tioredoxinas, γ - glutamato cisteín ligasa (γ -GCS), glutatión peroxidasa y glutatión reductasa], proteínas para la ubiquitinación, proteasoma y para transportadores de fármacos (MRPs) (Niture et al., 2010).

Así los organismos aeróbicos sintetizan una gran cantidad de enzimas antioxidantes para minimizar el daño provocado por las especies reactivas de oxígeno, entre las más estudiadas se encuentran las superóxido dismutasas (SODs), la familia de las glutatión peroxidasas y la catalasa; ésta última se encuentra en los peroxisomas y su función es remover el H_2O_2 generado por las reacciones de β oxidación de ácidos grasos de cadena larga (Ames et al., 1993).

La familia de las SODs catalizan la reacción de dismutación del radical superóxido, incrementando la constante de velocidad de esta importante reacción de dismutación, donde un $O_2^{\cdot-}$ es reducido a H_2O_2 y otro oxidado hasta O_2 (Figura 3).

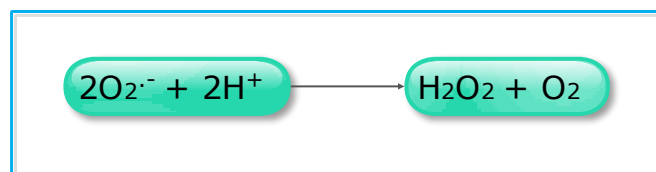


Figura 3. Reacción de dismutación del radical superóxido.

Este grupo de enzimas está presente en todas las partes del sistema nervioso y es uno de los sistemas depuradores de $O_2^{\cdot-}$ más importantes en el cerebro (Halliwell, 2006).

Todos los miembros de la familia SOD utilizan metales de transición en sus sitios activos como lo son las formas Cu,Zn-SOD que están en el espacio inter membranar de la mitocondria y en el resto de la célula o la forma mitocondrial que contiene manganeso (Mn-SOD) (Halliwell 2001). El producto de la SOD es H_2O_2 el cual es un metabolito tóxico y debe ser removido rápidamente, para esto la célula utiliza a dos familias de enzimas: las glutatión peroxidasas y las catalasas que reducen el peróxido de hidrógeno hasta agua y oxígeno.

La familia de las glutatión peroxidasas, son el grupo más importante de eliminación de H_2O_2 en el cerebro (Halliwell, 2006) este grupo de enzimas contiene selenio y utilizan el poder reductor del glutatión (GSH), un tripéptido que consiste en L- γ -glutamil- L- cisteínglicina, para remover el H_2O_2 , este proceso lo hace por medio del grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína, el cual sirve para la formación de un compuesto con un puente disulfuro (GS-SG) mediante la oxidación de dos moléculas GSH; así este compuesto participa en la reducción de una molécula de peróxido de hidrógeno. La enzima glutatión reductasa utiliza NADPH para reducir una molécula de GS-SG a dos moléculas de GSH permitiendo de esta manera la continua función de la glutatión peroxidasa (Davies, 2000; Halliwell, 2001).

Los genes que codifican para estas enzimas detoxificadoras pueden responder a cambios en los niveles de estrés permitiendo una rápida respuesta genética, la cual ha permitido a la célula sobrevivir a exposiciones oxidantes que normalmente podrían ser letales. La importancia de entender esta respuesta adaptativa radica en que, ante cualquier cambio en el ambiente de la célula, ésta logrará

contrarrestar los efectos tóxicos del oxígeno; dándole así sentido a *la paradoja del oxígeno*.

1.3.2 Factores de transcripción en estrés oxidante

En la actualidad se han reportado más de 100 genes involucrados en la respuesta antioxidante (Konigsberg, 2007), por lo que, las vías de transducción de señales que registran y activan dichas respuestas se han convertido en una área de estudio de suma importancia.

Entre los factores de transcripción que censan el estado redox de la célula, que se activan por ERO y/o ERN y que inducen la expresión de los genes encargados de la citoprotección, se encuentran, la proteína activadora 1 (AP1), el factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) y el factor nuclear κ B (NF- κ B) (Revisado en Halliwell y Gutteridge 2006).

1.4 Factor de transcripción Nrf2

La vía citoprotectora en la que participa el factor de transcripción Nrf2 (**Nrf2**: *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) se ha considerado como una de las más importantes para la célula (Dhakshinamoorthy et al., 2000; Lo y Hannink, 2006; Kobayashi et al., 2004) y tiene como objetivo combatir el estrés oxidante y electrofílico generado, como antes se ha mencionado, por la exposición a agentes químicos exógenos o endógenos, metales y la radiación para así, mantener la homeostasis redox.

El factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2 es un miembro de la subfamilia CNC (**Cap' n' collar**) de los factores de transcripción tipo *zipper* o cierre de leucinas (bZIP) que es capaz de unirse al sitio ARE (**Antioxidant Response Element**) de genes que codifican para enzimas antioxidantes, así como para la rápida inducción y activación de enzimas de la fase II (revisado en Konisberg F.M., 2007). Este factor contiene un dominio regulatorio en su extremo N (Neh2, el cual contiene 7 residuos de lisina que son dirigidos a ubiquitinación

mediante Cul3 por Keap1), un dominio central de transactivación y su dominio bZIP en el extremo COOH, que es el responsable tanto para su localización nuclear como para su unión al ADN (Figura 4) (Lo y Hannink, 2006).

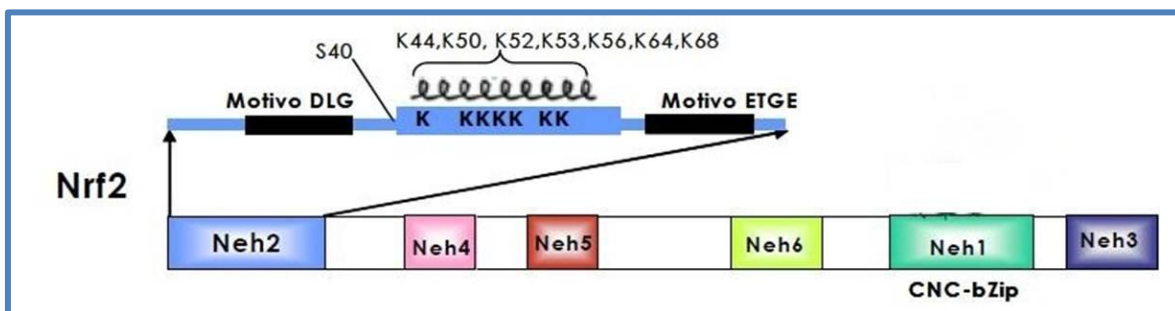


Figura 4. Dominios de Nrf2. El dominio Neh2 que se ha propuesto como sitio de unión a Keap1 mediante los motivos ETGE y DLG. En el dominio Neh2 también se encuentran siete residuos de lisina (K) que son importantes para su ubiquitinación y degradación (K44, K50, K52, K53, K56, K64, K68). D: ác. aspártico, L: leucina, G: glicina, E:ác. glutámico, T: treonina.

El mecanismo por el cual Nrf2 regula la defensa celular ante el estrés oxidante es a través de su unión con la secuencia consenso ARE de los genes que codifican para las enzimas de fase II, esta secuencia se encuentra en la región promotora de dichos genes y su secuencia *core* es GTCACA***GC (Jaiswal, 2004). Esta unión controla la expresión basal e inducible de los genes antioxidantes en respuesta a xenobióticos, antioxidantes, metales pesados y radiación UV (Egler et al., 2009; Rajesh et al., 2002).

1.4.1 Regulación de la función de Nrf2

El Nrf2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células por lo que su actividad se mantiene estrictamente regulada para que la célula pueda conservar un determinado estado redox y así permanecer en homeostasis.

Hasta ahora, el modelo más aceptado que describe la regulación de la función de Nrf2, propone que en condiciones de homeostasis, Nrf2 no se encuentra libre y activo todo el tiempo sino únicamente cuando se generan condiciones de estrés oxidante, así también en este modelo se plantea que Nrf2 se mantiene principalmente en el citoplasma unida a la proteína Keap1 y en bajos niveles en el resto de la célula (revisado en Konigsberg, 2007; Stewart et al., 2003; Kaspar et al., 2009; Itoh et al., 1999) (Figura 6a). Su localización en el citoplasma se debe principalmente a la interacción del dominio Neh2 de Nrf2 con el dominio DGR de Keap1, dominio que está formado por seis repeticiones de doble glicina (Cullian et al., 2004; Lo y Hannink, 2006).

Keap1 (*BTB-Kelch-like ECH*-associated protein 1*) es una proteína tipo Kelch que en su extremo N contiene un dominio BTB (*Broad-complex/tramtrack/bric-a-brac*) el cual es de homodimerización y de unión a culina 3 (Motohashi y Yamamoto, 2004; Copple et al., 2008) (Figura 5).

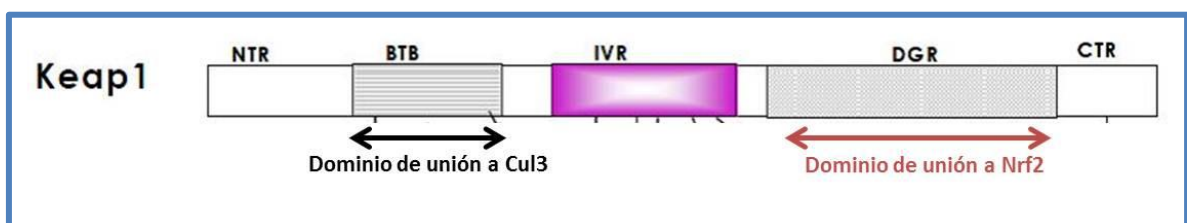


Figura 5. Dominios de Keap 1. NTR: N- terminal region; BTB: Broad-complex/ tramtrack/ bric-a-brac; IVR: intervening region; DGR: double glycine repeat; CTR; C-terminal region.

Keap1 tiene dos papeles importantes en el modelo de la regulación de Nrf2: por un lado forma un complejo con Nrf2, el cual tiene la función de mantener a Nrf2 en el citoplasma a través de un complejo denominado Crm1, que previene la localización nuclear de Nrf2 (Eggler, 2009; Copple et al., 2008). Su otra función es servir como un adaptador entre Nrf2 y Cul3 para su ubiquitinación y su posterior degradación dependiente del proteasoma 26S (Kobayashi et al.,

2004) (Figura 6a). Es decir es esencial para la formación del complejo Nrf2-Keap1-Cul3. Se ha propuesto que el dominio IVR de esta metaloproteína funciona como sensor de estrés oxidante, debido a que contiene residuos de cisteínas que se consideran altamente reactivas, y al reaccionar éstos ante un estímulo de estrés, Keap1 sufre cambios en su estructura lo que reduce su capacidad de retener a Nrf2 (Wakabayashi et al., 2004) (Figura 5, 6b).

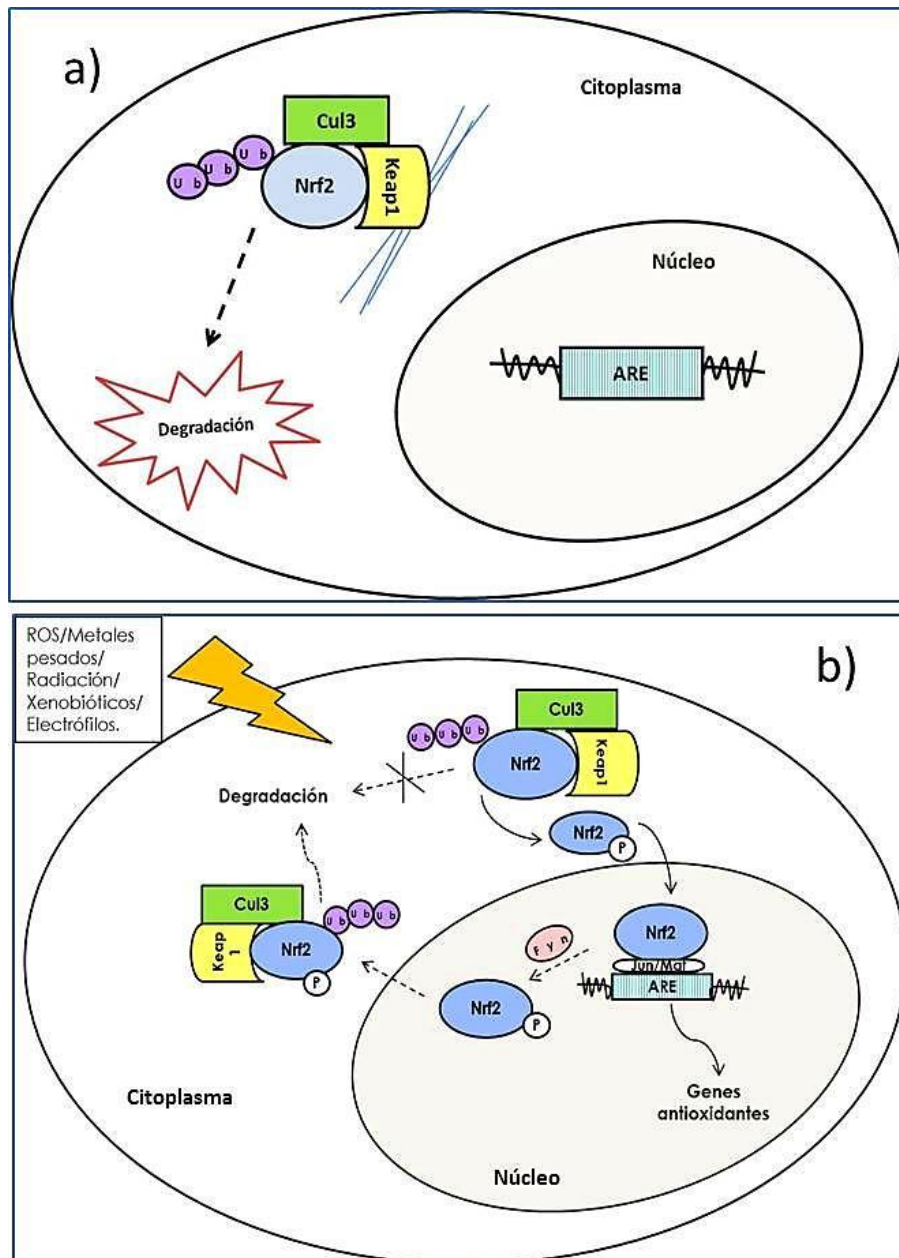


Figura 6. Modelo de la función y la regulación de Nrf2. a) Condiciones de no estrés. b) Condiciones de estrés.

En este modelo se plantea que Nrf2 se disocia del complejo Keap1/Cul3 cuando la célula es expuesta a estrés oxidante, se estabiliza y se transloca al núcleo. Una vez en el núcleo Nrf2 forma un heterodímero con otras proteínas del tipo bZIP, incluyendo a Jun (c-Jun, JunD y JunB) y proteínas Maf pequeñas (MafG, MafK, MafF) para así unirse a la región ARE y regular la expresión génica de enzimas antioxidantes (Jawed et al., 1999; Niture et al 2010). Después de que Nrf2 cumple su función en el núcleo, éste es exportado al citoplasma para su degradación vía Ubiquitin-Proteosoma a través del complejo Keap1/Cul3 (Jain y Jaiswal, 2006; Lo y Hannink, 2006) (Figura 6b).

1.5 Degradación de proteínas

Con el objetivo de mantener la funcionalidad y la viabilidad celular, es importante que las proteínas dañadas, modificadas, mal plegadas, o proteínas que han llegado a ser innecesarias sean reconocidas y degradadas. Para este propósito, están presentes diversos sistemas incluyendo el sistema proteosomal, el cual es el más importante de ellos, por lo menos en el citoplasma (Jung et al., 2009).

1.5.1 Sistema de Ubiquitin Proteosoma (UPS)

El Nrf2 es sólo uno de los numerosos sustratos del proteosoma. Este sistema de degradación se encuentra involucrado en muchas funciones celulares, por ejemplo en el control de la progresión del ciclo celular degrada ciclinas e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, así como proteínas mediadoras de apoptosis; en la regulación del crecimiento celular y en la expresión génica mediante la degradación de reguladores transcripcionales como c-Jun, NFκB, p53, β-catenina, entre otros; en la terminación de cascadas de señalización por medio de la degradación de protein-cinasas activadas (Jung et al., 2009; Thompson et al., 2008).

En gran medida la degradación de proteínas en la célula se lleva a cabo por el sistema de ubiquitin-proteosoma (*UPS: ubiquitin proteasoma system*) o también llamado vía proteolítica mediada por ubiquitina (Bedford et al., 2011). La ubiquitina es una proteína pequeña y tiene una masa molecular de aproximadamente 8.5 kDa, está formada por 76 aminoácidos y al unirse a otras proteínas las marca para una degradación por el 26S proteosoma, el cual es un complejo enzimático con un peso molecular de aproximadamente 2,000 kDa (Jana, 2012). El proteosoma se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células de los mamíferos (Peters et al., 1994; Figueiredo y Rockwell, 2001) y la señal mínima para una degradación eficiente por medio de este sistema es el marcaje de proteínas blanco con una cadena de tetraubiquitina.

La capacidad del UPS para conducir una rápida proteólisis sustrato específica le permite funcionar tanto como una molécula activadora/inhibidora de varias vías de señalización como intervenir en la rápida regulación de proteínas blanco. Su correcto funcionamiento es esencial en procesos celulares como la progresión del ciclo celular, la transducción de señales y el desarrollo y control de la calidad proteica (Segref y Hoppe, 2009). El mal funcionamiento o la alteración de este sistema puede conducir a diversas enfermedades humanas, incluyendo varios tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares como la isquemia, enfermedades virales y desordenes neurodegenerativos (Bedford et al., 2011; Jung et al., 2009; Lehman, 2009).

1.5.2 Proteosoma y enfermedades neurodegenerativas

El estudio de la participación del sistema UPS en la degradación de proteínas ha cobrado mayor relevancia desde que su desregulación se ha visto vinculada con los procesos neurodegenerativos (Kourtis y

Tavernarakis ,2011), por esto los procesos de degradación vía UPS de las proteínas en células cerebrales han sido de gran importancia, especialmente por la copiosa formación de depósitos de proteínas en las enfermedades neurodegenerativas (Ciechanover y Brundin, 2003).

Por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson, las mutaciones en los genes PARK2, PARK5, conllevan a una susceptibilidad del proteosoma, resultando en la acumulación de proteínas, formación de cuerpos de Lewy y la muerte de células dopaminérgicas, en las cuales a su vez la 6-OH dopamina incrementa la ubiquitinación proteica y la formación de cuerpos de Lewy (Le y Appel, 2004). En el caso de la enfermedad de Alzheimer existen dos típicas manifestaciones fisiológicas, por un lado la acumulación extracelular de agregados de β -amiloide y por otro la formación intracelular de agregados neurofibrilares de la proteína tau en su forma hiperfosforilada (Jung et al., 2009), estos agregados anormales han resultado ser inmunoreactivos a anticuerpos anti-ubiquitina, revelando que existe un exacerbado proceso de ubiquitinación sin embargo, estos agregados proteínicos no son degradados por el sistema ubiquitin proteosoma (Mori et al., 2012; Lehman, 2009).

1.5.3 Mecanismo de ubiquitinación de proteínas

En esta degradación mediada por ubiquitina tiene lugar un proceso llamado ubiquitinación, en el cual la proteína ubiquitina es acoplada a la proteína blanco por una unión peptídica, después esta proteína ubiquitinada es transportada a un complejo de proteasas denominado 26S proteosoma para su degradación (Bosu y Kipreos, 2008).

La ubiquitinación es un proceso complejo que consta de varios pasos y esta mediado por una serie de enzimas en las que se incluye una enzima activadora de ubiquitina E1 (UAE por sus siglas en inglés,

también conocida como UBA1), una enzima conjugadora de ubiquitina E2 (Ubc) y una ligasa de ubiquitina E3.

En el primer paso, una enzima activadora E1 consume ATP, con el objetivo de adenilar de manera temporal a la ubiquitina, y forma un enlace tioéster de alta energía entre el grupo COOH de la ubiquitina y un grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína de la enzima E1, así en el segundo paso la ubiquitina activada es transferida al residuo de cisteína de una enzima conjugadora de ubiquitina E2 por medio de una reacción de transtiolación, el último paso consiste en que la ubiquitina unida a E2 Ubc se asocia con una E3 ligasa de ubiquitina, la cual es capaz de reconocer una proteína blanco específica y de transferir la ubiquitina a un residuo de lisina de dicha proteína (Bedford et al., 2011).

Para que los sustratos sean susceptibles a degradación, múltiples ubiquitinas son acopladas al sustrato hasta producir una cadena de poliubiquitina, las proteínas poliubiquitinadas a través de la lisina 48 (K48) son generalmente degradadas por proteosoma, y las poliubiquitinadas en la lisina 63 (K63) son en última instancia degradadas en el lisosoma (Lehman, 2009; Kirkin et al., 2009). La ubiquitinación es sustrato específica y esta actividad altamente específica, puede ser aportada por las ligasas E3 de ubiquitina (Pickart, 2001; Segref y Hoppe, 2009).

1.5.4 Ligasas E3 de ubiquitina

En contraste con las enzimas E1 y E2, las ligasas E3 son altamente diversas. Considerando las proteínas blanco del UPS y en comparación de aproximadamente las 30 diferentes isoformas de las enzimas E2 conocidas, la actividad de las enzimas E1 resulta no ser específica, ya que hasta ahora sólo ocho isoformas de esta enzima existen en la célula (Figueiredo y Rockwell, 2001; Groettrup et al., 2008). De esta manera la especificidad de la ubiquitinación podría

deberse a la participación de las ligasas E3, ya que son las más variables y abundantes en la célula. Se han identificado más de 500 ligasas E3, lo que permite sugerir que una E2 puede asociarse a diferentes ligasas E3 dando una gran cantidad de complejos E2/E3 funcionales y por lo tanto un alto número de sustratos blanco específicos (Pickart, 2001; Ciechanover y Brundin, 2003).

Las ligasas E3 están clasificadas en dos clases principales: una como E3 ligasas con un dominio HECT (homologous to EGAP COOH-terminus) y la otra como E3 ligasas con un dominio *RING finger* (*really interesting new gene*) (Pintard et al., 2004; Furukawa y Xiong Y., 2005).

Las ligasas E3 con dominios *RING finger* constituyen uno de los más grandes grupos de enzimas en la célula (excediendo incluso a las cinasas) (Bedford et al., 2011). Éstas frecuentemente se asocian con otras proteínas auxiliares para formar complejos multiméricos funcionales. Hasta ahora se han caracterizado dos tipos principales de E3 ligasas con dominios RING: la APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) y el complejo SCF (*Skp1/cullin/F-box*)

Los principales complejos multiméricos ligasas E3 están asociados a un miembro de la familia de las proteínas llamadas culinas, el primer modelo descrito fue el complejo SCF, sin embargo hasta el momento este modelo de ligasas E3 donde las culinas son un pieza fundamental, se ha extendido hasta integrar toda una superfamilia denominada *cullin- RING ligasas (CRLs)*.

1.6 Complejos E3 ligasas basados en culinas

Las células humanas expresan siete diferentes culinas (Cul1, 2, 3,4A, 4B, 5 y 7) y cada culina forma una distinta clase de complejo CRLs, los cuales como se mencionó, son una superfamilia de ligasas E3 de ubiquitina que se caracterizan precisamente por tener un núcleo enzimático que contiene un miembro de la familia de las culinas,

además de distintos adaptadores y/o subunidades de reconocimiento de sustrato (Petroski y Deshaies, 2005; Marin, 2009).

Estudios de cristalografía de rayos X se han permitido dilucidar la estructura tridimensional de los complejos CRLs. En general estos complejos son multiméricos y tienen en común un centro catalítico que consiste en una proteína RING y un miembro de la familia de las culinas, una subunidad para el reconocimiento del sustrato SRS (por sus siglas en inglés) y una subunidad adaptadora que une a la SRS con el complejo, por ejemplo: Skp1 o Elongin C (Bosu y Kipreos, 2008) (Figura 7).

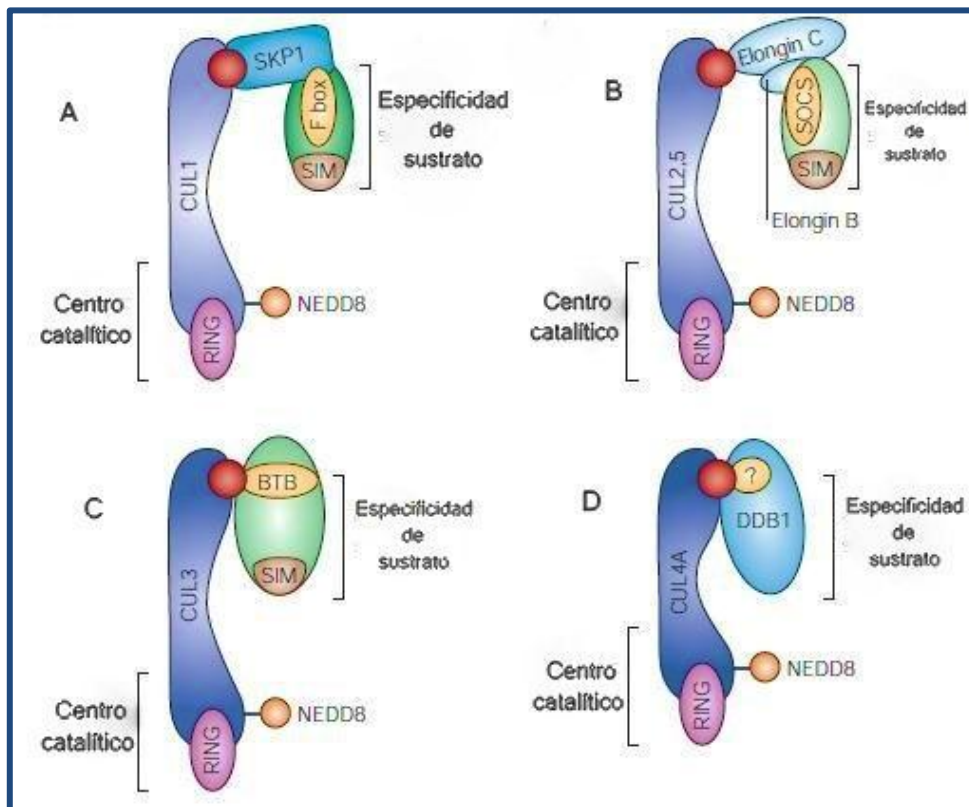


Figura 7. Diferentes complejos formados por la familia de las culinas.

La proteína RING presente en cada uno de los complejos se une al extremo COOH de la culina mientras que el extremo NH₂ de la misma culina se une a diversas proteínas características de cada complejo,

así aunque cada culina presenta similitudes en estructura entre los miembros de la familia, un segmento de éstas es variable en secuencia, lo que permite a cada culina interactuar con sus propias proteínas adaptadoras específicas (Pintard et al., 2004; Bosu y Kipreos, 2008) (Figura 7).

Las propiedades y el papel biológico de las culininas se encuentran resumidas en la tabla 2, si bien existen diferencias estructurales entre estos complejos, se han encontrado evidencias de que las CRL tienen un papel muy importante en la regulación y el control del ciclo celular (Pan et al., 2004). Además estos complejos multiméricos también están implicados en diversos procesos celulares, incluyendo múltiples aspectos de la calidad proteica, desarrollo celular, transducción de señales, transcripción, replicación del ADN, entre otros (Petroski y Deshaies, 2005).

1.6.1 Complejo E3 ligasa basado en culina 3

Originalmente los dominios BTB se encontraron en factores de transcripción de *Drosophila melanogaster*, ahora se sabe que todas las especies eucarióticas expresan una gran variedad de proteínas con dominios BTB. La homología estructural entre las proteínas BTB con Skp1 o Elongin C (subunidades de algunas CRLs) generó la hipótesis de que este tipo de proteínas BTB también podían interactuar con los miembros de la familia de las culininas, interesantemente se encontró que, diversas proteínas BTB sólo interactúan con un miembro de esta familia, con la **culina 3** (Cul3) y no así con los demás integrantes de la familia (Xu et al., 2003; Furukawa et al., 2003) (Tabla 3).

Tabla 2. Papel y propiedades biológicas de las culinas. (Modificada de Pan et al., 2004) RNR: Ribonucleotidoeductasa; ND: No determinado.

Culina	Componentes del complejo E3	Adaptador	Proteínas blanco	Relevancia biológica
1	Skp1-Cul1-F-box-ROC1/Rbx1	Skp1	P27, Ciclina E, β -catenina	Regulación del ciclo celular, transducción de señales, embriogénesis en ratón.
2	Elongin BC-Cul2-Proteína SOCS-ROC1/Rbx1	Elongin BC	HIF-1 α , proteínas del tipo zinc-finger	Regulación de O ₂ , control del ciclo celular.
3	Proteína BTB-Cul3-ROC1/Rbx1	Dominio BTB Proteínas BTB (MEL-26, Keap1)	MEI-1, Nrf2	Respuesta a estrés, desarrollo, transición de meiosis a mitosis, control de la fase S.
4A, 4B	DDB1-Cul4A/4B-DDB2 o CSA-ROC1/Rbx1	DDB1	Spd1, HOXA9	Activa a la RNR, hematopoyesis.
5	Elongin BC-Cul5-Proteína SOCS-ROC1/Rbx1	Elongin BC	ND	Asiste en la degradación de p53.
7	Skp1-Cul7-Fbx29-ROC1/Rbx1	Skp1	ND	Desarrollo vascular, crecimiento celular, proapoptosis.

Tabla 3. Función e interacción de proteínas BTB con Cul3

Proteína BTB	Función biológica	Referencia
MEL 26	Regula la actividad de MEI-1 en la formación del citoesqueleto en la meiosis y en la mitosis	Johnson et al, 2008; Pintard et al, 2004.
Gigaxonin	Promueve la degradación de MAP1B, MAP8 y cofactor B de la tubulina	Furukawa et al., 2003; Wang et al., 2006.
Keap1	Regula la degradación proteasomal de Nrf2 .	Kobayashi et al., 2004; Cullian et al., 2004; Furukawa et al., 2005.
PL2F	Represor transcripcional, marca genes del ciclo celular como ciclina A.	Pintard et al., 2004; Furukawa et al., 2003.
BTBD1	Se une a la topoisomerasa I	Furukawa et al., 2003.
KEL-8	Regula el apagado y encendido del receptor del glutamato en la sinapsis	Schaefer y Rongo, 2006.
NAC-1	Transloca el UPS del núcleo al citoplasma en las espinas dendríticas.	Shen et al., 2007.

La principal diferencia entre el complejo E3 basado en culina 3 y las diferentes clases de CRLs es la presencia de una proteína con dominio BTB. Las ligasas basadas en culina 3 no requieren de una proteína adaptadora (Skp1 o Elongin C) como las demás CRLs, sino que también la subunidad de reconocimiento del sustrato está

conformada por una sola proteína que une directamente a cul3, a través de un dominio BTB N-terminal, y al sustrato por su dominio C-terminal (Zimmerman et al., 2010), estas diferencias que hacen de ésta CRL, un complejo muy singular.

La importancia de la culina 3 en diversos procesos biológicos radica en su interacción con las denominadas proteínas BTB (Xu et al., 2003; Geyer et al., 2003). El caso del complejo E3 ligasa basado en culina 3, no sólo resulta interesante por sus características únicas dentro de la familia de las CRL sino también por la asociación de la culina 3 con la proteína Keap1, de la cual se habló en apartados anteriores y como se mencionó, está involucrada en la función del factor de transcripción Nrf2 (Figura 8).

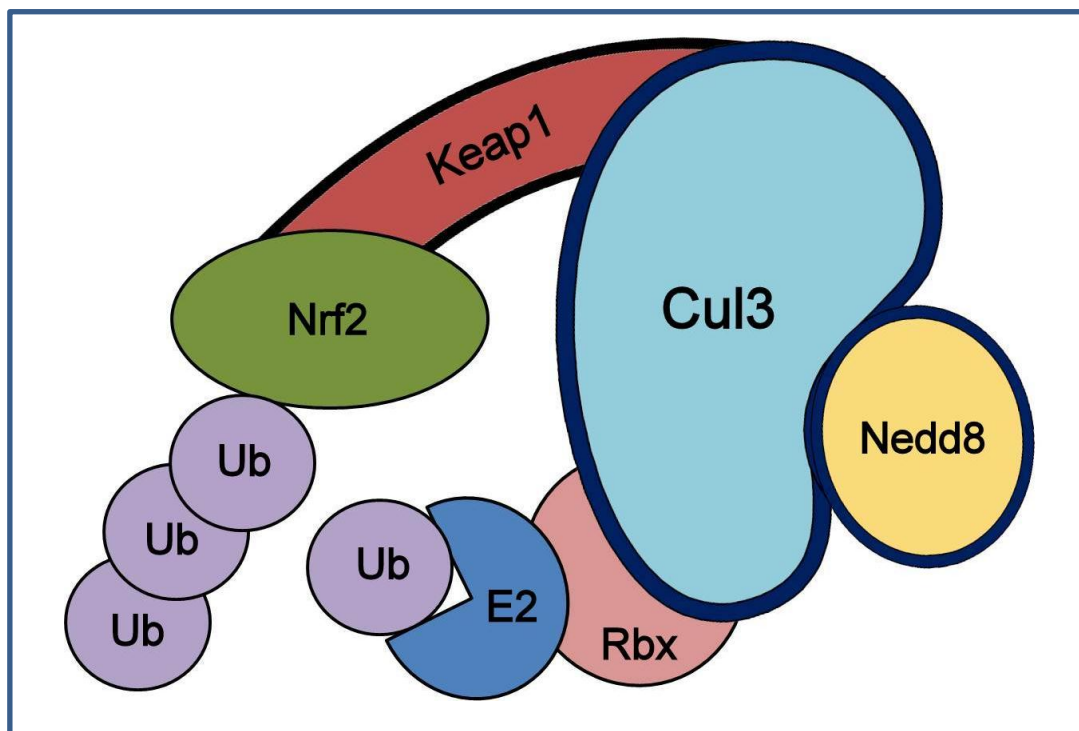


Figura 8. Representación esquemática del complejo Keap1/Cul3/Nrf2

Numerosos estudios hacen referencia a la importancia de la culina 3 en la regulación de la actividad de Nrf2, se ha encontrado que este factor de transcripción está presente en complejos de Cul3 *in vivo* y que esta culina dirige constitutivamente a Nrf2 a una degradación vía UPS (Lo et al., 2006; Sekhar et al., 2010) (Figura 8).

Se ha observado que alteraciones tanto en el dominio BTB de Keap1 y la modificación de la Cys151 de Keap1 altera la unión de Cul3 a ésta y por lo tanto la ubiquitinación de Nrf2 decrece (Eggler et al., 2009; Sekhar et al., 2010), además de esta evidencia, también se ha encontrado que la sobreexpresión de Cul3 está asociada a la sensibilidad a carcinogénesis y estrés oxidante (Loignon et al., 2009), lejos de ser sólo una proteína involucrada en un complejo que dirige la degradación de Nrf2 vía UPS. Cul3 es un factor determinante en la regulación de la actividad de dicho factor (Niture y Jaiswal, 2009; Kaspar y Jaiswal, 2010).

Cul3 es una proteína involucrada en procesos celulares tan importantes como lo es la vía citoprotectora mediada por Nrf2, por lo cual requiere de un mecanismo de regulación eficiente que permita al complejo E3 ligasa llevar a cabo su función adecuadamente. En general, la actividad de todas las culinas es regulada por un proceso llamado *nedilación* (Hannah y Zhou, 2009).

1.6.2 Regulación de las culinas

La actividad de las E3 ligasas basadas en culinas, es regulada a través de la conjugación reversible de una proteína pequeña del tipo de las ubiquitinas conocida como Nedd8 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 8*), ésta modificación covalente de Cul3 es esencial para su asociación con la enzima E2, por lo que promueve su capacidad de ubiquitinación de las proteínas blanco (Wu, JT et al 2005).

Nedd8 es una proteína parecida a ubiquitina, y está clasificada como del tipo 1, lo que quiere decir que se puede conjugar con proteínas para dirigirlas a procesos secundarios como lo hace la ubiquitinación. Hasta ahora se conoce que Nedd8 se une principalmente a los miembros de la familia de las culinas y así controla eventos biológicos vitales como la proteólisis vía UPS (Boh et al., 2011).

El proceso de conjugación de Nedd8 a las diversas culinas es parecido al de ubiquitinación, es un proceso dependiente de ATP, que está catalizado por una E1 (Uba3/ APP-BP1), donde Nedd8 activado es transferido a una E2 (Ubc12) que a su vez es la encargada de unir al polipeptido Nedd8 a la culina (Mori et al., 2004; Parry y Estele, 2004).

La nedilación está dada por la conjugación de Nedd8 a una lisina conservada cerca del carboxilo terminal de la culina, esta conjugación incrementa la actividad de las ubiquitin ligasas promoviendo por un lado el reclutamiento de la E2, y por otro estimulando un re arreglo conformacional en el dominio winged-helix B del C- terminal de la culina y al subdominio RING permitiendo de esta manera formar una estructura más "dinámica" que promueve así la transferencia de la ubiquitina al sustrato (Boh et al., 2011) (Figura 9).

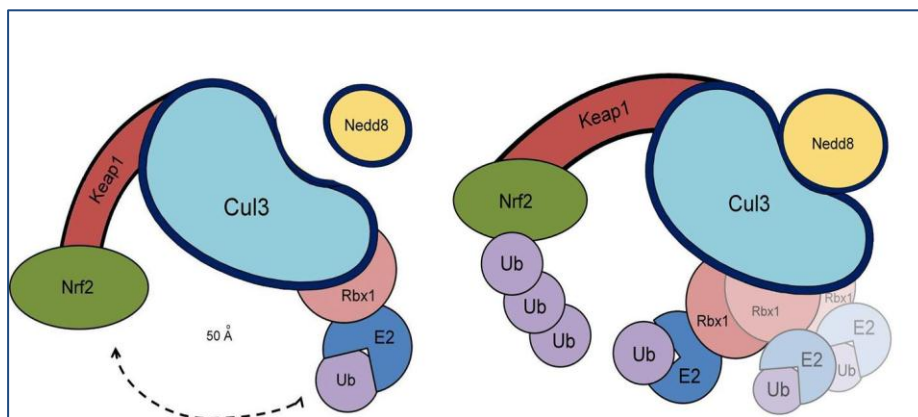


Figura 9. Ilustración del cambio conformacional de las culinas por la nedilación (Modificado de Merlet et al., 2009).

1.6.3 Nedd8 y enfermedades neurodegenerativas

El papel que adquiere la vía regulatoria de Nedd8, a través de mediar la ubiquitinación de diversas proteínas por medio de las CRLs es de gran interés y no sorprende que una alteración en el proceso de conjugación de Nedd8 con sus proteínas blanco, afecte la función normal de la célula.

Hasta ahora se han encontrado evidencias que sugieren que Nedd8 está involucrado en la formación de una gran variedad de inclusiones tanto intracitoplásmicas como intranucleares, incluyendo cuerpos de Lewy en enfermedad de Parkinson, en inclusiones intranucleares en enfermedades por poliglutamina (Mori et al., 2005; Ferro et al., 2007), así también en inclusiones neuronales y gliales en atrofia multisistémica y en los nudos neurofibrilares de la enfermedad de Alzheimer (Chen et al., 2012; Mori et al., 2012).

1.7 Modelo de neurodegeneración: Ácido Quinolínico.

Independientemente de las diferencias clínicas, los mecanismos patológicos de los desórdenes neurodegenerativos crónicos tienen en común algunas características que incluyen disturbios en la función mitocondrial, exitocidad por glutamato y un desequilibrio en el metabolismo del triptófano (Zádori et al., 2009).

El L-triptófano que no es utilizado para la síntesis proteica es metabolizado a través de la vía de la kinurenina (Stone, 2001). El metabolito del triptófano ácido 2,3 piridin-dicarboxílico, conocido comúnmente como ácido quinolínico (QUIN), es una de las principales moléculas neuroactivas formadas a través de esta ruta metabólica (Figura 8); ha sido postulado como un candidato para explicar la etiología de algunas enfermedades neurodegenerativas principalmente la enfermedad de Huntington (Rios y Santamaria, 1991; Stone, 2001).

El efecto neurotóxico del ácido quinolínico no sólo se debe a su capacidad de activar selectivamente los receptores de glutamato sensibles a N-metil-D-aspartato (NMDA) sino también a una serie de eventos relacionados con su capacidad de promover la formación de radicales libres y un estado de estrés oxidante en la célula

(Garthwaite y Gartwaite, 1987; Rios y Santamaria, 1991; Santamaria et al., 2003; Stone et al., 2000; Maldonado et al., 2010).

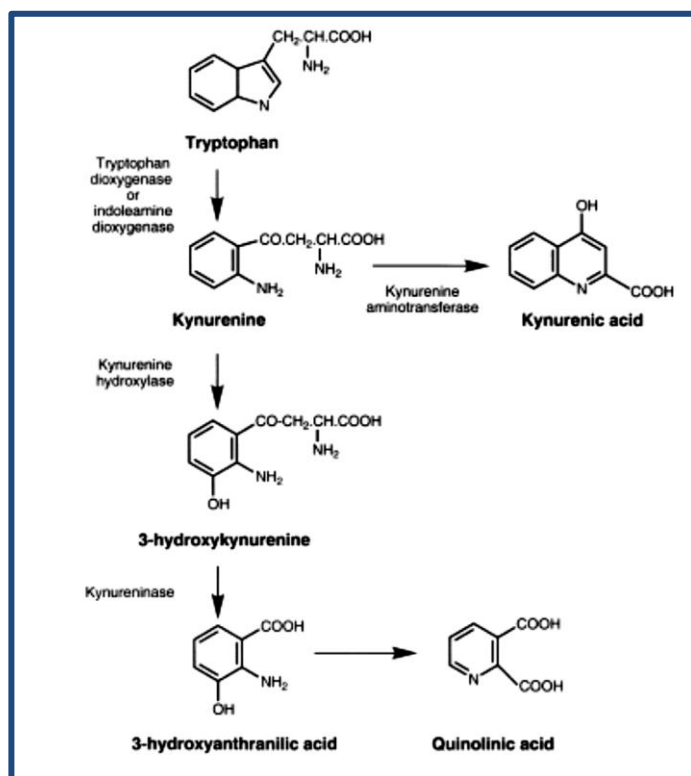


Figura 10. Vía de la kinurena y sus principales metabolitos.

Las neuronas del estriado cerebral presentan receptores de glutamato en abundancia, especialmente los sensibles a NMDA (Fernandes, 2001), por lo que la sobre estimulación de estos receptores por la acción del ácido quinolínico, participa en la alteración de la permeabilidad principalmente de los iones Ca^{2+} , aumentando su concentración citosólica, originando la activación de una gran diversidad de enzimas que pueden afectar el funcionamiento mitocondrial contribuyendo en la producción de ROS/ RNS, así como desencadenar muerte neuronal por la activación de la cascada apoptótica o por necrosis (Stone, 2001; Sanchez et al., 2010; Maldonado et al., 2010), así el ácido quinolínico, provoca degeneración del cuerpo estriado y por ello constituye un buen modelo experimental excitotóxico-prooxidante de daño neuronal.

2. JUSTIFICACIÓN

Una gran diversidad de enfermedades se han relacionado con el estrés oxidante y la generación de radicales libres, especialmente se relacionan con el envejecimiento y con enfermedades neurodegenerativas, entre las que destacan la enfermedad de Huntington, Alzheimer y Parkinson (Andersen, 2004). Por esta razón el estudio de la neurodegeneración en particular es uno de los más importantes. En nuestros días, se están haciendo grandes progresos para entender, prevenir y tratar dichas enfermedades, por lo cual, la búsqueda de moléculas que posean propiedades citoprotectoras contra el daño oxidante, para inducir la expresión de los genes que codifican para las enzimas de fase II por la vía mediada por Nrf2, ha resultado ser una de las principales áreas de investigación.

Sin embargo, recientes evidencias sugieren que el mal funcionamiento del sistema de eliminación de las proteínas de la célula, llamado sistema ubiquitin-proteosoma, tiene un papel muy importante en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas (Lehman, 2009). Este sistema requiere interacciones entre varias proteínas, una de las más importantes es Nedd8 de la cual depende la activación de las culinas, incluida la Culina 3, la cual media la degradación del factor Nrf2.

Hasta el momento no ha sido estudiado el efecto del estrés oxidante en la actividad de Cul3 y Nedd8, por ello, en este trabajo surge la necesidad de investigar si el estrés oxidante promueve la activación o desactivación de la nedilación de la proteína Cul3 llevando a la modificación de la regulación de la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 y por lo tanto contribuir en el entendimiento del mecanismo de neurodegeneración.

3. HIPÓTESIS

Si el estrés oxidante produce cambios en la expresión de la ligasa Cul3 o en su actividad mediada por la conjugación a Nedd8, es posible que este sea un evento clave en la regulación de la respuesta celular ante el daño producido por un agente oxidante como el QUIN.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General: Determinar los posibles cambios en la expresión diferencial en núcleo y citoplasma de Cul3 inducidos por QUIN en un modelo *in vitro* e *in vivo*.

4.2 Objetivos Particulares:

- Demostrar cambios en la localización subcelular de Cul3 como consecuencia de un aumento de especies reactivas de oxígeno.
- Demostrar que la expresión de la proteína Nedd8 sufre cambios en presencia de estrés oxidante en el estriado de rata.
- Demostrar que los posibles cambios en la expresión/ activación de Cul3 tiene consecuencias en la regulación del factor Nrf2.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

El ácido quinolínico (QUIN), se obtuvo de Sigma Chemical Co, el anticuerpo Anti- Cul3 utilizado se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (mouse monoclonal) al igual que el anticuerpo Anti-NEDD8 (Rabbit Polyclonal). Los anticuerpos secundarios marcados con HRP se obtuvieron de Sigma.

5.2 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 250-300 g proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Los animales se mantuvieron con ciclos de 12h luz/oscuridad y con dieta estándar. Todos los procedimientos realizados con los animales se llevaron a cabo de acuerdo a las Guías para el cuidado y Uso de animales de los Institutos Nacionales de Salud.

5.3 Modelo *In vitro*

5.3.1 Obtención de rebanadas de estriado. Se sacrificaron 6 animales a los cuales se les extrajo el cerebro, se desechó el cerebelo e inmediatamente se obtuvieron rebanadas de estriado de 400 μm . Las rebanadas de estriado se dividieron en 6 grupos ($n=5/\text{grupo}$) como se describen a continuación: Control 1, Control 2, Control 3; QUIN 1, QUIN 2, QUIN 3. Las muestras se pre incubaron a 37°C en solución KREBS-HEPES (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1.2 mM, Na-HEPES 25 mM, CaCl₂ 1 mM, glucosa 12 mM) previamente saturada en oxígeno (1hr). Posteriormente se aplicó ácido quinolínico 100 μM como agente pro-oxidante para los grupos denominados QUIN (1-3), mientras que los grupos control (1-3) se incubaron con el medio KREBS-HEPES. Al término de la incubación, se eliminó el medio de

incubación y las rebanadas fueron lavadas con PBS. Las muestras fueron inmediatamente congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

5.3.2 Separación y precipitación de proteínas nucleares y citoplásmicas. Los tejidos que habían sido guardados se lavaron con 200µL de PBS y se centrifugaron 1 min a 3000 rpm. Las células se homogenizaron manualmente, añadiendo 4 volúmenes del amortiguador de lisis A (HEPES [pH 7.9] 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, DTT 1 mM, PMSF como inhibidor de proteasas) e incubadas 15 minutos en hielo. Después se añadió NP-40 y se agitó con la ayuda de un vórtex inmediatamente por 15 segundos. Las muestras se centrifugaron a 6000 rpm/1 minuto, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 14000 rpm/20 minutos. Se recolectaron los extractos citoplásmicos (sobrenadante). Los pellets se resuspendieron en 4 volúmenes del amortiguador B (HEPES [pH 7.9] 20 mM, NaCl 400 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 1 mM, glicerol 25%, PMSF como inhibidor de proteasas) e incubados durante 30 minutos a 4°C con agitación suave. Terminado el tiempo de incubación se centrifugaron a 13000 rpm/5 minutos y se recuperaron los extractos nucleares (sobrenadante). A los sobrenadantes recuperados se les añadió 9 volúmenes de etanol al 100% frío, se mezcló por inversión y se dejaron 60 minutos a -20°C. Después se centrifugaron a máxima velocidad por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y una vez secas las muestras se resuspendieron en Tris-HCl pH 6.8 125 mM.

5.3.3 Detección de Cul3 y Nedd8 por western blot. Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó el método de Lowry. Posteriormente se separaron 50 µg de proteína citoplásmicas / nucleares por muestra mediante electroforesis SDS-PAGE (gel al 10%) y se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore). Las membranas se bloquearon durante 2 h con leche descremada en polvo al 5% en TBS con Tween 20 al 1% (TBST).

Después de lavar las membranas con TBST durante 10 minutos (3 veces), se incubaron por 12 h a 4°C con anti-NEDD8 (1:1,000) y luego de 3 lavados con TBST (10 min c/u) se incubó durante 2 h con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano, usando una dilución 1:5,000 en TBST/leche descremada 5%. Una vez detectada la proteína por quimioluminiscencia (Kit Immobilon, Millipore) y expuestos en filmes BioMax (Kodak), se realizó un protocolo de "stripping" a las membranas para después detectar Cul3 (1:1,000) en TBST; después de 3 lavados con TBST (5 minutos cada uno) se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano anti-ratón 1:5,000 en TBST, detectando la proteína por quimioluminiscencia.

Para normalizar la expresión de Cul3 y Nedd8, las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-GAPDH (1:1,000) y anti-H1 (1:1,000). Las señales obtenidas en la placa de autoradiografía se cuantificaron usando el programa de densitometría ImageJ 1.46 (National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de densitometría (UA): Cul3o Nedd8/GADPH (para citoplasmas), Cul3 o Nedd8/H1 (para núcleos).

5.4 Modelo *In vivo*

Seis animales se dividieron en 2 grupos (n=3/grupo), el grupo control (Ctrol) recibió solución salina isotónica vía intraestriatal, mientras el grupo ácido quinolínico (QUIN) recibió 1 µL de QUIN (equivalente a 240 nmol, disuelto en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4) vía intraestriatal, las coordenadas de administración fueron las siguientes: +0.5 mm anterior al bregma, -2.6 mm lateral al bregma y +4.5 mm ventral a la dura (Paxinos y Watson, 1998). Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (0.2 mL/250 g *i.p*) antes de la administración intraestriatal de QUIN o de solución salina isotónica,

respectivamente, ésta se realizó empleando un equipo estereotáxico y una microjeringa Hamilton.

5.4.1 Análisis inmunocitoquímico. Los animales se sacrificaron 48 horas después de la inyección con QUIN, siguiendo el procedimiento descrito a continuación: los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (0.2 mL / 250 g *i.p.*), cada rata se colocó en posición dorsal sobre una superficie lisa, se realizó una incisión ventral para exponer el corazón, introduciendo una jeringa en el ventrículo izquierdo y realizando una incisión en la aurícula derecha se perfundió con una solución de p-formaldehído 4% (PAF) a temperatura ambiente durante 90 segundos. Se cortó la cabeza y se extrajo el cerebro colocándolo en una solución de PAF con sacarosa al 30% fría. Los cerebros en solución se guardaron a 4°C durante 3 días.

Se incluyeron los cerebros en un medio O.C.T (Optimal Cutting Temperature). Los cortes se realizaron de 8 µm utilizando un criostato Microm HM520 a -21°C y se montaron en láminas Fisher Brand Superfrost®/Plus silanizadas.

Inmunofluorescencia: colocalización de Cul3 y Nedd8. Antes de incubar las laminillas con los correspondientes anticuerpos, se realizó una prueba con el objetivo de determinar las mejores diluciones de trabajo de cada anticuerpo y evitar el mayor ruido de fondo posible, una vez estandarizada la dilución se prosiguió de la siguiente manera. Las laminillas se pre incubaron en PBS con 1% de suero normal de caballo y con 0.3% de Tritón X-100 durante 30 minutos. Se incubaron las secciones con el primer anticuerpo (a 4°C por 16 horas en una cámara húmeda), anti-Nedd8 (1: 100), anti-Cul3 (1:100), respectivamente. Después de lavar con PBS 30 minutos se incubaron con el segundo anticuerpo por una hora. Se hicieron 3 lavados con PBS (10 mins c/u) antes y después de una incubación con Anti-DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) como marcador de núcleos (1 µg/ml).

Finalmente, las laminillas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes anti-ratón acoplado a FITC o anti-conejo acoplado a FITC, diluídos 1:100; después de 3 lavados con PBS (10mins c/u) antes y después de esta incubación se realizó el montaje de los cubreobjeto usando 10 μ L de solución de montaje (Glicerol/PBS 50% v/v), la unión de los cubreobjetos y los portaobjetos se sellaron con barniz transparente de uñas para evitar el secado y el movimiento del tejido.

Las muestras se observaron y se analizaron con el procesador de imágenes IM1000 de LEICA (Cambridge, UK).

5.5 Inmunoprecipitación (IP) de Cul3.

Diez animales se dividieron en 2 grupos (n=5/grupo), el grupo control (Ctrol) recibió solución salina vía intraestriatal, mientras el grupo ácido quinolínico (QUIN) recibió 1 μ L de QUIN (equivalente a 240 nmol). Los animales se sacrificaron 48 horas después de la inyección intraestriatal, se extrajo el cerebro e inmediatamente se obtuvo el estriado cerebral colocándolo en tubos de microcentrífuga con fondo redondo. Cada una de las muestras se congelaron rápidamente en N₂, se homogenizaron en un mortero hasta obtener un polvo fino y se guardaron a -70°C.

5.5.1 Extracción de proteínas nucleares para la IP. Las muestras se descongelaron rápidamente, y se resuspendieron en PBS frío. Después de centrifugar las muestras 10 min. a 200 r.p.m. a 4°C, se removió cuidadosamente el sobrenadante y se transfirió el equivalente a dos volúmenes de amortiguador A (HEPES-KOH [pH 7.9] 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM) respecto al volumen del tejido. Se homogenizó manualmente el tejido y se centrifugo a 2500 r. p. m/10 min. Se tomó y guardó el sobrenadante (citoplasma) a -70°C. Se añadió lentamente (con agitación) al pellet 3-4 volúmenes de amortiguador B (HEPES-KOH [pH 7.9] 20 mM,

glicerol 25%, MgCl₂ 1.5 mM, NaCl 0.42 mM, EDTA 0.2 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 0.5 mM) después de homogenizar manualmente el tejido, las muestras se agitaron durante 30 minutos en hielo. Finalmente se removieron los desechos nucleares por centrifugación a 13,000 r. p. m. / 15 min.

5.5.2 Preparación de la resina. Lavar las perlas de sefarosa (Sefarosa®4B Recombinante al 20% en etanol, Sigma Aldrich) 2 veces con 500 µL de PBS y restaurar el volumen en una suspensión al 50% en buffer B.

5.5.3 Pre lavado del lisado celular.

1. Se añaden 100 µl de perlas lavadas y reconstituídas, por cada 1000 µL de lisado (10-30 µL de la suspensión de perlas por 200 µL de lisado).
2. Incubar a 4°C/15 minutos en un agitador orbital.
3. Remover las perlas por centrifugación a 14,000 g/4°C/10 min. Guardar las perlas (pellet) en sol. PBS para su posterior limpieza. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
4. Determinar la concentración de proteínas del lisado celular por método de Lowry Low.
5. Diluir el lisado celular (equivalente a 500 µg de proteína) con buffer B.
6. Añadir el anticuerpo anti-cul3 al lisado pre-lavado.
7. Incubar a 4°C/1 hr con rotación.
8. Añadir 200µL de suspensión de perlas. Incubar a 4°C/4 hr con rotación.
9. Centrifugar el tubo a 2,500 g/ 30 segundos a 4°C.
10. Remover cuidadosamente el sobrenadante (desechar).
11. Lavar cuidadosamente las perlas con 500 µl de amortiguador B enfriado en hielo. Después de cada lavado aspirar cuidadosamente el sobrenadante (desechar). Hacer 4 lavados.
12. Añadir 60 µL de amortiguador Laemli 2X. Mezclar suavemente.

13. Agitar con la ayuda de un vórtex y hervir a 90-100°C por 10 minutos.
14. Centrifugar a 10,000 g/5 minutos para bajar las perlas. Colectar el sobrenadante cuidadosamente (transferirlo a un tubo nuevo) y correr en un gel SDS-PAGE al 10% y transferir a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore).

5.5.4 WB para la detección de Nrf2. La membrana se bloqueó durante 45 minutos con leche descremada en polvo al 5% en TBS con Tween 20 al 1% (TBST), se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBST y se realizó una incubación de 2hrs (dilución 1:1,000 con TBST). Después de realizar 3 lavados (10 min c/u) con TBST se hizo la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1:5,000 en TBST) durante 45 minutos. Finalmente se realizaron 3 lavados con TBST (10 min c/u). La detección de Nrf2 se realizó por quimioluminiscencia (Kit Immobilon ,Millipore) y expuestos en filmes BioMax (Kodak).

5.6 Análisis estadístico. Los datos se reportaron como la media \pm SD y se analizaron con el paquete estadístico Prism (Graph Pad, San diego, CA, EUA), usando la prueba t de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a valores de $p < 0.05$.

6.1 Modelo *In vitro*.

6.1.1 Efecto del estrés oxidante sobre los niveles de expresión de Cul3 y Nedd8 en núcleo y citoplasma.

Con el propósito de establecer si la exposición de las células estriatales a EROs induce la expresión de las proteínas Cul3 y nedd8 en el núcleo o en el citoplasma celular, se realizó la incubación de éstas con QUIN (100 μ M) en el modelo de rebanadas estriatales de cerebro de rata. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 11.

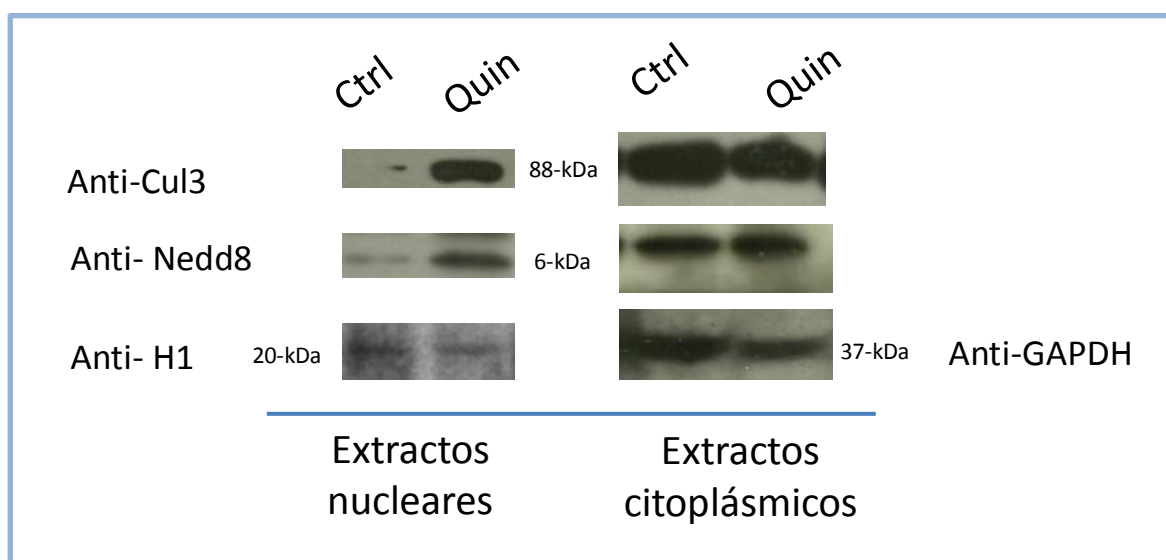


Figura 11. Western Blot de Cul3 y Nedd8 con sus respectivos controles de carga. Imagen representativa de 3 ensayos.

A través de la inmunodetección de la proteína Cul3 por Western Blot (Figura 11) se observó que en los grupos controles incubados sin QUIN, la expresión basal de Cul3 en citoplasma es muy alta mientras que en el núcleo es prácticamente indetectable. Los grupos tratados con QUIN (100 μ M) mostraron un aumento significativo en la expresión de Cul3 en núcleo, el análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (normalizado considerando la expresión de la

H1) indicó que el incremento en grupos con QUIN fue 1.07 ± 0.302 veces con respecto a los grupos control 0.14 ± 0.125 ($p < 0.0079$; Figura 12). El tratamiento con QUIN no cambió significativamente los niveles de Cul3 en citoplasma.

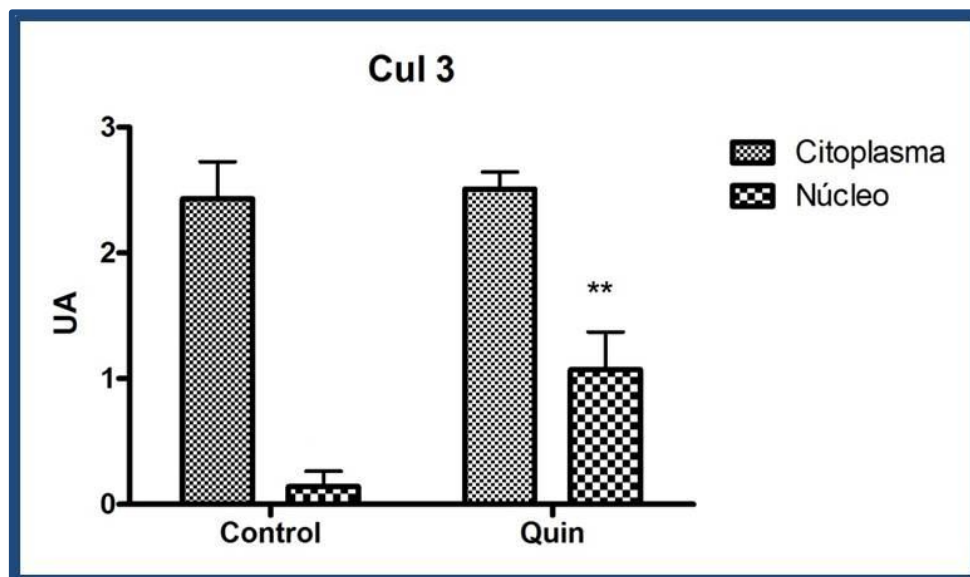


FIGURA 12. Efecto del estrés oxidante generado por ácido quinolínico (QUIN) sobre los niveles de expresión de Cul3 en células de estriado. Se presentan los niveles de expresión de Cul3 en unidades arbitrarias en citoplasma como en núcleo. Los valores son la media \pm SD ($n=3$). $p=0.6914$ para citoplasma y $**p=0.0079$ vs control en núcleo.

Se aprecia que Nedd8 se expresa en bajos niveles en los núcleos, aunque pareciera que la expresión detectada por Western blot en citoplasmas es grande, cuando se normaliza la medición con respecto a GADPH (control de carga para citoplasmas) se obtiene un nivel bajo de proteínas (figura 3). Se observó que en los grupos tratados con QUIN ($100 \mu\text{M}$) existe un aumento en los niveles de expresión de Nedd8 nuclear y aunque no es tan significativo como el aumento de Cul3 en núcleo, el análisis densitométrico reveló que el incremento de la expresión de Nedd8 en núcleo fue 1.55 ± 0.384 veces mayor en grupos con tratamiento con QUIN respecto a los grupos control 0.80 ± 0.339 ($p=0.0642$; Figura 13).

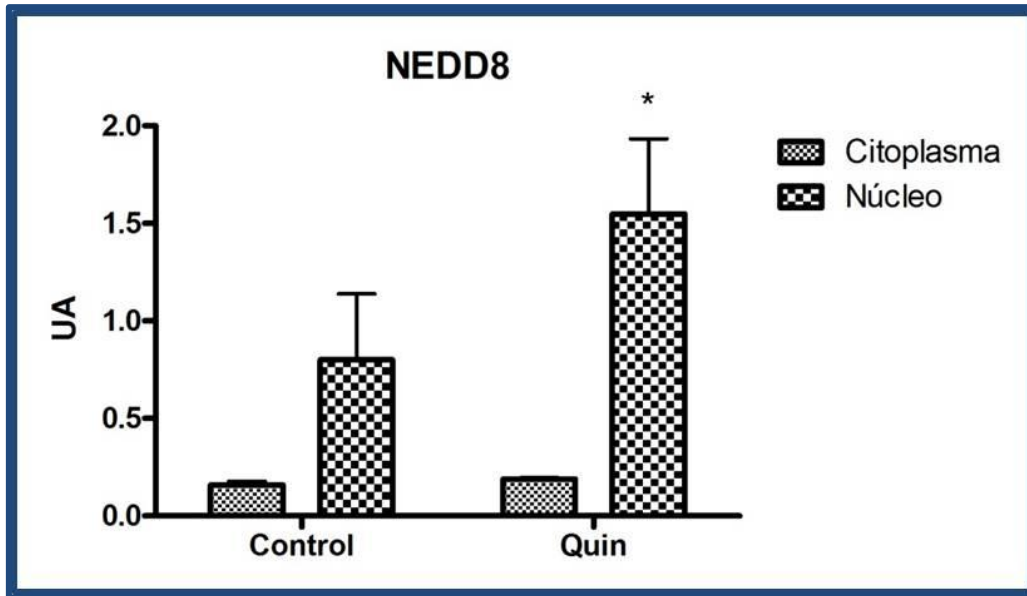


FIGURA 13. Efecto del estrés oxidante generado por ácido quinolínico (QUIN) sobre los niveles de expresión de Nedd8 en células de estriado. Se presentan los niveles de expresión de Nedd8 en unidades arbitrarias en citoplasma como en núcleo. Los valores son la media \pm SD (n=3). $P > 0.9999$ para citoplasma y $*P=0.0642$ vs control en núcleo. Los grupos tratados con QUIN (100 μ M) mostraron un aumento significativo en la expresión de Nedd8 en núcleo (1.55 \pm 0.384) con respecto a los grupos control (0.80 \pm 0.339).

5.1 Modelo *in vivo*.

5.2.1 Localización de las proteínas Cul3 y Nedd8 en el modelo *In vivo*.

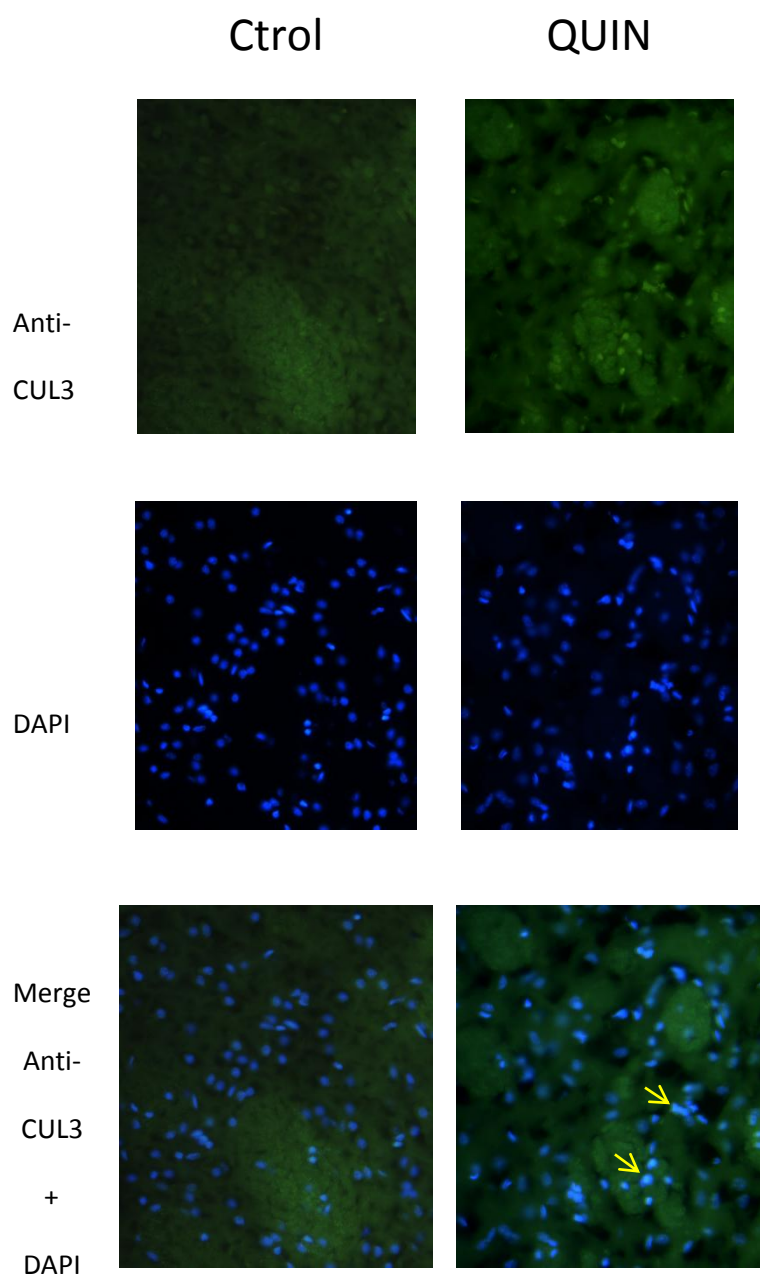
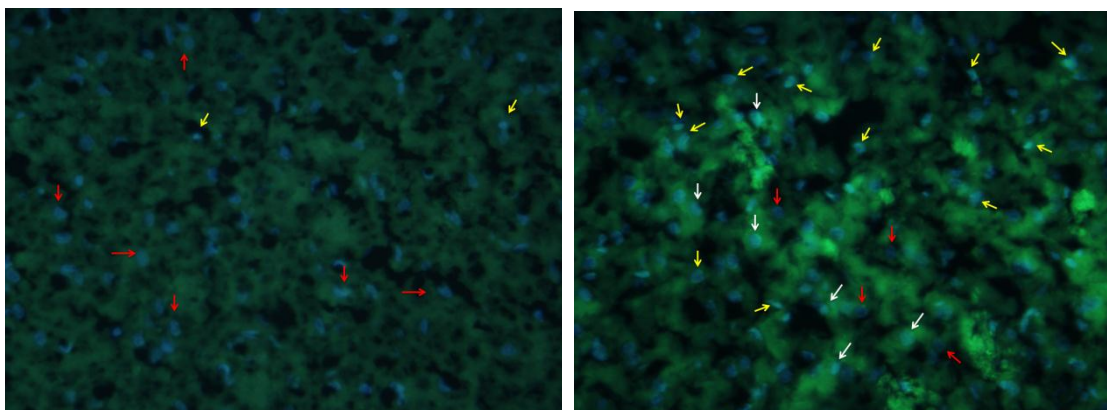


FIGURA 14. Inmunofluorescencia Indirecta en secciones coronales del estriado de cerebro de rata (40X). Las secciones se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-cul3 y con un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) Imágenes representativas de 3 ensayos y obtenidas con amplificación 40X.

En la inmunofluorescencia en cortes por congelación de cerebros de rata se observó que, 48 horas después de la inyección con QUIN la proteína CUL3 se localiza en el núcleo de la mayoría de las células, esta ubicación se corroboró con el marcaje de los núcleos con DAPI seguido de un sobrelape de imágenes para confirmar la colocalización nuclear de Cul3. Las ratas inyectadas con solución salina presentan a Cul3 en el citoplasma (figura 14; figura 15). En la figura 15 se presentan imágenes representativas de secciones coronales del estriado de cerebro de rata que indican la presencia de tres tipos de poblaciones celulares 48 horas después de la inyección con QUIN, las cuales no se observaron en cortes estriatales provenientes de ratas del grupo control.



↗ Principalmente nuclear ↓ Nuclear/Citoplásmica ↘ Citoplásmica

FIGURA 15. Inmunofluorescencia Indirecta en secciones coronales del estriado de cerebro de rata incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-CUL3 y un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde), núcleos en azul marcados con DAPI. Se distinguen tres poblaciones de células en los estriados tratados con QUIN (derecha). Imágenes representativas de 3 ensayos y obtenidas con amplificación 40X.

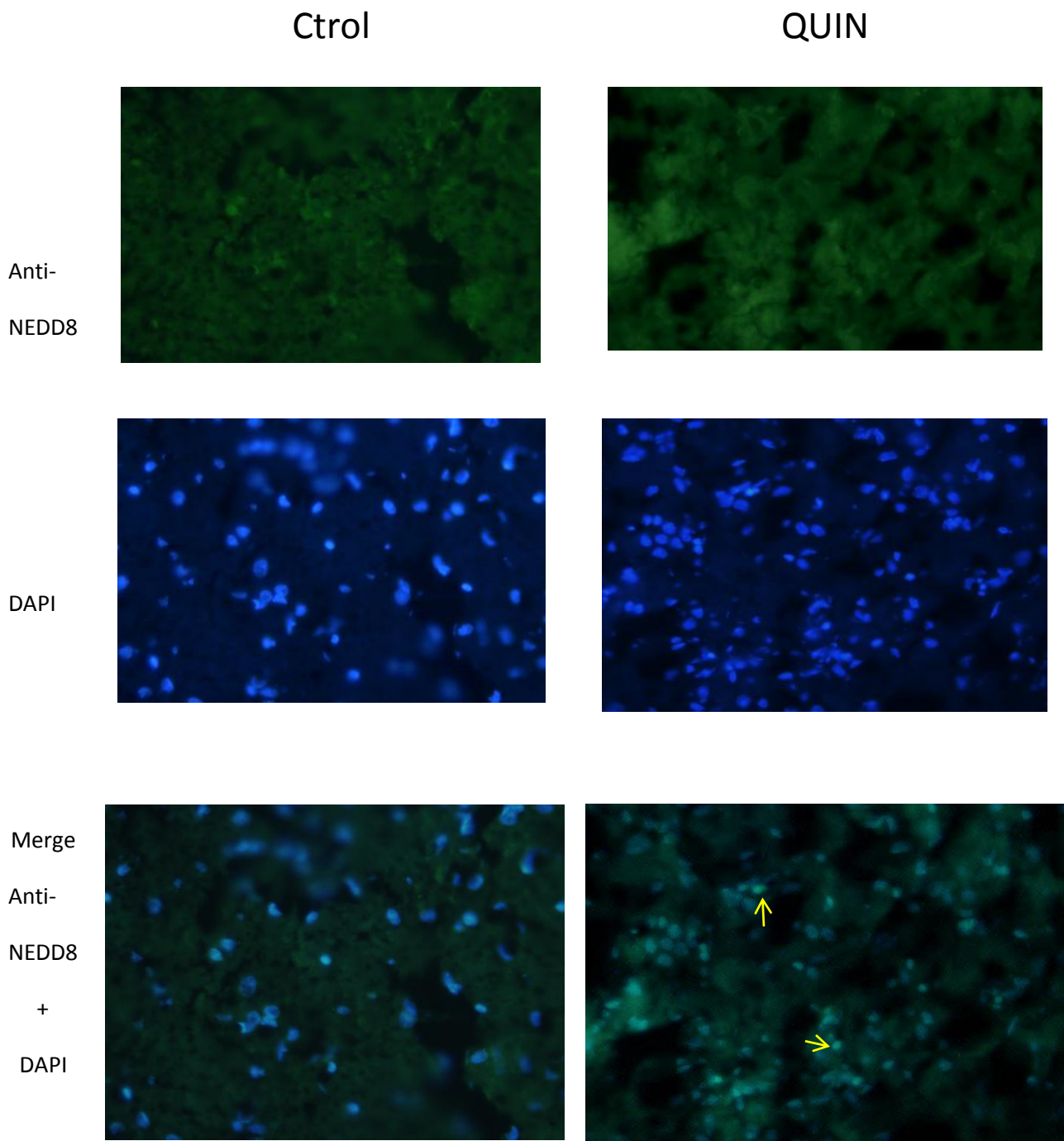


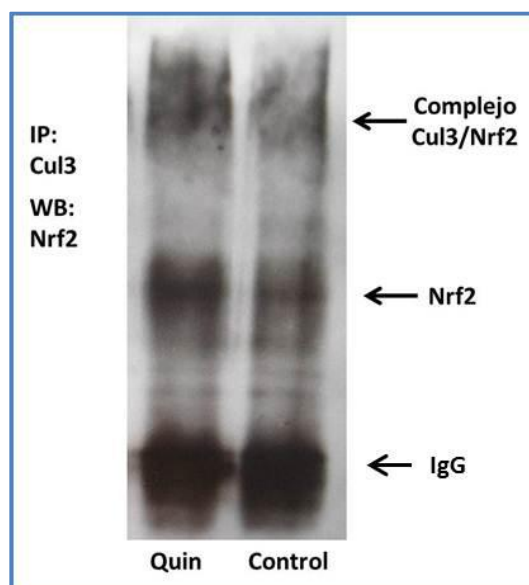
FIGURA 16. Inmunofluorescencia Indirecta en secciones coronales del estriado de cerebro de rata incubadas con el anticuerpo primario policlonal anti-NEDD8 y un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde) y núcleos en azul marcados con DAPI. Se observa una sobreposición perfecta de NEDD8 con los núcleos, que es más evidente a las 48h post-tratamiento con QUIN. Imágenes representativas de 3 ensayos y obtenidas con amplificación 40X.

Los resultados de la inmunofluorescencia para la detección de Nedd8 revelaron que en los controles existe una ligera fluorescencia y por lo tanto localización de Nedd8 en el núcleo, sin embargo 48 horas post-tratamiento con QUIN se observó que en todas las células hay un aumento en la inmunorreactividad para NEDD8 (Figura 16), indicando que el aumento en los niveles de NEDD8 es un evento que ocurre en todos los tipos celulares del estriado, en respuesta al estrés oxidante inducido por el QUIN.

5.3 Inmunoprecipitación de Cul3.

Con el objetivo de determinar si el aumento de Cul3 y Nedd8 en el núcleo podría ser un evento relacionado con el abatimiento de los niveles de Nrf2 nuclear, en la neurodegeneración in vitro (Tasset et al 2010), se realizó una inmunoprecipitación del complejo Cul3/proteínas nucleares de células del estriado cerebral de rata, y se detectó a Nrf2 por quimioluminiscencia (figura 17). Los resultados de este ensayo, revelan una señal más intensa en las células de estriado expuestas a QUIN (240 nmol) lo que indica que el estrés oxidante promueve la unión del complejo Cul3 a Nrf2 en el núcleo.

Figura 17. Inmunoprecipitación de Cul3/proteínas nucleares. Inmunoensayo de western blot para detección de Nrf2. Imagen representativa de 3 ensayos.



7. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mecanismo por el cual el factor de transcripción Nrf2 induce la expresión de proteínas de fase II ha sido ampliamente descrito en diversos trabajos. En este mecanismo se ha dado mayor importancia a la vía de señalización celular mediada por Keap1, en donde esta proteína se encuentra en el citosol unido a Nrf2, permitiendo su degradación continua vía el proteasoma, sin embargo, bajo determinados estímulos Nrf2 se separa del complejo que lo mantiene señalizado para su degradación y migra al núcleo para ejercer su función protectora, después de que este factor de transcripción ha cumplido su función cito-protectora, sufre modificaciones que le permiten ser exportado del núcleo hacia el citoplasma y ser degradado (Niture et al., 2010).

Con el propósito de diseñar estrategias que protejan a las células del daño causado por el estrés oxidante, se han buscado y caracterizado diversos compuestos que activan esta vía (revisado en Königsberg, 2007) para así inducir la translocación de Nrf2 al núcleo y promover la cito-protección.

Recientemente se ha sugerido que el sistema UPS juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas así también su desregulación ha sido implicada en un amplio espectro de patologías que incluyen el cáncer y las infecciones virales (Jung et al., 2009; Lehman, 2009). Por ello muchas aproximaciones terapéuticas han comenzado a dirigirse hacia los componentes del proteasoma (Grzegorz et al., 2006).

Teniendo como marco teórico la información anterior, esta tesis se desarrolló para determinar si en células de estriado cerebral el ácido quinolínico, un agente que no sólo se caracteriza por ser un agente excitotóxico sino también prooxidante, inducía cambios en los niveles de expresión de dos proteínas clave del sistema de degradación de

Nrf2 vía UPS, y en caso de ser así mostrar la relevancia de estos cambios en el mecanismo de daño celular bajo condiciones de estrés oxidante.

En este trabajo, encontramos que en condiciones basales la proteína Cul3 se localiza principalmente en el citoplasma (Figura 12), en donde de acuerdo con el modelo actual de regulación de la actividad del factor de transcripción Nrf2, participa en la degradación de Nrf2, proceso que también ocurre después de que Nrf2 ha cumplido su función citoprotectora en el núcleo (Niture et al., 2010). Así mismo, bajo estas condiciones, los niveles de expresión de Cul3 en el núcleo resultaron casi indetectables (Figura 11), mostrando así que principalmente lleva a cabo su función en el citoplasma.

La inducción de estrés oxidante por medio del ácido quinolínico causó un aumento en los niveles de expresión de Cul3 en el núcleo (Figuras 11 y 12), así también, hubo un aumento en el citoplasma, sin embargo, éste no fue significativo a diferencia del observado en el núcleo celular. Esta translocación de Cul3 en el núcleo es gran importancia ya que en diversos estudios se ha informado que Cul3 regula una diversidad de eventos nucleares por la unión a factores como la Topoisomerasa I (Zhang, 2004), ciclina E (Uta Kossatz et al., 2010), NPR1 (*nonexpressor of pathogenesis-related (PR) genes 1*) (Spoel et al., 2010), entre otros elementos que permiten la diferenciación, desarrollo y progresión del ciclo celular (Singer et al., 1999; Mistry et al., 2004; Pintard et al., 2003; Xu et al., 2003).

En la figura 13 se observó que Nedd8 es una proteína principalmente nuclear, de modo que, las proteínas con las que se conjuga son principalmente nucleares (Kamitani et al., 1997).

Sumando a lo anterior, el aumento en el nivel de expresión nuclear de la proteína NEDD8 (figura 13) en rebanadas tratadas con QUIN(a una concentración que promueve el daño neuronal) resultó aún más interesante. Nuestros datos sugieren que la conjunción de estos dos

eventos: por un lado la acumulación nuclear de Cul3 y por el otro lado un aumento en los niveles de Nedd8 proporcionan las condiciones necesarias para que exista la activación de la Culina3 a través del proceso de nedilación, evento que es reportado como esencial para la actividad de las culinas *in vivo* (Wu, et al., 2005). Estando Cul3 en el núcleo activado por la nedilación, podría promover la degradación en el núcleo de sus proteínas sustrato; entre las cuales se encuentra el factor Nrf2, lo que podría impedir su función protectora ante un reto de estrés oxidante, desencadenando la muerte celular.

Con la finalidad de confirmar la localización *in vivo* tanto de Cul3 como de Nedd8 en el núcleo celular, se realizaron análisis inmunocitoquímicos en los cuales se observó efectivamente que Nedd8 es principalmente una proteína nuclear que en condiciones basales se expresa en muy bajos niveles (Figura 16); en cambio, en condiciones de estrés aumenta su expresión (Figuras 13 y 16) ya que logra distinguirse de una manera mucho más definida la colocalización nuclear (Figura 16), esta acumulación de Nedd8 en el núcleo podría ser muy relevante ya que Nedd8 también se encuentra en cuerpos de inclusión intranucleares mostrados principalmente en células gliales asociados a diversas enfermedades neurodegenerativas (Mori F et al., 2012; Buffo et al., 2010). Así también, se observó que en los cortes de cerebro de ratas tratadas con ácido quinolínico la expresión de Cul3 aumentó en el núcleo, reflejado en un aumento de inmunoreactividad a Cul3 (Figura 14). Además se observaron tres tipos de poblaciones celulares que fueron inmunoreactivas a Cul3 (Figura 15), un tipo en el cual se localiza Cul3 tanto en el núcleo como en el citoplasma, otro en el cual sólo se localiza en el núcleo y células que no tienen Cul3 en el núcleo; estos resultados sugieren que este último tipo celular podría ser un tipo de células resistentes o con baja susceptibilidad al daño provocado por los radicales libres, y

por consiguiente, hablar de una vulnerabilidad selectiva a estrés oxidante (Saxena y Caroni P.,2011).

Si bien, Leidecker y colaboradores (2012) han demostrado que Nedd8 responde ante diversos estímulos como la inhibición del proteasoma, shock térmico y estrés oxidante, hay que destacar que el presente trabajo es el primero en demostrar que Nedd8 y Cul3 responden a estrés oxidante en un modelo excitotóxico/ pro-oxidante de neurodegeneración.

Debido a que se observaron niveles de expresión aumentados en el núcleo tanto de Cul3 como de Nedd8, pensamos que Cul3 podría promover la degradación de sus proteínas sustrato; entre las cuales se encuentra el factor Nrf2, que de acuerdo al modelo actual de regulación, entra al núcleo para activar la expresión de los genes que regulan la defensa antioxidante.

Los resultados de la inmunoprecipitación de Cul3 a partir de extractos nucleares (Figura 17), revelaron interesantemente que, las condiciones de estrés oxidante provocadas con QUIN promueven la unión de Cul3 a Nrf2, lo que nos lleva a pensar que lo degrada en el núcleo celular. Esta degradación de Nrf2 podría darse incluso antes de que éste pueda unirse a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) y evitando con ello que se monte una respuesta citoprotectora. Esto es consistente con lo observado en un trabajo previo, donde el mismo tratamiento con QUIN abate los niveles nucleares de Nrf2, en contradicción con lo establecido con el modelo actual de activación de Nrf2 (Tasset et al., 2010). Estos resultados están en concordancia con la información de los estudios de Kaspar (2010) y Niture (2009), en los cuales se revela que Nrf2 frente a un tratamiento con t-BHQ (un compuesto fenólico con propiedades antioxidantes) se estabiliza y migra al núcleo dentro de las primeras 2 horas del tratamiento, pero a su vez, promueve la importación nuclear del complejo Keap1/Cul3 para capturar y degradar rápidamente el Nrf2 nuclear y así darle

oportunidad a otras vías celulares de vigilancia y la célula sobreviva, muera o sufra senescencia.

Así mismo, recientemente se ha reportado que tanto el isotiocianato sulfurafano (un fitoquímico) y el CPDT (5,6-dihidrociclopenta-1,2-ditiol-3-tiona) una ditioltiona, ambos quimiopreventivos activadores de Nrf2, son capaces de atravesar el núcleo celular e impedir la degradación de Nrf2 en el núcleo, lo que al parecer sería su mecanismo de acción (Yun, 2012) al contrario de lo que siempre se había creído que ocurría exclusivamente en el citoplasma. Lo cual demuestra, como es claro en nuestros resultados de IP, que existe una degradación nuclear de Nrf2 aún en condiciones basales, y ésta se incrementa de manera importante en presencia de estrés oxidante. Existe evidencia que indica que Nrf2 es una proteína principalmente nuclear (Nguyen et al., 2005), esto resalta la importancia de la expresión de Cul3 y Nedd8 en el núcleo ya que una acumulación excesiva de Nrf2 en el núcleo puede llegar a ser perjudicial para la célula (Kaspar y Jaiswal, 2010).

Hay que hacer notar que los resultados obtenidos en este trabajo, invitan a proponer un nuevo modelo de regulación de Nrf2, en el cual se exponga cómo ante un estímulo oxidante los niveles de Cul3 y Nedd8 en el núcleo celular se incrementan, promoviendo una desregulación en la vía de cito protección y señalización normal de Nrf2, desencadenando así el posible mecanismo de neurodegeneración generado por un agente excitotóxico y pro-oxidante como lo es el QUIN (Figura 18).

Se ha sugerido que el incrementar la actividad de Nrf2 pudiera llegar a ser un método prometedor para combatir los daños producidos por el estrés oxidante. Sin embargo, no hay que perder de vista que la activación constitutiva y "constante" de Nrf2 podría no ser efectiva en condiciones de estrés oxidante, evento característico en diversas enfermedades neurodegenerativas, debido a que la sobre-activación nuclear de Nedd8 aunado al aumento en la expresión y translocación

de Cul3 en el núcleo, pueden promover la degradación de Nrf2, simultáneamente.

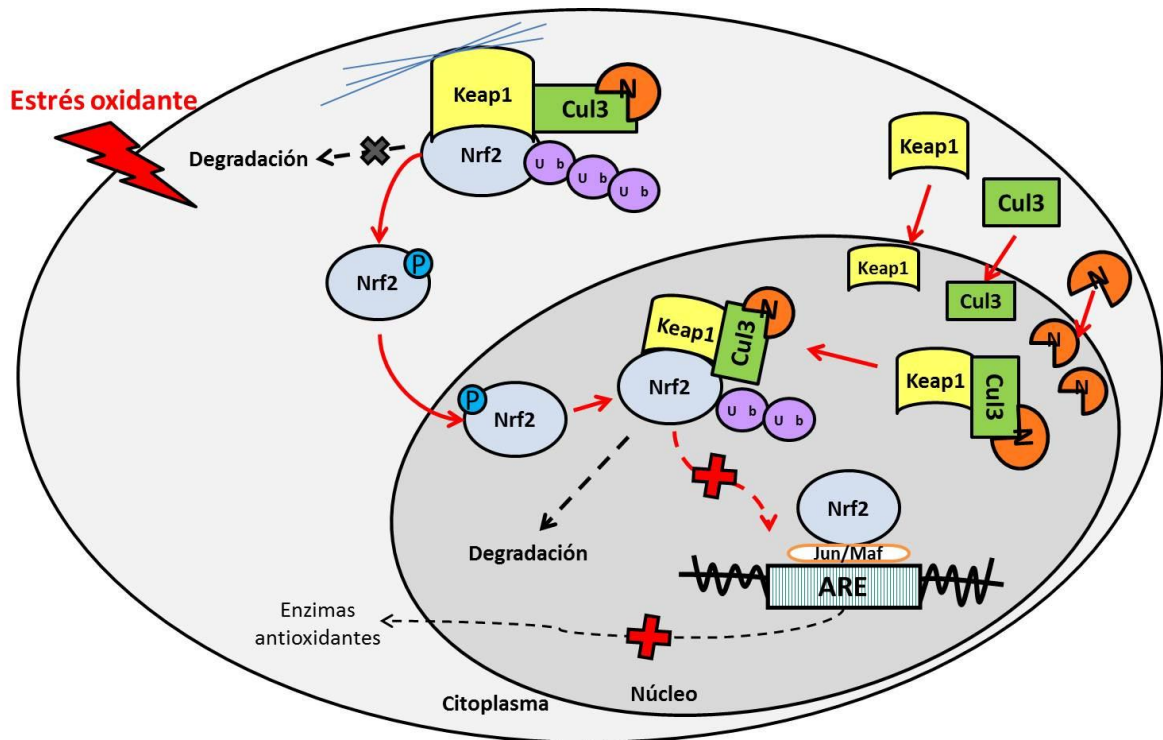


Figura 18. Modelo en el que se postula la participación de Cul3 y Nedd8 en el proceso de neurodegeneración provocado por estrés oxidante. Cul3 que se encuentra en el citoplasma en condiciones basales participando en la degradación de Nrf2, también participa en la degradación de Nrf2 después de que este factor ha cumplido su función protectora en el núcleo. La presencia de ERO induce la acumulación nuclear de Cul3 y Nedd8 lo cual puede ocasionar la degradación de sus proteínas blanco en el núcleo, entre las cuales se encuentra Nrf2, por lo que pudiera inhibir de esta manera la acción de las misma, desregulando la vía citoprotectora y señalización normal.

El estrés oxidante ha resultado ser un factor muy importante durante la etapa del envejecimiento principalmente en las enfermedades

neurodegenerativas, de esta manera los resultados obtenidos ayudan a entender un poco más sobre qué eventos y cómo podrían estar involucrados en el proceso de neurodegeneración ante un estímulo oxidante.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los cambios en la expresión de Cul3 y Nedd8 están implicados con la disminución de la capacidad detoxificadora y protectora de la célula ante estrés oxidante provocada por la desregulación de la actividad del factor de transcripción Nrf2, lo que contribuye en el deterioro morfo funcional de la célula que eventualmente conlleva a la neurodegeneración.

De esta manera, queda clara la importancia de analizar y comprender los mecanismos de regulación y activación de Nrf2 bajo condiciones de estrés y su asociación con las proteínas Keap1/Cul3/Nedd8 en respuesta a estos estímulos, antes de intentar cualquier tipo de manipulación terapéutica.

8. CONCLUSIONES

- I. Las condiciones de estrés generadas por QUIN permitieron evidenciar los cambios en los niveles de expresión y localización subcelular de Cul3 y Nedd8.
- II. Se observó un aumento estadísticamente significativo de Cul3 y Nedd8 en el núcleo celular de células de estriado cerebral de rata en presencia de estrés oxidante.
- III. Los resultados de inmunoprecipitación sugieren que el aumento de Cul3 como de Nedd8 en el núcleo por estrés oxidante podrían estar relacionados con un mecanismo de desregulación de la vía cito protectora mediada por Nrf2 en el cerebro, contribuyendo al daño neuronal.
- IV. La participación de Cul3 y Nedd8 en la regulación de la actividad de Nrf2 en presencia de estrés abre posibilidades para el diseño de blancos terapéuticos alternativos para el manejo de patologías relacionadas con la neurodegeneración por estrés oxidante.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ames Bruce N., Shigenaga Mark K y Hagen Tory M (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:7915-7922.
- Andersen, J.K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature reviews Neuroscience.* 5: S18-S25.
- Angoa Pérez Mariana y Rivas Arancibia Selva (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia?. *Arch Neurocién.* **12**(1):45-54.
- Bedford, L. Lowe, J. Dick, L. Mayer, R. and Brownell, J. (2011). Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. *Nature Reviews;* **10**:29-46.
- Boh BK, Smith PG, Hagen T (2011). Neddylated cullin-1 regulates cullin RING ligase activity in vivo. *Journal of Molecular Biology.* **409**(2):136-145.
- Bossy-Wetzler, E. Schwarzenbacher, R. Lipton A, S. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Medicine.* **10**:S2-S9.
- Bosu, D.R., Kipreos, E. T. (2008). Cullin- RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell Division;* 3:7
- Buffo A, Rolando C, Ceruti S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol.* (2010).**79**(2):77-89.
- Chen Y, Neve RL, Liu H. (2012). Neddylated cullin-1 dysfunction in Alzheimer's Disease. *J Cell Mol Med.* 16 (9):
- Chew, E.H. and Hagen, T. (2007). Substrate-mediated Regulation of Cullin Neddylated. *The Journal of Biological Chemistry.* **282**(23):17032-17040.
- Chiba, T. and Tanaka, K. (2004). Cullin-based Ubiquitin Ligase and its Control by NEDD8-conjugating System. *Current Protein and Peptide Science.* **5**(3):177-184.
- Ciechanover Aaron y Brundin Patrik (2003). The Ubiquitin Proteasome System in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometime the egg. *Neuron.* **40**:427-446.

Copple.M. I. et al.(2008). The Nrf2–Keap1 defence pathway: Role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology*. **246**:24–33.

Cullinan Sara B., Gordan John D., Jin Jianping,Harper J. Wade y Diehl J. Alan (2004). The Keap1- BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3- Based E3 ligase: Oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cel Biol*; **24** (19):8477-8486.

Davies, Kelvin J. A.(2000). Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life*, **50**: 279–289.

Dhakshinamoorthy S, Long DJ, Jaiswal AK (2000). Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curren topics in cellular regulation*. **36**:201-216.

Duda, D. M. et al. (2008). Structural Insights into Nedd8 Activation of Cullin-RING Ligases: Conformational Control of Conjugation. *Cell*. **134**: 995-1006.

Duda, D.M. et al. (2011). Structural regulation of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr Opin Struct Biol*. **21**(2): 257–264.

Egglar, A. Small, E. Hannink, M. and Mesecar, D. (2009). Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. *Biochem. J.*; **422**: 171-180.

Fernandes Leite (2001). La enfermedad de Huntington: una visión biomolecular. *Rev Neurol*. **32**(8):762-767.

Ferro Anabela , Carvalho Ana Luísa, Teixeira-Castro Andreia, Almeida Carla , Tomé Ricardo J., Cortes Luísa , Rodrigues Ana , Logarinho Elsa , Sequeiros Jorge, Macedo-Ribeiro Sandra , Maciel Patrícia (2007). NEDD8: A new ataxin-3 interactor. *Biochimica et Biophysica Acta* **1773**:1619–1627.

Figueiredo-Pereira Maria E. y Rockwell Patricia (2001). The ubiquitin/proteasome pathway in neurological disorders. Role of Proteases in the Pathophysiology of Neurodegenerative Diseases. 137-153.

Furukawa, M., Xiong, Y. (2005); BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cel Biol*; **25** (1): 162-171.

Furukawa, M., Y. J. He, C. Borchers, y Y. Xiong. 2003. Targeting of protein ubiquitination by BTB-cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat. Cell Biol.* **5**:1001–1007.

García H. D. et al. (2010). Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radical Biology & Medicine.* **49**:130–143.

Garthwaite G y Garthwaite J (1987). Quinolinate mimics neurotoxic actions of N-methyl-D-aspartate in rat cerebellar slices. *Neuroscience Letters,* **79**:35-39.

Geyer, R., Wee, S., Anderson, S., Yates, J. y Wolf, D. A (2003). BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Mol. Cell* **12**:783–790.

Gil Joana y Rego Ana Cristina (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci.* **27**:2803-2820.

Gilles J. G. et al. (2007). Characterization of the Kynurenine Pathway in Human Neurons. *The Journal of Neuroscience.* **27**(47):12884 – 12892.

Gong, L. y Yeh, E. T. H.(1999). Identification of the Activating and Conjugating Enzymes of the NEDD8 Conjugation Pathway. *The Journal of Biological Chemistry.* 274(17): 12036–12042.

Groettrup, M., Pelzer, C., Schmidtke, G., Hofmann, K (2008). Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends in Biochemistry. Sciences.* **33**(5):230–237.

Grzegorz Nalepa, Mark Rolfe y J. Wade Harper (2006). Drug discovery in the ubiquitin–proteasome system. *Nature Reviews, Drug Discovery.* **5**:596-613.

Gwénaél Rabut y Matthias Peter (2008). Function and regulation of protein neddylation. *EMBO reports.* **9** (10):969-976.

Halliwell B. y Gutteridge J.M. C (2006). *Free radicals in Biology and Medicine*, 4th edn, Oxford University Press, Oxford.

Halliwell Barry (2001). Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications for Antioxidant Treatment. *Drugs & Aging.* **18**(9):685-716.

Halliwell Barry y Carroll Cross (1994). Oxygen-derived Species: Their Relation to Human Disease and Environmental Stress. *Environ Health Perspect* **102**(Suppl 10):5-12.

Halliwell, B.(2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of Neurochemistry*. **97**:1634-1658.

Hannah Jeffrey y Zhou Pengbo (2009). Regulation of DNA damage response pathways by the cullin-RING ubiquitin ligases. *DNA Repair* **8**:536–543.

Hemlata Mistry^{a,b}, Beth A. Wilson^a, Ian J.H. Roberts^{b,c}, Cahir J. O'Kane^b, James B. Skeath (2004): Cullin-3 regulates pattern formation, external sensory organ development and cell survival during *Drosophila* development. *Mechanisms of Development*. **121**: 1495–1507.

Heng, M. Y. et al. (2009). In Vivo Evidence for NMDA Receptor-Mediated Excitotoxicity in a Murine Genetic Model of Huntington Disease. *The Journal of Neuroscience*. **29**(10):3200 –3205.

Hori, T. et al. (1999). Covalent modification of all members of human cullin family proteins by Nedd8. *Oncogene*. **18**:6829-6834.

Itoh Ken, Wakabayashi Nobunao, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel D, Yamamoto M (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & Development*. **13**:76-86.

Jain, A.K., Jaiswal, A.K., 2006. Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J. Biol. Chem*. **281**: 12132–12142.

Jaiswal, A. K. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radical Biology & Medicine*. **36**(10):1199–1207.

Jana Ranjan Nihar (2012). Protein homeostasis and aging: Role of ubiquitin protein ligases. *Neurochemistry International*. **60**:443-447.

Jawed Alam. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar Transcription Factor, Regulates Induction of the Heme Oxygenase-1 Gene. *The Journal Of Biological Chemistry*. **274**(37):26071–26078.

Jeffrey D. Singer, Mark Gurian-West, Bruce Clurman, et al(1999). Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev*. **13**: 2375-2387.

Johnson Jeffrey A., Johnson Delinda A., Kraft Andrew D., Calkins Marcus J. , Jakel Rebekah J., Vargas Marcelo R. y Pei-Chun Chen (2008). The Nrf2-ARE Pathway: An Indicator and Modulator of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.***1147**: 61–69.

Jones, J. et al. (2008). A Targeted Proteomic Analysis of the Ubiquitin-Like Modifier Nedd8 and Associated Proteins. *Journal of Proteome Research.* **7**(3): 1274–1287.

Jung Tobias, Catalgol Betül, Grune Tilman (2009). The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine* **30**:191–296.

Jung Tobias, Catalgol Betul, Grune Tilman (2009).The proteasomal system. *Molecular Aspects of medicine.* **30**:191-296.

Kamitani, T. et al. (1997). Characterization of Nedd8, a developmentally Down-regulated Ubiquitin-like protein. *The Journal os Biological Chemistry.* **272**(45): 28557-28562.

Kashiwagi A, Asahina T, Nishio Y, Ikebuchi M, Tanaka Y, Kikkawa R, Shigeta Y. (1996). Glycation, oxidative stress, and scavenger activity: glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. *Diabetes.* **45**: 84-6.

Kaspar J. W. y Jaiswal A. K.(2010) An Autoregulatory Loop between Nrf2 and Cul3-Rbx1Controls Their Cellular Abundance. *The Journal of Biological Chemistry.* 285(28):21349-21358.

Kaspar, W. J. Niture, K.S. Jaiswal, K.A. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine.* **47**:1304-1309.

Kirkin V, Mc Ewan DG, Novak I, Dikic I (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Molecular Cell.* **34**(3):259-269.

Kobayashi, A. et al. (2004);Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-Based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cel Biol;* **24** (16): 7130-7139 .

Kobayashi, A.(2006) Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1.*Mol. Cell. Biol.* **26**(1):221-229.

Kohen, R. y Nyska, A. (2002).Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and

Methods for Their Quantitation. Toxicology Pathology. **30**(6): 620–650.

Königsberg Fainstein Mina (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. REB **26**(1):18-25.

Konigsberg Fainstein, Mina. *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. El manual moderno, México, 2008.

Kourtis, N. y Tavernarakis, N. (2011). Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. The EMBO Journal. **30** (13): 2520–2531.

Kraft, A. D. et al. (2004). 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. The Journal of Neuroscience, **24**(5):1101–1112.

Le W y Appel SH (2004). Mutant genes responsable for Parkinson's disease. Current opinion in pharmacology. **4**(1):79-84.

Lehman, N.L. (2009). The ubiquitin proteasome system in neuropathology. Acta Neuropathol; **118**: 329-347

Leidecker O, Matic I, Mahata B, Pion E, Xirodimas DP. (2012). The ubiquitin E1 enzyme Ube1 mediates NEDD8 activation under diverse stress conditions. Cell Cycle. **11**(6):1142-50.

Li Lu. et al. (2005). Identification and characterization of cul-3b, a novel hominine CUL-3 transcript variant. Asian J Androl. **7** (2): 205–211.

Lin, M. T. y Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature. **443**: 787–795.

Lo, Shih-Ching y Hannink, M. (2006). CAND1-mediated substrate adaptor recycling is required for efficient repression of Nrf2 by Keap1. Mol Cel Biol. **26** (4):1235-1244.

Loignon, M. et al. (2009). Cul3 overexpression depletes Nrf2 in breast cancer and is associated with sensitivity to carcinogens, to oxidative stress and to chemotherapy. Molecular Cancer Therapeutics. **8**(8):2432-2440.

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

Marín Ignacio (2009). Diversification of the cullin family. *BMC Evolutionary biology.* **9**:267-278.

Meldrum Brian (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition* 1007S-105S.

Merlet, J.et al. (2009). Regulation of cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylation and dimerization. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **66**:1924 – 1938.

Migliorea, L. y Coppedèb, F. (2009). Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research.* 674:73–84.

Mistry Hemlata , Beth A. Wilsona, Ian J.H. Roberts Cahir J. O'Kaneb, James B. Skeatha (2004).Cullin-3 regulates pattern formation, external sensory organ development and cell survival during *Drosophila* development. *Mechanisms of Development* **121**:1495–1507.

Mori, F. et al. (2005). Accumulation of Nedd8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* **31**: 53-61.

Motohashi, H. y Yamamoto, M. (2004). Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Review TRENDS in Molecular Medicine.* 10(11):549-557.

Nguyen, T. Nioi,P. y Pickett, B.C. (2009).The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry.* **284**(20):13291–13295.

Niture, S.K. et al. (2010).Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **244**:37–42.

Ohh, M. et al. (2002). An intact Nedd8 pathway is required for Cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO reports.* **31**(21):177-182.

- Pan, Zhen-Qiang. et al. (2004). Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene*. **23**: 1985–1997
- Parry, G. y Estelle, M. (2004). Regulation of cullin-based ubiquitin ligases by the Nedd8/RUB ubiquitin-like proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. **15**:221–229.
- Paxinos, G.; Watson, C (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego Press.
- Peinado, M.A. et al.(2000). Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Rev Neurol*. **31** (11): 1054-1065.
- Peters Jan M, Franke W y Kleinschmidt J (1994). Distinct 19S and 20S subcomplexes of 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *The Journal of biological chemistry*. **269**(10):7709-7718.
- Petroski, M. y Deshaies, R. (2005); Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature reviews*. **6**: 9-20.
- Pickart CM (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry*. **70**:503-533.
- Pintard, L. Willems, A. y Peter, M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3–BTB complexes join the family. *The EMBO Journal*. **23**(8): 1681–1687.
- Rajesh K. Thimmulappa, Kim H. Mai, Sorachai Srisuma (2002). Identification of Nrf2-regulated Genes Induced by the Chemopreventive Agent Sulforaphane by Oligonucleotide Microarray. *Cancer Res*. **62**:5196-5203.
- Ridnour, L. A., Thomas, D. D., Mancardi, D., Espey, M. G., Miranda, K. M., Paolocci, N. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol. Chem*.
- Rios Camilo y Santamaria Abel (1991). Quinolinic Acid is a Potent Lipid Peroxidant in Rat Brain Homogenates. *Neurochemical Research*, **16**(10):1139-1143.
- Rushmore, H.T. Morton, R.M y Pickett, B.C.(1991). The Antioxidant Responsive Element. *The Journal of Biological Chemistry*. **266**(18): 11632-11639.

Santamaria Abel , Flores-Escartin Abigail, Martinez Juan Carlos, Osorio Laura, Galvan-Arzate Sonia, Pedraza Chaverri Jose, Maldonado Perla D, Medina-Campos Omar N., Jimenez-Capdeville Maria E, Manjarrez Joaquin, Y Rios Camilo (2003). Copper Blocks Quinolinic Acid Neurotoxicity In Rats: Contribution Of Antioxidant Systems. *Free Radical Biology & Medicine*. **35**(4):418–427.

Saxena Smita y Caroni Pico (2011). Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative Diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron Review Cell Press*. **71**:35-48.

Schaefer Henry y Rongo Christopher (2006).KEL-8 is a Substrate Receptor for CUL3-dependent Ubiquitin Ligase That Regulates Synaptic Glutamate Receptor Turnover. *Molecular Biology of the Cell* **17**: 1250–1260

Segref, A. y Hoppe, T. (2009); Think locally: control of ubiquitin-dependent protein degradation in neurons. *EMBO report*; **10** (1): 44-50.

Sekhar Konjeti R. , Girish Rachakonda, Michael L. Freeman (2010). Cysteine-based regulation of the CUL3 adaptor protein Keap1. *Toxicology and Applied Pharmacology* **244**:21–26.

Singer, J.D., Gurian-West, M., Clurman, B., Roberts, J.M., (1999). Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev*. **13**:2375–2387.

Soucy, Teresa, Lawrence R. Dick, Peter G. Smith, Michael A. Milhollen, y James E. Brownell (2010). The NEDD8 Conjugation Pathway and Its Relevance in Cancer Biology and Therapy. *Genes and Cancer*. **1**(7): 708-716.

Spoel Steven H., Yasuomi Tada y Gary J. Loake (2010). Post-translational protein modification as a tool for transcription reprogramming. *New Phytologist*. **186**: 333–339.

Stark, D. T y Bazan, N. G. (2011). Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Differentially Modulate Neuronal Cyclooxygenase-2 Function, Lipid Peroxidation, and Neuroprotection. *The Journal of Neuroscience*. **31**(39):13710 –13721.

Stewart, D. et al.(2003).Degradation of Transcription Factor Nrf2 via the Ubiquitin-Proteasome Pathway and Stabilization by Cadmium. *The Journal Of Biological Chemistry*. **278**(4):2396-2402.

Stone Trevor W. (2000). The development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for CNS neuroprotection. Trends in Pharmacol. Sciences. **21**:149-154.

Stone Trevor W. (2001). Endogenous neurotoxins from tryptophan. Toxicol. **39**:61-73.

Sumara, I. y Peter, M.(2007). A Cul3-Based E3 Ligase Regulates Mitosis and is Required to Maintain the Spindle Assembly Checkpoint in Human Cells. Cell Cycle. **6**(24): 3004-3010.

Talalay, P. (2000). Chemoprotection against cancer by induction of Phase 2 enzymes. BioFactors. **12**:5-11.

Talalay, P. et al. (2003). Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. Adv Enzyme Regul. **43**: 121-134.

Tanji, K. et al. (2007); The role of NEDD8 ultimate buster 1, NUB1, in neurodegenerative α -synucleinopathies. Hirosaki Med.J; 59 (suppl.): S143-S146.

Tasset, I. et al. (2010). Protective Effect of Tert-Butylhydroquinone on the Quinolinic-Acid-Induced Toxicity in Rat Striatal Slices: Role of the Nrf2-Antioxidant Response Element Pathway. Neurosignals. 18:24-31.

Thompson, S. et al. (2008). Ubiquitin-Proteasome System as a Modulator of Cell Fate. Curr Opin Pharmacol. **8**(1): 90-95.

Túnez, I. y Santamaría, A. (2009). Modelo de la enfermedad de Huntington inducido con ácido 3-nitropropionico. Rev Neurol. **48**(8):430-434.

Uta Kossatz, Kai Breuhahn, Benita Wolf, Matthias Hardtke-Wolenski, Ludwig Wilkens, Doris Steinemann, Stephan Singer, Felicitas Brass, Stefan Kubicka, Brigitte Schlegelberger, Peter Schirmacher, Michael P. Manns, Jeffrey D. Singer, y Nisar P. Malek (2010). The cyclin E regulator cullin 3 prevents mouse hepatic progenitor cells from becoming tumor-initiating cells. The Journal of Clinical Investigation. **120**(11):3820-3833.

Valko, M. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. **39**: 44-84.

Vargas, M.R. et al. (2008). Nrf2 Activation in Astrocytes Protects against Neurodegeneration in Mouse Models of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, **28**(50):13574 – 13581.

Wakabayashi, N. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *PNAS*. **101**(7): 2040-2045.

Wang W, Ding J, Allen E (2006). Gigaxonin interacts with tubulin folding cofactor B and controls its degradation through the ubiquitin-proteasome pathway. *Current Biology*. **15** (22): 2050-20505.

Wang, X.J. et al. (2008); Activation of Nrf2 by arsenite and monomethylarsonous acid is independent of Keap1-C151: enhanced Keap1-Cul3 interaction. *Toxicol Appl Pharmacol*; **230**(3):383–389.

Wei, N. y Deng, X.W.(2003). The COP9 signalosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**:261–86.

Wilhelm Krek. (2003). BTB proteins as henchmen of Cul3-based ubiquitin ligases. *Nature Cell Biology*. **5**(11):950-951.

Wimuttisuk, W y Singer J. D. (2007).The Cullin3 Ubiquitin Ligase Functions as a Nedd8-bound Heterodimer. *Molecular Biology of the Cell*. **18**: 899–909.

Wu, J.T. et al. (2005). Neddylation and deneddylation regulate Cul1 and Cul3 protein accumulation. *Nature Cell Biology*. **7**(10):1014-1020.

Xirodimas, D.P. et al. (2008). Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway. *EMBO reports*. **9** (3):280-286.

Xu, L., Y. Wei, J. Reboul, P. Vaglio, T. H. Shin, M. Vidal, S. J. Elledge, y J. W. Harper. 2003. BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL3. *Nature* **425**:316–321.

Yun Li, Joseph D. Paonessa, Yuesheng Zhang (2012). Mechanism of Chemical Activation of Nrf2. *PLoS ONE* **7**(4): e35122.

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

Zimmerman Erik S, Schulman Brenda A y Zheng Ning (2010). Structural assembly of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Current Opinion in Structural Biology* **20**:714–721.

Zipper, L. M. y Mulcahy, R. T. (2002).The Keap1 BTB/POZ Dimerization Function Is Required to Sequester Nrf2 in Cytoplasm. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**(39): 36544–36552.